



**GLICOPROTEÍNAS
TERAPÉUTICAS**

DISEÑO, EXPRESIÓN
EN CÉLULAS DE
MAMÍFERO Y ANÁLISIS
DE SUS GLICANOS

BIOT

**GLICO-
PROTEÍNAS
TERAPÉU-
TICAS**

Guillermina Forno
Marcos Oggero
(EDITORES)



Glicoproteínas terapéuticas

**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL**

Rector

Enrique Mammarella

Secretario de Planeamiento
Institucional y Académico

Miguel Irigoyen

Decana Facultad de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Adriana Ortolani



Consejo Asesor

Colección Cátedra

Miguel Irigoyen

Bárbara Mántaras

Gustavo Martínez

Isabel Molinas

Héctor Odetti

Ivana Tosti

Dirección editorial

Ivana Tosti

Coordinación editorial

María Alejandra Sedrán

Coordinación diseño

Alina Hill

Coordinación comercial

José Díaz

Corrección

Laura Prati

Diagramación interior y tapa

Nicolás Vasallo

© Ediciones UNL, 2021.

—

Sugerencias y comentarios

editorial@unl.edu.ar

www.unl.edu.ar/editorial

Glicoproteínas terapéuticas : diseño, expresión en células de mamífero y análisis de sus glicanos / Guillermina Forno ... [et al.] ; editado por Guillermina Forno; Marcos Oggero. – 1a ed – Santa Fe : Ediciones UNL, 2021.

Libro digital, PDF – (Cátedra)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-749-322-1

1. Ciencias Naturales. 2. Biología.
3. Biotecnología. I. Forno, Guillermina, ed. II.
Oggero, Marcos, ed.

CDD 570.28

© Amadeo, Arévalo, Attallah, Bertoncini,
Bollati-Fogolín, Bürgi, Ceaglio, Couto, Crispo,
Cutine, Etcheverrigaray, Fontana, Forno,
Gugliotta, Kratje, Mariño, Masin, Mauro,
Mohana-Borges, Montesino, Mufarrege, Oggero,
Perelmuter, Prieto, Rodríguez, 2021.



Glicoproteínas terapéuticas

**Diseño, expresión
en células de mamífero
y análisis de sus glicanos**

Guillermina Forno

Marcos Oggero

EDITORES

ediciones UNL

CÁTEDRA

Índice

AGRADECIMIENTOS / 8

PREFACIO / 9

1. GLICOBIOLOGÍA / 11

1.1. Introducción / 11

1.2. Monosacáridos que componen los glicanos / 13

1.3. Glicoconjugados: proteoglicanos, glicolípidos y glicoproteínas / 14

1.4. Estudio de la composición y estructura de las cadenas de hidratos de carbono / 18

1.5. Glicoconjugados de interés biofarmacéutico / 21

1.6. Humanización de la glicosilación / 22

2. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS. BIOSÍNTESIS / 27

2.1. Introducción / 27

2.2. Diversidad de glicoproteínas / 27

2.3. Organización celular de la glicosilación / 28

2.4. N-glicosilación / 30

2.5. O-glicosilación / 37

2.6. Otros tipos de glicosilación / 40

2.7. Conclusiones / 43

3. ROL BIOLÓGICO DE LOS GLICANOS / 48

3.1. Introducción / 48

3.2. Consideraciones generales y clasificación del rol biológico de los glicanos / 49

3.3. Funciones biológicas de los glicanos: una pequeña compilación de ejemplos para ilustrar la amplitud de roles de los oligosacáridos en diversos procesos biológicos / 51

3.4. Rol biológico de los glicanos en glicoproteínas terapéuticas / 61

4. LOS CARBOHIDRATOS COMO MEDIADORES CLAVES EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS / 77

4.1. Introducción / 77

4.2. Antígenos carbohidratos asociados a tumores (tacas): glicosilación aberrante como sello distintivo del proceso neoplásico / 78

4.3. El sistema intestinal como muestra de la importancia del eje glicanos-lectinas en la tolerancia inmunológica / 82

4.4. Resumen / 93

- 5. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS MEDIANTE HIPERGLICOSILACIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS / 97**
 - 5.1. Introducción / 97
 - 5.2. Modificación de glicanos / 98
 - 5.3. Glicoingeniería mediante la adición de glicanos. hiperglicosilación de proteínas / 101
 - 5.4. Bioterapéuticos obtenidos mediante glicoingeniería por hiperglicosilación / 110
 - 5.5. Conclusión / 112

- 6. EXPRESIÓN DE GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES EN DIFERENTES SISTEMAS / 121**
 - 6.1. Introducción / 121
 - 6.2. Glicoproteínas recombinantes como productos biológicos / 122
 - 6.3. plataformas de producción de glicoproteínas terapéuticas / 124

- 7. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS: UPSTREAM PROCESSING / 151**
 - 7.1. Introducción / 151
 - 7.2. Consideraciones generales de los cultivos celulares en biorreactores / 152
 - 7.3. Escalamiento de los cultivos en biorreactores / 165
 - 7.4. Conclusiones / 177

- 8. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS: DOWNSTREAM PROCESSING / 185**
 - 8.1. Introducción / 185
 - 8.2. Abordajes para el desarrollo del dsp / 186
 - 8.3. Estrategias de purificación para gp sin etiqueta / 189
 - 8.4. Idoneidad del sistema (*system suitability*) / 195
 - 8.5. Depuración (*clearance*) de partículas virales / 196
 - 8.6. Técnicas separativas / 199

- 9. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN DE INTERCAMBIO ANIÓNICO (HPAEC-PAD) / 207**
 - 9.1. Introducción / 207
 - 9.2. Fundamentos de la separación / 210
 - 9.3. Columnas / 211
 - 9.4. Eluyentes / 213
 - 9.5. Bombas / 214
 - 9.6. Preparación de la muestra / 214
 - 9.7. Detector / 215
 - 9.8. Supresor (neutralizador) / 219

9.9. Algunos ejemplos de análisis / 222

9.10. Conclusiones / 224

10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS / 228

10.1. introducción / 228

10.2. Estructura de proteínas y el proceso de plegamiento / 229

10.3. métodos biofísicos en el estudio de glicoproteínas / 231

10.4. metodologías espectroscópicas para el estudio de proteínas / 232

10.5. perspectivas a futuro de las metodologías analíticas / 247

10.6. Conclusiones / 249

11. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS / 254

11.1. Introducción / 254

11.2. Configuración general de los espectrómetros de masas / 255

11.3. Principales formas de ionización de macromoléculas / 256

11.4. principales analizadores de masas / 260

11.5. identificación de secuencia y caracterización estructural de biomoléculas por espectrometría de masas / 270

12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE GLICOPROTEÍNAS: MODELOS CELULARES Y ANIMALES / 281

12.1. Introducción / 281

12.2. Generalidades de los bioensayos / 281

12.3. Validación de bioensayos / 282

12.4. Tipos de modelos empleados en los bioensayos / 283

12.5. Anexo / 291

13. INMUNOGENICIDAD DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS / 300

13.1. Introducción / 300

13.2. Procesamiento y presentación antigénica de las glicoproteínas terapéuticas / 302

13.3. Herramientas para la evaluación de la inmunogenicidad de glicoproteínas de uso terapéutico / 306

13.4. Inmunogenicidad mediada por azúcares exógenos / 310

13.5. Estrategias para reducir la inmunogenicidad de glicoproteínas terapéuticas / 312

13.6. Conclusión / 314

14. CALIDAD DE PRODUCTOS BIOTERAPÉUTICOS / 319

14.1. Introducción / 319

14.2. Guías internacionales de calidad de medicamentos / 320

14.3. Especificaciones / 325

14.4. Estándares y sustancias de referencia / 330

15. COMPARABILIDAD Y SIMILITUD DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	/ 335
15.1. Genéricos y biosimilares	/ 335
15.2. Pasos para el desarrollo de un bioterapéutico	/ 339
15.3. Mecanismo de aprobación de un biosimilar. Demostración de biosimilitud	/ 341
15.4. ¿cuán parecido debe ser un biosimilar al producto de referencia?	/ 346
15.5. para finalizar	/ 347
16. GLICOPROTEÍNAS EN EL MERCADO BIOFARMACÉUTICO	/ 349
16.1. Introducción	/ 349
16.2. Drogas convencionales <i>versus</i> bioterapéuticos	/ 349
16.3. medicamentos biológicos y biotecnológicos	/ 350
16.4. Evolución de los biofarmacéuticos	/ 352
16.5. Producción de proteínas terapéuticas	/ 356
16.6. Segunda generación de bioterapéuticos: estrategias de modificación	/ 358
16.7. Nueva generación de bioterapéuticos	/ 362
16.8. Conclusiones	/ 366
17. ESTUDIO DE CASO DE PRODUCCIÓN DE UNA NUEVA GLICOPROTEÍNA TERAPÉUTICA: GLICOINGENIERÍA, EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE hIFN-α2b	/ 371
17.1. Interferón	/ 371
17.2. Glicoingeniería del hIFN- α 2b: IFN4N	/ 374
17.3. Producción de IFN4N en células CHO-K1 y HEK293	/ 375
17.4. Caracterización del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK}	/ 378
SOBRE LAS AUTORAS Y LOS AUTORES	/ 393

Quisiéramos ser ordenados y precisos en los agradecimientos y reconocer que muchos de los mismos quedarán por tributar, en cuyo caso nos disculpamos.

Inicialmente, a todos los autores de capítulos que aceptaron nuestra propuesta cumplieron con el desafío y esperaron pacientemente la materialización de la misma.

A la FBCB que nos apoyó con la postulación para la edición del libro y a la UNL que, al estimular estas actividades, nos proporcionó los medios para que el objetivo de la publicación se concrete.

Al Laboratorio de Cultivos Celulares, hoy parte del Centro Biotecnológico del Litoral, que nos vio crecer de las manos de dos gigantes: Marina y Ricardo, de quienes aprendimos, aprendemos y nunca dejaremos de aprender. ¡Gracias!

A todos nuestros compañeros de trabajo.

A nuestras familias, la de Guille (Germán, Consuelo, Rosario y Francisco), la de Marcos (Maricel, Gerónimo e Isabella). Gracias por acompañarnos, por ser pacientes y hacer feliz nuestro recorrido.

A nuestra amistad.

PREFACIO

La enseñanza de los procesos biotecnológicos constituye la fuerza motriz que impulsó la edición del presente libro. En particular, diseñar un proceso que involucra la producción de biofarmacéuticos de naturaleza glicoproteica constituye un eslabón fundamental en la preparación de un futuro biotecnólogo que aspire a alcanzar a través de su formación, un rol activo en la especialidad de los bioterapéuticos innovadores y biosimilares.

Este libro propone como eje organizador el desarrollo de glicoproteínas terapéuticas haciendo especial énfasis en aquellas producidas en células animales cuya maquinaria postraduccional les confiere particularidades que los presenta como productos adecuados para su aplicación en salud humana.

En una concisa descripción de su contenido, el libro se diagramó con 4 capítulos iniciales que involucran aspectos introductorios y básicos de la glicobiología, la biosíntesis de glicanos, la diversidad estructural de las glicoproteínas (GP), su funcionalidad e importancia en salud humana. Continúa con un capítulo orientado al diseño de proteínas terapéuticas mediante glicoingeniería que otorga un panorama de la generación de nuevas entidades biomejoradas. Luego, el proceso biotecnológico de obtención de las GP se hace presente en los siguientes capítulos relacionados con la expresión, producción y purificación a partir de huéspedes mamíferos (*upstream* y *downstream*). La evaluación de las mismas desde el punto de vista del análisis de la glicosilación (métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos), el estudio de su potencia biológica *in vitro* e *in vivo* y la evaluación de su potencialidad inmunogénica conforman un conjunto de capítulos dedicados a la caracterización de las

GP, en los cuales se encuentra información de utilidad para aplicar tanto en la rutina de los procesos de producción de tales moléculas como en los procedimientos de investigación y desarrollo. Los subsiguientes 2 capítulos describen los métodos analíticos utilizados para el control de calidad de un producto medicinal basado en GP terapéuticas y los aspectos regulatorios que se vinculan con la comparabilidad y biosimilitud de los bioterapéuticos. Finalmente, se incluye un capítulo que describe a las GP en el contexto de los restantes tipos de bioterapéuticos existentes en el mercado y un capítulo donde se ejemplifica con un caso de estudio el diseño, producción y análisis de la glicosilación de una nueva GP de interés terapéutico derivada del interferón- $\alpha 2b$.

Gran número de los temas aquí vertidos forman parte de 3 asignaturas optativas de la currícula de las Carreras de Biotecnología y Bioquímica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral: «Cultivo de células animales», «Recuperación y purificación de proteínas» y «Bioingeniería de células animales». Por tal motivo, el presente libro contribuye aportando material de estudio para comprender y profundizar los contenidos de dichas asignaturas y permite al estudiante ingresar en el camino de pensar, idear y reformular bioprocesos y bioproductos con destino farmacéutico.

En definitiva, es interés de los editores contribuir en el terreno de las incumbencias y formación de grado del profesional que surja de tales carreras otorgándoles, además, un panorama que pueda incentivarlos en la especialización en un campo tan promisorio, novedoso y de gran actividad como el de los bioterapéuticos.

Los editores

1 Glicobiología

RAQUEL MONTESINO

1.1. INTRODUCCIÓN

La glicobiología es el campo de la ciencia que comprende el estudio de la estructura, función y biología de los hidratos de carbono, también llamados glicanos, carbohidratos o cadenas de azúcares que están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

El estudio de los carbohidratos tuvo sus inicios en los comienzos del siglo xx, y fueron considerados principalmente como fuente de energía o como materiales estructurales, aparentemente carentes de otras actividades biológicas. Su estudio quedó retrasado si lo comparamos con el avance del conocimiento de otras macromoléculas durante la revolución de la biología molecular en la década de los setenta. Esto se justifica en parte a la complejidad estructural inherente de los glicanos, la dificultad para determinar sus secuencias y el hecho de que su biosíntesis no podía predecirse directamente a partir de una plantilla.

El desarrollo de nuevas tecnologías para estudiar las estructuras y funciones de los glicanos ha abierto una nueva etapa de la biología molecular llamada «glicobiología», palabra acuñada a finales de la década de 1980 que reconoce la unión de las disciplinas tradicionales química de carbohidratos y la bioquímica. La glicobiología, que estudia la biología molecular (síntesis, regulación y función biológica) de glicoproteínas y glicolípidos, es ahora uno de los campos de más rápido crecimiento en las ciencias naturales, con amplia relevancia para muchas áreas de la investigación básica, la biomedicina y la biotecnología. El campo incluye la química de los carbohidratos, las enzimas glicosidasas y glicosiltransferasas que participan en la síntesis y degradación de glicanos, el reconocimiento de glicanos por proteínas específicas, los roles de los glicanos en sistemas biológicos y su análisis o manipulación mediante diversas técnicas.

Las funciones biológicas de los carbohidratos son particularmente importantes en las interacciones que se establecen entre células y entre células y la matriz circundante. Los carbohidratos pueden encontrarse unidos covalentemente a las células y a las macromoléculas (glicoconjugados: glicoproteínas y glicolípidos) como unidades independientes (monosacáridos) o formando cadenas (glicanos) y son indispensables para el desarrollo de un organismo multicelular complejo. También pueden mediar en las interacciones entre

organismos como, por ejemplo, entre el huésped y un agente patógeno. La investigación científica continúa mostrando evidencias del papel de los hidratos de carbonos en las funciones celulares y demostrando que su variación o carencia está estrechamente relacionado con el desarrollo de enfermedades.

La mayoría de las proteínas producidas en células eucariontes se modifica postraduccionalmente durante su paso por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Figura 1.1). En estos compartimentos ocurren modificaciones de la cadena polipeptídica que permiten la conformación tridimensional requerida para una adecuada actividad biológica de la proteína. Una modificación postraduccional, esencial para la viabilidad celular, es la unión de glicanos a la cadena polipeptídica. Los oligosacáridos se unen covalentemente a las proteínas mediante enlace N-glicosídico o enlace O-glicosídico. El primero ocurre entre la N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el grupo amino del residuo asparagina en la proteína, y el segundo entre N-acetilgalactosamina (GalNAc); manosa (Man) o galactosa (Gal) y el grupo hidroxilo de serina o treonina. El contenido de glicanos que forman una macromolécula puede variar significativamente de una molécula a otra. En algunos casos los glicanos comprenden una parte importante del peso molecular del glicoconjugado. Sin embargo, no solo es importante la talla de los glicanos, la composición y estructura de los glicanos enlazados a las macromoléculas generalmente tienen un rol muy importante en las interacciones célula-célula, en la transducción de señales

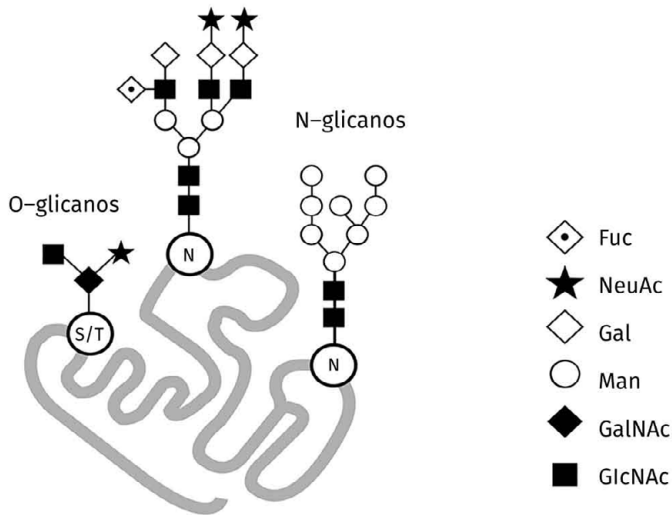


FIGURA 1.1. MODIFICACIÓN CO/POSTRADUCCIONAL DE LA CADENA AMINOACÍDICA POR LA INCORPORACIÓN DE GLICANOS AL GRUPO AMINO DEL RESIDUO ASPARAGINA (N-GLICOSILACIÓN) O AL GRUPO HIDROXILO DE LOS RESIDUOS SERINA O TREONINA (O-GLICOSILACIÓN). LA REPRESENTACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS SE REALIZÓ SEGÚN HARVEY (2011)

y en el tiempo de vida media de la molécula. Siendo un proceso eminentemente enzimático las características estructurales y de composición de los glicoconjugados se define como un proceso célula-específico y su síntesis es muy sensible a cambios tanto genéticos como epigenéticos.

1.2. MONOSACÁRIDOS QUE COMPONEN LOS GLICANOS

Los estudios previos revelan que los monosacáridos que más comúnmente forman parte de los glicanos son: D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, Fucosa, ácido siálico, D-xylosa y D-glucosa (Tabla 1.1).

TABLA 1.1. MONOSACÁRIDOS PRESENTES EN GLICOCONJUGADOS SINTETIZADOS EN CÉLULAS DE ORGANISMOS SUPERIORES

Tipo	Monosacárido	Abreviatura
Pentosas	D-xylosa	Xyl
Hexosas	D-glucosa	Glc
	D-galactosa	Gal
Hexosaminas	N-acetil-D-glucosamina	GlcNAc
	N-acetil-D-galactosamina	GalNAc
Deoxihexosa	L-fucosa	Fuc
Monosacáridos con 9 átomos de carbono	ácido N-acetilneuroamínico	Neu5Ac
	ácido N-glicolilneuroamínico	Neu5Gc

Los monosacáridos que forman las glicoproteínas no se encuentran como polímeros lineales, por el contrario, cada monosacárido puede generar teóricamente un enlace α o β con otro monosacárido. Por lo tanto, tres monosacáridos diferentes teóricamente podrían producir miles de trisacáridos únicos. Esta complejidad estructural aumenta a medida que aumenta el número de unidades de monosacáridos en el glicano. Afortunadamente, las macromoléculas biológicas, hasta hoy estudiadas, tienen relativamente pocas unidades de monosacáridos (Tabla 1.1), y su unión ocurre a través de un número limitado de enlaces, lo que ha posibilitado en cierta medida el estudio estructural de los glicoconjugados.

1.3. GLICOCONJUGADOS: PROTEOGLICANOS, GLICOLÍPIDOS Y GLICOPROTEÍNAS

1.3.1. Proteoglicanos

Los proteoglicanos son glicoconjugados que se forman por un núcleo proteico unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAG). Específicamente la unión ocurre entre el grupo hidroxilo de un residuo de serina y la xylosa del extremo reductor del polisacárido. Los glicosaminoglicanos son largos polímeros lineales de carbohidratos cargados negativamente, debido a la presencia de grupos sulfato y de grupos de ácido urónico. Los proteoglicanos son componente fundamental de la matriz extracelular de las células animales y actúan como moduladores de señales en los procesos de comunicación de las células con su entorno. Muchas enfermedades hereditarias, como el síndrome de Simpson–Golabi–Behmel y el síndrome de Ehlers–Danlos están asociadas a errores en la biosíntesis de proteoglicanos o de GAG.

1.3.2. Glicolípidos

La familia de los glicoconjugados también incluye los glicolípidos. Los glicolípidos forman parte de las membranas celulares, y están compuestos por glicanos que se unen al grupo hidroxilo terminal primario del componente lipídico de la ceramida. En las células animales, los glicolípidos provienen de la esfingosina que posee el grupo amino esterificado con un ácido graso pero el sustituyente del alcohol primario de la esfingosina contiene una o varias unidades de azúcares. El glicolípidos más simple es el cerebrósido, en el que el azúcar enlazado es una galactosa o una glucosa (Figura 1.2). Hay glicolípidos muy complejos como los gangliósidos que tienen una cadena ramificada de hasta siete monosacáridos. Los glicolípidos pueden ser neutros o aniónicos. Por ejemplo, el gangliósido es un glicolípidos aniónico que contiene uno o más residuos de ácido siálico.

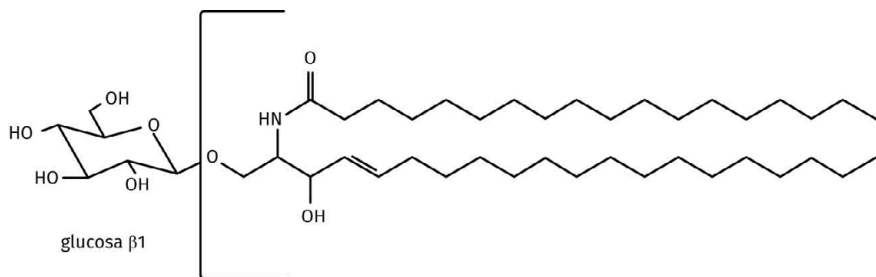


FIGURA 1.2. CEREBRÓSIDO, GLICOLÍPIDO MÁS PEQUEÑO FORMADO POR CERAMIDA Y UNA GLUCOSA ENLAZADA AL GRUPO HIDROXILO TERMINAL DE LA ESFINGOSINA

1.3.3. Glicoproteínas

Las glicoproteínas son glicoconjugados resultantes del enlace covalente de una o varias cadenas de glicanos a un polipéptido. Este enlace puede ser de tipo N- (N-enlazado) o de tipo-O (O-enlazado). El glicano N-enlazado se refiere a una cadena de carbohidrato unida covalentemente a un residuo de asparagina, que forma parte del tripéptido Asn-X-Ser/Thr, en una cadena polipeptídica, llamado sitio potencial de N-glicosilación.

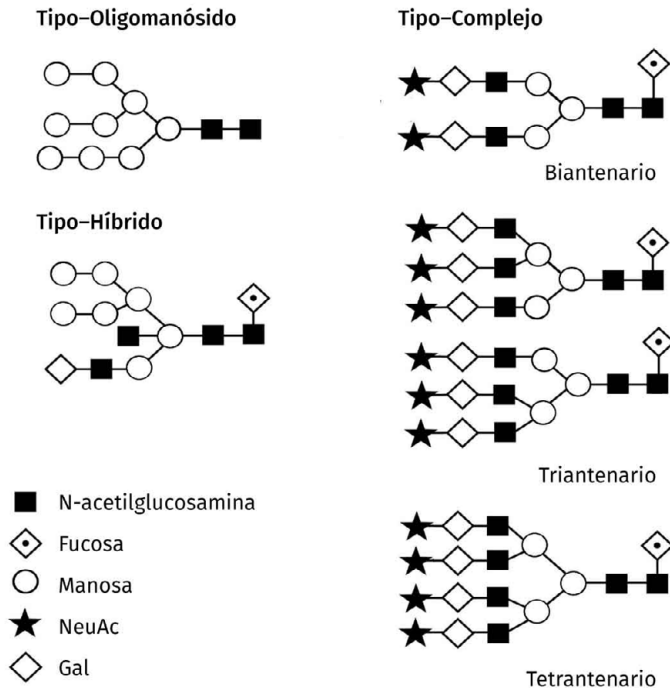


FIGURA 1.3. POSIBLES ESTRUCTURAS DE GLICANOS N-ENLAZADOS A LA CADENA POLIPEPTÍDICA LA INCORPORACIÓN DE GLICANOS COMIENZA EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y CONTINÚA HASTA GOLGI. ESTAS ESTRUCTURAS SON PREVALENTES EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS, OTROS MONOSACÁRIDOS PUEDEN ESTAR PRESENTES EN GLICO-PROTEÍNAS DE PLANTAS E INSECTOS

Los N-glicanos, además comparten una región común (núcleo) compuesta de cinco monosacáridos, dos N-acetilglucosaminas y tres manosas. Según la composición del resto de la cadena, los N-glicanos se clasifican en: tipo oligomanosídico, tipo complejo o híbrido. Otro aspecto que distingue esta modificación co-postraduccional es que la síntesis de la cadena polipeptídica y de la cadena de carbohidratos (oligosacárido precursor) ocurren de forma simultánea, pero

independiente. Una vez sintetizado el oligosacárido de 14 monosacáridos (Glc₃Man₉GlcNAc₂) es transferido al sitio potencial de N-glicosilación mediante la enzima oligosacariltransferasa. El oligosacárido luego de enlazado a la Asn es modificado por enzimas exoglicosidasas y glicosiltransferasas, ubicadas en los compartimentos intracelulares retículo endoplásmico y aparato de golgi, hasta alcanzar la composición final que tendrá en la proteína biológicamente activa (Figura 1.3). Según la composición de la cadena de glicanos esta se denotará como del tipo oligomanosídica o compleja. En el primer caso solo se extenderá la cadena con manosas, sin embargo, en el tipo complejo pueden conformar la cadena de glicanos hexosaminas, hexosas y deoxihexosas.

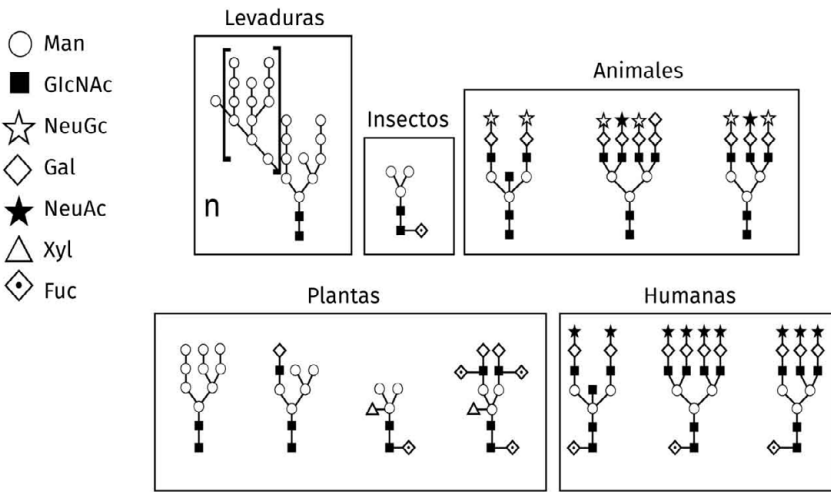


FIGURA 1.4. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL Y DE COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS DEPENDIENTES DE LAS CÉLULAS DONDE SE EXPRESAN LAS GLICOPROTEÍNAS

Además, pueden ocurrir diferentes ramificaciones de la cadena enlazada en un mismo sitio de glicosilación. Las ramificaciones se denotan en la literatura como glicanos di- tri- y tetra-antenados. La prevalencia de un tipo u otro de ramificación depende en gran medida de las células donde se expresen las glicoproteínas, pero también influye la posición del sitio de glicosilación (sequon) en la secuencia aminoacídica. Como estos eventos ocurren cuando la proteína ya se ha sintetizado completamente y ha adquirido una conformación espacial, pueden ocurrir impedimentos estéricos que limiten la extensión de la cadena y por tanto la adición de monosacáridos. Otro evento que se describe para algunas células es la presencia de exoglicosidasas que provocan un acortamiento de la cadena luego de su síntesis. Este es el caso de las estructuras paucimanosídicas reportadas en células de plantas (Triguero *et al.*, 2005). Además, las glicoproteínas de plantas aisladas desde fuentes naturales

u obtenidas de forma artificial en cultivos celulares presentan Xyl β 1,2 y Fuc α 1,3 enlazados a los glicanos de tipo complejos (Strasser, 2014) (Figura 1.4). Estos monosacáridos no están presentes en células de mamíferos por lo que limita el uso de los cultivos celulares de plantas para la expresión recombinante de proteínas para uso en humanos. Las células de plantas no son las únicas que presentan un patrón de glicosilación diferente a las glicoproteínas expresadas en células humanas. En este caso se ha documentado que las células de insectos también incorporan a sus cadenas de hidratos de carbonos Fuc α 1,3, resultando potencialmente inmunogénicas en humanos. Luego, la utilización de células de insectos para la producción de proteínas con fines terapéuticos en humanos se ha condicionado a la «humanización» del patrón de glicosilación de estas células, efecto que se logra mediante la expresión de glicosiltransferasas que definen un patrón de glicosilación semejante al que se obtiene en células humanas (Harrison & Jarvis, 2006; Tomiya, Betenbaugh, & Lee, 2003).

Otra forma de modificación postraducciona que ocurre de forma muy frecuente en proteínas expresadas en células eucariontes es la O-glicosilación (D'Onofrio *et al.*, 1988; Hart, Haltiwanger, Holt, & Kelly, 1989; Starr & Hanover, 1990). Esta modificación postraducciona, ocurre en el aparato del Golgi, por la adición secuencial de monosacáridos al polipéptido a través de un enlace covalente con el grupo hidroxilo de residuos de serinas o treoninas.

En mamíferos la síntesis de las cadenas comienza con el enlace de un residuo de GalNAc y es extendido por la adición de otros monosacáridos. El glicano O-enlazado resultante puede contener N-acetilgalactosamina (GalNAc), Gal, GlcNAc, Fuc y ácido siálico (Neu5Ac). A diferencia de la N-glicosilación, los O-glicanos no tienen un núcleo o motivo conservado (Figura 1.5). Se ha documentado además la síntesis de otros tipos de O-glicanos: O-fucosa y O-manosa que son añadidos en el retículo endoplásmico a residuos de cisteínas.

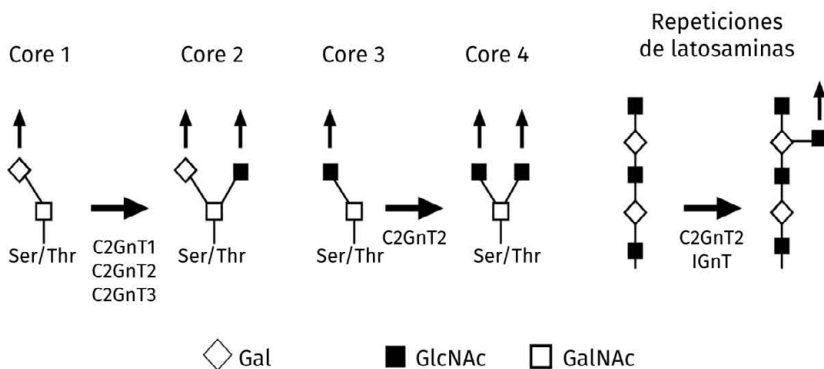


FIGURA 1.5. POSIBLES ESTRUCTURAS DE GLICANOS O-ENLAZADOS A GLICOPROTEÍNAS SINTETIZADAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS. LA EXTENSIÓN DE LAS CADENAS PUEDE INCLUIR LA ADICIÓN DE Fuc y NeuAc. C2GnT: CORE 2 GLICOSILTRANSFERASA; IGnT: LACTOSAMINA-GLICOSILTRANSFERASA

Actualmente existen estudios que describen que la O-glicosilación media las funciones moduladoras de muchas proteínas. Específicamente se conoce que la migración de las células del sistema inmune durante los procesos inflamatorios ocurre a través de la interacción de motivos glicosídicos, de proteínas de membrana de los linfocitos y proteínas tipo lectinas que se encuentran en las membranas del endotelio vascular (Schnaar, 2016). Además los O-glicanos presentes en las mucinas, glicoproteínas secretadas por las células caliciformes e importante componente del mucus del tracto intestinal, juegan un rol muy importante en mantener la homeostasis entre la microbiota residente y las células del sistema inmune en el intestino (Bergstrom & Xia, 2013). Específicamente la O-fucosilación juega un papel muy importante en la modulación de la interacción proteína-proteína y la consecuente transducción de señales al interior de las células (Luther & Haltiwanger, 2009).

1.4. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS CADENAS DE HIDRATOS DE CARBONO

Las estructuras glicosídicas que componen los glicoconjugados son muy heterogéneas y su composición y estructura pueden variar en la misma molécula, pues su síntesis no sigue un molde. Sin embargo, se conoce que existe cierta regularidad dependiendo de la célula donde ocurre la síntesis de las cadenas de glicanos (Raju, Briggs, Borge & Jones, 2000). La regularidad está determinada por los monosacáridos presentes y los tipos de enlaces entre estos. Por ejemplo, el disacárido Gal β 1-4GlcNAc β 1-(N-acetil-lactosamina o LacNAc) se observa con mayor frecuencia en las glicoproteínas sintetizadas en células animales, que el disacárido GalNAc β 1-4GlcNAc β 1- (LacdiNAc). De la misma forma se ha documentado que las LacNAc terminales pueden modificarse por fucosilación y pueden presentar ácidos siálicos enlazados. Así mismo se conoce que la presencia de Xyl β 1,2 y Fuc α 1,3 es frecuente en proteínas expresadas en células de plantas, no así en células de mamíferos. Lo anterior ha impulsado el desarrollo e implementación de métodos analíticos ortogonales que permitan el análisis de la composición, secuencia y estructura de los glicanos.

El desarrollo de las metodologías analíticas para el estudio de las cadenas de azúcares se ha caracterizado por un aumento en la sensibilidad y precisión en los análisis, sin embargo, se ha demostrado que en muchos casos es necesaria la combinación de técnicas ortogonales para la caracterización estructural de estas biomoléculas (Figura 1.6). Las estrategias son disímiles y dependen del nivel de caracterización que se desee obtener. Algunos laboratorios utilizan el glicoconjugado intacto para el análisis del

glicano y en otros laboratorios se realiza el estudio posterior a la separación de las cadenas de glicanos mediante métodos enzimáticos o químicos. Sin embargo, cualquiera sea la estrategia a seguir es crucial realizar el estudio a partir del glicoconjugado puro.

La metodología está determinada en muchos casos por la experiencia previa del laboratorio y la complejidad de los glicanos que se quieran estudiar. Por ejemplo, si la glicoproteína es producida artificialmente o aislada desde fuentes naturales por células de levaduras, se esperaría encontrar glicanos de tipo oligomanosídicos. El estudio de estos glicanos pudiera resultar más simple, por la presencia solamente de manosas enlazadas, sin embargo, se necesitan técnicas analíticas que permitan definir la presencia de sulfatos o fosfatos modificando las cadenas de azúcares (Bones *et al.*, 2011; Hirose, Kameyama & Ohi, 2002). En general los procedimientos incluyen:

- Incubación con lectinas conjugadas, específicas a monosacáridos y enlaces que se establecen entre estos (western blot, a partir de la glicoproteína).
- Liberación enzimática y/o química de N-glicanos.
- Derivatización con fluoróforos: 1) perfil de glicosilación, 2) cuantificación de monosacáridos.
- Separación en cromatografía líquida: de fase normal Amida-80, de intercambio iónico y de fase reversa para análisis de monosacáridos.
- Reacción con exoglicosidasas específicas. Reacciones que permiten el análisis estructural de los glicanos.
- Análisis por Espectrometría de Masas (ESI-MS, MALDI-MS, Ion mobility).

Las herramientas para el análisis de las cadenas de carbohidratos que forman parte de los glicoconjugados cada día se perfeccionan con el objetivo de incrementar la sensibilidad, la resolución y la reproducibilidad en los análisis. Actualmente se comercializan enzimas obtenidas de forma recombinante para la liberación de los glicanos (glicosiladas o amidasas, <https://www.neb.com/products/>) que permiten mayor eficiencia de corte en menor tiempo (Su, Wang, Wang, & Qi, 2005). Se diseñan matrices cromatográficas que logran mayor resolución en menor tiempo de corrida (<https://www.ludger.com/docs/products>) y a la vez se comercializan sistemas de HPLC y UPLC que permiten trabajar a mayores flujos acortando los tiempos de corrida, y mostrando igual o mayor resolución de las especies presentes en la mezcla. La espectrometría de masas también ha sido una herramienta muy importante en el estudio de los glicanos. Existen estudios que demuestran la importancia de seleccionar adecuadamente el tipo de ionización dependiendo de la carga y pureza de los glicanos, para lograr la mayor información estructural (Harvey, 2005a, 2005b, 2005c; Harvey *et al.*, 2013).

La Figura 1.6 muestra una estrategia general que podría ser utilizada tanto para el estudio de oligosacáridos de tipo oligomanosídicos, complejos o híbridos. Sin embargo, su adecuación dependerá de las características de

Estrategia para el estudio de N-glicanos

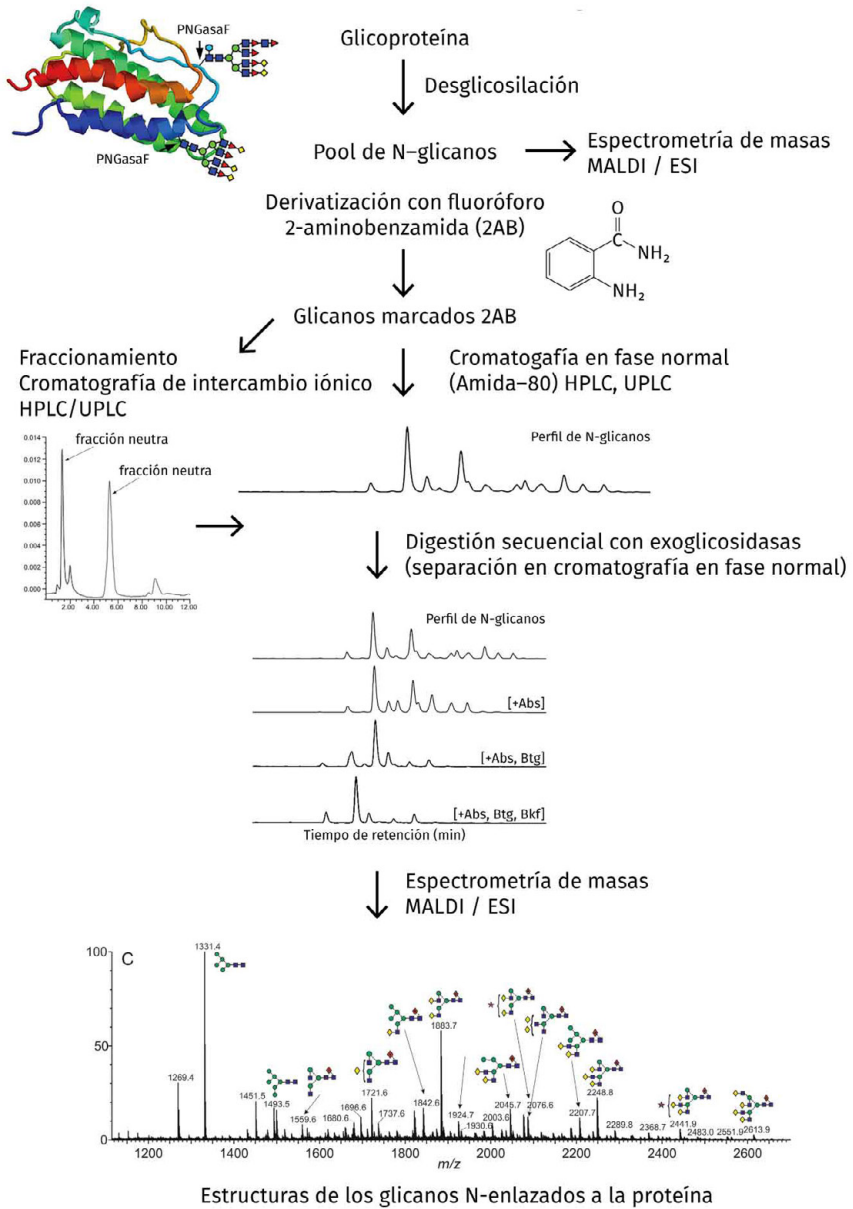


FIGURA 1.6. PROPUESTA DE ESTRATEGIA A UTILIZAR PARA EL ESTUDIO DE GLICANOS N-ENLAZADOS QUE NO POSEAN FUCA1,3 ENLAZADA EN LA GLCNAC DEL EXTREMO REDUCTOR DE LA CADENA

los oligosacáridos que se deseen analizar. Por ejemplo, para el análisis de oligosacáridos que posean $Fuc\alpha_{1,3}$, en el núcleo del glicano, no es posible utilizar la enzima Péptido-N-Glicosidasa F (PNGasaF), en este caso se utiliza la enzima amidasa PNGasaA luego de digestión con peptidasas, para lograr mayor eficiencia en la liberación de las cadenas de oligosacáridos. Además, se describe en la literatura el uso de otros fluoróforos, como por ejemplo el ácido 2-aminobenzoico (2AA), 2-aminopiridina (2AP), y el ácido 4-aminobenzoico (4ABA), todos con buena resolución en cromatografía líquida y alta sensibilidad (Higel, Demelbauer, Seidl, Friess, & Sorgel, 2013; Montesino *et al.*, 2008; Ruhaak *et al.*, 2010).

1.5. GLICOCONJUGADOS DE INTERÉS BIOFARMACÉUTICO

En la actualidad muchos fármacos para uso en humanos se obtienen por vía recombinante a partir de cultivos de células *in vitro*. La producción de estas moléculas se realiza siguiendo normas internacionales de buenas prácticas de manufactura, para obtener un producto con características físicoquímicas y actividad biológica similar de lote a lote de producción. Una de las exigencias que establece la liberación de los lotes de producción de los biofármacos es la identidad del patrón o perfil de glicosilación de los fármacos glicosilados (Montesino *et al.*, 2012; Zhang, Luo, & Zhang, 2016). Los laboratorios encargados de realizar los análisis de control de calidad deben establecer y validar las técnicas analíticas utilizadas para poder informar la identidad o variabilidad de los productos (P. Zhang *et al.*, 2016).

Estos análisis tienen relevante importancia cuando los sistemas artificiales de cultivo de células, para la producción de biofármacos, incorporan en sus glicanos monosacáridos y/o motivos glicosídicos no presentes en células humanas. En estos casos el incremento no deseado de estos motivos glicosídicos podría causar una respuesta inmune no deseada en los pacientes, por tanto, se exige un análisis riguroso basado en métodos de alta sensibilidad y confiabilidad.

Por otra parte, se conoce el impacto de la variación de la glicosilación durante el desarrollo de los procesos neoplásicos. Actualmente se considera que cambios en la glicosilación de las células neoplásicas está directamente relacionado por la progresión de la enfermedad, a través del crecimiento y supervivencia de las células tumorales, de la inmunomodulación inducida por el tumor y la metástasis (Stowell, Ju, & Cummings, 2015). Con estos antecedentes se refuerza la importancia del desarrollo de sistemas analíticos altamente sensibles y específicos para el estudio de los glicanos asociados a procesos neoplásicos, como potenciales marcadores tumorales.

1.6. HUMANIZACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN

La necesidad de incrementar la producción de moléculas para uso terapéutico convocó a los científicos a modificar los sistemas de expresión, de altos rendimientos de proteínas heterólogas, para que fueran capaces de producir proteínas estructuralmente similares a las proteínas producidas por células de mamíferos. Para ello modificaron la vía de secreción de estos hospederos (glicoingeniería), expresando o sobreexpresando glicosiltransferasas, teniendo como antecedentes la relación directa entre estructura-función de los glicanos enlazados a las macromoléculas.

La variabilidad estructural de los glicanos está determinada por la acción de glicosiltransferasas y glicosidasas, localizadas en las membranas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, que participan en la biosíntesis de los glicanos. Este conocimiento se ha utilizado en la modificación de la glicosilación final de las glicoproteínas, a través de la manipulación genética de los genes que codifican para las enzimas en las células que constituyen sistemas de expresión de alto rendimiento de proteínas heterólogas. Sin embargo, se ha demostrado que cambios epigenéticos también modifican el perfil de glicanos enlazados a los glicoconjugados (Gawlitzeck, Estacio, Furch, & Kiss, 2009; Nam, Zhang, Ermonval, Linhardt, & Sharfstein, 2008). Esta información, aparentemente desventajosa, pues incrementa la heterogeneidad de los glicoconjugados, se ha utilizado para la modulación de la glicosilación, y paradójicamente alcanzar mayor homogeneidad y calidad en los procesos productivos artificiales de glicoproteínas.

La levadura *P. pastoris*, con altos niveles de rendimientos productivos, muestra un patrón de glicosilación de tipo oligomanosídico lo que dificultaba su uso para la expresión de fármacos de uso en humano, principalmente asociado a la posible inmunogenicidad y el tiempo de aclaramiento del fármaco en la circulación (Montesino, García, Quintero, & Cremata, 1998). Para lograr la expresión de proteínas con un patrón de glicosilación similar al humano, y garantizar la estructura y función adecuada se realizaron modificaciones de la vía de secreción mediante la adición de glicosiltransferasas (Jacobs, Geysens, Verweken, Contreras, & Callewaert, 2009; Li *et al.*, 2006). Con este objetivo se modificó genéticamente la levadura *P. pastoris*, para la producción de inmunoglobulinas con un patrón de glicosilación «humanizado», lo que convierte a la levadura en una plataforma relevante para la fabricación de anticuerpos.

Actualmente hay líneas celulares de plantas y de insectos que también están modificadas genéticamente y que potencialmente podrían ser utilizadas para la producción de biofármacos. Las plantas como bioreactores se desarrollaron por tener menores costos asociados al proceso de expresión de las biomoléculas, sin embargo, la glicosilación característica de las células de plantas contiene glicanos truncados (pausimanosídicos) y monosacáridos no presentes en células de mamíferos (ver Figura 1.4). Entre las estrategias

desarrolladas para disminuir la población de oligosacáridos complejos que contienen β 1-2Xyl y α 1-3Fuc enlazados se reporta la adición, a la secuencia génica de interés, de secuencias de anclaje al retículo endoplásmico KDEL, (Lys-Asp-Glu-Leu). Con esta modificación las proteínas presentan patrones de glicosilación mayormente oligomanosídico, disminuyendo la posibilidad de generar respuesta inmune ocasionada por motivos glicosídicos no sintetizados en células humanas (Triguero *et al.*, 2011). Los esfuerzos para obtener una plataforma de producción de biofármacos recombinantes basado en plantas transgénicas ha conducido a la mutación de los genes involucrados en la síntesis de estructuras paucimanosídicas y la expresión de otros genes que participan en la obtención de estructuras complejas biantenarias multisialiladas (Chen, 2016). Es importante considerar al momento de hacer glicoingeniería el papel que juegan los monosacáridos y las estructuras derivadas de estos, en la potencia, inocuidad, estabilidad y actividad biológica de los biofármacos, pues no siempre la sobreexpresión de glicosiltransferasas conduce al incremento de la actividad biológica de los fármacos.

Referencias bibliográficas

- BERGSTROM, K. S., & XIA, L.** (2013). Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*, 23(9), 1026–1037. 10.1093/glycob/cwt045
- BONES, J., MITTERMAYR, S., MCLOUGHLIN, N., HILLIARD, M., WYNNE, K., JOHNSON, G. R., GRUBB J. H., SLY W. S., RUDD, P. M.** (2011). Identification of N-glycans displaying mannose-6-phosphate and their site of attachment on therapeutic enzymes for lysosomal storage disorder treatment. *Anal Chem*, 83(13), 5344–5352. 10.1021/ac2007784
- CHEN, Q.** (2016). Glycoengineering of plants yields glycoproteins with polysialylation and other defined N-glycoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(34), 9404–9406. 10.1073/pnas.1610803113
- D'ONOFRIO, M., STARR, C. M., PARK, M. K., HOLT, G. D., HALTIWANGER, R. S., HART, G. W., & HANOVER, J. A.** (1988). Partial cDNA sequence encoding a nuclear pore protein modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(24), 9595–9599.
- GAWLITZEK, M., ESTACIO, M., FURCH, T., & KISS, R.** (2009). Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 103(6), 1164–1175. 10.1002/bit.22348
- HARRISON, R. L., & JARVIS, D. L.** (2006). Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce «mammalianized» recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*, 68, 159–191. 10.1016/S0065-3527(06)68005-6
- HART, G. W., HALTIWANGER, R. S., HOLT, G. D., & KELLY, W. G.** (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem*, 58, 841–874. 10.1146/annurev.bi.58.070189.004205
- HARVEY, D. J.** (2005a). Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from N-linked carbohydrates. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(5), 622–630. 10.1016/j.jasms.2005.01.004
- HARVEY, D. J.** (2005b). Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 2. Fragmentation of high-mannose N-linked glycans. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(5), 631–646. 10.1016/j.jasms.2005.01.005
- HARVEY, D. J.** (2005c). Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 3. Fragmentation of hybrid and complex N-linked glycans. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(5), 647–659. 10.1016/j.jasms.2005.01.006
- HARVEY, D. J., MERRY, A. H., ROYLE, L., CAMPBELL, M. P., & RUDD, P. M.** (2011). Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types. *Proteomics*, 11(22), 4291–4295. 10.1002/pmic.201100300

- HARVEY, D. J., SCARFF, C. A., EDGEWORTH, M., CRISPIN, M., SCANLAN, C. N., SOBOTT, F., SCRIVENS, J. H.** (2013). Travelling wave ion mobility and negative ion fragmentation for the structural determination of N-linked glycans. *Electrophoresis*, 34(16), 2368–2378. 10.1002/elps.201200669
- HIGEL, F., DEMELBAUER, U., SEIDL, A., FRIESS, W., & SORGEL, F.** (2013). Reversed-phase liquid-chromatographic mass spectrometric N-glycan analysis of biopharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem*, 405(8), 2481–2493. 10.1007/s00216-012-6690-3
- HIROSE, M., KAMEYAMA, S., & OHI, H.** (2002). Characterization of N-linked oligosaccharides attached to recombinant human antithrombin expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 19(14), 1191–1202. 10.1002/yea.914
- JACOBS, P. P., GEYSSENS, S., VERVECKEN, W., CONTRERAS, R., & CALLEWAERT, N.** (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc*, 4(1), 58–70. 10.1038/nprot.2008.213
- LI, H., SETHURAMAN, N., STADHEIM, T. A., ZHA, D., PRINZ, B., BALLEW, N., GERNGROSS, T. U.** (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 24(2), 210–215. 10.1038/nbt1178
- LUTHER, K. B., & HALTIWANGER, R. S.** (2009). Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(5), 1011–1024. 10.1016/j.biocel.2008.10.001
- MONTESINO, R., CALVO, L., VALLIN, A., RUDD, P. M., HARVEY, D. J., & CREMATA, J. A.** (2012). Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody Nimotuzumab through process development. *Biologicals*, 40(4), 288–298. 10.1016/j.biologicals.2012.04.005
- MONTESINO, R., GARCIA, R., QUINTERO, O., & CREMATA, J. A.** (1998). Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 14(2), 197–207.
- MONTESINO, R., TOLEDO, J. R., SANCHEZ, O., SANCHEZ, A., HARVEY, D. J., ROYLE, L., CREMATA, J. A.** (2008). Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. *Arch Biochem Biophys*, 470(2), 163–175. 10.1016/j.abb.2007.11.019
- NAM, J. H., ZHANG, F., ERMONVAL, M., LINHARDT, R. J., & SHARFSTEIN, S. T.** (2008). The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 100(6), 1178–1192. 10.1002/bit.21853
- RAJU, T. S., BRIGGS, J. B., BERGE, S. M., & JONES, A. J.** (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, 10(5), 477–486.
- RUHAAK, L. R., ZAUNER, G., HUHN, C., BRUGGINK, C., DEELDER, A. M., & WUHRER, M.** (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 397(8), 3457–3481. 10.1007/s00216-010-3532-z

- SCHNAAR, R. L.** (2016). Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *J Leukoc Biol*, 99(6), 825–838. 10.1189/jlb.3R10116-021R
- STARR, C. M., & HANOVER, J. A.** (1990). Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition in vitro. *J Biol Chem*, 265(12), 6868–6873.
- STOWELL, S. R., JU, T., & CUMMINGS, R. D.** (2015). Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*, 10, 473–510. 10.1146/annurev-pathol-012414-040438
- STRASSER, R.** (2014). Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. *Front Plant Sci*, 5, 363. 10.3389/fpls.2014.00363
- SU, Y. S., WANG, S. J., WANG, P., & QI, Q. S.** (2005). [High level expression of PNGase F in Escherichia coli and its bioactivities]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 21(6), 911–915.
- TOMIYA, N., BETENBAUGH, M. J., & LEE, Y. C.** (2003). Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins. *Acc Chem Res*, 36(8), 613–620. 10.1021/ar020202v
- TRIGUERO, A., CABRERA, G., CREMATA, J. A., YUEN, C. T., WHEELER, J., & RAMÍREZ, N. I.** (2005). Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnol J*, 3(4), 449–457. 10.1111/j.1467-7652.2005.00137.x
- TRIGUERO, A., CABRERA, G., RODRÍGUEZ, M., SOTO, J., ZAMORA, Y., PÉREZ, M., CREMATA, J. A.** (2011). Differential N-glycosylation of a monoclonal antibody expressed in tobacco leaves with and without endoplasmic reticulum retention signal apparently induces similar in vivo stability in mice. *Plant Biotechnol J*, 9(9), 1120–1130. 10.1111/j.1467-7652.2011.00638.x
- ZHANG, L., LUO, S., & ZHANG, B.** (2016). Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *MAbs*, 8(2), 205–215. 10.1080/19420862.2015.1117719
- ZHANG, P., WOEN, S., WANG, T., LIAU, B., ZHAO, S., CHEN, C., RUDD, P. M.** (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today*, 21(5), 740–765. 10.1016/j.drudis.2016.01.006

2 Glicosilación de proteínas. Biosíntesis

CAROLINA ATTALLAH Y MARÍA CELESTE RODRÍGUEZ

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo abordaremos la biosíntesis de glicoproteínas, en particular, de uso terapéutico. Nos centraremos en la expresión de estas moléculas a partir de células eucariotas, ya que las mismas permiten obtener proteínas cuya glicosilación semeja a la de las proteínas humanas.

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas. Resulta muy importante conocer sus mecanismos debido a su influencia en la solubilidad, hidrofiliidad y carga neta negativa de las glicoproteínas, reduciendo las interacciones intermoleculares inespecíficas en espacios extracelulares y protegiéndolas contra la proteólisis (Imperiali & O'Connor, 1999; Breitling & Aebi, 2013; García-Fruitós, 2014).

2.2. DIVERSIDAD DE GLICOPROTEÍNAS

Los glicanos que conforman las glicoproteínas constituyen en sí mismos mecanismos de diversidad para este tipo de moléculas. Además de las distintas combinaciones de monosacáridos, podemos mencionar el tipo de unión entre estas unidades estructurales. Es así que se definen dos posibles estereoisómeros para el carbono anomérico de un azúcar (α o β), y se puede establecer lo propio para cada uno de los azúcares que conforman la mencionada porción glucídica. Incluso, estos azúcares pueden sufrir modificaciones como sulfatación o acetilación.

Por otro lado, el tipo de unión de los glicanos a la porción peptídica de las glicoproteínas constituye otro mecanismo de diversidad. De este modo, se definen N- u O-glicanos, dependiendo del átomo por medio del cual se unen a la porción peptídica. La N-glicosilación consiste en la unión de la cadena de oligosacáridos al átomo de nitrógeno (N) de una asparagina (Asn), mientras que la O-glicosilación consiste en la unión de la porción glucídica al oxígeno (O) de una serina (Ser) o treonina (Thr).

Los O-glicanos en general son cortos, a menudo contienen entre uno y cuatro residuos de carbohidrato. En cambio, los N-glicanos siempre contienen manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc), y suelen estar muy ramificados pudiendo

presentar un residuo de ácido siálico de carga negativa al final de cada una de estas ramificaciones. Las diferencias estructurales entre los N- y O-glicanos dependen, en gran medida, del proceso de síntesis de cada uno de ellos. Los O-glicanos se añaden de a uno por vez a través de glicosiltransferasas diferentes. Mientras que la biosíntesis de los N-glicanos comienza con la adición de un oligosacárido preformado de 14 residuos, y la eliminación y adición posterior de otros residuos, de a uno por vez, en un orden definido y con la participación de una enzima diferente en cada paso (Springer & Gagneux, 2013).

2.3. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA GLICOSILACIÓN

Las proteínas de uso terapéutico producidas por células eucariotas son proteínas de secreción. Por lo tanto, son incorporadas de manera cotraduccional al retículo endoplasmático (RE), y viajan a través del aparato de Golgi y las vesículas secretorias hasta llegar al exterior de la célula.

La maquinaria de secreción que involucra la glicosilación no está localizada en una organela específica dentro de la célula. Involucra principalmente al aparato de Golgi, pero también otras organelas y compartimientos intracelulares, tales como el núcleo (en la biosíntesis de ácido siálico), RE (pasos iniciales de la N-glicosilación), lisosomas (recirculación de monosacáridos) y citoplasma (biosíntesis de precursores).

2.3.1. Traslocación al RE

La síntesis de las proteínas de secreción comienza en los ribosomas libres, localizados en el citosol. Luego de la expresión de un péptido señal de localización en el RE, de 16 a 30 residuos, la proteína de reconocimiento de señal (SRP, de su sigla en inglés *signal recognition particle*) interacciona con el complejo ARN-ribosoma-proteína, interrumpiendo la traducción. De este modo, todo el complejo es dirigido hacia el RE. La SRP interacciona con su receptor, presente en la membrana del RE, desencadenando la translocación de la proteína nascente al interior del sistema de endomembranas a través de un conjunto de proteínas denominado translocón. Una vez en el lumen del RE, el péptido señal es clivado por la peptidasa señal presente en dicho compartimiento y la síntesis de la proteína continúa su curso hacia el interior del sistema de endomembranas (Siegel, 1995; Nilsson *et al.*, 2015) (Figura 2.1).

Ya en el RE, los polipéptidos recién sintetizados comienzan su maduración a través de diferentes modificaciones postraduccionales que tienen lugar a lo largo de la vía secretoria. En particular, nos focalizaremos en la adición y procesamiento de carbohidratos. Algunas reacciones de glicosilación se producen en el lumen del RE, otras en las cisternas del *cis*-, *medial*- o *trans*-Golgi.

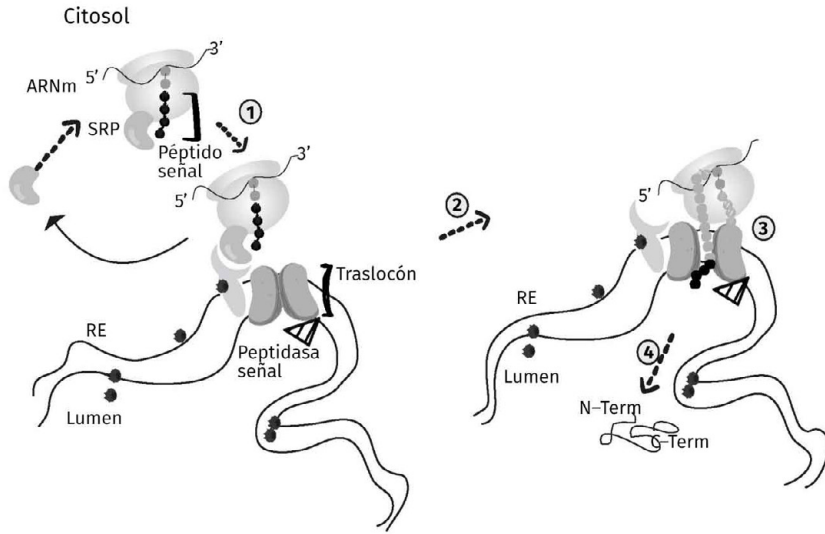


FIGURA 2.1. TRASLOCACIÓN AL RE DE LA CADENA NACIENTE DE UNA PROTEÍNA DE SECRECIÓN. LA SPR INTERACCIONA CON EL PÉPTIDO SEÑAL, CUANDO ÉSTE EMERGE DEL RIBOSOMA (1); EL COMPLEJO SPR-PROTEÍNA NACIENTE Y RIBOSOMA, INTERACCIONA CON EL RECEPTOR DE SPR EN LA MEMBRANA DEL RE (2), LO QUE PROVOCA LA APERTURA DEL TRASLOCÓN. ASÍ, LA SPR SE LIBERA Y SE REANUDA LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA Y A MEDIDA QUE SE VA SINTETIZANDO INGRESA AL LUMEN (3). FINALMENTE, LA PROTEÍNA NACIENTE INGRESA AL LUMEN, EL RIBOSOMA SE LIBERA Y SE CIERRA EL TRASLOCÓN (4)

2.3.2. Precursores para la síntesis de oligosacáridos

Los monosacáridos que conformarán las glicoproteínas llegan al citosol de la célula mediante diferentes mecanismos. Pueden ingresar mediante transportadores específicos en forma dependiente o independiente de energía (por difusión facilitada), o ser rescatados de las vías de degradación dentro de la misma célula. Esta vía de salvataje de hexosas contempla la degradación, que tiene lugar en los lisosomas a pH bajo, y el rescate de los monosacáridos que son llevados fuera de los lisosomas a través de transportadores específicos.

Una vez en el citosol de la célula, los monosacáridos deben ser activados para su empleo en la biosíntesis de glicoproteínas. Dicha activación consiste en la conversión a nucleótidos-hexosa, lo cual ocurre principalmente en el citosol, a excepción de la síntesis de CMP-Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico-citidil monofosfato), que se lleva a cabo en el núcleo. Para el proceso de activación de los monosacáridos se requieren nucleósidos trifosfato y una hexosa con un fosfato en el carbono anomérico. En la Tabla 2.1 se muestran los azúcares, y los correspondientes nucleótidos, que conforman las formas activadas que participan en la glicosilación de las proteínas en células animales.

TABLA 2.1. HEXOSAS Y NUCLEÓTIDOS DE LAS FORMAS ACTIVADAS QUE PARTICIPAN EN LA GLICOSILACIÓN DE LA MAYORÍA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL

Hexosa	Nucleótido
Glucosa (Glc)	UDP
Galactosa (Gal)	UDP
Manosa (Man)	GDP
Fucosa (Fuc)	GDP
N-acetilglucosamina (GlcNAc)	UDP
N-acetilgalactosamina (GalNAc)	UDP
Xilosa (Xyl)	UDP
Ácido siálico (Neu5Ac o Neu5Gc)	CMP

Luego de ser activados, los nucleótidos–hexosa deben ingresar a la vía secretoria. Para llevar a cabo esta tarea, existen antiportadores independientes de energía que liberan los nucleótidos–hexosa dentro del lumen del RE o del aparato de Golgi, a cambio de la salida simultánea de nucleósidos monofosfatos. La mayoría de estos antiportadores se han encontrado en el Golgi, aunque algunos fueron identificados en el RE. Esta localización se corresponde con las glicosiltransferasas necesarias para su incorporación en las cadenas de oligosacáridos en formación. Es así que la presencia de los nucleótidos–hexosa en el Golgi resulta uno de los mecanismos de regulación de la glicosilación (Neufeld & Ginsburg, 1965).

2.4. N-GLICOSILACIÓN

2.4.1. Membrana del RE

En las células eucariotas la biosíntesis de los N–glicanos comienza a partir de la formación de oligosacáridos unidos a lípido (LLO, de su sigla en inglés *lipid-linked oligosaccharides*). A través de la generación del LLO, la célula logra un proceso muy eficiente en el que se incrementa la concentración local de los sustratos necesarios para las enzimas involucradas. El dolicol es un lípido presente en la membrana del RE que actúa como transportador de los oligosacáridos. Es un polímero de unidades de isopreno, cuyo número varía dependiendo del organismo. En particular, en células de mamíferos se han reportado de 18 a 21 unidades (Rip *et al.*, 1985). La unidad de isopreno– α

saturada es fosforilada generando dolicol fosfato (Dol-P). El Dol-P puede ser generado *de novo* por la vía biosintética o por desfosforilación del Dol-PP, liberado en la reacción de N-glicosilación catalizada por una oligosacaril-transferasa (OST) (ver más adelante). Esta última es la encargada de transferir el oligosacárido preformado al sustrato proteico.

Todas las enzimas biosintéticas involucradas en la formación del LLO se encuentran unidas o asociadas a la membrana del RE, e incluso algunas de ellas están organizadas en complejos para optimizar las reacciones que catalizan. El LLO está compuesto principalmente por tres tipos de monosacáridos: 2 unidades de GlcNAc, 9 de Man y 3 de Glc (Figura 2.2).

De esta manera, la síntesis del LLO se produce tras la adición de residuos de azúcares, lo que ocurre inicialmente en el citoplasma y luego continúa en el lumen del RE (Figura 2.3). Para la síntesis de UDP-Glc se necesita la formación de Glc-6-P como precursor, que luego es convertida a Glc-1-P (Daran *et al.*, 1995). Mientras que para la biosíntesis de GDP-Man y UDP-GlcNAc se emplea fructosa-6-P como precursor, la cual se genera a partir de Glc-6-P por isomerización enzimática (Dickinson, 1991).

La biosíntesis del LLO es llevada a cabo por una serie de glicosiltransferasas codificadas por genes ALG (del inglés, *asparagine-linked glycosylation*). Se inicia en la cara citoplasmática de la membrana del RE a través de la N-acetilglucosamina-fosfato transferasa codificada por el gen *ALG7*, que cataliza la adición de GlcNAc-P al Dol-P, a partir del nucleótido-hexosa UDP-GlcNAc, generando Dol-PP-GlcNAc. El segundo residuo de GlcNAc se

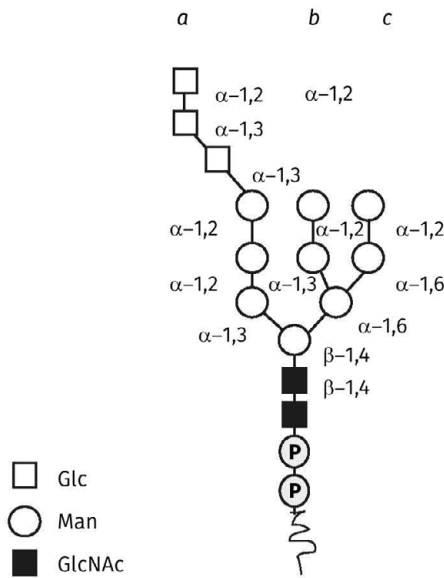


FIGURA 2.2. ESTRUCTURA DEL OLIGOSACÁRIDO PREFORMADO (LLO) UNIDO A LÍPIDO EN LA MEMBRANA DEL ER

adiciona al Dol-PP-GlcNAc por la acción de un complejo proteico codificado por *ALG13* y *ALG14* (Bickel *et al.*, 2005) Luego, continúa la elongación del LLO con la adición de cinco residuos de Man, en forma consecutiva, empleando GDP-Man como sustrato. La β -1,4 manosiltransferasa (codificada por *ALG1*) agrega la primer Man al Dol-PP-GlcNAc₂. La Alg2p adiciona dos residuos más de Man, primero la α -1,3 y luego la α -1,6 Man, generando dos ramificaciones (Kämpf *et al.*, 2009). La Alg11p agrega los otros dos residuos de Man unidos de forma α -1,2 a la ramificación *a* (Figura 2.2). Estas tres manosiltransferasas, orientadas hacia el citoplasma, también pueden formar un complejo proteico (Gao, Nishikawa & Dean, 2004).

El Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ es el producto final de la biosíntesis que ocurre hacia el citosol, ya que posteriormente el complejo es translocado al lumen del RE. Existen controversias sobre la participación de Rft1p en dicha translocación (Helenius *et al.*, 2002; Rush *et al.*, 2009). Una vez en el lumen del ER, se adicionan cuatro residuos más de Man y tres residuos de Glc a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente. Estos últimos se generan a partir

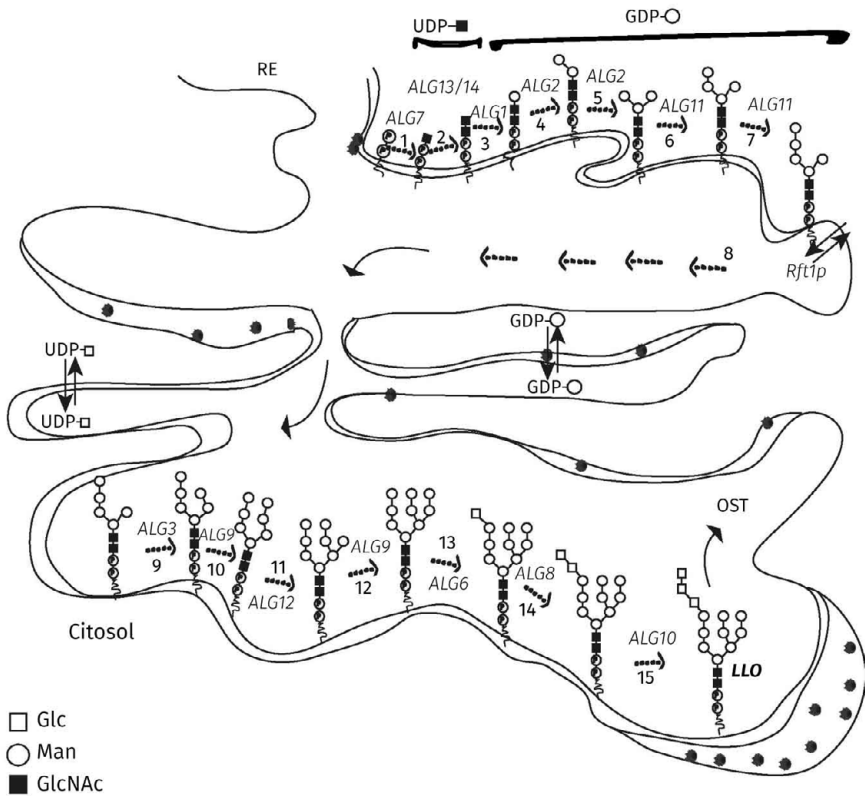


FIGURA 2.3. BIOSÍNTESIS DEL LLO CATALIZADA POR UNA SERIE DE GLICOSILTRANSFERASAS CODIFICADAS POR GENES ALG

de Dol-P, y GDP-Man o UDP-Glc, según corresponda, en la cara citoplasmática de la membrana del RE (Figura 2.3). En mamíferos, la Dol-P-Man sintasa, constituida por DPM1, DPM2 y DPM3, es la enzima encargada de la síntesis del Dol-P-Man (Maeda *et al.*, 2000). El Dol-P-Glc se genera a través de la sintasa codificada por el gen *ALG5* a partir de UDP-Glc (Heesen *et al.*, 1994). Estos sustratos, Dol-P-Glc y Dol-P-Man, son translocados desde la cara citoplasmática hacia el lumen del RE, aunque aún no se conoce la identidad de las proteínas que participan en este mecanismo.

Cabe mencionar que el Dol-P-Man y Dol-P-Glc, además de actuar como sustratos para la N-glicosilación, actúan como sustratos para la O-manosilación y la formación de moléculas de anclaje glicosilfosfatidolinositol (GPI) (Welti, 2013).

Resulta interesante resaltar que las glicosiltransferasas que agregan Man y Glc en el lumen del RE emplean Dol-P-hexosas como sustrato, a diferencia de las enzimas presentes en la cara citosólica, que emplean los nucleótidos-hexosa. Las glicosiltransferasas que actúan en el lumen del RE se agrupan en la superfamilia GT-C según su secuencia primaria y el empleo de azúcares fosfato unidos a lípido como sustrato (Lairson *et al.*, 2008). La α -1,3 manosiltransferasa está codificada por *ALG3* y es la que inicia la elongación de la ramificación *b* (Figura 2.2). Luego, Alg9p cataliza la adición de una Man unida de forma α -1,2, completando la elongación de esta ramificación. La Alg12p genera la ramificación *c* por adición de una Man de forma α 1,6. La elongación de esta rama, al igual que en la ramificación *b*, la realiza la Alg9p, agregando una Man unida de manera α -1,2 (Frank & Aebi, 2005).

Por último, para completar la formación del precursor LLO, deben agregarse tres residuos de Glc a la α -1,2 Man de la ramificación *a*. La glicosiltransferasa codificada por *ALG6* es la encargada de adicionar la primer Glc en unión α -1,3. Después, Alg8p agrega la segunda Glc de forma α -1,3 y Alg10p agrega la última Glc en unión α -1,2 (Burda & Aebi, 1999).

El ensamblado de este precursor LLO es estrictamente ordenado y secuencial. Es así que cada paso ocurre al finalizar el anterior, e incluso es favorecido con la culminación del paso previo.

Una vez finalizada la síntesis del LLO se transfieren en bloque los 14 residuos de azúcares a un residuo Asn de un polipéptido naciente por la acción de una OST. Ya hemos descripto cómo ingresa el polipéptido naciente al lumen del RE, por lo que solo resta mencionar que simultáneamente ocurre la formación del precursor LLO y al identificar una Asn, en el marco de una secuencia consenso Asn-X-Ser/ Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Pro), la OST cumple su función. Se considera que el polipéptido naciente está en condiciones de ser glicosilado cuando presenta una longitud de 65 aminoácidos desde el sitio P del ribosoma. En mamíferos se ha sugerido que la OST está asociada al translocón e interacciona con el ribosoma (Harada *et al.*, 2009).

La OST, dependiendo del organismo, está formada por un complejo de proteínas, pero las Stt3p constituyen el centro catalítico al que se agregan subunidades complementarias. La duplicación y diversificación de las unidades que conforman las OSTs representan estrategias para aumentar la posibilidad de glicosilación de las proteínas (Schwarz & Aebi, 2011). La OST tiene como sustratos tanto el LLO como la cadena polipeptídica naciente, lo que determina una interacción diferente con cada uno de ellos. La OST reconoce las GlcNAc₂ del LLO y la α -1,2 Glc terminal en la ramificación *a*. Los residuos de Man en las ramificaciones *b* y *c* no parecen tener la misma relevancia (Burda & Aebi, 1999). Además de interactuar con los azúcares, la OST reconoce el transportador lipídico. Se demostró que la enzima no puede utilizar transportadores formados por pocas unidades de isopreno (Fang *et al.*, 1995). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la OST reconoce residuos de Asn en el contexto de la secuencia Asn-X-Ser/Thr. Sin embargo, se debe considerar que no todos los residuos Asn presentes en la secuencia consenso se encuentran glicosilados, lo que determina otro factor de diversidad y heterogeneidad. Existen varios factores que influyen en la N-glicosilación, como lo es la distancia a las hélices transmembrana o la distancia hacia el carboxilo terminal (Nilsson & Von Heijne, 1993, 2000). Incluso, se ha reportado que el aminoácido consecutivo a la secuencia consenso condiciona la glicosilación de la Asn (Mellquist *et al.*, 1998).

La conservación de la secuencia consenso no es absoluta. Se ha reportado hasta un 2 % de glicosilación de la Asn en las secuencias Asn-X-Cys, Asn-Gly-X y Asn-X-Val, en diferentes especies (Miletich & Borze Jr., 1990; Sato *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2011).

Ya que la OST transfiere el LLO en forma cotraduccional, se debe tener en cuenta que la N-glicosilación ocurre cuando la proteína no está plegada. De esta manera, dado que la N-glicosilación es esencial para el correcto plegamiento de la proteína, se considera un mecanismo de control de dicho proceso (Schwarz & Aebi, 2011).

Aún en el RE, y antes de pasar al Golgi, los oligosacáridos ahora unidos a la proteína, sufren la remoción secuencial de los tres residuos de Glc y una Man (Munro, 2001). La α -glucosidasa I actúa específicamente sobre la α -1,2 Glc terminal y la α -glucosidasa II remueve secuencialmente los otros dos residuos α -1,3 Glc. La eliminación de estos residuos y la readición transitoria de la Glc contigua al residuo de Man de la ramificación *a* contribuyen al tiempo de retención en el RE de una glicoproteína dada durante el plegamiento (Figura 2.4).

Antes de salir del RE muchas glicoproteínas sufren la remoción del residuo α -1,2 Man terminal de la ramificación *b* por la acción de una α -manosidasa I. Existe una segunda α -manosidasa I-like en el RE que no posee actividad manosidasa. Esta última se denomina EDM (de su sigla en inglés *RE degradation-enhancing α -mannosidase I-like protein*) y juega un papel importante en el reconocimiento de glicoproteínas mal plegadas, las que envía a una vía de degradación.

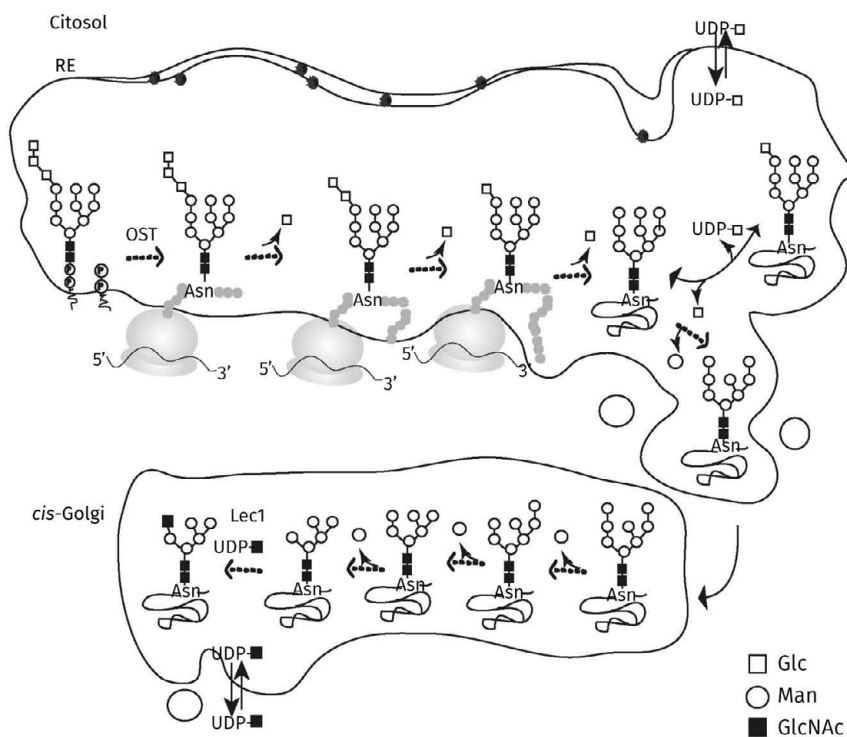


FIGURA 2.4. PROCESAMIENTO DE LOS N-GLICANOS EN EL LUMEN DEL ER Y EN EL CIS-GOLGI

Luego, las proteínas son exportadas al lumen del Golgi. La maduración de los N-glicanos comienza en el *cis*-Golgi mediante la remoción de todos los residuos α -1,2 Man llevada a cabo por la manosidasa I del Golgi (Figura 2.4). De este modo se genera la estructura $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$, la cual es un intermediario clave en la generación de los N-glicanos híbridos y complejos (ver Figura 1.3). En algunos casos, este intermediario escapa a nuevas modificaciones y la proteína que se secreta posee N-glicanos del tipo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$. En la mayoría de los casos, las proteínas maduras que poseen estos N-Glicanos ricos en manosa no son procesadas en su paso por el *cis*-Golgi. A diferencia de los organismos multicelulares, las levaduras no truncan los residuos de Man en el *cis*-Golgi. En cambio, agregan residuos de Man adicionales para producir estructuras de alta manosa que contiene muchos residuos ramificados de este azúcar. Estos N-glicanos de levadura son inmunogénicos en humanos, por lo que estos organismos no son de elección para la producción de glicoproteínas terapéuticas recombinantes, a menos que estén genéticamente modificados para generar N-glicanos semejantes a los de las células de mamíferos.

En el *medial*-Golgi se inicia la biosíntesis de los N-glicanos híbridos y complejos. La N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAcT-I) cataliza la adición de un residuo de GlcNAc a la α -Man 1,3 en la ramificación *a*. Con posterioridad, la α -manosidasa II remueve la α -1,3 Man y α -1,6 Man de la ramificación *b* y *c*, respectivamente, para formar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$. La actividad de la α -manosidasa II constituye un punto de control de este proceso ya que solo actúa en forma consecutiva a la GlcNAcT-I. Luego, una segunda GlcNAc se agrega a la α -1,6 Man por la acción de una GlcNAcT-II. De este modo, la actividad de esta última enzima gobierna la generación de los N-glicanos complejos (Figura 2.5). Los N-glicanos híbridos se generan si la α -manosidasa II no afecta la estructura $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$. La acción incompleta de la α -manosidasa II puede resultar en $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ híbridos (Péanne *et al.*, 2013).

Las estructuras biantenarias generadas en el *medial*-Golgi funcionan como punto de partida para las tri- y tetraantenarias obtenidas por la acción de las enzimas GlcNAcT-IV y GlcNAcT-V. Se pueden generar ramificaciones adicionales tras la acción de enzimas como GlcNAcT-IX o GlcNAcT-Vb, o bien, por la acción de la GlcNAcT-VI. Los N-glicanos complejos e híbridos pueden llevar un residuo GlcNAc bisectante, que se une a la β -1,4 Man mediante la GlcNAcT-III. La presencia de la GlcNAc bisectante inhibe la acción de la α -manosidasa II y previene la acción de GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV y GlcNAcT-V en ensayos *in vitro*. Sin embargo, si la GlcNAc-III actúa luego de la α -manosidasa II, se pueden sintetizar complejos bi-, tri- y tetraantenarios con una GlcNAc bisectante (Figura 2.6).

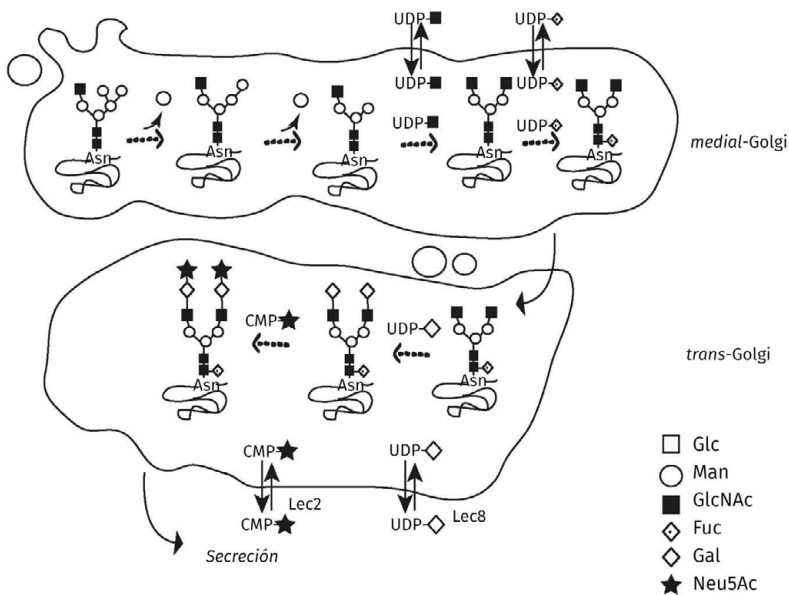


FIGURA 2.5. PROCESAMIENTO Y MADURACIÓN DE LOS N-GLICANOS EN EL MEDIAL- Y TRANS-GOLGI

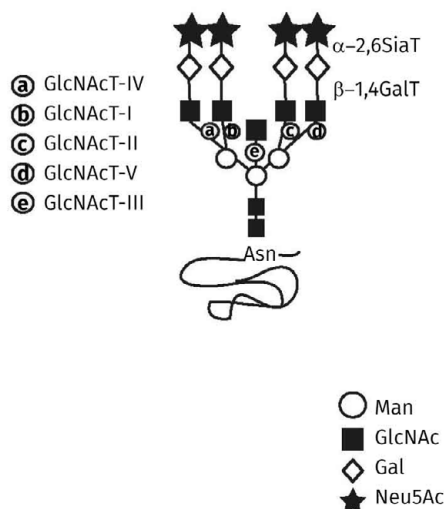


FIGURA 2.6. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS BI-, TRI-, TETRAANTENARIAS, Y DE LA GLCNAC BISECTANTE

Aun en el compartimento *medial*-Golgi, se puede añadir un residuo de fucosa (Fuc) en unión α -1,6 a la GlcNAc, unida covalentemente al residuo de Asn del polipéptido, por acción de la fucosiltransferasa central. Sin embargo, las modificaciones terminales de los N-glicanos, incluida la adición de la α -1,6 Fuc, se producen principalmente en las cisternas del *trans*-Golgi por diferentes fucosiltransferasas, galactosiltransferasas y sialiltransferasas (Péanne *et al.*, 2013).

Los residuos de Gal y ácido siálico se añaden secuencialmente a cada uno de los extremos no reductores de las antenas de los N-glicanos. La galactosilación de N-glicanos es catalizada principalmente por las β -1,4 y β -1,3 galactosiltransferasas (Wang *et al.*, 2017). Los sistemas de expresión de mamíferos no humanos, tales como las células CHO y NSO, pueden agregar Neu5Gc (ácido N-glicolilneuramínico) y Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico), mientras que las células humanas solo producen glicoproteínas que contienen Neu5Ac, el cual se agrega al residuo Gal en un enlace α -2,3; α -2,6 o α -2,8. Dicho residuo terminal debe analizarse detalladamente ya que puede resultar inmunogénico en proteínas de uso terapéutico en humanos.

2.5. O-GLICOSILACIÓN

La O-glicosilación consiste en la adición de un residuo de azúcar a una Ser o Thr de una cadena polipeptídica. Los O-glicanos se encuentran menos ramificados que la mayoría de los N-glicanos y son comúnmente estructuras

biantenarias. La biosíntesis de los mismos no requiere un precursor de LLO para la transferencia al polipéptido.

La O-glicosilación se inicia en diferentes sitios de la célula dependiendo de la naturaleza de la hexosa unida al residuo de Ser o Thr de la cadena polipeptídica. La más abundante es la O-glicosilación tipo mucina, que estudiaremos en detalle, y comienza con la unión de una GalNAc (O-GalNAc) a los residuos aminoacídicos mencionados, presente en secreciones mucosas y en proteínas de la membrana plasmática. Otros tipos de O-glicosilación incluyen la O-GlcNAc encontrada en proteínas nucleares y citoplasmáticas, O-Man en α -distroglicano, O-Fuc y O-Glc presentes en proteínas de membrana, O-Gal unida a 5-hidroxisilisina (5-Hyl) en el colágeno, O-Xyl en proteoglicanos, y O-GlcNAc en proteínas extracelulares (Götting *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Sakaidani *et al.*, 2010).

Como mencionamos, nos ocuparemos de las mucinas. La biosíntesis de las mismas comienza en el Golgi con la incorporación de una GalNAc en unión α al grupo hidroxilo de residuos de Ser o Thr, por la acción de una familia de polipéptido N-acetilgalactosamina transferasas (GalNAcTs o ppGalNAcT), que emplean UDP-GalNAc como sustrato. En mamíferos se han reportado más de 20 miembros en la familia de las GalNAcTs que actúan de manera coordinada. Estas enzimas están presentes en el Golgi y actúan después de que se hayan producido la mayoría de los eventos de plegamiento de las proteínas. La gran cantidad de enzimas que controlan la etapa inicial de la O-glicosilación tipo mucina la hace diferente de otros tipos de glicosilación. Cada una de estas enzimas presenta diferente eficiencia para transferir el residuo GalNAc a un determinado aminoácido o es más eficiente cuando otras ya transfirieron el residuo correspondiente a un sitio vecino, o bien el entorno de aminoácidos incide en la actividad de cada una de ellas (Brockhausen *et al.*, 2009). Se han reportado GalNAcTs en distintos compartimentos del Golgi, siendo relevante esta distribución en la determinación del grado de O-glicosilación que presentará la proteína secretada.

En contraste con la N-glicosilación, no se ha determinado una secuencia consenso para la adición de GalNAc a la porción peptídica, aunque existen algunos criterios y algoritmos predictivos (Gerken *et al.*, 2008).

La agrupación de O-glicanos en mucinas se debe, en parte, a la presencia de un número variable de residuos de Ser y Thr en un contexto de aminoácidos no cargados, a menudo ricos en Pro. Las mucinas pueden formar geles y, en el caso de las más pequeñas, son de tipo solubles. Algunas mucinas contienen un dominio transmembrana hidrofóbico que sirve para insertar la molécula en la membrana celular. Las mucinas secretadas tienen regiones ricas en cisteína y cistina que son responsables de su polimerización y la formación de moléculas extremadamente grandes.

Los O-glicanos se extienden en el Golgi, para formar glicanos O-GalNAc lineales o ramificados, mediante la adición de Gal, GlcNAc, ácido siálico, Fuc, GalNAc y sulfatos (Brockhausen *et al.*, 2009). Muchas de las enzimas involucradas en estos procesos son las mismas que participan de la N-glicosilación, excepto las glicosidasas que no intervienen en la modificación de los O-glicanos.

Posteriormente a la unión de la O-GalNAc, se agregan diferentes azúcares que determinan las estructuras «core» de los O-glicanos (ver Figura 1.3). Se han definido ocho de estas estructuras, las cuales además pueden ser modificadas por la adición de otros azúcares (ver Figura 5.2). Existen glicosiltransferasas implicadas únicamente con el ensamblado de glicanos de O-GalNAc, además de las que también están involucradas en la N-glicosilación.

El primer azúcar (GalNAc) unido a la proteína crea el antígeno Tn (Ser/Thr-GalNAc), el cual es poco común en mucinas normales, pero a menudo se encuentra en mucinas derivadas de tumores. Esto sugiere que, en células tumorales, se encuentra inhibida la extensión de la estructura de O-GalNAc. Otra estructura que comúnmente se asocia a cáncer es el antígeno Tn sialidado que contiene un residuo de ácido siálico en unión α -2,6 al residuo GalNAc. Si el ácido siálico se encuentra O-acetilado, los anticuerpos anti-Tn sialidado no pueden reconocerlo.

La unión de una Gal a la GalNAc por la acción de una β -1,3 galactosiltransferasa o C1GalT1 determina la generación del core 1. Esta estructura se denomina antígeno T por lo que la enzima mencionada también se denomina T sintasa. Esta enzima depende de la proteína Cosmc que actúa como chaperona en el RE asegurando su presencia y funcionalidad en el Golgi. El antígeno T también puede estar sialidado y ello previene otras modificaciones en el core 1. Generalmente no se encuentra el antígeno T expuesto.

Los O-glicanos de O-GalNAc core 2 son estructuras ramificadas generadas a partir del core 1. Las enzimas responsables de su formación pertenecen a la familia de las β -1,6 N-acetilglucosamina transferasas o C2GnT1-3. Existen dos principales tipos de C2GnTs, el tipo L (de leucocitos) que solo sintetizan el core 2, y el tipo M (de mucina) que también están involucradas en la síntesis del core 4 y otras ramificaciones unidas a GlcNAc en enlace β -1,6.

La enzima responsable de la síntesis de O-glicanos de O-GalNAc core 3 es la β -1,3 N-acetilglucosamina transferasa (β 3GnT6).

La síntesis del core 4 depende de la actividad de la β -1,6 N-acetilglucosamina transferasa de tipo M (C2GnT2) y requiere la síntesis previa del core 3 O-GalNAc.

Las glicosiltransferasas que sintetizan los core 5 al 8 aún no han sido caracterizadas.

La elongación del residuo de Gal de los glicanos O-GalNAc del core 1 y core 2 está catalizada por una β -1,3 N-acetilglucosamina transferasa específica de los glicanos O-GalNAc. Estos O-glicanos también pueden ramificarse por N-acetilglucosamina transferasas y galactosiltransferasas para formar secuencias de β -1,3 GlcNAc β -1,4 Gal repetidas (poli-N-acetil-lactosamina) que representan el pequeño antígeno i. Las reacciones de elongación menos comunes son la formación de secuencias GlcNAc- β -1,4 GalNAc (LacdiNAc) y GlcNAc- β -1,3 Gal. Las unidades de poli-N-acetil-lactosamina pueden estar ramificadas por miembros de la familia β -1,6 N-acetilglucosamina transferasa, dando como resultado el antígeno I grande.

Algunas de estas reacciones de ramificación son comunes a otros O- y N-glicanos, y glicolípidos.

A diferencia de los N-glicanos, los glicanos O-GalNAc no tienen enlaces Gal- α -2,6 NeuAc, aunque sí comparten estructuras GalNAc- α -2,6 Neu5Ac como en el antígeno Tn sialidado. Por lo tanto, en la mayoría de las células productoras de mucina de mamíferos, las α -2,6 sialiltransferasas actúan sobre la GalNAc y las α -2,3 sialiltransferasas actúan sobre la Gal. Algunas de las sialiltransferasas y sulfotransferasas prefieren los glicanos O-GalNAc como su sustrato, aunque muchas de ellas también actúan sobre las estructuras de N-glicanos.

Las modificaciones sobre O-glicanos de tipo mucinas incluyen O-acetilación de ácido siálico y O-sulfatación de galactosa y GlcNAc. Estos O-glicanos son muy heterogéneos.

Los O-glicanos que presentan O-Man son abundantes en levaduras y hongos, mientras que en mamíferos se presentan en un número restringido de proteínas, siendo característicos aquellos glicanos con secuencias de GalNAc sialidadas y fucosiladas, similares a las presentes en mucinas. En eucariotas la O-manosilación se inicia en el RE por la acción conjunta de dos proteínas O-manosiltransferasas (POMT1 y 2), las cuales emplean Dol-P-Man como sustratos. La extensión de las cadenas se produce en el Golgi (Brockhausen *et al.*, 2009).

2.6. OTROS TIPOS DE GLICOSILACIÓN

Las glicosilaciones mencionadas en este apartado ayudan a conocer la gran diversidad de estructuras que pueden generar las células eucariotas. Esta breve descripción es solo introductoria ya que el detalle de la biosíntesis de estos tipos de glicosilación escapa a los objetivos del presente libro.

2.6.1. Biosíntesis del anclaje GPI

El GPI es una modificación postraduccional del extremo carboxilo terminal de las proteínas de membrana, que ocurre en el RE.

La biosíntesis del anclaje GPI involucra tres etapas. En primer lugar, se produce el preensamblado del precursor GPI en la membrana del RE. En segundo lugar, ocurre la unión del GPI al extremo carboxilo de una proteína, de manera postraduccional. Estos aminoácidos son hidrofóbicos, por lo que permanecen unidos a la membrana del RE para luego ser sustituidos por el anclaje GPI. En tercer lugar, la proteína con el anclaje GPI es remodelada en el RE y Golgi, y transportada hasta la membrana celular donde permanecerá de cara al medio extracelular (Figura 2.7). La estructura α -1,4 Man α -1,6 GlcN mio-inositol-1-P-lípido es un sello distintivo de anclajes GPI y estructuras relacionadas.

La biosíntesis de GPI involucra la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc a fosfatidilinositol (PI) para generar N-acetilglucosamidil-PI (GlcNAc-PI) mediante un complejo multiproteico unido a la membrana del RE. Este paso transcurre sobre la cara citoplasmática del RE, seguido de la N-acetilación del GlcNAc-PI para generar glucosamina-PI (GlcN-PI) y la posterior translocación al lumen del RE (Ferguson *et al.*, 2017). Luego ocurre la acilación del inositol y continúa de síntesis de las moléculas de anclaje GPI como se muestra en la Figura 2.7.

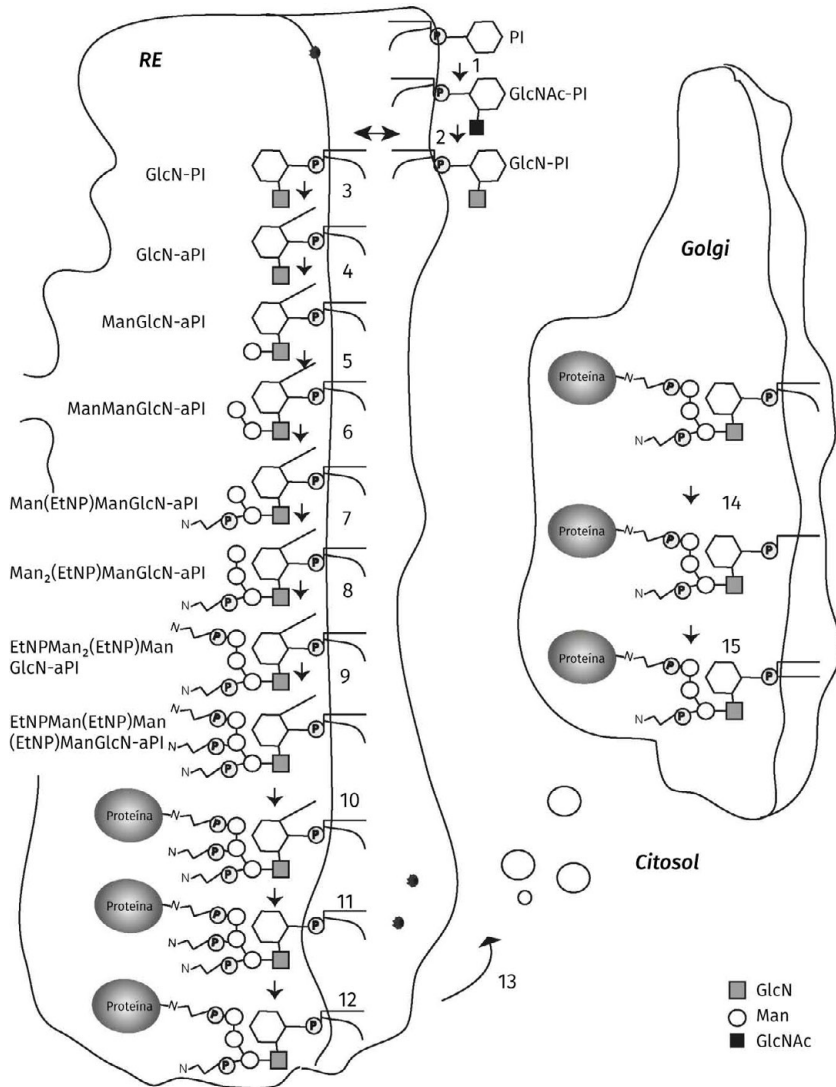


FIGURA 2.7. BIOSÍNTESIS DE ESTRUCTURAS DE ANCLAJES GPI EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

2.6.2. Glicosfingolípidos

El primer glicosfingolípido (GSL) que se caracterizó fue la galactosilceramida (GalCer), que consiste en un único residuo de galactosa unido a la ceramida. La ceramida se sintetiza en la cara citoplasmática del RE. La glucosilceramida (GlcCer) es sintetizada sobre la cara citoplasmática del RE y el Golgi, luego se trasloca al Golgi, donde es elongada por una serie de glicosiltransferasas. En contraste, la GalCer, se sintetiza en la cara luminal del RE y viaja al Golgi, donde es sulfatada para formar sulfátidos.

Los patrones de expresión de GSL están determinados por la distribución intracelular de las enzimas requeridas para su biosíntesis. Los niveles de nucleótidos-hexosa utilizados por las glicosiltransferasas en la luz de Golgi (que incluyen UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc y CMP-Neu5Ac) afectan a la estructura final de los glicanos y están regulados por enzimas presentes en el citoplasma o núcleo, y por la actividad de los transportadores de azúcar de nucleótidos en la membrana de Golgi. Los gangliósidos son GSL que contienen ácido siálico; en humanos poseen exclusivamente ácido siálico del tipo Neu5Ac, mientras que en otros mamíferos contienen tanto Neu5Ac como Neu5Gc. Los ácidos siálicos en gangliósidos pueden modificarse adicionalmente mediante O-acetilación o eliminación del grupo N-acilo, para generar un grupo amino libre (Schnaar & Kinoshita, 2017).

2.6.3. Proteoglicanos y glicosaminoglicanos

Los proteoglicanos (PG) son un tipo de glicoconjugados compuestos por largas cadenas no ramificadas de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos (GAG), que se unen covalentemente a un *core* proteico. Estas moléculas poseen carga negativa y están constituidas por unidades repetidas de ácido urónico o Gal, y GlcNAc o GalNAc. Existen cuatro clases principales de GAG: heparina/heparán sulfato (HP/HS), condroitín sulfato (CS), queratán sulfato y ácido hialurónico, siendo este último el único no covalentemente unido al *core* proteico. Los GAG presentan una gran diversidad estructural debido a reacciones enzimáticas interrelacionadas, incluidas N- y O-sulfatación y epimerización (Rajas *et al.*, 2017) blocking the interaction between eukaryotic receptors and bacterial ligands may enable the pathogenesis process to be stopped. Cell surface glycosaminoglycans (GAGs).

La mayoría de los PG también contienen N- y O-glicanos. Los GAG están constituidos por cadenas mucho más largas que otros tipos de glicanos (Lindahnl *et al.*, 2017).

2.6.4. Glicosilación nucleoplasmática

Aunque los glicoconjugados predominan en la superficie celular, en las secreciones celulares y en la matriz extracelular, dentro de la vía secretora y los lisosomas; también existen glicoproteínas estables en el citoplasma, el núcleo y los plástidos de las células eucariotas.

Las cadenas laterales hidroxilo de Thr, Ser, tirosina (Tyr), hidroxiprolina (Hyp) e Hyl constituyen sitios potenciales de unión de O-glicanos, y Asn y arginina (Arg) proporcionan sitios de unión para N-glicanos. Los aminoácidos Thr, Ser y Asn constituyen los sitios de unión predominantes en la vía de secreción pero, curiosamente, los ejemplos mejor caracterizados de O-glicosilación nucleocitoplasmática se producen en Tyr, Hyp y Arg. Algunos ejemplos de glicosilación nucleocitoplasmática involucran una reacción de glicosilación que se produce en el citoplasma o núcleo, y la proteína glicosilada permanece y funciona dentro de estos compartimentos. También existen glicosiltransferasas que modifican el ADN (West & Hart, 2017).

2.7. CONCLUSIONES

El estudio de las glicoproteínas es un área compleja debido a la gran diversidad de estas moléculas. Este capítulo ha tenido el propósito de brindar conocimiento acerca de las estructuras y mecanismos celulares que determinan la naturaleza de las glicoproteínas, centrandose especial atención en las proteínas de secreción. Además, debemos considerar que las condiciones intrínsecas o extrínsecas a la célula que las produce modulan la presencia de los glicanos y el grado de ocupación de los potenciales sitios de glicosilación. Esto último representa un área de creciente interés para la glicoingeniería, que busca mejorar las características de proteínas con fines terapéuticos.

Referencias bibliográficas

- BENNETT, E. P., MANDEL, U., CLAUSEN, H., GERKEN, T. A., FRITZ, T. A. & TABAK, L. A.** (2012). Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), 736–756. 10.1093/glycob/cwr182.
- BICKEL, T., LEHLE, L., SCHWARZ, M., AEBI, M. & JAKOB, C. A.** (2005). Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Alg13p and Alg14p form a complex required for the formation of GlcNAc 2-PP-dolichol. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34500–34506. 10.1074/jbc.M506358200.
- BREITLING, J. & AEBI, M.** (2013). N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*, 5(8), 1–15. 10.1101/cshperspect.a013359.
- BROCKHAUSEN, I., SCHACHTER, H. & STANLEY, P.** (2009). O-GalNAc Glycans. En *Essentials of Glycobiology*. second. NY: Cold Spring Harbor.
- BURDA, P. & AEBI, M.** (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1426(2), 239–257. 10.1016/S0304-4165(98)00127-5.
- DARAN, J. M., DALLIES, N., THINES SEMPOUX, D., PAQUET, V. & FRANÇOIS, J.** (1995) Genetic and Biochemical Characterization of the UGP1 Gene Encoding the UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 233(2), 520–530. 10.1111/j.1432-1033.1995.520_2.x.
- DICKINSON, J. R.** (1991). Biochemical and genetic studies on the function of, and relationship between, the PGI1- and CDC30-encoded phosphoglucose isomerases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology*, 137(4), 765–70. 10.1099/00221287-137-4-765.
- FANG, X., GIBBS, B. S. & COWARD, J. K.** (1995). Synthesis and evaluation of synthetic analogues of dolichyl-P-P-chitobiose as oligosaccharyltransferase substrates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5(22), 2701–2706. 10.1016/0960-894X(95)00460-B.
- FERGUSON, M., HART, G. & KINOSHITA, T.** (2017). Glycosylphosphatidylinositol Anchors. En *Essentials of Glycobiology*. 3rd. edition.
- FRANK, C. G. & AEBI, M.** (2005). ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology*, 15(11), 1156–1163. 10.1093/glycob/cwj002.
- GAO, X.-D., NISHIKAWA, A. & DEAN, N.** (2004). Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*, 14(6), 559–570. 10.1007/978-4-431-54240-7_14.
- GARCÍA-FRUITÓS, E.** (2014). *Insoluble proteins: Methods and protocols*. 10.1007/978-1-4939-2205-5.
- GERKEN, T. A., TEN HAGEN, K. G. & JAMISON, O.** (2008). Conservation of peptide acceptor preferences between drosophila and mammalian polypeptide-GalNAc transferase ortholog pairs. *Glycobiology*, 18(11), 861–870. 10.1093/glycob/cwn073.

- GÖTTING, C., KUHN, J. & KLEESIEK, K.** (2007). Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci.*, 64(12), 1498–1517.
- HARADA, Y., LI, H., LI, H. & LENNARZ, W. J.** (2009). Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (17), 6945–6949. 10.1073/pnas.0812489106.
- HEESEN, S. TE, LEHLE, L., WEISSMANN, A. & AEBI, M.** (1994). Isolation of the ALG5 Locus Encoding the UDP-Glucose: Dolichyl-Phosphate Glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 224(1), 71–79. 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19996.x.
- HELENIUS, J., NG, D. T. W., MAROLDA, C. L., WALTER, P., VALVANO, M. A. & AEBI, M.** (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature*, 415(6870), 447–450. 10.1038/415447a.
- HU, P., SHIMOJI, S. & HART, G. W.** (2010). Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(12), 2526–2538. 10.1016/j.febslet.2010.04.044.
- IMPERIALI, B. & O'CONNOR, S. E.** (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(6), 643–649. 10.1016/S1367-5931(99)00021-6.
- KÄMPF, M., ABSMANNER, B., SCHWARZ, M. & LEHLE, L.** (2009). Biochemical characterization and membrane topology of Alg2 from *Saccharomyces cerevisiae* as a bifunctional α 1,3- and 1,6-mannosyltransferase involved in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 11900–11912. 10.1074/jbc.M806416200.
- LAIRSON, L. L., HENRISSAT, B., DAVIES, G. J. & WITHERS, S. G.** (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 521–555. 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.
- LINDAHL, U., COUCHMAN, J., KIMATA, K. & ESKO, J.** (2017). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. En *Essentials of Glycobiology*. 3rd. edition.
- LU, J., TAKAHASHI, T., OHOKA, A., NAKAJIMA, K. I., HASHIMOTO, R., MIURA, N., TACHIKAWA, H. & GAO, X. D.** (2012). Alg14 organizes the formation of a multiglycosyltransferase complex involved in initiation of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology*, 22(4), 504–516. 10.1093/glycob/cwr162.
- MAEDA, Y., TANAKA, S., HINO, J., KANGAWA, K. & KINOSHITA, T.** (2000). Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3. *The EMBO journal*, 19(11), 2475–2482. 10.1093/emboj/19.11.2475.
- MATSUI, T., TAKITA, E., SATO, T., KINJO, S., AIZAWA, M., SUGIURA, Y., HAMABATA, T., SAWADA, K. & KATO, K.** (2011). N-glycosylation at noncanonical Asn-X-Cys sequences in plant cells. *Glycobiology*, 21(8), 994–999. 10.1093/glycob/cwq198.

- MELLQUIST, J. L., KASTURI, L., SPITALNIK, S. L. & SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.** (1998). The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, 37(19), 6833–6837. 10.1021/bi972217k.
- MILETICH, J. P. & BORZE JR., G. J.** (1990). B Protein C Is Not Glycosylated at Asparagine 329. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11397–11404.
- MUNRO, S.** (2001). What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus?. *FEBS Letters*, 498(2–3), 223–227. 10.1016/S0014-5793(01)02488-7.
- NEUFELD, E. F. & GINSBURG, V.** (1965). Carbohydrate metabolism. *Annu Rev Biochem.*, 34, 297–312.
- NILSSON, I. & VON HEIJNE, G.** (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5798–5801.
- NILSSON, I. & VON HEIJNE, G.** (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17338–17343. 10.1074/jbc.M002317200.
- NILSSON, I., LARA, P., HESSA, T., JOHNSON, A. E., VON HEIJNE, G. & KARAMYSHEV, A. L.** (2015). The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence. *J Mol Biol.*, 427(6 Pt A), 1191–1201. 10.1016/j.jmb.2014.06.014.The.
- PÉANNE, R., VANBESELAERE, J., VICOONE, D., MIR, A.-M., BIOT, C., MATTHIJS, G., GUÉRARDE, Y., & FOULQUIER, F.** (2013). Chapter 10: Assessing ER and Golgi N-Glycosylation Process Using Metabolic Labeling in Mammalian Cultured Cells. En *Methods in Cell Biology* (pp. 157–176). 10.1016/B978-0-12-417164-0.00010-0.
- RAJAS, O., QUIRÓS, L. M., ORTEGA, M., VAZQUEZ-ESPINOSA, E., MERAYO-LLOVES, J., VAZQUEZ, F. & GARCÍA, B.** (2017). Glycosaminoglycans are involved in bacterial adherence to lung cells. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 319. 10.1186/s12879-017-2418-5.
- RIP, J. W., RUPAR, C. A., RAVI, K. & CARROLL, K. K.** (1985). Distribution, metabolism and function of dolichol and polyprenols. *Progress in Lipid Research*, 24(4), 269–309. 10.1016/0163-7827(85)90008-6.
- RUSH, J. S., GAO, N., LEHRMAN, M. A., MATVEEV, S. & WAECHTER, C. J.** (2009). Suppression of Rft1 expression does not impair the transbilayer movement of Man5GlcNAc2-P-P-dolichol in sealed microsomes from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), 19835–19842. 10.1074/jbc.M109.000893.
- SAKAIDANI, Y., FURUKAWA, K. & OKAJIMA, T.** (2010). O-GlcNAc modification of the extracellular domain of Notch receptors. *Methods Enzymol.*, 480, 355–373.
- SATO, C., KIM, J.-H., ABE, Y., SAITO, K., YOKOYAMA, S. & KOHDA, D.** (2000). Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys

sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *J Biochem.*, 127(1), 65–72.

- SCHNAAR, R. & KINOSHITA, T.** (2017). Glycosphingolipids. En *Essentials of Glycobiology*. 3rd. edition.
- SCHNAAR, R. L.** (2015). Glycans and glycan binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist. *J Allergy Clin Immunol.* 2015, 135(3), 609–615. 10.1016/j.jaci.2014.10.057.Glycans.
- SCHWARZ, F. & AEBI, M.** (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), 576–582. 10.1016/j.sbi.2011.08.005.
- SIEGEL, V.** (1995). A second signal recognition event required for translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell*, 82(2), 167–170. 10.1016/0092-8674(95)90301-1.
- SPRINGER, S. A. & GAGNEUX, P.** (2013). Glycan evolution in response to collaboration, conflict, and constraint. *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), 6904–6911. 10.1074/jbc.R112.424523.
- WANG, P., WANG, H., GAI, J., TIAN, X., ZHANG, X., LV, Y. & JIAN, Y.** (2017). Evolution of protein N-glycosylation process in Golgi apparatus which shapes diversity of protein N-glycan structures in plants, animals and fungi. *Scientific Reports*, 7, 1–13. 10.1038/srep40301.
- WELTI, M.** (2013). Regulation of dolichol-linked glycosylation. *Glycoconjugate Journal*, 30(1), 51–56. 10.1007/s10719-012-9417-y.
- WEST, C. & HART, G.** (2017). Nucleocytoplasmic Glycosylation. En *Essentials of Glycobiology*. 3rd. edition.

3 Rol biológico de los glicanos

NATALIA CEAGLIO

3.1. INTRODUCCIÓN

Existen muchas «teorías» acerca de la función de los oligosacáridos en las diferentes clases de glicoconjugados. Ajit Varki, un experto que se ha dedicado a estudiar la glicosilación desde los años 80, postula que en principio todas las teorías acerca del rol biológico de los glicanos serían correctas, y que la gran diversidad y complejidad de estas moléculas no se ha podido explicar aún con una única teoría en común. No obstante, es importante destacar que si bien la evidencia experimental obtenida indica que todas las teorías son probables, también se pueden encontrar excepciones para cada caso (Varki, 1993; Varki, 2017).

Los glicanos se encuentran distribuidos de forma ubicua en todas las células vivas y en el ambiente extracelular de los organismos multicelulares (Cohen, 2015), representan uno de los cuatro grupos de macromoléculas con relevancia biológica que permiten la existencia de los seres vivos. Así, del mismo modo que los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, los carbohidratos son esenciales para la vida y exhiben propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales únicas que podrían conferir beneficios o, más aún, favorecer determinados eventos evolutivos. Tanto es así que Lauc *et al.* (2014) se han aventurado a proponer que la invención de los glicanos ha sido la «tercera revolución durante la evolución», luego de la aparición de los ácidos nucleicos y las proteínas.

No obstante, contrariamente a lo que ocurre con las proteínas, que se sintetizan de manera directa a partir de un molde de ADN, los glicanos son un producto que surge a partir de un camino biosintético complejo, el cual se halla afectado por miles de factores genéticos y ambientales, derivando en una enorme complejidad y variedad de estructuras. La diversidad en la glicosilación se encuentra en todos los niveles de organización biológica: entre especies, dentro de poblaciones de la misma especie y también dentro de diferentes moléculas y tipos celulares dentro del mismo organismo (Kobata, 1992; Tsuji, 1996). De esta manera, la composición y estructura de los glicanos dependerá de la expresión diferencial de las enzimas involucradas en los diferentes tejidos y tipos celulares, de la disponibilidad de sustrato y de condiciones ambientales, y podría cambiar a medida que la célula sufre procesos de desarrollo, activación, diferenciación, inflamación y cáncer (Lauc

et al., 2014; Krasnova & Wong, 2016). Esta batería de estructuras sería clave para permitir el desarrollo de nuevas funciones en organismos multicelulares.

Por otra parte, la conjugación de glicanos a otras moléculas, por ejemplo a proteínas, ha ampliado el espectro de funciones de las mismas en organismos complejos (Elbein, 1991). Asimismo, la naturaleza parece haber aprovechado de la amplia diversidad de glicanos que se expresan en dichos organismos permitiendo la evolución de proteínas que reconocen glicanos discretos, que, como se verá posteriormente, son denominadas proteínas de unión a glicanos (GBPs, del inglés *glycan binding proteins*), mediando así procesos fisiológicos o patológicos específicos (Cohen, 2015; Varki *et al.*, 2009, cap. 26).

El rol biológico de los oligosacáridos parece abarcar desde aquellas funciones que son triviales hasta aquellas cruciales para el desarrollo, crecimiento o supervivencia de un organismo (Varki, 2017). Por otra parte, existen aún muchos glicanos cuya función se desconoce completamente. La ausencia de glicosilación es embriónicamente letal (Marek *et al.*, 1999) y las mutaciones que obstruyen o impiden una adecuada glicosilación causan enfermedades debilitantes (Freeze, 2006). Desafortunadamente, gran parte del panorama se pierde cuando se estudian las proteínas sin sus glicanos, o conjugadas a glicanos de estructura inadecuada o diferente a la natural, como ocurre durante la producción de glicoproteínas recombinantes en otros organismos, tipos celulares o ambientes no naturales (Lauc *et al.*, 2014).

En el presente capítulo se brindará un panorama general de las funciones de diferentes tipos de glicanos, intentando ilustrar una pequeña fracción de la amplia variedad de roles que los mismos cumplen en numerosos procesos biológicos con algunos ejemplos que, sin duda, resultarán limitados para tal fin. Además, en virtud de la temática del libro, se hará hincapié en la influencia de los glicanos sobre la estructura y/o función de glicoproteínas terapéuticas, incluyendo hormonas, citoquinas, enzimas y anticuerpos.

3.2. CONSIDERACIONES GENERALES Y CLASIFICACIÓN DEL ROL BIOLÓGICO DE LOS GLICANOS

Existen determinados «principios generales» acerca del rol biológico de los glicanos (Varki & Lowe, 2009, cap. 6; Varki, 2017):

- Las consecuencias biológicas de alterar la glicosilación en diferentes sistemas parece ser altamente variable e impredecible. *A priori* es difícil predecir la función de un oligosacárido en un determinado glicoconjugado y su importancia relativa dentro de un organismo. Existen diferentes estrategias para evaluar la función de glicanos: evitar la glicosilación, evitar la elongación de las cadenas, deglicosilación enzimática o química, mutación genética de sitios de glicosilación, estudio de mutantes naturales o generación de mutantes con defectos genéticos de las vías de glicosilación

- (Olden *et al.*, 1985; Elbein, 1991); interferencia de la interacción glicano–GBP mediante el uso de anticuerpos, entre otras (Smith & Cummings, 2013). Las consecuencias de dicha interferencia varían desde ser esencialmente indetectables hasta la pérdida completa de funciones particulares. También dependerán del tipo de célula o si el estudio se realiza *in vivo* o *in vitro*.
- La misma secuencia de glicanos puede mediar diferentes funciones en diferentes tejidos dentro del mismo organismo o en diferentes estadios de su desarrollo (funciones intrínsecas del organismo) o en diferentes contextos ambientales (funciones extrínsecas del organismo). Por ejemplo, si bien los glicanos conteniendo manosa–6–fosfato (M6P) están involucrados en el tráfico hacia el lisosoma, se han encontrado también en otras proteínas no relacionadas y podrían ejercer funciones propias de las mismas.
 - De forma muy general, se podría decir que las funciones más específicas y cruciales de los oligosacáridos son mediadas por 3 características de los glicanos: secuencias inusuales, secuencias terminales y modificaciones de los glicanos (sulfatación, fosforilación, etc.). Dichas características también son probablemente los blancos para la interacción con microorganismos patógenos y toxinas. Quizás como una consecuencia, las variaciones de la glicosilación intra– e inter–especies son rasgos relativamente comunes (Varki *et al.*, 2009; cap. 19).
 - Finalmente, resulta sencillo obtener defectos genéticos de la glicosilación en células en cultivo para su estudio. Lamentablemente, las consecuencias de dichas alteraciones suelen ser limitadas (Lowe & Marth, 2003). No obstante, los mismos defectos en un organismo intacto pueden tener consecuencias más importantes y hasta catastróficas (Ioffe & Stanley, 1994). Esto deja claro que las principales funciones de los glicanos son operativas solo en organismos intactos, e indica la importancia de realizar estudios de este tipo para dilucidar los roles aún desconocidos de los oligosacáridos.

Los roles de los glicanos son numerosos y pueden superponerse, por lo que no resulta fácil realizar una clasificación general. Lowe y Marth (2003) los han dividido de acuerdo con su estructura en:

- Funciones de los glicanos del núcleo y proximales: los mismos son compartidos dentro de las clases particulares de glicanos (N–glicanos, O–glicanos, glicolípidos, glicosaminoglicanos, anclaje GPI y hialuronos) y, debido a su posición proximal durante la biosíntesis, se encuentran presentes e inalterados a pesar de los subsiguientes pasos de síntesis o hidrólisis. Dado que estos glicanos son conservados, es de esperar que cualquier alteración en su estructura afecte múltiples sistemas y tipos celulares, aunque la existencia de isoenzimas ha demostrado algún tipo de especificidad entre sistemas fisiológicos.
- Funciones de los glicanos terminales y sus modificaciones: sialidación, fucosilación, sulfatación, fosforilación, entre otros, los cuales pueden ser

distinguidos de los glicanos del núcleo por su posición distal durante la biosíntesis y porque en general son expresados de manera célula-específica.

No obstante, teniendo en cuenta su función propiamente dicha y no su estructura, Varki (1993, 2017) ha clasificado al rol de los glicanos en dos grandes categorías, en las cuales nos basaremos en el resto del capítulo:

1. Funciones propias de los glicanos, no relacionadas a su interacción con otra molécula: existen diversas funciones que los glúcidos cumplen o por sí mismos o dentro de un glicoconjugado, basadas en efectos estructurales, físicos y moduladores (que pueden resumirse como «funciones estructurales y moduladoras»).
2. Funciones que involucran el reconocimiento específico de los glicanos por otras moléculas, más comúnmente a proteínas de unión a glicanos (GBPs).

Las proteínas de unión a glicanos pueden dividirse a su vez en dos categorías: GBPs intrínsecas, las cuales reconocen glicanos del mismo organismo que generalmente median las interacciones célula-célula o reconocen moléculas extracelulares; y GBPs extrínsecas, que reconocen glicanos de un organismo diferente, mayormente provienen de patógenos microbianos, como adhesinas, aglutininas y toxinas, pero que también pueden mediar relaciones simbióticas, como la flora intestinal. Estos dos tipos de reconocimiento a través de glicanos actúan como fuerzas opuestas que dirigen selectivamente el cambio evolutivo, lo que parcialmente origina la enorme diversidad de estructuras glicosídicas encontradas en la naturaleza (Gagneaux & Varki, 1999).

Un último aspecto que podría ser considerado un rol adicional de los glicanos consiste en la mimetización de patógenos microbianos mediante una «decoración» con glicanos típicos de su huésped, con el fin de evadir la respuesta inmune.

En la siguiente sección se describirán los roles mencionados haciendo uso de diversos ejemplos.

3.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS GLICANOS: UNA PEQUEÑA COMPILACIÓN DE EJEMPLOS PARA ILUSTRAR LA AMPLITUD DE ROLES DE LOS OLIGOSACÁRIDOS EN DIVERSOS PROCESOS BIOLÓGICOS

3.3.1. Funciones etructurales moduladoras

Los glicanos pueden unirse a diferentes moléculas para dar lugar a glicoconjugados o pueden ser entidades moleculares por sí mismas. Si bien se hará mención de las funciones de ciertos glúcidos que no se pueden pasar por alto dada su importancia en la naturaleza, se describirán con mayor detalle

las funciones biológicas de los glicanos sobre glicoproteínas terapéuticas, que es sobre lo cual versa el presente libro.

3.3.2. Funciones estructurales «generales»

Dentro de las funciones estructurales «generales» de los glicanos, se pueden mencionar las funciones que cumplen como «barrera» y, de esta manera, «protectoras». El *glicocálix endotelial* (localizado entre la corriente sanguínea y el endotelio) está compuesto principalmente por proteoglicanos y glicoproteínas y es un importante determinante de la permeabilidad vascular, actuando como barrera permeable solo a determinadas moléculas (Varki & Sharon, 2009; Stonebraker *et al.*, 2004). Las *cubiertas de polisacáridos que exhiben diversos procariotas* también representan una barrera física sustancial, protegiéndolos de la fagocitosis y también otorgándole funciones de adhesión que permiten, en ciertos casos, iniciar el proceso de infección (Moran *et al.*, 2011). Los *O-glicanos de las mucinas* que forman parte del glicocálix del epitelio de la superficie ocular tienen una función muy importante como barrera; los O-glicanos de las mucinas mantienen una conformación extendida y rígida, permitiendo que las mismas se extiendan 300 nm desde la membrana apical de las células apicales de la superficie ocular, y constituyendo así una barrera (mediada también por su interacción con galectina-3) que, por ejemplo, previene la adhesión de bacterias o de cualquier elemento extraño. Por ejemplo, experimentos con colorantes indican que la penetración de los mismos se correlaciona con la síntesis de O-glicanos (Guzman-Aranguez & Argüeso, 2010; Ablamowicz & Nichols, 2016).

Los glicanos también exhiben funciones «organizacionales» y «estabilizadoras». Por ejemplo, aquellos unidos a las moléculas de la matriz extracelular (como los glucosaminoglucanos (GAG) de los proteoglicanos; estos últimos contienen 95 % de GAG y 5 % de proteína) son importantes para el mantenimiento de la estructura, porosidad e integridad de los tejidos. El tipo de GAG que se encuentra está determinado por el tipo de tejido (por ejemplo, en cartílago se encuentran como GAG predominantes el sulfato de coindroitina y el sulfato de keratano) (Varki & Sharon, 2009; Couchman & Pataki, 2012).

La matriz extracelular consiste en una variedad de glicoconjugados; los dos más importantes son los *proteoglicanos* y las *proteínas fibrosas* con funciones estructurales (colágeno, que otorga resistencia mecánica, y elastina, que otorga elasticidad) y funciones adhesivas (fibronectina, laminina). Cada uno de ellos demuestra sitios de unión a diversos tipos de cadenas de azúcares que ayudan a la organización general de la matriz. Para nombrar algunos ejemplos, la fibronectina y el colágeno contienen sitios de unión a sulfato de heparina, que permiten la organización de la membrana basal y la matriz extracelular. El sulfato de condroitina y de keratano contribuye a la organización y la fuerza de tracción del cartílago. Se ha demostrado que la cadena de sulfato de condroitina

del proteoglicano decorina es requerida para la organización de la fibronectina en la matriz extracelular de células CHO, dictando así el fenotipo de las células en cultivo. En otro caso, la función de unión a beta-galactósidos de una lectina soluble parece estar involucrada en la organización de la elastina en la matriz extracelular (Sarrazin *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2005).

3.3.3. Funciones estructurales y moduladoras particulares de las glicoproteínas

Las funciones mencionadas anteriormente, que podrían considerarse como «fisiológicas», se superponen con los efectos directos que ejercen los glicanos dentro de la estructura de las glicoproteínas. Los glicanos son moléculas hidrofílicas de gran tamaño que pueden modular el plegamiento y la estabilidad de las proteínas que modifican. Dentro de las funciones estructurales y moduladoras específicas de las glicoproteínas, en muchos casos se ha demostrado que los oligosacáridos están involucrados en la iniciación del plegamiento correcto del polipéptido en el RE rugoso y en el mantenimiento subsecuente de la solubilidad y conformación de la proteína. De esta manera, aquellas proteínas que son incorrectamente glicosiladas no pueden plegarse correctamente, no egresan del RE y, en consecuencia, son degradadas. Mediante una contribución sustancial de la hidrofobicidad general del polipéptido, los glicanos inhiben la posible agregación causada por la exposición inevitable de parches hidrofóbicos en las cadenas polipeptídicas que aún no están estructuradas (Ruddok & Molinari, 2006; Nagae & Yamaguchi, 2012).

El RE es el lugar en donde se sintetizan las proteínas que ingresan a la vía secretoria. Previo a su salida, las proteínas adquieren su estructura terciaria y, de ser necesario, se ensamblan en oligómeros funcionales. Para facilitar estos procesos existen una gran variedad de chaperonas y enzimas facilitadoras del plegamiento. Asimismo, el estado de plegamiento es monitoreado por un sistema de control de calidad, el cual retiene en el RE a aquellas especies que no han adquirido su conformación nativa. Si una proteína es incapaz de plegarse correctamente es retenida en el RE y eventualmente es retrotraslocada al citosol para ser degradada por el proteasoma. En glicoproteínas, los N-glicanos son utilizados también durante la maduración como un sistema que codifica información acerca de su estado conformacional, siendo un elemento clave en varias instancias decisivas a lo largo de la vía secretoria. Es de conocimiento que un polipéptido naciente con un motivo N-X-S/T es sustrato de la enzima oligosacaryltransferasa (OST), quien le transfiere en bloque el oligosacárido GlcNAc₂Man₉Glc₃. Posteriormente, la glicoproteína naciente accede a un sistema de chaperonas calnexina/calreticulina; el acceso a este complejo requiere la remoción de los dos residuos de glucosas por las glucosidasas G1 y G11. La disociación de la glicoproteína del complejo se produce cuando se hidroliza la tercera glucosa, dando lugar así a la secreción

de la proteína correctamente plegada. Si la proteína no está correctamente plegada, se producen una serie de ciclos de deglucosilación/glucosilación para darle posibilidad a la misma para que se pliegue correctamente. No obstante, aquellos polipéptidos que no han podido adquirir la estructura terciaria correcta son reconocidos por un sistema que progresivamente desmantela los N-glicanos mediante remoción secuencial de los residuos de manosa, que son retrotraslocados al citosol y degradados en el proteosoma, proceso que se conoce como ERAD (*ER-associated degradation*) (Helenius & Aebi, 2001; Caramelo, 2009; Parodi, 2000).

No obstante, existen muchos ejemplos de proteínas cuya síntesis, plegamiento y tráfico no son afectados por alteración de su glucosilación, lo que se incluye dentro de las «excepciones» que se mencionaron previamente (es decir, mientras que puede encontrarse evidencia para muchas teorías que explican el rol de los glicanos, también se encuentran excepciones para cada caso).

En glicoproteínas, los oligosacáridos pueden proveer función protectora frente al reconocimiento del polipéptido por proteasas y anticuerpos; también se han encontrado excepciones en las cuales la modificación de los glicanos no interfiere con la sensibilidad de la glicoproteína a la proteólisis o al reconocimiento inmune.

En muchos casos, la presencia de N-glicanos aumenta la estabilidad térmica de una proteína y disminuye su susceptibilidad a proteasas. Sin embargo, en otros tantos casos la estabilidad de una glicoproteína no se ve afectada luego de deglicosilarla.

Por otra parte, en general los glicanos disminuyen la tendencia a formar agregados proteicos, aumentando marcadamente la reversibilidad de los procesos de desnaturalización. Esto puede adscribirse a un efecto de «protección hidrofílica», en donde el glicano cubre la superficie proteica previniendo las interacciones inespecíficas, comportándose como chaperonas químicas. A nivel de la estructura local, la presencia de un glicano favorece la formación de giros en la cadena polipeptídica, y muy comúnmente se los encuentra en este tipo de estructuras (Fields *et al.*, 1992; Schental-Bechor & Levy, 2010).

Es probable que las funciones estructurales, protectoras y estabilizantes de los glicanos no hayan requerido la complejidad de estructuras que hoy se encuentran en la naturaleza para ejercerse. En concordancia con esto, los inhibidores que solo afectan los pasos de procesamiento de glicanos más avanzados en general no interfieren con este tipo de funciones. De esta manera, estas funciones no son la causa, o mejor dicho, no explican la extensa diversidad estructural que existe en la naturaleza.

En relación con las propiedades moduladoras, la glucosilación puede modular la interacción entre proteínas. Por ejemplo, algunos factores de crecimiento parecen adquirir su capacidad de unión dependiente de la glucosilación mientras están en tránsito en el aparato de Golgi. Esto podría limitar interacciones tempranas no deseadas entre el receptor recién sintetizado y un factor de crecimiento que es sintetizado por la misma célula (Varki & Lowe, 2009).

La glicosilación también puede mediar un efecto «on-off» en las funciones de proteínas: por ejemplo, cuando la gonadotropina coriónica humana (hCG) se encuentra deglicosilada en la Asn52 aún puede unirse a su receptor con similar afinidad pero no puede estimular la adenilato ciclasa. En la mayoría de los casos, no existe un efecto «on-off» tan marcado, sino parcial, ya que los glicanos pueden modular la función hacia un lado u otro. Por ejemplo, la función de muchas hormonas y citoquinas puede ser modulada por su grado de glicosilación. Este concepto es muy importante para el desarrollo de un proceso biotecnológico, ya que permite determinar cuál conjunto de glicofomas producidas por células en cultivo son las necesarias para ejercer la actividad deseada. Un ejemplo muy claro de estas funciones moduladoras es el de las hormonas glicoproteicas humanas: hormona folículoestimulante (hFSH), hormona luteinizante (hLH) y hCG, las cuales poseen una subunidad alfa en común y difieren en su subunidad beta. Además, la glicosilación es diferente entre ellas y en diferentes estadios del desarrollo. En mujeres jóvenes fértiles se ha encontrado FSH cuyas cadenas de N-glicanos se encuentran mayormente unidas a dos sitios, mientras que en mujeres menopáusicas la FSH se encuentra mayoritariamente glicosilada en sus cuatro sitios de N-glicosilación. Esto indicaría una diferencia de función de acuerdo con la edad fértil (Matzuk *et al*, 1989; Bousfield & Dias, 2011; Choi & Smitz, 2014).

De esta manera, la glicosilación parece ser un mecanismo para generar una marcada diversidad funcional a partir de un set limitado de interacciones ligando-receptor utilizando genes derivados de un único genoma. Por supuesto, existen excepciones a estos conceptos, ya que muchas interacciones ligando-receptor son independientes de la glicosilación y por lo tanto no se ven afectadas por cambios en la misma.

3.3.4. Funciones de reconocimiento intrínseco

El reconocimiento de glicanos por GBPs del mismo organismo permite que estos ejerzan funciones de diversos tipos:

3.3.4.1. Tráfico intracelular

El mejor ejemplo de esta función es el rol de los residuos de manosa-6-fosfato (M6P) para dirigir las enzimas lisosomales hacia su destino final, el lisosoma. En células eucariotas, los receptores de M6P (MPRS) median la distribución de más de 60 proteínas hacia el lisosoma mediante unión de los residuos M6P de sus N-glicanos. Existen dos tipos diferentes de MPRS, el dependiente de cationes de 46 kDa (CD-MPR) y el independiente de cationes de ~300 kDa (CI-MPR), los cuales son los únicos miembros de la familia de lectinas tipo P. Las proteínas lisosomales se distinguen de otras en el camino secretorio

adquiriendo los residuos de M6P en dos pasos: 1) La fosfotransferasa de GlcNAc transfiere una GlcNAc1-P a uno o dos residuos de manosa de un N-glicano para dar lugar a un intermediario fosfodiéster y 2) la N-acetilglucosaminidasa remueve el residuo GlcNAc en la red trans-Golgi (TGN, *Trans-Golgi Network*) para generar el fosfomonoéster M6P. El complejo MPR/enzima lisosomal se transporta a través de la TGN hacia el endosoma tardío donde el bajo pH induce su disociación. Las enzimas liberadas son empacadas en lisosomas y los receptores pueden seguir dos caminos: retornar al Golgi para repetir el proceso, o dirigirse hacia la membrana plasmática para internalizar ligandos exógenos. La importancia de este sistema de reconocimiento en la biogénesis de los lisosomas se encuentra ilustrada por las más de 40 enfermedades lisosomales de acumulación que se estima afectan entre 1 a 5000 nacidos vivos. Por ejemplo, los estados patológicos en los cuales la fosforilación es deficiente (como la pseudo-polidistrofia de Hurler) se caracterizan por una imposibilidad de dirigir las proteínas al lisosoma en diferentes tipos celulares. Sin embargo, también a esta función precisa y elegante se encuentran excepciones: la M6P no es absolutamente requerida para el tráfico lisosomal en algunos eucariotas inferiores, y también se han descrito otros receptores endocíticos que reconocen secuencias de carbohidratos específicos, pero cuya función aún no se ha dilucidado (Kim *et al.*, 2009).

3.3.4.2. Tráfico extracelular

Como ya se ha mencionado, la glicosilación posee un efecto sobre la estabilidad de las proteínas a la proteólisis, que presumiblemente afecta su degradación y vida media dentro de una única célula, aunque también puede ocurrir en espacios extracelulares como la circulación sanguínea. En organismos intactos o completos, el reconocimiento de secuencias de oligosacáridos por determinados receptores puede resultar en la remoción de los glicoconjugados o hasta de la célula completa que despliega ese glicano de la circulación. Existen diferentes receptores de carbohidratos de la superficie celular de tipo lectinas que están involucrados en el *clearance* de productos sanguíneos.

Uno de los receptores más estudiados es el receptor hepático de asialoglicoproteínas (también conocido como receptor de Ashwell, por ser quien lo descubrió), que remueve aquellas proteínas glicosiladas que carecen de ácido siálico terminal (y, por ende, dejan expuestos residuos de Gal) de la circulación. Por lo tanto, el contenido de ácido siálico puede determinar la vida media en circulación de una glicoproteína. La rápida remoción de glicoproteínas de la circulación sanguínea luego de su desialidación y exposición del residuo Gal β -1,4 fue reportada por primera vez por Ashwell y Morell en los años 70, llevando al descubrimiento del receptor de asialoglicoproteínas (ASGP-R). No obstante, más recientemente, se ha descubierto que las glicoproteínas que contienen ácido siálico unido a la Gal mediante un enlace α -2,6 pueden ser

removidas del torrente sanguíneo por el ASGP-R. Contrariamente, aquellos residuos de ácido siálico unidos mediante enlace α -2,3 impiden la interacción con el ASGP-R y, por ende, incrementan la vida media de la glicoproteína. Diferentes estudios hipotetizan que el ASGP-R se uniría a los grupos hidroxilo unidos al C3 y C4 de la Gal. Mientras que el ácido siálico α -2,3 bloquearía el acceso a ambos hidroxilos mediante reemplazo del OH del C3 con un enlace glicosídico y potencial impedimento estérico sobre el OH del C4, el ácido siálico α -2,6 permitiría el acceso a los mismos. La regulación de la expresión de las α -2,3 y α -2,6 sialiltransferasas podría determinar que una proteína sea removida más o menos rápidamente de la circulación mediante este mecanismo (Morell *et al.*, 1971; Ashwell y Morell, 1974; Park *et al.*, 2005).

Un ejemplo de una glicoproteína cuya vida media en circulación es extremadamente rápida en ausencia de ácido siálico es la eritropoyetina, cuyas vías de eliminación principales son la filtración renal y *clearance* por ASGP-R (Imai *et al.*, 1990). Otro ejemplo lo constituye la vía de eliminación del factor de von Willebrand cuando se encuentra desialilado, ya que de lo contrario la eliminación se produce a través de otros receptores no relacionados a la glicosilación (O'Sullivan *et al.*, 2016). En relación con las células completas, el *clearance* de plaquetas por el hígado puede contrarrestar la coagulación peligrosa que puede ocurrir durante la sepsis. El mecanismo involucra el *clearance* a través del ASGP-R, que se une a las glicoproteínas alteradas por las bacterias causantes de la sepsis (Tao *et al.*, 2017).

Es interesante destacar nuevamente la importancia de los residuos terminales de los glicanos para ejercer una determinada función, en este caso, la de participar en los procesos de tráfico tanto intracelular como extracelular. Como se mencionó (sección 2), uno de los principios que emergen de la generalización de las funciones de los glicanos es que aquellas más relevantes están ejercidas por tres características, siendo una de ellas el tipo de residuo terminal de la cadena de oligosacáridos.

3.3.4.3 Funciones hormonales

Actualmente se sabe que los oligosacáridos libres pueden tener efectos biológicos por sí mismos en diferentes sistemas, actuando de esta manera como hormonas. Un ejemplo son los fragmentos de heparan o dermatan sulfato liberados por ciertos tipos celulares, que pueden tener efectos en situaciones complejas como en la reparación de heridas (Kosir *et al.*, 2000). También se han descrito las propiedades bioactivas de fragmentos de ácido hialurónico en sistemas de mamíferos. En células de cáncer, oligosacáridos de ácido hialurónico inducen apoptosis e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* (Safdar *et al.*, 2017). No obstante, en la mayoría de los casos los receptores putativos de estas moléculas y sus mecanismos de acción aún no han sido caracterizados.

3.3.4.4. Reconocimiento célula–célula y célula–matriz

Debido a que las células se encuentran recubiertas con una densa capa de azúcares, es lógico pensar que los oligosacáridos deberían ser determinantes críticos en la interacción célula–célula, y así se ha demostrado. Uno de los ejemplos más caracterizados es el de la familia de moléculas de adhesión de las selectinas, que reconocen estructuras glicosídicas de sus ligandos y así median interacciones críticas entre células sanguíneas y células vasculares (L-selectina, leucocitos–células endoteliales; E-selectina, leucocitos–endotelio estimulado o herido; P-selectina, plaquetas activadas o endotelio–leucocitos) en una amplia variedad de condiciones normales y patológicas (Varki *et al.*, 2009, cap. 26; Dickramer & Taylor, 1993). Recientemente se ha observado que ciertos sitios críticos de reconocimiento son en realidad combinaciones de glicanos y proteínas. Por ejemplo, la P-selectina reconoce el ligando genérico de selectinas sialil LewisX con alta afinidad solo en el contexto de los 13 aminoácidos amino–terminales del ligando glicoproteico de P-selectina–1 (PSGL–1), que incluye ciertos residuos de tirosina sulfatados requeridos (Hirose *et al.*, 1998). Las interacciones entre carbohidratos también pueden tener un rol específico en interacciones célula–célula y adhesión. Un ejemplo es la compactación del embrión murino en el estadio mórula (12–16 células), que se encuentra facilitada por interacciones LewisX–LewisX, las cuales no son fuertes de manera individual, pero si están en gran cantidad generan un efecto «velcro» (Fenderson *et al.*, 1984).

3.3.5. Funciones de reconocimiento extrínseco

Como se mencionó anteriormente, muchos glicanos pueden actuar como sitios específicos de unión a una gran variedad de virus, bacterias y parásitos, y actuar como blancos de reconocimiento de muchas toxinas bacterianas y de plantas, cumpliendo así las denominadas funciones de reconocimiento extrínseco, es decir por GBPs de otros organismos. A continuación se describen algunas de ellas.

3.3.5.1. Reconocimiento de agentes nocivos (función «traidora» o «traicionera»)

La exquisita especificidad de reconocimiento de la secuencia de un oligosacárido por virus, bacterias y parásitos es indiscutible. Un ejemplo destacado lo constituyen las hemaglutininas de muchos virus que reconocen específicamente el tipo de ácido siálico del huésped, sus modificaciones (el ácido siálico puede ser hidroxilado para formar el ácido glicolilneuramínico; también puede ser acetilado, metilado y sulfatado en sus grupos hidroxilo) y hasta el

tipo de unión a la cadena de oligosacáridos (α -2,3, α -2,6). La hemaglutinina del virus de la influenza es una proteína transmembrana trimérica compuesta por un dominio globular HA1 y otro HA2. Cada dominio HA1 interactúa con ácido siálico. Los virus de la influenza aviar preferentemente se unen a los receptores celulares que contienen residuos de ácido siálico unidos mediante enlaces α -2,3, mientras que los virus de la influenza humana se unen a receptores que contienen ácido siálico unido por enlace α -2,6. La sustitución de muy pocos residuos en la hemaglutinina viral puede alterar la especificidad del receptor del virus de la influenza y también la transmisión del virus (Imai & Kawaoka, 2012; Xiong *et al.*, 2014; Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

Otro ejemplo son las toxinas bacterianas, como la toxina del cólera, que se une con gran especificidad al gangliósido GM1 (un oligosacárido que contiene ácido siálico unido a un lípido ceramida) pero no a otras estructuras relacionadas. Así, puede entrar a la célula y, luego de eludir todos los mecanismos de degradación celular, logra intoxicarla mediante un desbalance osmótico (Fishman, 1982).

De la misma manera, los oligosacáridos sintetizados de manera incompleta (o parcialmente degradados) como el antígeno Tn pueden comportarse como autoantígenos en el hombre (Fu *et al.*, 2016).

Esta especificidad es indudable y ha sido de gran utilidad para investigar estas estructuras glicosídicas o como herramientas biotecnológicas. No obstante, para el organismo que los sintetiza, proveer estas señales para ayudar al éxito del microorganismo patógeno o para permitir el auto-daño autoinmune no representa ninguna ventaja (Varki & Lowe, 2009, cap. 6).

3.3.5.2. Protección frente a microorganismos y anticuerpos (función «enmascaradora» o «señuelo»)

Así como algunos oligosacáridos pueden funcionar como sitios de reconocimiento para el ataque microbiano o inmune, otros pueden servir para anular estas reacciones perjudiciales. Algunos organismos han desarrollado la habilidad de enmascarar o modificar glicanos reconocidos por microorganismos, toxinas o anticuerpos autoinmunes. Continuando con los ejemplos de la sección anterior, la adición de un único O-acetil éster a la posición 9 del ácido siálico terminal del receptor del virus de la influenza A impide que los mismos se unan. La extensión de la cadena de oligosacáridos del gangliósido GM1 previene la unión de la toxina colérica. La adición de galactosa y ácido siálico al antígeno Tn impide su reactividad autoinmune (MacKenzie *et al.*, 1997; Varki & Gagneaux, 2012; Fu *et al.*, 2016; Wasik *et al.*, 2016).

Por otra parte, las secuencias de glicanos en glicoconjugados solubles como las mucinas pueden actuar como «señuelos» para microorganismos y parásitos. De esta manera, un organismo patógeno o una toxina buscando

unirse a la membrana mucosa de una célula pueden encontrar antes su ligando glicosídico específico unido a una mucina soluble, que luego puede ser eliminada mediante acción ciliar, eliminando el daño potencial para las células adyacentes. También, el ácido siálico presente en la superficie de los glóbulos rojos, que constituyen células anucleadas, puede servir de señuelo para evitar la acción de virus que llegan a la circulación, ya que los mismos no pueden replicarse (Varki & Gagneaux, 2012; Yu *et al.*, 2014). En estos casos el huésped puede dirigir la especificidad del receptor del patógeno hacia su propia conveniencia.

3.3.5.3. Mimetismo molecular de agentes patógenos

En contraposición a la función «señuelo», algunos patógenos que invaden animales multicelulares a veces se «decoran» a sí mismos con estructuras de glicanos que parecen ser idénticas o casi idénticas a aquellas encontradas en la superficie celular de sus huéspedes. Estos glicanos forman una capa gruesa en la superficie del microbio y de esta manera representan una estrategia exitosa para evadir la respuesta inmune. Los agentes patógenos han desarrollado este mimetismo con el huésped probablemente mediante apropiación directa o indirecta de los glicanos del huésped, evolución hacia caminos biosintéticos similares o hasta transferencia génica lateral. En algunas instancias, el impacto de este fenómeno se agrava por la generación de reacciones autoinmunes (Varki & Gagneaux, 2012).

3.3.5.4. Funciones «simbióticas»

Existen casos en los cuales las relaciones simbióticas entre animales o plantas y microorganismos parecen ser ayudadas por interacciones que involucran oligosacáridos específicos. Por ejemplo, ciertas bacterias comensales del intestino de animales y algunas bacterias formadoras de nódulos en raíces de plantas parecen mediar su unión a las superficies del huésped a través de secuencias específicas de oligosacáridos. En particular, las mucinas altamente O-glicosiladas son utilizadas para el crecimiento, adhesión y protección de los trillones de células microbianas presentes en el lumen del tracto gastrointestinal. Las bacterias simbióticas intestinales son muy importantes para los seres humanos ya que ayudan a la digestión de la comida, producen algunas vitaminas y proveen protección frente a bacterias patógenas. En devolución, las bacterias simbióticas pueden usar los glicoconjugados del huésped para colonizar el intestino y los glicanos del huésped y de la dieta como fuente de energía. En estos casos, el reconocimiento interespecie proporciona una función útil para ambos organismos involucrados (Hooper & Gordon, 2001; Linden *et al.*, 2008).

3.4. ROL BIOLÓGICO DE LOS GLICANOS EN GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

Gran parte de las proteínas terapéuticas, incluyendo citoquinas, hormonas, enzimas y anticuerpos, se hallan glicosiladas. Los oligosacáridos poseen un marcado efecto sobre muchas propiedades biológicas de las glicoproteínas que los contienen, incluyendo su solubilidad, estabilidad (resistencia a proteasas y a degradación térmica), antigenicidad, inmunogenicidad, actividad biológica, farmacocinética y vida media en plasma. Esta modificación resulta clave tanto sobre sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas, como también sobre su eficacia terapéutica. Más aún, como se describe en el Capítulo 6, en las últimas décadas se han desarrollado numerosas estrategias que involucran la ingeniería de la glicosilación, o glicoingeniería, con el objetivo de mejorar la eficacia de glicoproteínas terapéuticas (Elliot *et al.*, 2003; Solá & Griebenow, 2010). A continuación, se detallan los efectos de los diferentes tipos de glicosilación sobre las propiedades de glicoproteínas terapéuticas.

3.4.1. Efectos sobre la solubilidad y agregación

La presencia de oligosacáridos a menudo promueve la solubilidad y evita la agregación de proteínas. Los oligosacáridos podrían contribuir al aumento de la solubilidad de las glicoproteínas mediante el enmascaramiento de grupos hidrofóbicos de su superficie. La N-glicosilación de la α -galactosidasa A (REPLAGAL1; Shire) en la Asn215 es requerida para evitar la exposición de un parche hidrofóbico que facilita la agregación de la proteína (Iaonnou *et al.*, 1998). La α -galactosidasa A es una enzima lisosomal que degrada las uniones α galactosídicas de diversos glicoconjugados, y cuya deficiencia resulta en la acumulación de sus sustratos (especialmente globotriasilceramidas), causando una patología conocida como enfermedad de Fabry. La terapia de esta enfermedad se realiza por reemplazo, es decir, se basa en la administración de la enzima α -galactosidasa A recombinante activa. Por este motivo, es fundamental que la misma se encuentre en un estado conformacional óptimo para ejercer su acción catalítica, y se ha demostrado que la N-glicosilación es fundamental para cumplir dicho objetivo, determinando también el tipo de huésped adecuado para su producción (en este caso, células de mamífero) (Matsuura *et al.*, 1998). Este ejemplo es uno de muchos que describen el efecto de la N-glicosilación sobre la agregación proteica, pero existe una gran cantidad de ejemplos similares, que también involucran la acción de glicanos de tipo O-. Se ha observado que la remoción completa de los O-glicanos del factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF) resulta en un alto nivel de autoagregación, lo cual conduce a su inactivación biológica (Oh-Eda *et al.*, 1990).

La glicoingeniería, a través de la hiperglicosilación alcanzada mediante la adición de nuevos sitios potenciales de N-glicosilación a una proteína, también podría contribuir a evitar o disminuir la agregación de la misma. Por ejemplo, se ha logrado prevenir la agregación inducida por calentamiento a temperaturas superiores a 37 °C del interferón-alfa2b humano recombinante bacteriano (rhIFN- α) mediante la adición de sitios potenciales de N-glicosilación por mutagénesis sitio-dirigida y expresión en células de mamífero. Así, mientras que la incubación del rhIFN- α a temperaturas superiores a su T_m resultó en la aparición de multímeros de elevada masa molecular, no se observaron agregados luego del tratamiento térmico del IFN-4N, una variante hiper-N-glicosilada del hIFN- α que contiene 4 sitios potenciales de N-glicosilación (Ceaglio *et al.*, 2010a) (Figura 3.1A). La elevada hidrofiliidad de los ácidos siálicos presentes en las estructuras de oligosacáridos de tipo complejos que exhibe dicha muteína podría contribuir a bloquear la agregación mediante el enmascaramiento de residuos hidrofóbicos (Gooche *et al.*, 1992).

3.4.2. Efectos sobre la estabilidad térmica

En muchos casos, la remoción total de oligosacáridos de las proteínas lleva a una disminución de su estabilidad térmica. Por ejemplo, la remoción enzimática de los ácidos siálicos de la eritropoyetina humana (hEPO) aumenta su velocidad de desnaturalización a 70 °C (Goochee *et al.*, 1992; Jenkins & Curling, 1994; Chamorey *et al.*, 2002). De este modo, la resistencia de la hEPO a la inactivación térmica se debe en gran parte a la presencia de azúcares, y los ácidos siálicos terminales contribuyen notablemente a dicha estabilidad. Otros experimentos de deglicosilación *in vitro* de distintas proteínas (incluyendo la fetuina sérica bovina, glucoamilasa y ovotransferrina, entre otras) también han demostrado que este comportamiento es dependiente del contenido de carbohidratos, con efectos mayores para proteínas altamente glicosiladas y sin diferencias significativas para glicoproteínas con un contenido modesto de glicanos (menos del 10 %) (Wang *et al.*, 1996).

De manera inversa, el agregado de sitios potenciales de N-glicosilación al hIFN- α bacteriano y al hIFN- α nativo producido en células CHO (que contiene un bajo contenido de glúcidos de tipo O-) resultó en un notable incremento de su resistencia térmica. De esta manera, mientras que la incubación a temperaturas superiores a 70 °C durante 10 min de los IFNs no modificados provocó la pérdida total de su actividad biológica *in vitro*, el IFN4N preservó más del 65 % de su bioactividad luego de la misma incubación a 95 °C (Ceaglio *et al.*, 2010a) (Figura 3.1B).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el incremento de estabilidad térmica mediado por glicanos. Por una parte, el incremento del grado de glicosilación estabilizaría el estado nativo de la proteína mediante

el aumento de las fuerzas de unión no covalentes internas, disminuyendo la dinámica estructural y haciendo más rígida la estructura proteica, llevando así a una mayor estabilidad conformacional. Por otra parte, los glicanos de mayor tamaño parecerían desestabilizar el estado desplegado de la proteína (Solá & Griebenow, 2008; Schental-Bechor & Levy, 2008).

3.4.3. Efectos sobre la estabilidad frente a proteasas

La estabilidad de una glicoproteína *in vivo* generalmente es función de su resistencia al ataque por proteasas. Los carbohidratos pueden ejercer un rol en la protección al ataque de enzimas proteolíticas extracelulares, probablemente mediante el encubrimiento de sitios de clivaje. La presencia de ácidos siálicos terminales protege a la eritropoyetina (EPO) (Goldwasser *et al.*, 1974), al activador del plasminógeno tisular (tPA) (Wittwer & Howard, 1990) y a los IFNs (Cantell *et al.*, 1992) del ataque proteolítico.

Asimismo, se ha demostrado una mayor estabilidad del IFN-4N en suero de rata en relación a la exhibida por la molécula no modificada por glicoingeniería, lo que indicaría que la glicosilación conferiría una mayor resistencia a la inactivación por proteasas séricas a temperatura fisiológica, probablemente mediante el enmascarado de sitios e impedimento estérico para la acción proteolítica (Figura 3.1C) (Ceaglio *et al.*, 2010b).

Por otra parte, el IFN-4N demostró una mayor resistencia a la elastasa (Figura 3.1D) (Ceaglio *et al.*, 2010b). Este comportamiento también ha sido reportado para el IFN- γ , para el cual se ha demostrado que los glicanos unidos a la Asn25 son críticos para preservar su actividad frente al tratamiento con elastasa, plasmina y catepsina G (Sareneva *et al.*, 1995). Asimismo, el hg-CSF es más susceptible a la acción de elastasa humana comparado con su análogo O-glicosilado (Carter *et al.*, 2004). Se ha sugerido que determinadas serina proteasas derivadas de neutrófilos, entre ellas la elastasa leucocitaria, podrían poseer un importante rol en procesos proteolíticos extracelulares en sitios de inflamación, entre los que se destaca el control de la bioactividad de citoquinas (Bank & Ansorge, 2001).

En general, la glicosilación produce un incremento en la estabilidad de las glicoproteínas frente a muchos factores que resultan relevantes para su aplicación en la industria farmacéutica, incluyendo oxidación, *cross-linking*, pH, agentes químicos, calentamiento, congelamiento (desnaturalización), precipitación, inactivación cinética y agregación. Estos efectos estabilizantes parecen ser generalizados, ya que ocurren en una variedad de proteínas no relacionadas estructuralmente (Solá *et al.*, 2008).

3.4.4. Efectos sobre la farmacocinética y clearance *in vivo*

Los oligosacáridos poseen un rol significativo en la definición de la velocidad de depuración (o *clearance*) de glicoproteínas *in vivo*, una propiedad crítica para la determinación de la eficacia de una proteína terapéutica. La actividad biológica específica evaluada *in vitro* será de poca importancia si la proteína inyectada es eliminada rápidamente del sistema circulatorio.

Por ejemplo, la actividad *in vitro* de la EPO aumenta cuando la misma es desializada, pero la actividad *in vivo* disminuye considerablemente debido a su rápido *clearance* plasmático (Takeuchi *et al.*, 1990).

Otro ejemplo notable es el de la gonadotropina coriónica (eCG) y la hormona luteinizante lutropina (eLH) equinas, las cuales son hormonas glicoproteicas producidas por la placenta y la glándula pituitaria, respectivamente. Tanto la subunidad alfa como la subunidad beta de ambas hormonas provienen de un único gen y tienen una secuencia aminoacídica idéntica. No obstante, difieren en el tipo de glicosilación unida a los sitios que contienen. Se ha demostrado que la eCG exhibe N-glicanos complejos di- y tri-antenarios, de los cuales un 80 % termina en ácido siálico. En contraste, más del 70 % de los N-glicanos de la eLH contiene 1 o 2 ramificaciones que se encuentran sulfatadas. Es probable que los sitios de producción de ambas hormonas difieran en la expresión de las correspondientes transferasas. La eLH, pero no la eCG, se une al receptor hepático específico para la secuencia terminada en SO₄-GalNAcGlcNAc. Como consecuencia, la eLH es removida de la circulación 5,7 veces más rápido que la eCG. Dado que la mayor diferencia estructural entre la eCG y la eLH es la glicosilación terminal de sus glicanos de tipo N-, es probable que la diferencia en su vida media plasmática defina las diferencias funcionales de ambas hormonas (Smith *et al.*, 1993; Choi & Smith, 2014).

La farmacocinética es una de las propiedades fundamentales que se logra mejorar cuando se desarrolla un biofarmacéutico de segunda generación mediante técnicas de glicoingeniería. Efectivamente, la adición de 4 sitios de N-glicosilación al rhIFN- α produjo una mejora significativa de sus propiedades farmacocinéticas, exhibiendo el IFN-4N una vida media plasmática 25 veces superior y un *clearance* plasmático 20 veces inferior luego de su inoculación subcutánea en ratas con respecto a la molécula no modificada (Figura 3.1E) (Ceaglio *et al.*, 2008).

La glicosilación actúa mediante múltiples mecanismos para disminuir el *clearance* de proteínas terapéuticas (Gooche *et al.*, 1992; Morell *et al.*, 1971; Koury, 2003):

- Las proteínas humanas que poseen masas moleculares inferiores a 70 kDa son continuamente removidas de la circulación mediante filtración glomerular. La velocidad de filtración a través de los túbulos renales es sensible a la estructura terciaria de la proteína y a su masa molecular. Además, la filtración renal puede ser inhibida mediante repulsión de cargas, ya que la barrera glomerular se encuentra cargada negativamente debido

a la presencia de glicosaminoglicanos. De esta manera, en glicoproteínas de bajo peso molecular, los oligosacáridos pueden prolongar la vida media en circulación a través del aumento del tamaño y de la carga superficial que aportan los ácidos siálicos.

- Existen varios mecanismos de *clearance* circulatorio asociados con receptores de alta afinidad que reconocen los monosacáridos terminales de los carbohidratos de las glicoproteínas. Como se describió previamente (sección 3.2.2), el ASGP-R presente en hepatocitos se une a las glicoproteínas que exhiben una Gal o una GalNAc terminal, incluyendo los oligosacáridos complejos de tipo-N desialidados, produciendo su eliminación de la circulación. Se piensa que este mecanismo es el principal responsable de la rápida eliminación de la EPO desialidada. También existen receptores de Man que depuran proteínas con alto contenido de Man, como las producidas por células de levadura (Cumming, 1991).
- Como se mencionó en la sección 3.3, la glicosilación puede enmascarar los sitios de reconocimiento y clivaje de proteasas, protegiendo a las glicoproteínas de la degradación por proteasas inespecíficas. Este efecto tendría un efecto positivo sobre la farmacocinética de la glicoproteína, reduciendo la vía de eliminación de la circulación mediante la inactivación por proteasas séricas.
- La eliminación de glicoproteínas mediada por sus receptores específicos también puede ser un mecanismo importante de *clearance* de proteínas terapéuticas. En este caso, la menor afinidad al receptor que suelen tener las proteínas glicosiladas y altamente sialidadas en comparación con sus contrapartes no glicosiladas puede contribuir a reducir su velocidad de depuración.

3.4.5. Efectos sobre la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*

El efecto preciso de los glicanos sobre la bioactividad de proteínas no puede ser generalizado ni predicho. Existen ejemplos en los cuales la carencia de azúcares produce una disminución de la actividad biológica *in vitro* (por ejemplo, la remoción de ácido siálico elimina la actividad coagulante del Factor IX) (Chavin & Weidner, 1984) o, como ya se mencionó, cuando la hCG se encuentra deglicosilada en la Asn52, aún puede unirse a su receptor con similar afinidad, pero no puede estimular la adenilato ciclasa. En otros casos, la ausencia de oligosacáridos produce un aumento de dicha actividad; por ejemplo, la prolactina aglicosilada posee una mayor afinidad de unión por el receptor y una mayor capacidad de estimular la proliferación celular que su contraparte glicosilada (Markoff *et al.*, 1988).

No obstante, existen numerosas evidencias que demuestran que los ensayos *in vitro* no son de utilidad para predecir la actividad biológica *in vivo* ni la eficacia terapéutica de una glicoproteína, ya que no tienen en cuenta sus

características farmacocinéticas, farmacodinámicas y metabolismo (Egrie *et al.*, 2003), factores que, como vimos, se encuentran influenciados por la glicosilación.

Un ejemplo clásico lo constituye la hEPO: a pesar de que la hormona desialidada muestra un incremento de entre 2 y 2,5 veces en su actividad *in vitro*, la misma exhibe una reducción de 1000 veces en su actividad biológica *in vivo* comparada con su forma nativa, lo que se atribuye a su rápido *clearance* plasmático (Goochee *et al.*, 1992; Jenkins & Curling, 1994).

Este comportamiento también se ha manifestado en proteínas modificadas mediante glicoingeniería: a pesar de que la actividad antiviral y antiproliferativa *in vitro* del IFN-4N se redujo notablemente con respecto a la correspondiente a la molécula nativa, la mejora de sus propiedades farmacocinéticas causada por el efecto de los N-glicanos adicionados se tradujo en un incremento de su actividad antitumoral *in vivo* en ratones inmunocomprometidos (Figura 3.1) (Ceaglio *et al.*, 2010b).

Una mención aparte merece el efecto de la N-glicosilación sobre anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos. La N-glicosilación de la Asn297 del dominio CH2 del Fc influye en las funciones efectoras de los mAbs. Luego de la unión al antígeno (Ag), los mAbs pueden ejercer sus funciones efectoras mediadas por su porción Fc. Mediante su unión a receptores de Fc o a proteínas del complemento, los mAbs inducen ADCC (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, por su sigla en inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) o CDC (citotoxicidad dependiente de complemento, por su sigla en inglés, *complement-dependent cytotoxicity*), respectivamente. La ADCC se induce luego de la unión a los receptores Fc- γ (Fc- γ R) a la porción Fc. La afinidad de unión Fc-Fc- γ R se encuentra influenciada por la glicosilación del dominio CH2. Los N-glicanos de la Asn297 son de tipo complejo biantenarios compuestos por un núcleo de dos GlcNAc y tres Man, al cual puede estar o no unida una Fuc, una GlcNAc bisectante, Gal y ácido siálico terminal. Se ha demostrado que la ausencia de la Fuc- α 1,6 unida al núcleo incrementa la afinidad de unión al Fc- γ R111 e incrementa la actividad ADCC. Es decir, la actividad ADCC se incrementa con un menor contenido de Fuc. La adición de una GlcNAc bisectante, que también resulta en la remoción de la Fuc del núcleo, también incrementa la actividad ADCC significativamente. Además, las IgGs sializadas demostraron una menor actividad ADCC que las IgG no sializadas. La afinidad de unión de la proteína del complemento C1q con el Fc también se encuentra afectada por la N-glicosilación de la Asn297: a mayor contenido de Gal se obtiene una mayor actividad CDC. Adicionalmente, al influenciar tanto la ADCC como la CDC, dos funciones importantes de los anticuerpos terapéuticos, la N-glicosilación también podría tener un impacto sobre la farmacocinética de los mAbs (Hayes *et al.*, 2014).

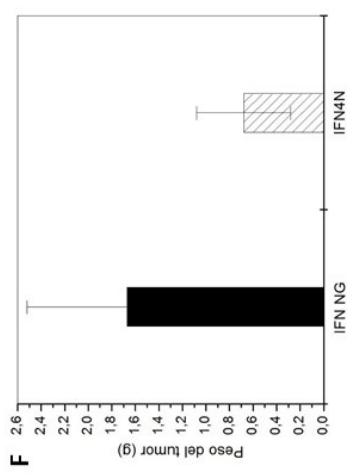
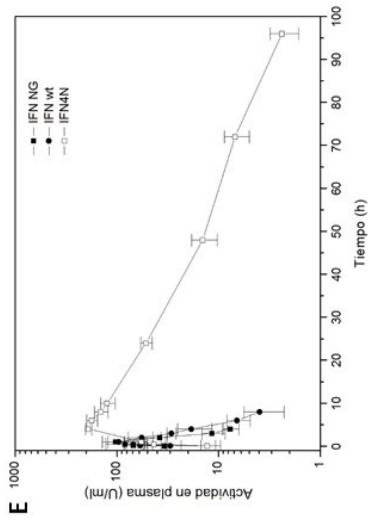
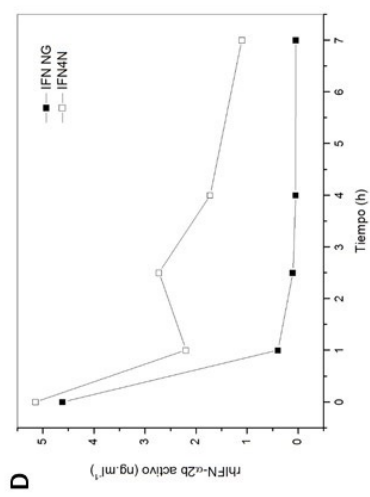
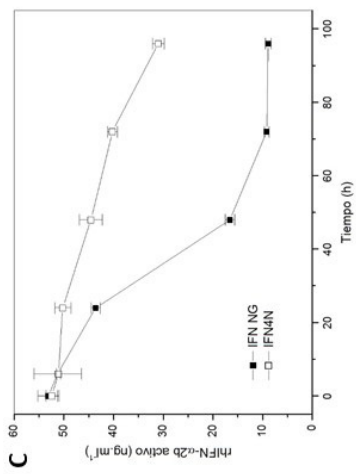
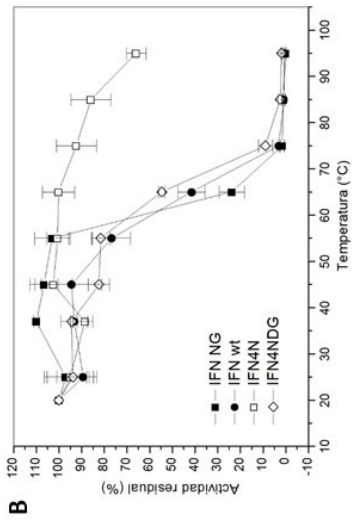
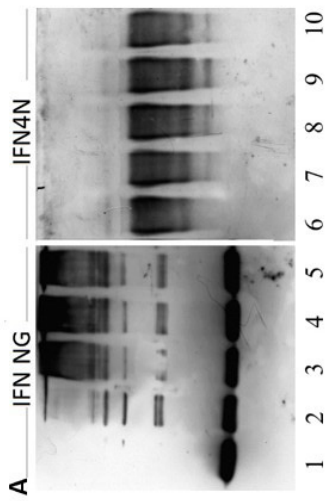


FIGURA 3.1. [PÁG. ANTERIOR]. EFECTO DE LA N-GLICOSILACIÓN SOBRE DIFERENTES PROPIEDADES DE UNA MUTEÍNA HIPER-N-GLICOSILADA DEL IFN- α . **A.**¹ Y **B.**² ESTABILIDAD TÉRMICA DEL IFN NO GLICOSILADO (IFN NG), IFN NATIVO (IFN WT), IFN α 4N E IFN α 4N N-DEGLICOSILADO (IFN α 4NDG) A DIFERENTES TEMPERATURAS. **A.** ANÁLISIS DE LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR CALOR MEDIANTE WESTERN BLOT (CALLES 1, 6: 20 °C; CALLES 2, 7: 37 °C; CALLES 3, 8: 65 °C; CALLES 4, 9: 75 °C; CALLES 5, 10: 85 °C); **B.** ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIVIRAL RESIDUAL (%). **C.**³ ESTABILIDAD DEL IFN NG E IFN α 4N A 37 °C EN PLASMA DE RATA *IN VITRO*. SE EVALUÓ LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL RESIDUAL (%) A DIFERENTES TIEMPOS. **D.**⁴ ESTABILIDAD DEL IFN NG E IFN α 4N FRENTE A LA ACCIÓN DE LA ELASTASA *IN VITRO* A 37 °C. SE EVALUÓ LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL *IN VITRO* REMANENTE A DISTINTOS TIEMPOS. **E.**⁵ PERFILES FARMACOCINÉTICOS DE IFN NG, IFNWT E IFN α 4N LUEGO DE LA INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE UNA ÚNICA DOSIS DE 1.10⁵ U EN RATAS. **F.**⁶ ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL IFN NG E IFN α 4N EN RATONES NUDE ATÍMICOS IMPLANTADOS S.C. CON CÉLULAS DE CARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANAS (PC-3) Y TRATADOS CON UNA ÚNICA DOSIS SEMANAL DE 3.10⁵ UI DE CADA CITOQUINA. LUEGO DE 5 SEMANAS, SE DETERMINÓ EL PESO PROMEDIO DEL TUMOR (N=7)

^{1,2} ADAPTADA DE CEAGLIO ET AL, 2010A, CON PERMISO DE ELSEVIER. ^{3,4} ADAPTADA DE CEAGLIO ET AL, 2010B, CON PERMISO DE ELSEVIER. ⁵ ADAPTADA DE CEAGLIO ET AL, 2008, CON PERMISO DE ELSEVIER. ⁶ ADAPTADA CON PERMISO DE: SPRINGER, PROCEEDINGS OF THE 21ST ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR ANIMAL CELL TECHNOLOGY (ESACT) DUBLIN, IRELAND, JUNE 7-10, 2009. ESACT PROCEEDINGS, VOL 5., SECOND-GENERATION INTERFERONS: AN EFFECTIVE, LONG-LASTING HYPERGLYCOSYLATED IFN- α 2, CEAGLIO N., ETCHEVERRIGARAY M., KRATJE R., CONRADT H.S., OGGERO M., COPYRIGHT (2012)

3.4.6. Efectos sobre la antigencidad e inmunogenicidad

La glicosilación contribuye a las propiedades antigénicas de las proteínas de diferentes maneras, ya sea inactivando el epítopo peptídico (enmascaramiento de sitios antigénicos) o formando parte de la estructura reconocida por el anticuerpo. Algunas cadenas de oligosacáridos pueden ser antigénicas por sí mismas y generar anticuerpos anticarbohidratos, mientras que otras necesitan del entorno proteico para ser reconocidas (Lisowska, 2002).

Los efectos de los azúcares sobre la inmunogenicidad de las proteínas, es decir, sobre la capacidad de estimular una respuesta inmune, son menos claros. No se han detectado anticuerpos anti-EPO en pacientes a los cuales se les ha administrado dicha hormona producida en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), cuya secuencia aminoacídica es idéntica a la de la proteína nativa, pero posee características distintivas en su porción glicosídica. Por otro lado, las proteínas que son normalmente glicosiladas pueden resultar inmunogénicas si son administradas en su forma no glicosilada (Goochee *et al.*, 1992). De esta manera, se ha verificado la existencia de anticuerpos inducidos durante el tratamiento de patologías empleando las formulaciones no glicosiladas de IL-2, IFN- γ , GM-CSF y G-CSF (Revoltella *et al.*, 1997; Wadhwa *et al.*, 2000). Muchos de estos anticuerpos resultaron neutralizantes de la actividad biológica de las mencionadas citoquinas. En consecuencia, la

selección de un huésped celular adecuado (como las células de mamífero) para la producción de citoquinas glicosiladas reduciría los riesgos del desarrollo de respuesta inmune de tipo humoral durante el empleo terapéutico de tales proteínas.

3.5. CONCLUSIONES

Hemos visto que no resulta sencillo realizar una generalización del rol biológico de los glicanos. A medida que avanza el conocimiento, se proponen nuevas funciones, todas ellas válidas, pero probablemente ninguna de ellas universal, es decir, sin excepciones. Más aún, seguramente muchas quedarán aún sin descubrir, y en algunas décadas al revisar este capítulo el mismo se encuentre incompleto o hasta obsoleto. No obstante, no quedan dudas de que los glicanos son moléculas indispensables para el desarrollo de la vida, influenciando desde pequeñas moléculas hasta organismos completos, y cuya existencia ha tenido un rol protagónico durante la evolución, permitiendo la supervivencia de las especies que hoy conocemos.

Referencias bibliográficas

- ABLAMOWICZ, A. F. & NICHOLS, J. J.** (2016). Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. *Ocul Surf.*, 14(3), 331–41. 10.1016/j.jtos.2016.03.003.
- ASHWELL, G. & MORELL, A. G.** (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 41(0), 99–128.
- BANK, U. & ANSORGE, S.** (2001). More than destructive: neutrophil derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.*, 69, 197–206.
- BOUSFIELD, G. R. & DIAS, J. A.** (2011). Synthesis and secretion of gonadotropins including structure–function correlates. *Rev Endocr Metab Disord*, 12, 289–302. 10.1007/s11154-011-9191-3
- CANTELL, K., HIRVONEN, S., SARENEVA, T., PIRHONEN, J. & JULKUNEN, I.** (1992). Differential inactivation of interferons by a protease from human granulocytes. *J. Interferon Res.*, 12, 177–183.
- CARAMELO, J. J.** (2009). La dulce vida: el papel de los azúcares en la biosíntesis de glicoproteínas. *Química Viva*, 2, 80–105.
- CARTER, C. R. D., WHITMORE, K. M. & THORPE, R.** (2004). The significance of carbohydrates on G CSF: differential sensitivity of G CSFs to human neutrophil elastase degradation. *J. Leukoc. Biol.*, 75, 515–522. 10.1189/jlb.0803378
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2008). Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, 90(3), 437–449. 1016/j.biochi.2007.10.013
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2010a). Influence of carbohydrates on the stability and structure of a hyperglycosylated human interferon alpha mutein. *Biochimie*, 92, 971–978. 10.1016/j.biochi.2010.04.004
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., CONRADT, H. S., GRAMMEL, N., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2010b) Highly glycosylated human alpha interferon: an insight into a new therapeutic candidate. *J Biotechnol*, 146, 74–83. 10.1016/j.jbiotec.2009.12.020
- CHAMOREY, A. L., MAGNÉ, N., PIVOT, X. & MILANO, G.** (2002). Impact of glycosylation on the effects of cytokines. A special focus on oncology. *Eur. Cytokine Netw.*, 13(2), 154–160.
- CHAVIN, S. I. & WEIDNER, S. M.** (1984). Blood clotting factor IX. Loss of activity after cleavage of sialic acid residues. *J. Biol. Chem.*, 259(6), 3387–3390.
- CHOI, J. & SMITZ, J.** (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 383, 203–213. 10.1016/j.mce.2013.12.009
- COHEN, M.** (2015) Notable Aspects of Glycan–Protein Interactions. *Biomolecules*, 5, 2056–2072. 10.3390/biom5032056

- ELBEIN, I.A.** (1991). The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function. *Trends Biotechnol.*, 9, 346–352.
- ELLIOT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., AOKI, K., BRANKOW, D., BUCK, L., BUSSE, L., CHANG, D., FULLER, J., GRANT, J., HERNDAY, N., HOKUM, M., HU, S., KNUD-TEN, A., LEVIN, N., KOMOROWSKI, R., MARTIN, F., NAVARRO, R., OSSLUND, T., ROGERS, G., ROGERS, N., TRAIL, G. & EGRIE, J.** (2003) Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat. Biotechnol.*, 21, 414–421. 10.1038/nbt799
- FENDERSON, B. A., ZEHAZI, U. & HAKOMORI, S.** (1984). A multivalent lacto-N-fucopentaose III-lysyllysine conjugate decompacts preimplantation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective. *J Exp Med.*, 160(5),1591–1596.
- FIELDS, G. B., ALONSO, D. O. V., STIGTER, D. & DILL, K. A.** (1992). Theory for the aggregation of proteins and copolymers. *J. Phys. Chem.*, 96, 3974–3981.
- FISHMAN, P. H.** (1982). Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol.*, 69(2), 85–97.
- FREEZE, H. H.** (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.*, 7(7), 537–551. 10.1038/nrg1894
- FU, C., ZHAO, H., WANG, Y., CAI, H., XIAO, Y., ZENG, Y. & CHEN, H.** (2016). Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA*, 88(6), 275–286. 10.1111/tan.12900.
- GAGNEUX, P. & VARKI, A.** (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9(8), 747–755. 10.1093/glycob/9.8.747
- GOLDWASSER, E., KUNG, C. K. H. & ELIASON, J.** (1974). On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J. Biol. Chem.*, 249, 4202–4206.
- GOOCHEE, C. F., GRAMER, M. J., ANDERSEN, D. C., BAHR, J. B. & RASMUSSEN, J. R.** (1992). The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. *Biotechnology*, 9, 1347–1355.
- GUZMAN-ARANGUEZ, A. & ARGÜESO, P.** (2010). Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf.*, 8(1), 8–17.
- HAYES, J. M., COSGRAVE, E. F. J., STRUWE, W. B., WORMALD, M., DAVEY, G. P., JEFFERIS, R. & RUDD, P. M.** (2014). En Daëron, M. & Nimmerjahn, F. (Eds.), *Fc Receptors*, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 382, 10.1007/978-3-319-07911-0. Springer.
- HELENIUS, A. & AEBI, M.** (2001). Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291(5512), 2364–2369.
- HIROSE, M., KAWASHIMA, H. & MIYASAKA, M.** (1998). A functional epitope on P-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 but not to sialyl Lewis X oligosaccharides. *Int Immunol.*, 10(5), 639–649.

- HOOPER, L. V. & GORDON, J. I.** (2001). Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*, 11(2), 1R-10R.
- HUANG, M. L., COHEN, M., FISHER, C. J., SCHOOLEY, R. T., GAGNEUX, P. & GODULA, K.** (2014) Determination of receptor specificities for whole influenza viruses using multivalent glycan arrays. *Chem Commun (Camb)*, 51(25), 5326-5329. 10.1039/c4cc08613a.
- IMAI, N., HIGUCHI, M., KAWAMURA, A., TOMONOH, K., OH-EDA, M., FUJIWARA, M., SHIMONAKA, Y. & OCHI, N.** (1990). Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem.*, 194(2), 457-462.
- IMAI, M. & KAWAOKA, Y.** (2012). The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr Opin Virol.*, 2(2), 160-167. 10.1016/j.coviro.2012.03.003.
- IOANNOU, I. A., BISHOP, D. F. & DESNICK, R. J.** (1992) Overexpression of human α -galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J Cell Biol.*, 119, 1137-1150.
- IOFFE, E. & STANLEY, P.** (1994). Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *J THROMB HAEMOST.*, 14(12), 2446-2457. 10.1111/jth.13537
- JENKINS, N. & CURLING, E. M. A.** (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 354-364.
- KIM, J. J., OLSON, L. J. & DAHMS, N. M.** (2009). Carbohydrate Recognition by the Mannose 6-phosphate Receptors. *Curr Opin Struct Biol.*, 19(5), 534-542. 10.1016/j.sbi.2009.09.002
- KOBATA, A.** (1992). Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem.*, 209(2), 483-501.
- KOSIR, M. A., QUINN, C. C., WANG, W. & TROMP, G.** (2000). Matrix glycosaminoglycans in the growth phase of fibroblasts: more of the story in wound healing. *J Surg Res.*, 1, 45-52. 10.1006/jsre.2000.5840
- KOURY, M. J.** (2003). Sugar coating extends half-life and improves effectiveness of cytokine hormones. *Trends Biotechnol.*, 21(11), 462-464. 10.1016/j.tibtech.2003.09.002
- KRASNOVA, L. & WONG, C. H.** (2016). Exploring human glycosylation for better therapies. *Mol Aspects Med.*, 51, 125-143. 10.1016/j.mam.2016.05.003
- LAUC, G., KRIŠTIĆ, J. & ZOLDOŠ, V.** (2014). Glycans – the third revolution in evolution. *Front Genet.*, 5, 145. 10.3389/fgene.2014.00145
- LINDEN, S. K., SUTTON, P., KARLSSON, N. G., KOROLIK, V. & MCGUCKIN, M. A.** (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.*, 1(3), 183-197. 10.1038/mi.2008.5.

- LISOWSKA, E.** (2002). The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 445–455.
- LOWE, J. B. & MARTH, J. D.** (2003) A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem.*, 72, 643–69. 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161809
- MACKENZIE, C. R., HIRAMA, T., LEE, K. K., ALTMAN, E. & YOUNG, N. M.** (1997). Quantitative analysis of bacterial toxin affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *J Biol Chem.*, 272(9), 5533–5538.
- MAREK, K. W., VIJAY, I.K. & MARTH, J. D.** (1999). A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 9(11), 1263–1271.
- MARKOFF, E., SIGEL, M. B., LACOUR, N, SEAVEY, B.,K., FRIESEN, H. G. & LEWIS, U. J.** (1988). Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology*, 123(3), 1303–1306.
- MATSUURA, F., OHTA, M., IOANNOU, I. A. & DESNICK, R. J.** (1998). Human alpha-galactosidase A: Characterization of the N-linked oligosaccharides on the intracellular and secreted glycoforms overexpressed by Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, 8, 329–339.
- MATZUK, M. M., JEFFERY, S., KEENE, L. & BOIME, I.** (1989). Site Specificity of the Chorionic Gonadotropin N-Linked Oligosaccharides in Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, 264(5), 2409–2414.
- MORAN, A. P., GUPTA, A. & JOSHI, L.** (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut*, 60(10), 1412–25. 10.1136/gut.2010.212704
- MORELL, A. G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I. H., HICKMAN, J. & ASHWELL, G.** (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol. Chem.*, 246(5), 1461–1467.
- MORELL, A. G., GREGORIADIS, G. & SCHEINBERG, H.** (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* 246(5), 1461–1467.
- NAGAE, M. & YAMAGUCHI, Y.** (2012). Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 8398–8429. 10.3390/ijms13078398
- OH-EDA, M., HASEGAWA, M., HATTORI, K., KUBONIWA, H., KOJIMA, T., ORITA, T., TOMONOU, K., YAMAZAKI, T. & OCHI, N.** (1990). O linked sugar chain of human granulocyte colony stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.* 265, 11432–11435.
- OLDEN, K., BERNARD, B. A., HUMPHRIES, M. J., YEO, T., YEO, K., WHITE, S. L. (...)** Parent, J. B. (1985). Function of glycoprotein glycans. *Trends Biochem Sci.*, 10(2), 78–92. 10.1016/0968-0004(85)90238-5
- O’SULLIVAN, J. M., AGUILA, S., MCRAE, E., WARD, S. E., RAWLEY, O., FALLON, P. G., BROPHY, T. M., PRESTON, R. J., BRADY, L., SHEILS, O., CHION, A. & O’DONNELL, J. S.** (2016). N-linked glycan truncation causes enhanced clearance

of plasma-derived von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(2), 728–732.

- PARK, E. I., MI, Y., UNVERZAGT, C., GABIUS, H. J. & BAENZIGER, J. U.** (2005). The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. *PNAS*, 102(47), 17125–17129. 10.1073/pnas.0508537102
- PARODI, A. J.** (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.*, 348, 1–13.
- REVOLTELLA, R. P., LARICCHIA ROBBIO, L., MOSCATO, S., GENUA, A. & LIBERATI, A. M.** (1997). Natural and therapy induced anti GM CSF and anti G CSF antibodies in human serum. *Leuk. Lymphoma*, 26(1), 29–34. 10.3109/10428199709058597
- RUDDOCK, L. W. & MOLINARI, M.** (2006). N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci.*, 119(Pt 21):4373–4380. 10.1242/jcs.03225
- SAFDAR, M. H., HUSSAIN, Z., ABOUREHAB, M. A. S., HASAN, H., AFZAL, S. & THU, H. E.** (2017). New developments and clinical transition of hyaluronic acid-based nanotherapeutics for treatment of cancer: reversing multidrug resistance, tumour-specific targetability and improved anticancer efficacy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.*, 30, 1–14. 10.1080/21691401.2017.1397001
- SARENEVA, T., PIRHONN, J., CANTELL, K. & JULKUNEN, I.** (1995). N glycosylation of human interferon γ : glycans at Asn 25 are critical for protease resistance. *Biochem. J.*, 308, 9–14.
- SARRAZIN, S., LAMANNA, W. C. & ESKO, J. D.** (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(7), pii: a004952. 10.1101/cshperspect.a004952
- SEO, N. S., HOCKING, A. M., HÖÖK, M. & MCQUILLAN, D. J.** (2005). Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions. *J Biol Chem.*, 280(52), 42774–42784. 10.1074/jbc.M511531200
- SHENTAL-BECHOR, D. & LEVY, Y.** EFFECT OF GLYCOSYLATION ON PROTEIN FOLDING: A CLOSE LOOK AT THERMODYNAMIC STABILIZATION. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, 105(24), 8256–8261. 10.1073/pnas.0801340105
- SMITH, D. F. & CUMMINGS, R. D.** (2013). Application of Microarrays for Deciphering the Structure and Function of the Human Glycome. *Mol Cell Proteomics*, 12, 902–912. 10.1074/mcp.R112.027110
- SMITH, P. L., BOUSFIELD, G. R., KUMAR, S., FIETE, D., & BAENZIGER, J. U.** (1993). Equine Lutropin and Chorionic Gonadotropin Bear Oligosaccharides Terminating with S04–4–GalNAc and S1aa2, 3Gal, Respectively. *J Biol Chem.* 268(2), 795–802.
- SOLÁ, R. J. & GRIEBENOW, K.** (2010). Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy. *BioDrugs*, 24(1), 9–21. 10.2165/11530550-000000000-00000
- SOLÁ, R. J. & GRIEBENOW, K. A.** (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.*, 98(4), 1223–1245. 10.1002/jps.21504

- STENCEL-BAERENWALD, J. E., REISS, K., REITER, D. M., STEHLE, T. & DERMODY, T. S.** (2014). The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol.*, 12(11), 739–749. 10.1038/nrmicro3346
- STONEBRAKER, J. R., WAGNER, D., LEFENSTY, R. W., BURNS, K., GENDLER, S. J., BERGELSON, J. M., BOUCHER, R. C., O'NEAL, W. K. & PICKLES, R. J.** (2004). Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to luminal infection. *J Virol.*, 24, 13755–13768. 10.1128/JVI.78.24.13755-13768.2004
- TAKEUCHI, M., TAKASAKI, S., SHIMADA, M. & KOBATA, A.** (1990). Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 265(21), 12127–12130.
- TAO, L., ZENG, Q., LI, J., XU, M., WANG, J., PAN, Y., WANG, H., TAO, Q., CHEN, Y., PENG, J., HOU, M., JANSEN, A. J., NI, H. & ZHAI, Z.** (2017). Platelet desialylation correlates with efficacy of first-line therapies for immune thrombocytopenia. *J Hematol Oncol.*, 10(1), 46. 10.1186/s13045-017-0413-3.
- TSUJI, S.** (1996). Molecular Cloning and Functional Analysis of Sialyltransferases. *J Biochem*, 120, 1–13.
- VARKI, A. & GAGNEUX, P.** (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.*, 1253(1), 16–36. 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x
- VARKI, A. & SHARON, N.** (2009) Historical Background and Overview. En Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzler, M. E. (Eds.). *Essentials of Glycobiology* (2nd. edition) (chapter 1). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- VARKI, A.** (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), 97–130. 10.1093/glycob/3.2.97
- VARKI, A.** (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49. 10.1093/glycob/cww086
- VARKI, A., & LOWE, J. B.** (2009). Biological Roles of Glycans. En Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzler, M. E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd. edition) (chapter 6). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- VARKI, A., ETZLER, M. E., CUMMINGS, R. D. & ESKO, J. D.** (2009). Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. En Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzler, M. E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd. edition) (chapter 26). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- VARKI, A., FREEZE, H. H., GAGNEUX, P.** (2009). Evolution of Glycan Diversity. En Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W. & Etzler, M. E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd. edition) (chapter 19). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- WADHWA, M., MEAGER, A., DILGER, P., BIRD, C., DOLMAN, C., DAS, R. G. & THORPE, R.** (2000). Neutralizing antibodies to granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1 alpha and interferon alpha but not other cytokines in human immunoglobulin preparations. *Immunology*, 99(1), 113–123.
- WANG, C., EUFEMI, M., TURANO, C. & GIARTOSIO, A.** (1996). Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, 35(23), 7299–7307. 10.1021/bi9517704
- WASIK, B. R., BARNARD, K. N., PARRISH, C. R.** (2016). Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection. *Trends Microbiol.*, 13(11), 2944–2960. 10.1074/mcp.M114.039875
- WITTWER, A.J. & HOWARD, S.C.** (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single chain to two chain tissue type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry*, 29, 4175–4180.
- XIONG, X., MCCAULEY, J. W. & STEINHAEUER, D. A.** (2014). Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 385, 63–91. 10.1007/82_2014_423
- YU, Y., LASANAJAK, Y., SONG, X., HU, L., RAMANI, S., MICKUM, M. L., ASHLINE, D. J., PRASAD, B. V., ESTES, M. K., REINHOLD, V. N., CUMMINGS, R. D. & SMITH, D. F.** HUMAN MILK CONTAINS NOVEL GLYCANS THAT ARE POTENTIAL DECOY RECEPTORS FOR NEONATAL ROTAVIRUSES. *MOL. CELL. PROTEOMICS*, 13(11), 2944–2960. 10.1074/mcp.M114.039875

4 Los carbohidratos como mediadores claves en procesos fisiológicos y patológicos

KARINA V. MARIÑO Y ANABELA M. CUTINE

4.1. INTRODUCCIÓN

El estudio funcional de los glicoconjugados (macromoléculas que contienen hidratos de carbono en su estructura) permaneció históricamente relegado frente al de los ácidos nucleicos y las proteínas debido al concepto central que establece que el flujo de información celular va desde el ADN al ARN y luego a proteínas, relegando a los hidratos de carbono a funciones tradicionalmente metabólicas o de estabilidad biofísica. A esto se le suma la alta complejidad estructural de los glicanos, directamente relacionada a su biosíntesis sin molde (su capacidad de ramificarse, su estereoquímica, su natural variabilidad, la que hizo que el estudio analítico del glicoma (perfil de glicanos presente en una célula o tejido) fuera encarado en profundidad tan solo recientemente. Con el desarrollo de nuevas tecnologías nació el área denominada Glicómica Funcional, la que permite correlacionar la estructura de los glicanos con su funcionalidad biológica.

El glicoma celular es mucho más fácilmente modulado que los genes o el RNA, siendo influenciado por diversos factores tanto ambientales como genéticos, y haciendo que el perfil de glicanos expuesto por la célula funcione como una carta de presentación para interactuar dinámicamente con su entorno. Esta comunicación muchas veces es mediada por proteínas específicamente evolucionadas para reconocer glicoeptopes particulares, denominadas lectinas, las que poseen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) con afinidad característica y que marca la familia a la que pertenecen. Estas proteínas están ampliamente distribuidas y conservadas en la naturaleza: en mamíferos se han descrito más de 80 lectinas divididas en 12 familias diferentes, pero también se expresan en bacterias y microorganismos.

La función principal del sistema inmune es reconocer y atacar aquello que no nos es propio, como microorganismos invasores. En un proceso de aprendizaje esencial para el mantenimiento de la salud, este sistema debe aprender a identificar lo propio (para así generar tolerancia y mantener la homeostasis), y a la vez educarse en el reconocimiento de aquellas señales que revelan lo «no propio» (por ejemplo, los patógenos), con el objeto de atacar y eliminar los peligros de manera eficiente. El equilibrio inmune es delicado, y la disrupción del mismo puede provocar diversas enfermedades: cuando el sistema inmune falla y reconoce algo propio como ajeno se producen las

conocidas como enfermedades autoinmunes; cuando la reacción inmune no es debidamente controlada puede generarse un proceso inflamatorio crónico; cuando lo ajeno no es reconocido la respuesta inmune no se dispara, y no hay defensa frente a lo no propio o ajeno.

Es así como los glicoconjugados están involucrados en todos estos procesos: muchas toxinas bacterianas son glicosidasas que degradan el glicoma de las células del huésped, y muchas proteínas mediadoras de la adhesión e invasión de patógenos son lectinas que reconocen glicanos específicos en las células del huésped. El glicoma de superficie es también esencial en el proceso de iniciación, desarrollo y resolución de la respuesta inmune: la funcionalidad de los glicanos en la inmunidad va más allá del reconocimiento y activación de la respuesta, incluyendo funciones importantes como la maduración y activación de diferentes tipos celulares, su tráfico celular y el control de su actividad.

Hoy en día podemos clasificar también a las células tumorales como pertenecientes a lo ajeno o no propio. Alteradas en su expresión génica, durante muchos años se creyó que la inmunidad no podía reconocer un tumor en desarrollo, pero hoy sabemos que sí es capaz de hacerlo y que en muchos casos el tumor regula o inhibe la respuesta inmune para sobrevivir y expandirse. Entre las diferencias que presentan las células neoplásicas, el glicoma de superficie se ha demostrado alterado; este glicoma aberrante las diferencia de las células normales, y asiste en procesos como la migración y la metástasis tumoral.

En este capítulo describiremos algunos ejemplos de cómo las interacciones entre carbohidratos y lectinas influyen y modelan la respuesta inmune en contextos fisiológicos y patológicos, incluyendo interacciones huésped-patógeno y enfermedades neoplásicas.

4.2. ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A TUMORES (TACAS): GLICOSILACIÓN ABERRANTE COMO SELLO DISTINTIVO DEL PROCESO NEOPLÁSICO

Más allá de la diversidad estructural que presenta el glicoma celular y su dinámica capacidad de adaptación frente al entorno, para cada tipo celular puede definirse una firma de glicanos o glicoma de manera reproducible en condiciones fisiológicas. Lo mismo puede ser dicho del glicoma de suero, el que se define en base a las glicoproteínas circulantes y el rango de glicofomas presentes para las mismas. Sin embargo, los procesos neoplásicos producen alteraciones en las estructuras de los glicanos tanto para glicoconjugados de membrana tumoral como para glicoproteínas de suero en pacientes con estas enfermedades. De hecho, y como se describirá más adelante, muchos de los biomarcadores utilizados hoy en la clínica para diferentes tipos de tumores son macromoléculas con glicosilación aberrante.

Es importante resaltar que, de todos los cambios estructurales posibles en glicosilación, solamente un grupo limitado se correlaciona con la transformación maligna de la célula y con la progresión del tumor, probablemente consecuencia de la selección hacia aquellas modificaciones útiles para la supervivencia de la célula neoplásica. Si bien las alteraciones en el perfil de glicosilación varían según el tipo de tumor, a partir de la caracterización estructural del perfil de glicanos se han podido definir los conocidos como «antígenos carbohidratos asociados a tumores» (en inglés, *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*, TACAS), marcadores moleculares de células tumorales que implican tanto la sub- o sobreexpresión de ciertos glicopeptidos comunes a células no malignizadas, como la neoexpresión de estructuras específicas. Esta alteración del glicoma desencadena diferentes procesos biológicos, que repercuten en el propio tumor (su capacidad de desarrollo, migración y metástasis) y en procesos inmunológicos asociados (como programas de regulación celular y escape tumoral). Si bien el glicoma tumoral varía según el tipo de célula (por ejemplo, no es lo mismo el glicoma de superficie de una célula tumoral de mama que el de una de páncreas), los cambios más frecuentemente observados en los N-glicanos están asociados a una mayor ramificación y complejización. En este sentido, se observa un aumento en las estructuras multiantenarias, mayor cantidad de N-glicanos $\beta(1,6)$ -ramificados y/o fucosilados, un aumento en la síntesis de cadenas de polilactosamina y en la sialilación y finalmente, mayor proporción de antígenos tipo Lewis (Lewis X o Le^x, Lewis Y o Le^y, sialil Lewis X o SLe^x, sialil Lewis A o SLe^a). En tanto, los O-glicanos se presentan truncados y con estructuras inmaduras como el antígeno Tn (GalNAc- α -O-Ser/Thr) o el antígeno T (también conocido como Core 1 O-glicano, Gal $\beta(1,3)$ GalNAc- α -O-Ser/Thr). Estos TACAS incluyen también estructuras tipo sialilTn (sTn), y entre los glicolípidos con glicosilación alterada, glicoesfingolípidos Globo H y gangliósidos GM2 y GD2/GD3 (Figura 4.1). Este O-glicoma aberrante asiste en la movilidad celular y adhesión contribuyendo a un fenotipo invasivo y consecuentemente, a la promoción de metástasis.

Muchos de los TACAS expresados diferencialmente en la célula tumoral se pueden detectar también a nivel sérico, como consecuencia de la sobreexpresión de los glicoconjugados que los contienen. Un ejemplo clásico es MUC1, una mucina transmembrana altamente O-glicosilada detectable en suero de pacientes con neoplasia de origen epitelial, que asiste al crecimiento y desarrollo metastásico, así como a la resistencia a las terapias. Como consecuencia de la transformación neoplásica y la pérdida de polaridad celular, MUC1 entra en circulación. Su O-glicosilación está alterada y su expresión correlaciona con invasión, metástasis y pobre supervivencia del paciente. Los cambios en el glicoma de suero también se producen como consecuencia de las alteraciones en glicoproteínas séricas de origen no tumoral; si bien los mecanismos moleculares asociados aún no han sido del todo elucidados, se ha propuesto que las glicoproteínas séricas con glicosilación aberrante podrían estar asociadas a la inflamación antitumoral. Este concepto surge

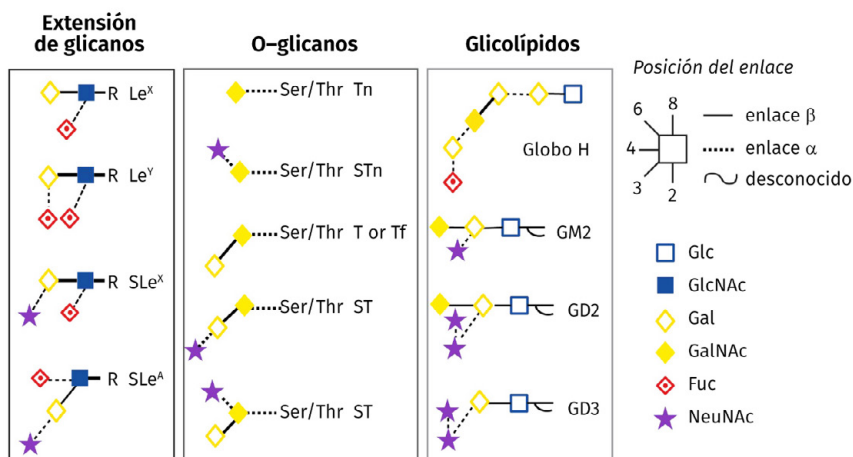


FIGURA 4.1. ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A TUMOR (TACAS). LAS ALTERACIONES EN EL PERFIL DE GLICOSILACIÓN VARÍAN SEGÚN EL TIPO DE TUMOR. EN EL CASO DE LOS N-GLICANOS, ÉSTAS PUEDEN INCLUIR LA SOBREENSILACIÓN DE COMPLEJOS MULTIANTENARIOS, ALTAMENTE FUCOSILADOS Y/O SIALILADOS Y LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANTÍGENOS COMO LEWIS X (LEX), LEWIS Y (LEY), SIALIL LEWIS X (SLEX), O SIALIL LEWIS A (SLEA). EN OPOSICIÓN, LOS O-GLICANOS SE ACORTAN, PRESENTANDO ESTRUCTURAS COMO GALNAC (TN), SIALIL TN (STN), ANTÍGENO DE THOMSEN...FRIEDENREICH (TF). FINALMENTE, EN EL CASO DE GLICOLÍPIDOS, LOS TACAS MEJOR ESTUDIADOS SON GLOBO H, GM2, GD2 Y GD3 (ADAPTADO DE CAGNONI ET AL, 2016)

de la observación de alteraciones similares en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoidea. Hoy en día, buena parte de los biomarcadores utilizados para diagnóstico y prognosis en enfermedades neoplásicas son glicoproteínas, y muchas de ellas con glicosilación alterada (Tabla 4.1). A nivel sérico, entre los biomarcadores de origen tumoral en aplicación clínica se encuentra CA19-9, un nombre alternativo para el glicopeptido SLe^a presente en glicoproteínas y glicolípidos circulantes cuyas altas concentraciones se han asociado con mala prognosis en cáncer gástrico y de colon. Este marcador serológico es utilizado en pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal, gástrico, pancreático o biliar, y es esencial para monitorear respuesta clínica a terapia. En tanto MUC1, antes mencionada, se cuantifica en el ensayo conocido como determinación de CA15-3 en pacientes de cáncer de mama para monitorear respuesta a terapia y también detectar recurrencia de manera temprana.

Algunos de estos TACAS han sido utilizados en vacunas terapéuticas con el objeto de despertar la respuesta inmune antitumoral. Entre ellas se incluyen vacunas para cáncer de mama con blanco en O-glicanos truncados como Tn, STn y antígeno T presentes en mucinas, para el tratamiento de melanoma utilizando GM2 y GD3, y finalmente para cáncer de próstata basadas en el glicoesfingolípido Globo H. Las alteraciones en glicosilación observadas en glicoproteínas de origen

TABLA 4.1. LISTA DE BIOMARCADORES APROBADOS POR LA FDA USADOS ACTUALMENTE EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Marcador	Nombre	Tipo de cáncer	Tipo de detección	Aplicación clínica	Año de aprobación por la FDA
AFP	α -Fetoproteína	Hígado	Concentración de proteínas y fucosilación del core (para AFP-L3)	Diagnóstico, estadificación, detección de recurrencia y monitoreo	1992/ 2008
PSA, Pro2PSA	Antígeno prostático específico	Próstata	Concentración de proteínas	Screening, discriminación de cáncer y enfermedad benigna	1986/ 1994/ 2012
CA125 (MUC16)	Antígeno de cáncer	Ovario	Concentración de proteínas	Detección de recurrencia y monitoreo	1997/ 2011
HE4 (FDC2)	Proteína epididimal humana 4	Ovario	Concentración de proteínas	Detección de recurrencia y monitoreo	2008
test OVA1 (varias proteínas)	β -2 Microglobulina + CA12511 (sube), apolipoproteína A1 + prealbúmina + transferrina (baja)	Ovario	Concentración de proteínas	Predicción	2009
Test ROMA	HE4 + CA125	Ovario	Concentración de proteínas	Predicción	2011
CA15-3 (MUC1)	Antígeno de cáncer 15-3	Mama	Oligosacáridos sialilados de unión O en MUC1	Monitoreo	1997
CA27-29	Antígeno de cáncer 27-29	Mama	Concentración de MUC1	Monitoreo	2002
CA19-9	Antígeno de carbohidratos 19-9 o antígeno de cáncer 19-9	Páncreas, ovario	SLe ^a en mucinas de glicoproteínas y gangliósidos	Monitoreo	2002
CEA	Antígeno carcinoembrionario	Colon, estómago, páncreas, pulmón y mama	Concentración de proteínas	Detección de recurrencia y monitoreo	1985
HER2/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento humano epidermal	Mama	Concentración de proteínas	Elección de la terapia	1998
Tg	Tiroglobulina	Tiroides	Concentración de proteínas	Monitoreo	1997

no tumoral también han resultado en biomarcadores útiles para la clínica: un ejemplo paradigmático es la detección del aumento en *core* α -1,6-fucosilación (1,6)-fucosilación sérica en pacientes con hepatocarcinoma celular, basada principalmente en el aumento de los N-glicanos *core*-fucosilados producido en -fetoproteína-L3 (AFP-L3). Esta glicofoma altamente (-1,6)-fucosilada está selectivamente asociada al tumor, y su detección por kit comercial en suero fue aprobado por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos para el diagnóstico de esta enfermedad neoplásica; su uso se expandió rápidamente como alternativa o complemento al diagnóstico por imágenes.

Finalmente, diversos autores han postulado el uso de lectinas vegetales capaces de reconocer este glicoma aberrante para el diagnóstico temprano de neoplasia por imágenes, y posteriormente, para el delivery selectivo de terapias antitumorales. Un ejemplo es el uso de la lectina de *Sambucus nigra* inmovilizada en nanopartículas fluorescentes, ya que reconoce el siálico (-2,6) altamente expresado en células tumorales. Esta opción fue propuesta para cáncer de mama y para cáncer colorrectal.

4.3. EL SISTEMA INTESTINAL COMO MUESTRA DE LA IMPORTANCIA DEL EJE GLICANOS-LECTINAS EN LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

El intestino es, sin duda, uno de los órganos con mayor complejidad a nivel glicobiológico. En el mismo encontramos no solo derivados de carbohidratos que provienen de nuestra dieta (polisacáridos como el almidón de origen vegetal, condroitín sulfato proveniente de la carne animal, y los oligosacáridos libres de leche, para nombrar algunos), sino también glicanos propios de las células intestinales, glicoconjugados que conforman el mucus que recubre el lado luminal del intestino (mucinas, inmunoglobulina A secretoria, etc.) y finalmente, aquellos glicoconjugados bacterianos que se exponen en la superficie de la microbiota intestinal (ya sean bacterias comensales o patógenas, Figura 4.2). El sistema intestinal es dinámico e intrincado, y su constante exposición a antígenos externos requiere que el sistema inmune asociado a mucosas esté finamente regulado. Por un lado, debe inducir tolerancia contra antígenos alimentarios inocuos y microbiota comensal, pero por el otro y simultáneamente, montar respuestas adecuadas contra posibles patógenos para evitar enfermedades. La gruesa capa de mucus que recubre el tracto intestinal está compuesta mayoritariamente por mucinas, glicoproteínas que están compuestas por carbohidratos en un 80 % de su peso. Estos O-glicanos, de estructura X-GalNAc- α -O-Ser/Thr (donde X pueden ser diversos monosacáridos que dan lugar a diferentes estructuras *core* (ver Capítulo 2 y 6) son tan abundantes en mucinas que, de hecho, la clasificación estructural de los mismos responde al nombre O-glicanos *tipo mucina*. Es tal

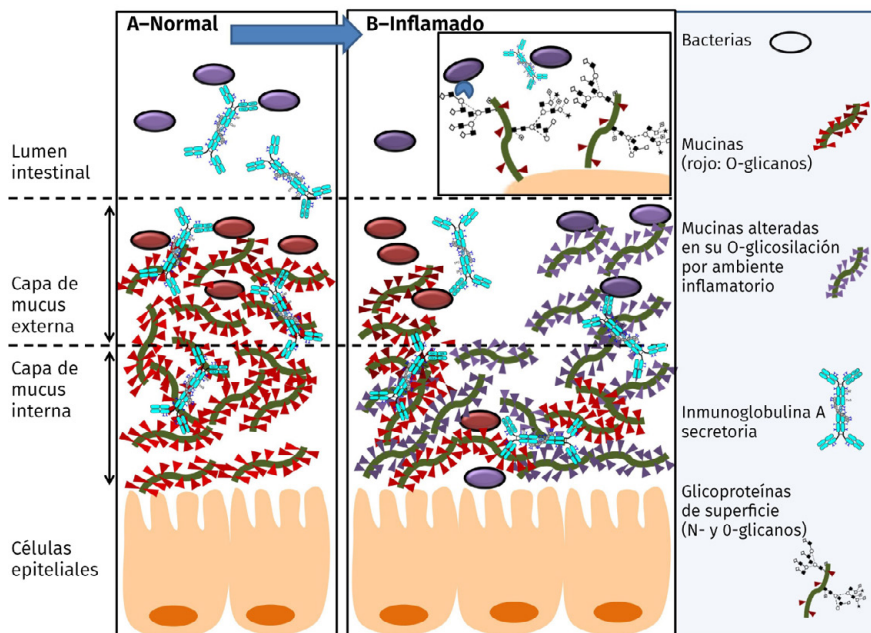


FIGURA 4.2. GLICOBIOLOGÍA DEL COLON, Y SU ALTERACIÓN DURANTE EL PROCESO DE INFLAMACIÓN. A. ESQUEMA DEL COLON EN HOMEOSTASIS LAS CÉLULAS EPITELIALES ESTÁN RECUBIERTAS POR MUCUS, PRINCIPALMENTE COMPUESTO POR PROTEÍNAS ALTAMENTE O-GLICOSILADAS (MUCINAS) QUE ACTÚAN NO SOLO COMO BARRERA FÍSICA DE PROTECCIÓN FRENTE A BACTERIAS SINO COMO FUENTE DE CARBOHIDRATOS PARA AQUELLOS MICROORGANISMOS QUE PUEDEN COLONIZARLAS (ÓVALO ROJO). ALGUNAS BACTERIAS (ÓVALO VIOLETA) NO PUEDEN COLONIZAR, Y CONTINÚAN POR EL TRACTO INTESTINAL PARA LUEGO SER ELIMINADAS. SIGA, LA INMUNOGLOBULINA PREDOMINANTE EN MUCOSAS RECONOCE TANTO BACTERIAS COMENSALES COMO PATOGENICAS, DESATANDO UNA REACCIÓN INMUNE INFLAMATORIA SOLO EN EL CASO DE LAS ÚLTIMAS. B.- ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL COLON EN PROCESO INFLAMATORIO. LA BARRERA FÍSICA DE MUCUS DISMINUYE COMO CONSECUENCIA DE LA INFLAMACIÓN, PERMITIENDO QUE CIERTAS BACTERIAS LLEGUEN A CONTACTAR CON LAS CÉLULAS EPITELIALES Y DESATANDO EN CONSECUENCIA UNA RESPUESTA INMUNE. A SU VEZ, EL PROCESO INFLAMATORIO PUEDE MODIFICAR EL REPERTORIO DE MICROBIOTA INTESTINAL AL PRODUCIR ALTERACIONES EN LA GLICOSILACIÓN DE MUCINAS. EN EL RECUADRO SE OBSERVAN BACTERIAS UNIENDO LOS GLICANOS DEL HUÉSPED A TRAVÉS DE LECTINAS Y OTRAS INTERACTUANDO CON SIGA A TRAVÉS DE SUS GLICANOS

la importancia de esta barrera biofísica de mucus que se ha propuesto el concepto de *legislación por carbohidratos*, donde las estructuras de glicanos presentes en las mucinas del intestino determinan la capacidad de colonización de ciertas bacterias, y en consecuencia la composición de la microbiota intestinal. A su vez, los microorganismos también son parte de la renovación y degradación de esta barrera de mucus, ya que muchas bacterias poseen enzimas glicolíticas que degradan estos glicoconjugados en su beneficio.

En enfermedades inflamatorias intestinales (EII), como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, la función de las mucinas y su glicosilación ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que en mucinas intestinales de pacientes con colitis ulcerosa hay una expresión aumentada de O-glicanos inmaduros como STn, y que las formas de O-glicanos más extendidas, sulfatadas o sialiladas prácticamente desaparecen. Ya sea como causa o consecuencia de estas alteraciones estructurales en las mucinas, la microbiota de pacientes con EII se ve profundamente modificada por el proceso inflamatorio intestinal.

En estos pacientes no solo la estructura de los O-glicanos de mucinas se encuentra modificada: la barrera física que presenta el mucus es mucho más fina, y consecuentemente menos eficaz en evitar el contacto con la microbiota, la que puede entonces llegar hasta el epitelio y generar una respuesta inmune no deseada (Figura 4.2B). Como componente central del sistema inmune en mucosas se encuentra también la IgA secretoria (SIgA), el anticuerpo más abundante en el lumen intestinal y cuya función protectora se basa en el reconocimiento de patógenos entéricos y su discriminación de bacterias comensales. La SIgA es una macromolécula altamente glicosilada (Figura 4.3), y se ha postulado que mientras interacciona con microorganismos patógenos mediante su porción variable (Fab), la interacción con las comensales se daría mediante el reconocimiento de sus glicanos en la porción constante (Fc) o en el componente secretorio por lectinas de origen bacteriano. El recubrimiento de microorganismos comensales por SIgA en el intestino es parte de la educación del sistema inmune que se desarrolla en el neonato, asistiendo en el reconocimiento selectivo de los patógenos y favoreciendo la colonización de los comensales beneficiosos para el huésped como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. En neonatos donde el sistema inmune aún no está del todo desarrollado, la SIgA es proveída por la leche materna (Figura 4.3).

4.3.1. Lectinas bacterianas: adhesinas como factores clave en adhesión e invasión

La adherencia al mucus es una propiedad esencial para que las bacterias comensales puedan colonizar el intestino, y también el primer paso en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas. Para asegurar su supervivencia, la mayor parte de los microorganismos que colonizan el intestino presentan varios mecanismos de adhesión mediados por factores bacterianos denominados adhesinas, muchos de los cuales son lectinas que se unen a glicoproteínas, glicolípidos o glicosaminoglicanos presentes en la superficie celular del huésped. Los factores de adhesión bacteriana suelen ser parte de los pili o fimbriae, finos apéndices similares a cabellos que recubren la superficie de las bacterias. Normalmente se componen de una unidad proteica repetitiva, y en su extremo más alejado de la superficie celular presentan una

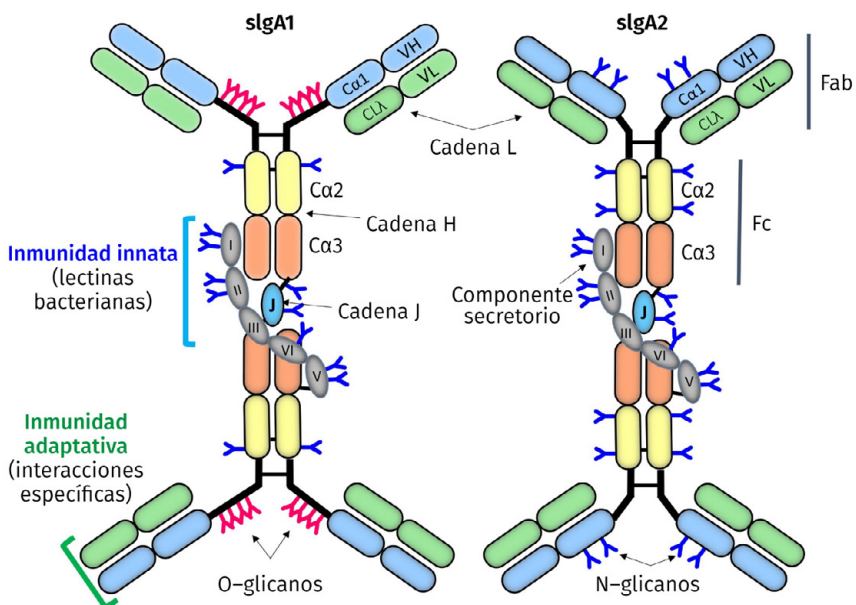


FIGURA 4.3. ESTRUCTURA DE LAS DOS VARIANTES DE SIgA PRESENTES EN HUMANOS AMBAS SON HOMODÍMEROS, CON DOS CADENAS PESADAS (H) Y DOS CADENAS LIVIANAS (L) UNIDAS POR UNA CADENA J Y UN COMPONENTE SECRETORIO. CONTIENEN VARIOS SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN EN LA CADENA PESADA Y EL COMPONENTE SECRETORIO. SIgA1 ES MAYORITARIA EN LA LUZ INTESTINAL A NIVEL DEL COLON Y POSEE UNA REGIÓN BISAGRA ENTRE LA PORCIÓN CONSTANTE (Fc) Y LA PORCIÓN VARIABLE (Fab) MÁS EXTENSA QUE SIgA2, PRESENTANDO ADEMÁS 5 SITIOS POSIBLES DE O-GLICOSILACIÓN. SE POSTULA QUE MIENTRAS EL FAB ESTÁ DIRECTAMENTE RELACIONADO CON LA INMUNIDAD ADAPTATIVA MEDIANTE EL RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DE ANTÍGENOS, LOS GLICANOS PRESENTES EN AMBAS ESTRUCTURAS ESTARÍAN INVOLUCRADOS EN LA INMUNIDAD INNATA POR EL RECONOCIMIENTO DE ESTOS A TRAVÉS DE LECTINAS DE ORIGEN BACTERIANO

adhesina que media las interacciones con el huésped. Por ejemplo, ciertas cepas patógenas de *Salmonella* presentan pili que facilitan su adherencia a la mucosa intestinal humana, causando diarrea infecciosa. Los ligandos específicos a los que se unen las bacterias en las células animales se conocen como receptores de adhesina y son bastante variables; de hecho, el tropismo de ciertas bacterias por tejidos específicos (por ejemplo, sistema respiratorio versus sistema gastrointestinal) se define por el repertorio de pares receptor-adhesina expresados. En algunos casos, las bacterias expresan adhesinas que unen mucinas o glicoproteínas de matriz extracelular como fibronectina. En otros, la adhesión puede estar mediada por carbohidratos terminales o motivos internos en la estructura glicosídica, que pueden ser expuestos a

las adhesinas por la acción de glicosidasas específicas. También es posible encontrar lectinas bacterianas ancladas a membrana, como es el caso de *S. enterica serovar Typhi*, causante de la fiebre tifoidea en humanos: este microorganismo comienza su proceso de infección por invasión intracelular de células intestinales epiteliales, y el núcleo (*core*) externo del lipopolisacárido (LPS) de esta bacteria es esencial para el proceso de internalización en células epiteliales. La eliminación de carbohidratos clave en el núcleo de LPS reduce marcadamente la eficiencia de la invasión. Otro ejemplo es *Helicobacter pylori*, la causa de úlceras gástricas más común en humanos: su reconocimiento de glicopeptidos tipo Lewis B a través de la adhesina BabA hizo que recientemente se postulase la utilización de nanopartículas decoradas con estas glicoestructuras como terapia para la eliminación de este patógeno.

La SIgA, mencionada anteriormente, también es capaz de prevenir la adhesión de patógenos a las superficies epiteliales por competencia de interacción con sus propios glicanos, ya que en ambas isoformas humanas tanto la cadena pesada de SIgA como el componente secretorio de la misma están altamente glicosilados (Figura 4.3). Como estos glicanos son similares estructuralmente a aquellos en la cara luminal de las células epiteliales, se ha propuesto que la SIgA tanto libre como unida a bacterias puede actuar como inhibidor competitivo de la unión bacteria-epitelio. Por ejemplo, SIgA en concentraciones similares a las encontradas en leche materna humana inhibe la unión de la toxina A de *Clostridium difficile* a sus receptores epiteliales por interacción con los residuos de galactosa y ácido siálico presentes en el componente secretorio (Figura 4.3). Además, y si bien es lógico pensar que la SIgA ha evolucionado con la función de reconocer los microorganismos patógenos a través de la región variable, en los últimos años se ha demostrado que más del 70 % de las bacterias comensales se encuentran recubiertas por SIgA, pero su interacción en muchos casos es vía glicanos. En este sentido, se ha propuesto que las interacciones entre los glicanos de SIgA y las bacterias comensales son uno de los mecanismos por los que controla la homeostasis intestinal (Figura 4.3).

4.3.2 Oligosacáridos libres en leche materna en la colonización intestinal temprana y en el control del establecimiento de microbiota en neonatos

En el desarrollo neonatal de mamíferos, la madre provee una parte importante del estímulo ambiental en la forma de leche materna, uno de los fluidos biológicos más complejos que provee nutrientes, compuestos protectores y factores de desarrollo y crecimiento. El efecto protector de la leche materna va más allá del período de lactancia, por lo que se ha postulado que modula las funciones de inmunidad y barrera de mucosas a largo plazo, pero con un mecanismo aún en estudio. Claramente, la primera diferencia es el

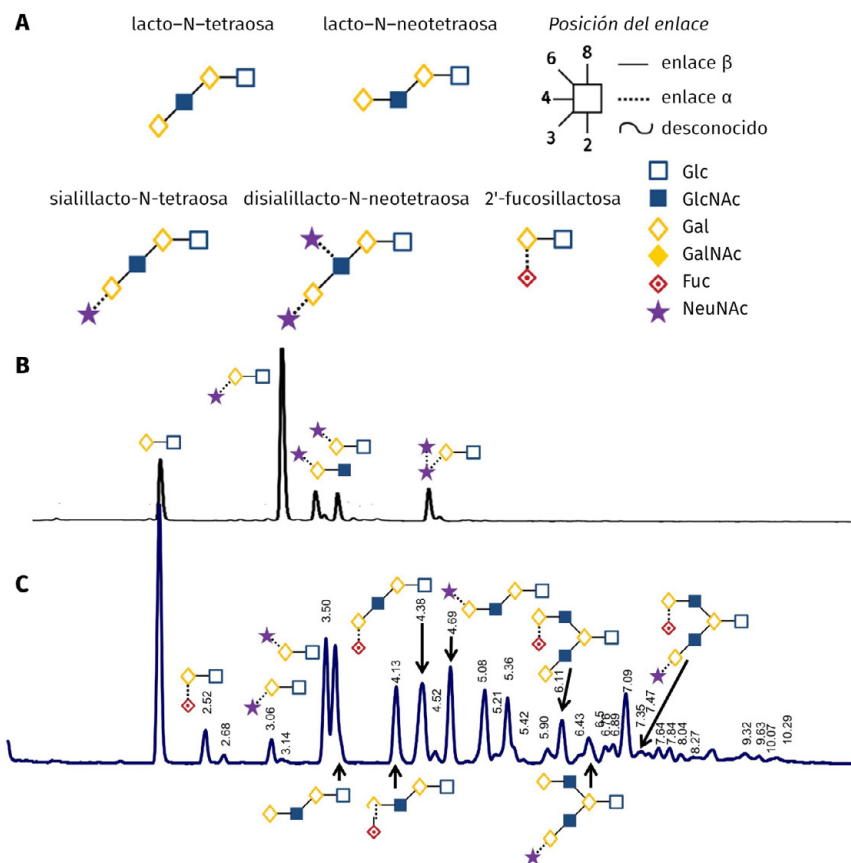


FIGURA 4.4. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE MATERNA Y LECHE BOVINA ESTRUCTURAS DE OLIGOSACÁRIDOS REPRESENTATIVOS PRESENTES EN LECHE, INCLUYENDO LACTO-N-TETRAOSA Y LACTO-N-NEOTETRAOSA (NEUTROS), 2'-FUCOSILLACTOSA (NEUTRO FUCOSILADO), SIALILLACTO-N-TETRAOSA Y DISIALILLACTO-N-NEOTETRAOSA (SIALILADOS CON UNA O DOS CARGAS NEGATIVAS, RESPECTIVAMENTE). **B.** CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE BOVINA, DERIVATIZACIÓN CON 2-AMINOENZAMIDA Y SEPARACIÓN POR MATRIZ HIDROFÍLICA (HILIC-FLR). SE IDENTIFICAN EN CADA PICO LAS ESTRUCTURAS MAYORITARIAS PRESENTES. **C.** CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS LIBRES EN LECHE MATERNA, DERIVATIZACIÓN CON 2-AMINOENZAMIDA Y SEPARACIÓN POR MATRIZ HIDROFÍLICA (HILIC-FLR). SE SIMBOLIZAN SOLO ALGUNAS DE LAS 100 ESTRUCTURAS IDENTIFICADAS EN LECHE MATERNA. EN ESTE PANEL SE PUEDE OBSERVAR COMO, COMPARADO AL CROMATOGRAMA B, LAS ESTRUCTURAS PRESENTES EN LECHE MATERNA SON MUCHO MÁS COMPLEJAS Y VARIADAS

establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha demostrado distinta entre niños alimentados con leche materna y con formulaciones artificiales a partir de leche bovina comercial.

Dentro de la compleja composición de la leche, una buena proporción son los oligosacáridos libres en leche (oLL), donde cada especie de mamífero a través de un proceso evolutivo ha seleccionado estructuras de glicanos libres que resultan de la adaptación a las necesidades de cada animal. En leche materna humana, estos oligosacáridos se encuentran en una concentración aproximada de 10–15 g/L lo que, considerando su bajo peso molecular, los hace extremadamente abundantes. Generalmente las estructuras presentes son derivados del disacárido lactosa, con considerable variación estructural dependiente de la especie animal y particularmente en el caso de la leche materna humana, con dependencia del background genético y étnico, incluyendo la expresión de grupos sanguíneos. Los oligosacáridos se pueden clasificar en neutros no fucosilados, neutros fucosilados y cargados sialilados, donde los últimos contienen estructuras neutras y neutras fucosiladas decoradas con ácido siálico en diferentes proporciones (Figura 4.4A). En leche humana materna todos estos grupos están representados, mientras que la leche de animales domésticos (bovina, de cabra, de oveja) presenta estructuras más simples y menos fucosiladas (Figuras 4.4B y 4.4C).

Al ser carbohidratos, inicialmente se creyó que tenían propiedades nutricionales, pero se ha demostrado que la mayoría de los mismos prácticamente no se degradan en su pasaje por el tracto intestinal. El perfil de oLL se demostró muy similar en leche materna y en heces de infantes, salvo por pequeñas diferencias en porcentaje de abundancia. Sin embargo, esto parece depender de la estructura específica de los oLL, ya que por ejemplo la lacto-N-tetraosa disminuye considerablemente en heces, y 50 % de las heces de infantes analizadas no presentan sialilacto-N-tetraosa o disialilacto-N-neotetraosa (Figura 4.4A). Se ha postulado que del total de los oLL ingeridos y no recuperados en heces, una buena parte es fermentada por microbiota, mientras que otra parte pasaría a nivel sistémico vía la barrera epitelial y con una potencial función inmunomoduladora, pero los estudios a este nivel son aún escasos. Hoy sabemos que los oLL son un factor clave de protección innata. Los oLL controlan de manera indirecta el establecimiento de la microbiota intestinal en el neonato, favoreciendo ciertas especies bacterianas comensales necesarias para degradar los alimentos en favor de la nutrición del neonato. Un ejemplo es el género *Bifidobacterium*, ya que las bacterias de este grupo fermentan estos oligosacáridos como parte de su proceso metabólico natural. Estas bacterias lácticas son una de las primeras en colonizar el tracto gastrointestinal humano, y su genoma contiene un arreglo de genes muy abundante para el metabolismo de carbohidratos. Es más: algunas especies muestran un genoma especializado para la degradación de oligosacáridos libres en leche. De hecho, los oLLs con N-acetilglucosamina en

su estructura fueron inicialmente conocidos como «factor bifidus», un factor clave para la colonización del tracto intestinal por Bifidobacteria. Estos datos sugieren que los OLL promueven determinadas especies de *Bifidobacterium* liberando N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa, y que estos monosacáridos no solo sirven al huésped como fuente de carbono sino también a otras bacterias de la microbiota intestinal, ayudando a un balance en las poblaciones que componen el microbioma del huésped.

Desde hace varias décadas estudios independientes demostraron una fuerte asociación entre el amamantamiento y la disminución en los casos de diarrea y enfermedades respiratorias, hecho que puede ser parcialmente atribuido a la potencial acción competitiva de los OLL. Estos glicanos libres, cuyas estructuras se asemejan a aquellas con las que microorganismos patógenos interactúan, compiten con los glicanos naturales del sistema intestinal en los procesos de adhesión, colonización y/o invasión. Al ser oligosacáridos solubles, los microorganismos no pueden adherirse a las mucinas o a la superficie celular y son eliminados. Particularmente, las estructuras derivadas de la 2'-fucosilactosa (Figura 4.4) han demostrado ser un factor de protección innato transmitido al infante vía la leche materna, siendo eficaz en la disminución de la invasión de células epiteliales humanas por *Campylobacter jejuni*, agente causante de diarrea. Diversos OLL fucosilados también disminuyen la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), uno de los microorganismos causantes de diarreas severas en infantes. La lacto-N-neotetraosa (Figura 4.4A) demostró poseer una actividad biológica similar.

4.3.3. El otro lado de la moneda: las lectinas del huésped como factor clave en la regulación de la respuesta inmune

Las familias de lectinas en humanos se dividen en tres grandes grupos: Lectinas de tipo C (debido a que son calciodependientes), Galectinas (lectinas solubles con afinidad por derivados de lactosa, Gal(1,4)-Glc) y Siglecs (del inglés, *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*, lectinas tipo inmunoglobulina que unen ácido siálico). Las familias de lectinas se clasifican según la estructura primaria y secundaria del dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), aunque pueden variar en la estructura glicosídica por la que presentan afinidad. Su funcionalidad también es muy variada, y en esta sección describiremos algunas de ellas focalizando en sus funciones en el sistema inmune en respuesta a microorganismos intestinales (lectinas de tipo C) y al desarrollo tumoral (Siglecs/Galectinas).

4.3.4. Inducción de la respuesta inmune por Lectinas de tipo C: ¿ataque o tolerancia?

Las lectinas tipo C poseen funciones muy relevantes a nivel inmune, actuando como receptores de adhesión y señalización. DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule -3- Grabbing Nonintegrin*) es una lectina presente en la superficie de células inmunes que reconoce glicanos de alta Man o fucosilados presentes en microorganismos patógenos (por ejemplo, *Enterobacter sakazakii*, cuya presencia en fórmulas de leche para neonatos es una de las causas más frecuentes de meningitis y enterocolitis necrotizante). Si bien se esperaría que el reconocimiento de estas estructuras por DC-SIGN en las células dendríticas (células especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígeno a linfocitos T) provoque la activación de la respuesta inmunológica y la eliminación de los microorganismos patógenos, *E. sakazakii* es un ejemplo de cómo una bacteria puede tomar ventaja de la actividad inmunomoduladora de DC-SIGN y utilizarla para su propio beneficio. Esta bacteria evita la presentación de antígenos a las células T y de ese modo asegura su supervivencia dentro de las células dendríticas, asegurando un nicho de reproducción y la bacteremia suficiente para luego cruzar la barrera hematocefálica, causando meningitis (Figura 4.5A). Las interacciones de DC-SIGN no se limitan al reconocimiento de microorganismos patógenos, sino que también involucra probióticos. Los efectos beneficiosos de los probióticos incluyen el control de la inflamación intestinal, como la que se observa en enfermedades como Crohn o colitis ulcerosa, pero los mecanismos no han sido del todo esclarecidos. En el caso de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei*, dos probióticos de amplio uso, se ha demostrado que los mismos inducen la producción de linfocitos T regulatorios (una población linfocitaria que controla la inflamación) vía unión a DC-SIGN, generando un estado de tolerancia e inmunomodulación positiva. Finalmente, DC-SIGN funciona como receptor clave de la SIgA, asistiendo a la vigilancia inmunológica en mucosas.

Otro miembro de esta familia es Dectin-1, una lectina con afinidad por β -glucanos producidos por hongos, por ejemplo, *Candida albicans*, un hongo presente en el fungoma intestinal de manera corriente en humanos, pero que frente a un estado de inmunosupresión como el que se presenta en personas transplantadas o pacientes con cáncer puede tornarse patógeno (Figura 4.5A). La unión de esta lectina a su ligando en la superficie del patógeno provoca la fagocitosis de este, y se ha demostrado que ratones deficientes en Dectin-1 tienen menor sobrevivencia y mayor cantidad de órganos infectados después de ser inyectados con *C. albicans*, remarcando su importancia. Además, se ha demostrado que Dectin-1 es un receptor que reconoce los glicanos de la cadena pesada de SIgA para su transcitosis reversa, un proceso por el cual este anticuerpo unido a bacterias es transportado desde la luz intestinal a través del epitelio proveyendo información

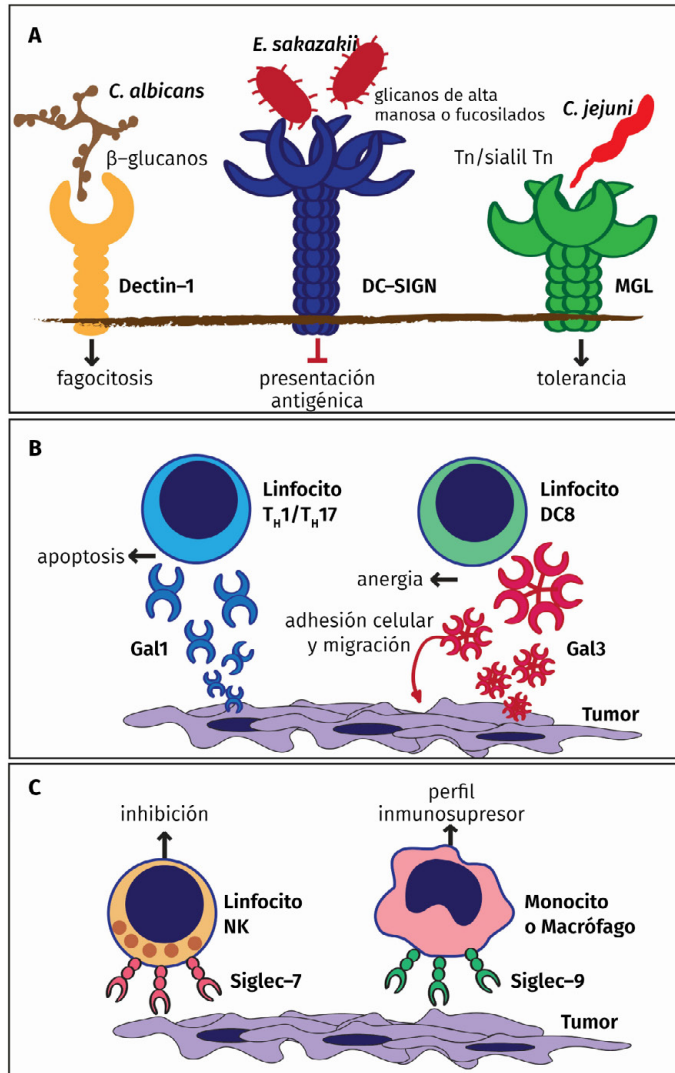


FIGURA 4.5. EJEMPLOS DE INTERACCIONES CLAVE PARA LECTINAS DE TIPO C, SIGLECS Y GALECTINAS. **A.** LECTINAS TIPO C. DC-SIGN SE EXPRESA EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y RECONOCE GLICOEPITOPES DE AGENTES INFECCIOSOS COMO *E. SAKAZAKII*, EN ESTE CASO LA BACTERIA IMPIDE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA POR PARTE DE LA CÉLULA DENDRÍTICA. DECTIN-1 UNE ESPECÍFICAMENTE B-GLUCANOS PRESENTES EN LAS PAREDES CELULARES DE HONGOS COMO *C. ALBICANS* Y PROMUEVE LA LA FAGOSITOSIS DE LOS MISMOS. MGL RECONOCE A *C. JEJUNI* A TRAVÉS DE LAS TERMINALES N-ACETILGALACTOSAMINA DEL LPS FAVORECIENDO LA DIFERENCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA UN PERFIL TOLEROGÉNICO. **B.** GALECTINAS. GAL1 INDUCE LA APOPTOSIS SELECTIVA DE LINFOCITOS T EFECTORES DE LAS SUBPOBLACIONES T_H1 Y T_H17 . GAL3 TAMBIÉN CONTRIBUYE A FAVORECER UN MICROAMBIENTE TUMORAL INMUNOTOLERANTE FAVORECIENDO LA ANERGIA DE LINFOCITOS T CD8 QUE INFILTRAN TUMORES. **C.** SIGLECS. SIGLEC-7 EJERCE UN ROL CRUCIAL EN EL ESCAPE TUMORAL POR INHIBICIÓN DE CÉLULAS NK. SIGLEC-9 GENERA LA POLARIZACIÓN DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HACIA UN PERFIL INMUNOSUPRESOR

a las células presentadoras de antígeno, que activan la respuesta inmune en caso de ser necesario. De este modo, los glicanos de SIgA son clave en el proceso de desencadenamiento de la respuesta inmune (en el caso de patógenos) o mantenimiento de la tolerancia (en el caso de comensales). Finalmente, otra lectina que pertenece a esta familia es MGL (del inglés, *Macrophage Galactose-type C-type Lectin*). Esta lectina presenta afinidad por estructuras truncadas de O-glicanos, Tn y STn. La funcionalidad inmunológica de MGL es muy diversa, e incluye el reconocimiento de microorganismos patógenos como *Campylobacter jejuni*, pero en vez de desencadenar una respuesta antimicroorganismo *C. jejuni* aprovecha la actividad inmunomoduladora de MGL, produciendo una respuesta inmunológica tolerogénica y favoreciendo su supervivencia (Figura 4.5A).

4.3.5. Siglecs y Galectinas como agentes proescape tumoral

Las galectinas son proteínas capaces de reconocer residuos de N-acetilacetilactosamina (Gal (1,4)GlcNAc, LacNAc) presentes en diferentes glicoconjugados de la superficie celular. Si bien los miembros de esta familia comparten propiedades estructurales y funcionales que los unen, entre los mismos se han descrito sutiles preferencias de afinidad por diversos derivados de LacNAc según los mismos se encuentren decorados con fucosa o siálico, entre otros. Las galectinas han demostrado un papel clave en la modulación del sistema inmune a distintos niveles, y particularmente en el caso de enfermedades neoplásicas, su papel modulador en eventos como la tumorigénesis y/o metástasis las han hecho atractivos blancos terapéuticos. Por ejemplo, estas lectinas son capaces de inducir la apoptosis de linfocitos T efectores, contribuyendo al ambiente tolerogénico y al escape tumoral. Entre los miembros de esta familia, dos de los más estudiados son Galectina-1 (Gal1) y Galectina-3 (Gal3).

Gal1 es una lectina con afinidad por unidades de LacNAc terminales que no se encuentren (2,6)-sialiladas. Esta galectina se encuentra sobre-expresada en casi todos los tipos tumorales y posee un papel clave en el escape tumoral, ya que media la apoptosis de linfocitos T efectores T_H1 y T_H17 a partir su unión selectiva al glicoma de superficie de los mismos. De este modo, Gal-1 promueve el desarrollo neoplásico, ya que al eliminar los linfocitos T responsables de reconocer y atacar el tumor, esta lectina asiste al ambiente de tolerancia requerido para su desarrollo (Figura 4.5B).

De manera similar a Gal1, Gal-3 favorece distintos aspectos de la biología tumoral como la adhesión celular, la migración, e inclusive puede mediar la resistencia a apoptosis tumoral inducida por agentes quimioterapéuticos. Si bien posee afinidad por diversos glicoantígenos, Gal3 reconoce Gal β (1,3)GalNAc α 1-O-Ser/Thr (antígeno T, Figura 4.1) con alta afinidad, uno de los TACAS con más frecuencia de expresión en diversos tumores. Esta interacción

Gal3- antígeno T ejerce roles importantes en el proceso metastásico ya que afecta los estadios iniciales de la adhesión endotelio-célula tumoral. Además, Gal3 también puede contribuir a la tolerancia necesaria para el desarrollo del tumor ya que modula la actividad inmune antitumoral mediante diversos mecanismos, entre ellos, el control de los linfocitos T CD8 antitumorales (Figura 4.5C).

Finalmente, el incremento de sialilación se ha descrito como una característica de la célula tumoral (ver sección 2 de este capítulo). Las siglecs, también conocidas como lectinas de tipo I, son proteínas de membrana afines a ácido siálico. Las Siglecs son capaces de inhibir la respuesta inmune tanto por unión a sialoglicoconjugados expresados en las mismas células inmunes que las producen, como por respuesta a ligandos exógenos. Con funciones tanto en inmunidad innata como adaptativa, su interacción con glicanos sialilados en el microambiente tumoral ha sido solo parcialmente estudiada, pero generalmente presentan un papel protumorigénico ya que inhiben la respuesta antitumoral. A modo de ejemplo, Siglec-7 es capaz de evitar el ataque de células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killers*) al tumor, favoreciendo el desarrollo neoplásico. Finalmente, Siglec-9, una lectina con afinidad preferencial por glicopeptidos de ácido siálico con unión 2,3 a Gal, puede interactuar con MUC1 (una mucina de membrana altamente O-glicosilada, sobreexpresada en tumores y glicosilada de manera aberrante en los mismos (ver sección 2 de este capítulo) y de este modo, promover un ambiente protumorigénico. Siglec-9 es expresada en monocitos y macrófagos, y al interactuar con las formas de MUC1 altamente sialiladas producidas por las células tumorales, educa a estas células en un perfil inmunosupresor para así inducir la inhibición de la respuesta inmune y en consecuencia, el desarrollo tumoral (Figura 4.5C).

En síntesis, y como se ha detallado mediante diversos ejemplos en este capítulo, la glicobiología es una disciplina científica transversal que puede aportar no solo al conocimiento general, sino a la comprensión de los mecanismos de modulación de la respuesta inmune, las interacciones huésped-patógeno y el desarrollo neoplásico. Su exploración requiere de un abordaje multidisciplinario que involucra la utilización de las nuevas tecnologías estructurales desarrolladas para la caracterización de glicoconjugados, y la interpretación funcional de esos datos en un contexto fisiopatológico. Sin dudas, la glicobiología como campo de estudio seguramente se expandirá y realizará grandes aportes al área clínica en los años venideros.

4.4. RESUMEN

La caracterización estructural y funcional de la glicosilación como proceso celular de modificación postraduccional de proteínas ha surgido como área de alto interés industrial, principalmente a partir del cambio de paradigma

que se produjo con la producción recombinante de bioterapéuticos. Sin embargo, la funcionalidad biológica del glicoma (conjunto de glicoconjugados presentes en un determinado tipo celular, tejido u organismo) lleva ya muchos años en estudio, y ha demostrado ser clave en el contexto de salud y enfermedad humana. La variabilidad estructural del glicoma es controlada y exquisitamente regulada por factores genéticos y ambientales y, en consecuencia, este funciona como una carta de presentación y comunicación celular, donde las alteraciones del mismo (ya sean causa o consecuencia de un proceso patológico) pueden desencadenar diversas respuestas biológicas. La evolución ha generado familias de proteínas con dominios de reconocimiento de carbohidratos (lectinas) que se especializan en la decodificación de la información contenida en el glicoma, haciendo que el eje lectinas-glicoma participe en una amplia variedad de procesos de comunicación célula-célula. La doble vía de comunicación que se establece como consecuencia del reconocimiento de glicanos es decisiva para el funcionamiento del sistema inmune: en un modelo simplificado, la respuesta inmunológica puede entenderse como el resultado del reconocimiento y discriminación de aquello que es propio y debe ser tolerado, en oposición a aquello que es ajeno y debe ser controlado o eliminado. El papel del glicoma como mediador clave en procesos fisiológicos y patológicos es justamente el centro de atención de este capítulo.

Centralizaremos el análisis en dos áreas de estudio: en primer lugar, se discutirá la glicosilación aberrante como una característica distintiva de la célula tumoral, y se demostrará su asociación con diferentes procesos biológicos e inmunológicos que, en líneas generales, promueven el crecimiento y escape tumoral. En segundo lugar, se describirán ejemplos de cómo funciona el eje lectinas-glicoma en el sistema intestinal, y su influencia sobre el establecimiento de la microbiota y la homeostasis inmune.

Referencias bibliográficas

- CAGNONI, A. J., PÉREZ SÁEZ, J. M., RABINOVICH, G. A., & MARIÑO, K. V.** (2016). Turning-off signaling by siglecs, selectins, and galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer. *Front. Oncol*, 6, 109. 10.3389/fonc.2016.00109
- FRASCHILLA, I. & PILLAI, S.** (2017). Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol. Rev.*, 276(1), 178–191. 10.1111/imr.12526
- HARVEY, D. J., MERRY, A. H., ROYLE, L., CAMPBELL, M. P., DWEK, R. A. & RUDD, P. M.** (2009) Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics*, 9(15), 3796–801. 10.1002/pmic.200900096
- KIRWAN, A., UTRATNA, M., O'DWYER, M. E., JOSHI L. & KILCOYNE M.** (2015). Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. *Biomed. Res. Int.*, 490531. 10.1155/2015/490531
- MANTIS, N. J., ROL, N. & CORTHÉSY, B.** (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, 4, 603–611. 10.1038/mi.2011.41
- MARIÑO, K. V., SALDOVA, R., ADAMCZYK, B. & RUDD, P. M.** (2012). Changes in Serum N-Glycosylation Profiles: Functional Significance and Potential for Diagnostics. *Carbohydr. Chem.*, 37, 57–93.
- MARIÑO K., BONES J., KATTLA J. J. & RUDD P. M.** (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 6, 713–23. 10.1038/nchembio.437
- MAYER, S., RAULF, M. R. & LEPENIES, B.** (2017) C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochem Cell Biol*, 147(2), 223–237. 10.1007/s00418-016-1523-7
- MÉNDEZ-HUERGO, S. P., BLIDNER, A. G. & RABINOVICH, G. A.** (2017). Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr. Opin. Immunol.*, 45, 8–15. 10.1016/j.coi.2016.12.003
- PINHO, S. S. & REIS, C. A.** (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15, 540–555. 10.1038/nrc3982
- POOLE, J., DAY, C. J., VON ITZSTEIN, M., PATON, J. M. & JENNINGS, M. P.** (2018). Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 440–452. 10.1038/s41579-018-0007-2
- VARKI, A.** (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49. 10.1093/glycob/cww086
- VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., ET AL.** (2015–2017). *Essentials of Glycobiology* [online]. 3rd. edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- YU, Z. T., NANTHAKUMAR, N. N. & NEWBURG, D. S.** (2016). The Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Quenches *Campylobacter jejuni*-Induced Inflammation in Human Epithelial Cells HEP-2 and HT-29 and in Mouse Intestinal Mucosa. *J. Nutr.*, 146(10), 1980–1990. 10.3945/jn.116.230706
- ZIZZARI, I. G., NAPOLETANO, C., BATTISTI, F., RAHIMI, H., CAPONNETTO, S., PIERELLI, L., NUTI, M. & RUGHETTI, A.** (2015). MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference. *J. Immunol. Res.*, 450695. 10.1155/2015/450695

5

Ingeniería de proteínas terapéuticas mediante hiperglicosilación en células de mamíferos

MARCOS OGGERO Y NATALIA CEAGLIO

5.1. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico humano adquiere gran notoriedad a nivel de las células de mamífero debido a la capacidad de estas últimas de proporcionar modificaciones postraduccionales similares a las proteínas humanas.

La demanda en términos del tipo y la cantidad de proteínas terapéuticas dependerá de los procedimientos aplicados al tratamiento de diversas patologías y para las cuales muchos de los bioterapéuticos se basan en glicoproteínas (GP).

Las GP naturales o recombinantes son entidades de origen proteínico que durante su síntesis reciben la decoración glicosídica en forma co/postraducciona. La masa de glicanos incorporados a la macromolécula le confiere diferentes propiedades que se manifiestan generando cambios a nivel de la farmacocinética, inmunogenicidad, interacción con el receptor, activación celular, comunicación célula-célula, direccionamiento a determinados tejidos u organelas, entre otras (Sethuraman & Stadheim, 2006; Li & d'Anjou, 2009).

En virtud de esto, la optimización del contenido glicosídico constituye un aspecto relevante de la biotecnología orientada a la producción de glicoproteínas terapéuticas ya sea a partir de sus contrapartes naturalmente glicosiladas o de nuevas entidades que serán modificadas mediante diversos métodos de glicoingeniería.

Por lo tanto, la glicoingeniería surge como una estrategia basada en la modificación del contenido y/o la estructura de los glicanos de una proteína mediante la aplicación de modificaciones genéticas que dan lugar a protocolos para modificar proteínas y células. En un sentido amplio la glicoingeniería incluye la optimización y remodelación de glicanos que naturalmente se expresan en una dada proteína, la eliminación de los mismos o la incorporación de nuevos (Figura 5.1), todo ello con el objetivo de generar entidades con propiedades novedosas o mejoradas, que en el caso de bioterapéuticos se traduzca en el incremento de la potencia biológica y la disminución de los efectos adversos.

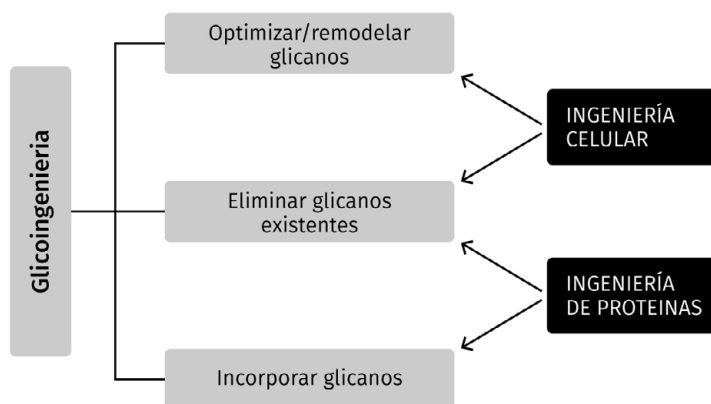


FIGURA 5.1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ASPECTOS QUE INVOLUCRA LA GLICOINGENIERÍA

5.2. MODIFICACIÓN DE GLICANOS

Desde el punto de vista de la optimización y remodelación de glicanos, el control o la modificación de diferentes caminos biosintéticos constituyen los mecanismos por los cuales la glicoingeniería busca, entre otros aspectos, evitar/reducir la macro/microheterogeneidad de glicoproteínas de manera que exhiban un contenido más definido de glicanos. Por ejemplo, en células eucariotas tales como levaduras, células de insectos, plantas y células de mamíferos, los trabajos se orientaron a incrementar el grado de ocupación aumentando la eficiencia de N-glicosilación (Cho *et al.*, 2012), a conferir la capacidad de producir glicanos de tipo complejo y a evitar la síntesis de N-glicanos ausentes en humanos y potencialmente inmunogénicos, tales como el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y la hipermanosilación (Arico *et al.*, 2013; Aumiller *et al.*, 2012; Wang & Lomino 2012). Asimismo, la manipulación genética a nivel de la sialidación, fucosilación, galactosilación y ramificación constituyen procedimientos para modificar la glicosilación de proteínas en la búsqueda de modular determinadas funciones y propiedades de las mismas. Los mecanismos para lograr una glicosilación más definida se basan en aplicar mutagénesis para producir *knockout* de determinadas enzimas (Patnaik & Stanley, 2006), desarrollar interferencia mediante la utilización de inhibidores específicos de enzimas (Zhou *et al.*, 2008; Scanlan *et al.*, 2007) o, finalmente en el otro extremo, incrementar la expresión de enzimas glicomodificadoras (Fukuta *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2011). Los trabajos de Heffner *et al.*, (2018) y de Tejwani

et al., (2018) constituyen dos interesantes revisiones de modificaciones de glicanos que exploran detalladamente los mecanismos y procedimientos que se mencionaron con anterioridad e introducen conceptos claros con respecto a la glicoingeniería a nivel celular empleando sistemas de expresión mamíferos. Todo esto permitirá enriquecer un producto terapéutico con las glicofomas deseadas.

Asimismo, se debe considerar que los diferentes métodos de glicoingeniería han sido aplicados a la obtención de moléculas con un contenido glicosídicamente más definido empleando distintos tipos celulares. Es conocido que las células CHO constituyen el huésped de elección para expresar glicoproteínas de interés terapéutico debido a su capacidad de expresar proteínas en condiciones de cultivos en adherencia o en suspensión y por representar un sistema bien caracterizado y para el cual la robustez inherente a su empleo y reproducibilidad es su principal distinción. Sin embargo, en los últimos años, han surgido las líneas celulares humanas como sistemas de expresión debido a su capacidad de producir proteínas que portan modificaciones postraduccionales consistentes con aquellas presentes en las proteínas producidas por el propio ser humano. De este modo, las células HEK son capaces de producir proteínas cuyos residuos glicosídicos pueden ser modificados por ácido siálico (AS) en unión α 2-6, fucosa en enlace α 1-3/4 o GlcNAc bisectante (Gugliotta *et al.*, 2017). Tales modificaciones son características de las células humanas y no pueden ser realizadas por las células derivadas de hámsteres debido a la ausencia de determinadas enzimas (Dumont *et al.*, 2015; Durocher & Butler, 2009).

Por otro lado, las células CHO producen glicanos antigénicos como Neu5Gc y α -Gal, ambos ausentes en proteínas de origen humano (Bosques *et al.*, 2010; Dietmair *et al.*, 2012; Ghaderi *et al.*, 2012). Esto motivó el creciente interés de producción de proteínas recombinantes terapéuticas que requieren modificaciones postraduccionales específicas en huéspedes humanos y, así, que diferentes productos biofarmacéuticos derivados de células HEK hayan sido aprobados por la Administración de drogas y alimentos (FDA) y la Agencia de medicinas europea (EMA) y que tres de ellos se encuentren en el mercado (Gugliotta *et al.*, 2017).

Es importante considerar entonces, que en todo procedimiento de glicoingeniería es necesario profundizar en los mecanismos o caminos que conducen a la glicosilación de proteínas para así, disponer la información necesaria para seleccionar el tipo de célula a emplear en la producción de una proteína recombinante de interés terapéutico.

Un caso emblemático de la glicoingeniería lo constituye la tecnología GlycoDelete[®], que fue primariamente desarrollada en células humanas HEK293 (Meuris *et al.*, 2014) y luego aplicada en células vegetales (Piron *et al.*, 2015). El sistema tiende a reducir la heterogeneidad debida a la N-glicosilación durante la producción de GP y a evitar la inmunogenicidad frecuentemente observada durante el uso de bioterapéuticos basados en

glicoproteínas recombinantes producidas en células vegetales (β -1,2-xilosa y α -1,3-fucosa constituyen residuos y enlaces altamente inmunogénicos). La tecnología consiste en una modificación de la maquinaria de glicosilación mediante inactivación de la N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y sobreexpresión de una enzima deglicosilante (endo-N-acetil- β -D-glucosaminidasa, endoT) a nivel del aparato de Golgi. Esta última enzima hidroliza los glicanos de tipo alta manosa (Figura 5.2) que se expresan en proteínas derivadas de células *knockout* para la enzima GnTI. Por lo tanto, dichas modificaciones rinden glicoproteínas que portan un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la Asn correspondiente. En huéspedes mamíferos el residuo GlcNAc puede ser posteriormente elongado mediante galactosil- y sialiltransferasas que agregan galactosa (Gal) o AS para producir proteínas con el disacárido Gal-GlcNAc o su derivado α -2,3-sialilado (Meuris *et al.*, 2014). En el caso de las células vegetales la estrategia de glicoingeniería mediante GlycoDelete[®] produce GP conteniendo N-glicanos que poseen un único residuo GlcNAc debido a que no se observan posteriores modificaciones para generar oligosacáridos de mayor tamaño a partir del mencionado monosacárido aminado (Piron *et al.*, 2015). Esta tecnología se dirige fundamentalmente a producir proteínas recombinantes para las cuales sus funciones no se vean afectadas por la pérdida del N-glicano de tipo complejo (Figura 5.2). Además, simplifica el proceso de purificación y disminuye sus propiedades inmunogénicas.

En el sector izquierdo (A) se observan los N-glicanos con sus formas oligosacáridicas típicas: alta manosa, híbrida y compleja. Los tres comparten el core pentasacárido: Man₃GlcNAc₂. En el sector derecho (B) se ejemplifican los 8 cores oligosacáridicos correspondientes a los O-glicanos, señalándose los 4 cores predominantes.

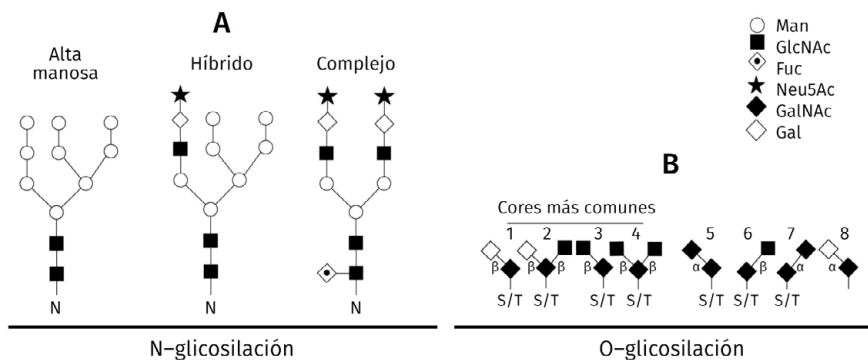


FIGURA 5.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ESTRUCTURA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS CARACTERÍSTICOS PRODUCIDOS POR CÉLULAS DE MAMÍFERO

5.3. GLICOINGENIERÍA MEDIANTE LA ADICIÓN DE GLICANOS. HIPERGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

La glicoingeniería no solo radica en un procedimiento para optimizar la glicosilación de una proteína o remodelar la estructura de sus glicanos sino que puede ser además definida como un proceso útil para prolongar la duración de su acción e incrementar la actividad *in vivo* de proteínas mediante la introducción de nuevos glicanos conteniendo AS terminal (Elliott *et al.*, 2003). En este sentido, Sinclair y Elliott, (2005) concluyeron que un aspecto de la glicoingeniería consiste en la introducción de secuencias consenso de N-glicosilación en posiciones deseadas del esqueleto peptídico de modo de generar proteínas con mayor vida media en plasma. La hiperglicosilación de proteínas mediante la introducción de *nov*o de sitios de N-glicosilación fue descrita por diferentes autores. El caso más resonante lo constituye el bioterapéutico Aranesp® (darbepoetin alfa) utilizado para el tratamiento de anemia causada por la insuficiencia renal crónica o por la quimioterapia. Tal biofarmacéutico fue obtenido mediante hiperglicosilación de eritropoyetina humana (hEPO) (Egrie & Browne, 2001; Egrie *et al.*, 2003). Asimismo, la N-glicoingeniería de proteínas ha sido exitosamente aplicada a otras entidades peptídicas conteniendo N-glicanos, como la hormona folículoestimulante humana, hFSH (Perlman *et al.*, 2003), interferón-beta humano, hIFN-β (Song *et al.*, 2014) o carentes de ellos como interferón-alfa humano, hIFN-α (Ceaglio *et al.*, 2010a; Ceaglio *et al.*, 2010b, 2008).

Por otro lado, la adición de glicanos de tipo O (tipo mucina) a proteínas también forma parte de la denominada glicoingeniería mediante adición de glicanos ya que se vincula con la introducción de nuevos carbohidratos conteniendo moléculas de ácido siálico. La hiperglicosilación de proteínas mediante la adición de *nov*o de sitios de O-glicosilación ha sido aplicada exitosamente para la generación de otro bioterapéutico existente en el mercado de biofarmacéuticos conocido con la denominación comercial de Elonva® (corifollitropin alfa) empleado para el tratamiento de infertilidad (Croxtall & McKeage, 2011). Su aplicación se ha extendido a proteínas para las cuales la N-glicoingeniería ha resultado igualmente exitosa en la obtención de derivados que exhiban mejoras en sus propiedades biológicas: hEPO (Fares *et al.*, 2007), hFSH (Fares *et al.*, 1992) e hIFN-α (Ceaglio *et al.*, 2016; Ceaglio *et al.*, 2010a). Sin embargo, no existe aún bibliografía que compare la capacidad de una u otra modificación para lograr efectos similares.

5.3.1. N-glicoingeniería de proteínas

El desarrollo de la N-glicoingeniería de proteínas se basa en la selección racional de posiciones adecuadas para incorporar residuos N-glicosídicos, conservando la funcionalidad y propiedades estructurales de la proteína de interés.

Si bien la secuencia N-X-S/T es conocida como sitio potencial de N-glicosilación, la presencia de secuencias de dicho tripéptido en la proteína no indica que invariablemente sean ocupadas por glicanos, a pesar de que todas son sometidas a la misma maquinaria de glicosilación. Se estima así que entre un 10 % y un 30 % de los sitios potenciales de glicosilación no están ocupados y que la eficiencia de glicosilación depende de la disponibilidad de precursores unidos al dolicol, de la actividad de la enzima oligosacaryltransferasa (OST) y de la estructura de las proteínas en todos sus niveles (Kornfeld & Kornfeld, 1985).

La biosíntesis de modificaciones postraduccionales (PTM; del inglés, post-translational modifications) como la N-glicosilación no constituye un proceso guiado por templados genéticos, lo cual da lugar a una gran diversidad de variantes de una misma glicoproteína. En las células eucariotas el procedimiento es ineficiente de manera tal que muchas de las reacciones biosintéticas no llegan a completarse generando adición incompleta de glicanos a proteínas o el subsecuente procesamiento incompleto de los glicanos recientemente incorporados a las mismas (Zacchi & Schulz, 2016). Considerando lo definido por estos autores, la heterogeneidad generada por la transferencia subestequeométrica de glicanos a las proteínas recibe el nombre de macroheterogeneidad mientras que la diversidad producto del procesamiento subestequeométrico de glicanos se denomina microheterogeneidad. Todos estos procesos dan lugar a la formación de glicoisofomas de una dada glicoproteína caracterizada por el mismo esqueleto peptídico pero diferente composición de glicanos.

Para poder cumplir con el procedimiento de N-glicoingeniería mediante la adición de glicanos es necesario definir factores que afectan la eficiencia de N-glicosilación de manera de ser tenidos en cuenta al momento de realizar un diseño racional de nuevas glicoproteínas.

La eficiencia con la cual un oligosacárido es transferido al residuo de Asn dependerá de la accesibilidad del tripéptido susceptible de N-glicosilación al complejo de la OST (Jones *et al.*, 2005).

La Figura 5.3 resume los factores que afectan la eficiencia de N-glicosilación, considerando los tres primeros niveles de organización de las proteínas.

Teniendo en cuenta la estructura primaria, la ocupación de sitio es altamente influenciada por ella, particularmente por aminoácidos que forman parte o se encuentran próximos al tripéptido N-X-S/T. El residuo central, denominado X, tiene un rol destacado en la eficiencia de glicosilación. Se ha demostrado que la existencia de Pro en dicha posición anula la ocupación del sitio independiente de la presencia de Ser o Thr. Además, se ha evidenciado que la existencia de Trp, Asp, Glu y Leu en posición central resulta en un bajo grado de ocupación generando un grado ineficiente de glicosilación cuando la tercera posición del tripéptido está ocupada por Ser (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996). Sin embargo, no sucede lo mismo cuando en el sitio consenso de cualquiera de los aminoácidos centrales, anteriormente mencionados

(Trp, Asp, Glu y Leu), se encuentran en el contexto de Asn y Thr, es decir, N-X-T (Kasturi *et al.*, 1997). Asimismo, se ha reportado una preferencia en la adición de glicanos en sitios consenso del tipo N-X-T con respecto a N-X-S demostrado por un grado de ocupación de 7/3, respectivamente (Petrescu *et al.*, 2004) y consistente con una mayor especificidad por OST (Kasturi *et al.*, 1995; Breitling & Aebi, 2013).

Otro factor que disminuye notoriamente la eficiencia de N-glicosilación es la presencia de Pro en posición inmediata posterior a S/T en el sitio consenso (posición Y o +3 de la secuencia N-X-S/T-Y) (Mellquist *et al.*, 1998). Sin embargo, en secuencias conteniendo Ser, existe un aumento del contenido de Pro en posición -6, -3 y +4, posiblemente por el giro que imprimen en la cadena, lo que aumentaría la capacidad de reconocimiento de OST (Petrescu *et al.*, 2004). Asimismo, estos autores demostraron que existe una clara preferencia por aminoácidos no polares en las posiciones -2 y +4 y, en particular, por residuos aromáticos en las posiciones -2 y -1, por aminoácidos no polares pequeños en posición +1 y por voluminosos residuos hidrofóbicos en las posiciones +3 y +5. Además es notoria la baja incidencia de residuos ácidos en posición C-terminal de sitios fehacientemente N-glicosilados. Contrariamente, sitios consensos de N-glicosilación no ocupados en determinadas proteínas presentan un elevado contenido de tales residuos corriente arriba del sitio, indicando que la carga negativa resultaría desventajosa para la ocupación con N-glicanos. De esta primera parte es posible concluir que el grado de ocupación de los sitios susceptibles de N-glicosilación es regulada por la secuencia de aminoácidos ubicados localmente y no por los remotos a ellos.

La posición del sitio probable de N-glicosilación en la secuencia de la proteína también juega un rol importante como se indica en la Figura 5.3 (Breitling & Aebi, 2013). Análisis estadísticos demostraron la frecuencia de tales sitios no glicosilados se incrementa hacia el extremo C de las proteínas (Gavel & Von Heijne, 1990); en efecto, esta particularidad fue posteriormente confirmada por estudios *in vitro* mediante los cuales se demostró que dicha eficiencia se reduce cuando los sitios se hallan aproximadamente a 60 residuos del extremo C y por la presencia de secuencias hidrofóbicas de transmembrana ubicadas entre el sitio y el terminal carboxílico de la glicoproteína (Nilsson & von Heijne, 2000). Esta característica podría ser explicada por el incremento de la velocidad relativa de adquisición de la estructura nativa o de la de translocación hacia el extremo (Schulz, 2012).

Con respecto a la estructura secundaria (Figura 5.3), se ha determinado que aproximadamente un 70 % de las secuencias consenso de N-glicosilación se localizan en giros β , un 20 % en láminas β y un 10 % en hélices α (Rudd & Dwek, 1997; Imberty & Perez, 1995). Es decir, puede darse en todo tipo de estructura secundaria, pero con preponderancia hacia los denominados *turns* y *bends*. Por lo general las regiones «desordenadas» de las proteínas son zonas más favorables para la adición de N-glicanos pudiendo incrementar la estabilidad de la misma, en contraste con regiones más estructuradas y

Factores que afectan la eficiencia de N-glicosilación

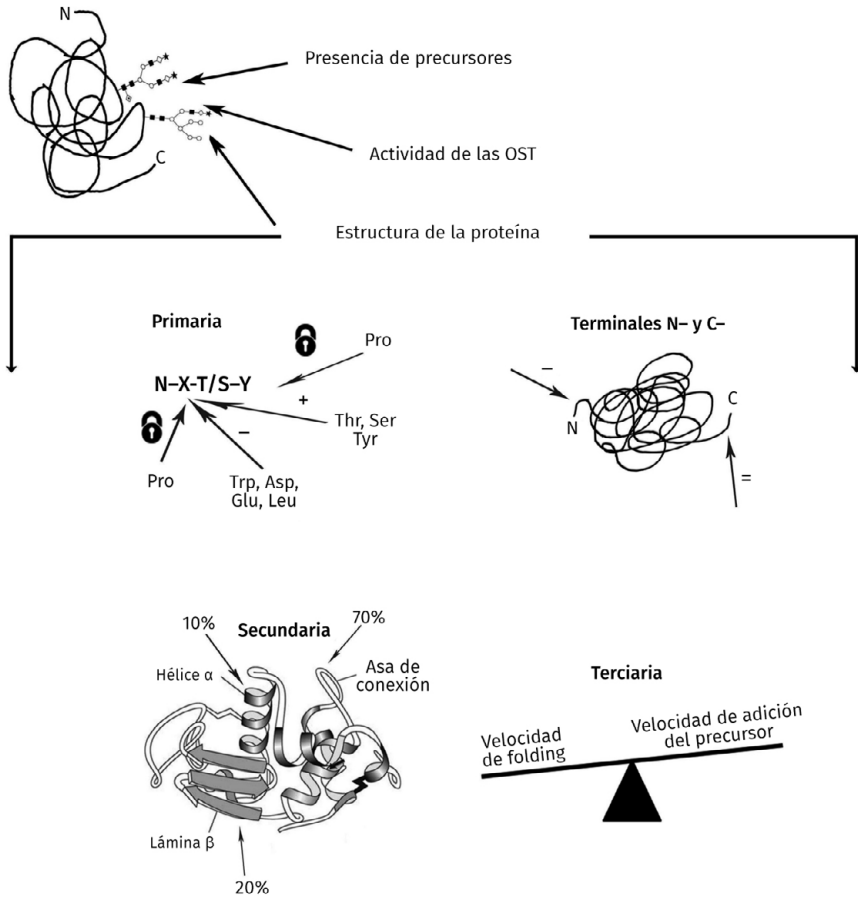


FIGURA 5.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE N-GLICOSILACIÓN. ENTRE ELLOS, SE INDICA LOS QUE AFECTAN LOS NIVELES ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS (PRIMARIA, SECUNDARIA Y TERCIARIA); INCLUSO LOS EFECTOS A NIVEL DE LOS EXTREMOS N- Y C- DE LAS MISMAS

menos flexibles. Un aspecto llamativo lo constituye la elevada probabilidad de que los sitios de N-glicosilación se encuentren en o justo después de puntos en la secuencia peptídica donde hay un cambio en la estructura secundaria. Esto plantea la posibilidad de que la glicosilación favorezca la reorientación de la cadena peptídica. Además de estabilizar un pliegue local particular, los glicanos pueden desempeñar un papel en la organización del proceso de plegamiento promoviendo cambios en la conformación de la cadena principal mediante la generación de productos intermedios de plegamiento (Petrescu *et al.*, 2004). El hallazgo de que los sitios ocupados por N-glicanos tiendan a

estar ubicados en regiones de mayor flexibilidad contribuye a explicar el rol estabilizante de los mismos (Jones *et al.*, 2005).

Por otro lado, debido a que la N-glicosilación se define como un proceso cotraduccional, la eficiencia de glicosilación resultará como consecuencia de una competencia entre la velocidad de plegamiento y la de adición del precursor lipídico (Jones *et al.*, 2005; Shental-Bechor & Levy, 2009).

5.3.1.1. Estrategias para incorporar N-glicanos a proteínas

Los procedimientos para la incorporación de nuevos N-glicanos a proteínas se basan en la modificación de su estructura primaria mediante la aplicación de las siguientes modalidades:

- a. Introducción de mutaciones puntuales de determinados aminoácidos para originar sitios susceptibles de N-glicosilación, aprovechando la existencia de zonas de la proteína que presentan características apropiadas para el evento de incorporación de N-glicanos.
- b. Incorporación de péptidos en el extremo N de proteínas. Los péptidos portan sitios de incorporación de N-glicanos emulando aquellos derivados de glicoproteínas conocidas o generados *de novo*.

a. Introducción de mutaciones puntuales

La generación de un sitio potencial de N-glicosilación (N-X-T/S) puede ser llevada a cabo mediante mutagénesis sitio-dirigida del ADNc de la proteína de interés y su posterior expresión en células de mamífero. Con el objetivo anteriormente mencionado de aprovechar la existencia de regiones apropiadas de la proteína para que la misma sea modificada mediante N-glicosilación, los aminoácidos a mutar deben ser cuidadosamente seleccionados. Para ello, se debe considerar que los sitios consenso deben exhibir una elevada probabilidad de glicosilación y no deben alterar en demasía la estructura 3D y estabilidad de la proteína en la búsqueda de preservar su actividad biológica.

Considerando la estructura primaria, diversos son los aminoácidos que pueden ser mutados con el objetivo de generar un sitio del tipo N-X-T/S. Sin embargo, se opta por el camino más conservativo, es decir, aquel que signifique la modificación del menor número de residuos posibles (Ceaglio *et al.*, 2008; Samoudi *et al.*, 2015; Samoudi *et al.*, 2017).

Considerando el tripéptido consenso de N-glicosilación (N-X-T/S) se pueden seguir dos caminos:

- Identificación de cada residuo que se encuentre en posición -2 con respecto a residuos de Ser y de Thr de la secuencia proteica y su modificación por Asn.
- Identificación de cada residuo de Asn en la secuencia proteica y mutación del residuo en posición +2 por Thr, dado que como se ha mencionado

anteriormente, la presencia de Thr en el sitio consenso es capaz de conferir un grado de ocupación superior con respecto a su par hidroxilado Ser (Petrescu *et al.*, 2004).

Luego de identificar todas las posibles modificaciones a realizar a nivel de la secuencia peptídica se procede a evaluar mediante herramientas de análisis teóricos las probabilidades de:

- Glicosilación.
- Preservación de la funcionalidad de la proteína de interés.

A partir de los conceptos teóricos antes enunciados con respecto a la probabilidad de glicosilación y siguiendo el análisis de las diferentes mutéínas propuestas, se realiza el descarte de aquellas modificaciones que disminuyen o anulan la potencialidad de N-glicosilación mediante un escaneo «macro», es decir sin tener un dato matemático otorgado por algoritmos de evaluación de probabilidad de N-glicosilación. Así, todas las posibles mutéínas sugeridas que contienen sitios próximos al extremo C de la proteína de interés no deberían ser consideradas candidatos apropiados; incluso, se predice que aquellas conteniendo el aminoácido Pro en la posición central del sitio consenso de N-glicosilación o inmediatamente después del mismo estarán desprovistas de N-glicanos y, por lo tanto, deberían descartarse. Del mismo modo, aquellas que contienen residuos de Leu, Glu, Asp y Trp en el aminoácido central del tripéptido generan, debido a su tamaño e hidrofobicidad, alteraciones estructurales que no son compatibles con la inserción de los glicanos.

Una vez finalizado este primer cribado, la probabilidad de glicosilación puede ser analizada utilizando predictores *online* de N-glicosilación mediante el empleo de servidores tales como NetNGlyc 1.0 Server (Gupta & Brunak, 2002), GlycoEP Server (Chauhan *et al.*, 2013) and NGlycPred (Chuang *et al.*, 2012), siendo el primero el más utilizado.

Desde otro punto de vista, las mutaciones realizadas no deberían causar distorsión significativa de la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína que conduzca a la disminución o pérdida de su actividad biológica. Por este motivo se sugiere que el primer aminoácido del tripéptido consenso (Asn o el aminoácido que será modificado por Asn) exhiba elevada accesibilidad al solvente. Este parámetro puede ser calculado a partir de algoritmos *online* tales como ASAview (Ahmad *et al.*, 2004) o NetSurfP v1.1 (Petersen *et al.*, 2009), los cuales aportarán información con respecto a grado de exposición al solvente del residuo que unirá el glicano.

De lo contrario si el residuo que deberá recibir el glicano se encuentra inmerso u oculto en la estructura de la proteína, es altamente probable que su mutación por Asn o la adición de la cadena oligosacáridica altere la adquisición de su estructura nativa y conduzca a su baja expresión o pérdida de la actividad biológica.

Esta metodología fue aplicada a diversas proteínas como se mencionara anteriormente, entre las cuales se encuentran experimentalmente

documentadas variantes de hEPO (Egrie *et al.*, 2003), hIFN- α (Ceaglio *et al.*, 2008) e hIFN- β (Song *et al.*, 2014; Samoudi *et al.*, 2017) y solo *in silico* documentadas tales como otras variantes de hIFN- β (Samoudi *et al.*, 2015) y variantes del factor de coagulación IX (Ghasemi *et al.*, 2016).

b. Fusión a péptidos conteniendo sitios potenciales de N-glicosilación

En este caso, la incorporación de nuevos sitios de N-glicosilación no se lleva a cabo mediante mutaciones puntuales de la secuencia natural de la proteína de interés sino que consiste en la fusión de una secuencia peptídica conteniendo sitios potenciales de N-glicosilación ya sea generados de *novο* o derivados de glicoproteínas conocidas.

El extremo N de las glicoproteínas es frecuentemente seleccionado para el agregado de tales péptidos debido que el terminal C exhibe menor frecuencia de N-glicosilación.

Tal procedimiento tiene la ventaja de minimizar la distorsión de la estructura 3D de la proteína y, a la vez, introducir un mayor número de sitios de N-glicosilación a través de un único cambio: la elongación del extremo N de la misma. Sin embargo, una desventaja del método radica en que, si el terminal N de la proteína se encuentra involucrado en la unión al receptor, la fusión de una estructura peptídica altamente voluminosa por la incorporación de glicanos podría afectar en gran medida su actividad biológica.

No existen muchos ejemplos en la literatura de la utilización de esta metodología. El ejemplo característico es el correspondiente a la fusión de los péptidos ANIT, ANITV and ANITVNITV a hFSH, los cuales contienen uno o dos sitios potenciales de N-glicosilación.

5.3.2. O-glicoingeniería de proteínas

La O-glicosilación de tipo mucina junto a la N-glicosilación constituyen las modificaciones postraduccionales glicosídicas más frecuentes de las proteínas secretadas. Dada la mayor frecuencia de O-glicosilaciones de tipo mucina con respecto a aquellas de tipo no mucina, nos referiremos a O-glicosilación como la modificación de naturaleza mucínica. La misma consiste en la unión covalente de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de Ser o Thr (Van den Steen *et al.*, 1998).

Un aspecto que diverge con respecto a la N-glicosilación es que en la O-glicosilación no se conoce con precisión una secuencia consenso para adición de glicanos, sino que existen evidencias de la preferencia de dominios ricos en los residuos de Ser/Thr/Pro para el cual el aminoácido Thr constituye el residuo de mayor probabilidad de adquisición de glicanos con respecto a su aminoácido relacionado Ser (Van den Steen *et al.*, 1998). La presencia de Pro en la cercanía del aminoácido aceptor del glicano le confiere, debido a

su conformación de giro β , una exposición apropiada que conduciría a una O-glicosilación más eficiente.

En mamíferos, la O-glicosilación se inicia en el cis-Golgi por la acción de unas 20 transferasas (Ts) para dar lugar a la síntesis del antígeno Tn. Tales transferasas constituyen una familia de isoenzimas denominadas UDP-N-acetilgalactosamina: polipéptido acetilgalactosaminiltransferasas (ppGANTasas, EC 2.4.1.41) que transfieren GalNAc desde el azúcar donante UDP-GalNAc a residuos de Ser o Thr para formar la unión alfa anomérica GalNAc α 1-O-Ser/Thr en la cadena polipeptídica recientemente sintetizada, es decir después que han ocurrido los eventos de plegamiento (Bennett *et al.*, 2012).

Las mencionadas isoenzimas se expresan en forma tejido-específica en mamíferos adultos y muestran especificidad de sustrato (Yang *et al.*, 2014; Steentoft *et al.*, 2013). Asimismo, se ha sugerido que las isoenzimas T1-T3 son las principales isoenzimas que contribuyen a generar el O-glicoproteoma en la mayoría de las líneas celulares, mientras que las restantes parecerían tener una menor contribución con funciones solapadas (Kong *et al.*, 2015).

Luego de la transferencia de los residuos GalNAc, estos son procesados mediante la acción de más de 30 glicosiltransferasas que adicionan diferentes monosacáridos (Gal, GlcNAc, AS y fucosa) para formar O-glicanos lineales o ramificados. En específico, el antígeno Tn (GalNAc- α -O-Ser/Thr) es sialilado o elongado para dar lugar a 8 *cores* que pueden ser posteriormente extendidos. Cuatro de esos *cores* son los más comúnmente observados (Figura 5.2). A diferencia de los N-glicanos, los O-glicanos son más cortos mientras que los primeros con diversas ramificaciones o antenas son los responsables de la elevada heterogeneidad de las glicoproteínas.

Existen claras evidencias de la localización de los O-glicanos en regiones desordenadas con preferencia en estructuras de tipo *coil*, *turns*, regiones de conexión de dominios o cercanas a los terminales N- y/o C- de las proteínas (Julenius *et al.*, 2005).

Los glicanos de tipo mucina existen en la forma de 8 estructuras diferentes en las cuales el núcleo de todas ellas es el residuo GalNAc. En humanos, la mayoría de los O-glicanos constituyen las estructuras o *cores* de tipo 1 (Gal β 1-3GalNAc) representado glicanos pequeños y de tipo 2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) que tienden a ser glicanos de mayor tamaño; todos ellos finalizados con una 1 o 2 moléculas de AS (Jensen *et al.*, 2009; Mrazek *et al.*, 2013).

5.3.2.1. Estrategias para incorporar O-glicanos a proteínas

Tanto la ausencia de secuencias consenso de O-glicosilación como las características estructurales o de su entorno que incrementan las posibilidades de tal modificación, orientan hacia procedimientos de O-glicoingeniería basados en la búsqueda de dominios peptídicos a partir de proteínas naturales que contengan una elevada densidad de O-glicanos o bien mediante el diseño

de *novo* de secuencias probables de O-glicosilación. La fusión de péptidos, conteniendo sitios consenso de O-glicosilación, en los extremos N- y/o C- de las proteínas a modificar, representan un procedimiento útil de O-glicoingeniería por hiperglicosilación. De este modo, se evitan las extensas perturbaciones a nivel del esqueleto peptídico que conllevan a cambios de naturaleza estructural es decir a mayores niveles de organización de la proteína (Ceaglio *et al.*, 2016). Un péptido que reúne tales características y fuese ampliamente utilizado con fines de hiper-O-glicosilación es el denominado CTP, del inglés *carboxyl-terminal peptide*, que deriva del extremo C de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, hCG (Pierce & Parsons, 1981). Más adelante se ejemplificará su empleo.

La bioinformática aporta elementos de interés para analizar las probabilidades de O-glicosilación una vez que se ha seleccionado una secuencia naturalmente O-glicosilada o luego de diseñar una nueva secuencia peptídica conteniendo dominios enriquecidos en Ser/Thr/Pro. Existen diversos predictores de O-glicosilación, todos ellos basados en la evaluación de la probabilidad de adición de O-glicanos de tipo mucina a proteínas producidas por mamíferos (Mazola *et al.*, 2011). Ejemplos de los mismos son: NetOglyc (Julenius *et al.*, 2005), CKSAAP_OGlySite (Chen *et al.*, 2008) e ISOGlyP (Leung *et al.*, 2014).

La O-glicosilación de tipo mucina resulta más compleja con respecto a los mecanismos que gobiernan la N-glicosilación considerando el gran número y las diferentes propiedades de las isoenzimas ppGalNAc transferasas que participan en su síntesis (Leung *et al.*, 2014). En función de lo anteriormente mencionado, la mayoría de los predictores de O-glicosilación no tienen en cuenta los siguientes aspectos:

- El amplio rango de combinaciones de residuos de Ser/Thr/Pro en el contexto de otros aminoácidos para generar un sitio potencial de adición de O-glicanos.
- La especificidad de sustratos peptídicos de las diferentes isoformas de ppGalNAc transferasas.

El predictor ISOGlyP es, en este sentido, altamente recomendable debido a su capacidad de desarrollar la evaluación de sitios potenciales de O-glicosilación en términos de la especificidad de isoenzimas transferasas de GalNAc. Además, dicho predictor genera la posibilidad de diferenciar cuantitativamente las preferencias de residuos aminoacídicos (denominado valor de incremento, EVP) por los dominios catalíticos de las diversas ppGalNAc-transferasas. De este modo, valores de EVP superiores a la unidad indican una preferencia de glicosilación por un dado sitio mientras que valores inferiores a 1, sugieren una actividad de glicosilación disminuida (Leung *et al.*, 2014).

Como se mencionó con anterioridad, el péptido CTP (rico en Ser y Pro) constituye la extensión C-terminal de la hCG que le confieren especificidad

biológica e inmunológica a la hormona (de Medeiros & Norman, 2009). La hCG junto con las gonadotrofinas producidas por la glándula pituitaria, hLH y hFSH (hormonas luteinizante y folículoestimulante humanas) y la hormona estimulante de la glándula tiroidea humana (hTSH), constituyen una familia de hormonas glicoproteicas heterodiméricas que contienen una subunidad idéntica o común (subunidad α) covalentemente ligada con la subunidad β ; esta última es responsable de conferir la especificidad biológica a cada proteína (Grossmann *et al.*, 1997; Pierce & Parsons, 1981).

La subunidad β de la hCG se diferencia no solo en la secuencia aminoacídica sino también en la presencia del péptido CTP que se caracteriza por la existencia de 4 residuos de Ser responsables de la existencia de residuos O-glicosídicos (Cole & Khanlian, 2007). El rol de tal extensión probablemente radique en mantener un tiempo de vida media en plasma más prolongado de la hCG comparado con las otras hormonas glicoproteicas (Matzuk *et al.*, 1990).

Se ha utilizado la tecnología de fusionar una o más unidades de CTP a los extremos N y/o C de diversas proteínas con el fin de mejorar sus propiedades terapéuticas. Las siguientes proteínas fueron modificadas mediante la adición del péptido CTP: subunidad β de la hFSH (Trousdale *et al.*, 2009) y hTSH (Joshi *et al.*, 1995), subunidad α de la hCG (Furuhashi *et al.*, 1995), hormona de crecimiento humana (hGH) (Fares *et al.*, 2010), eritropoyetina humana (hEPO) (Fares *et al.*, 2011) e interferón- α 2b humano (hIFN- α 2b) (Ceaglio *et al.*, 2016). La utilización del péptido CTP demostró no afectar el ensamblaje, la secreción, la afinidad por el receptor y la actividad in vitro de muchas de las proteínas fusionadas al mismo y, en particular, mejoró las propiedades farmacocinéticas de otra de ellas como hIFN- α 2b (Ceaglio *et al.*, 2016).

5.4. BIOTERAPÉUTICOS OBTENIDOS MEDIANTE GLICOINGENIERÍA POR HIPERGLICOSILACIÓN

A continuación, se expondrán brevemente dos ejemplos de generación de bioterapéuticos obtenidos mediante glicoingeniería por hiper-N-glicosilación e hiper-O-glicosilación, respectivamente:

Darbepoetina alfa (Aranesp®)

Biofarmacéutico de segunda generación de denominación comercial Aranesp® de propiedad de Amgen, Estados Unidos. El mismo fue obtenido mediante mutagénesis sitio-dirigida de hEPO. La rhEPO es utilizada para el tratamiento de anemia asociada con insuficiencia renal crónica, cáncer y SIDA, naturalmente presenta tres sitios de N-glicosilación (Asn24, Asn38 y Asn83) y un sitio de O-glicosilación (Ser126) distribuidos en una secuencia peptídica de 165 residuos aminoacídicos

(Egrie & Browne, 2001; Egrie *et al.*, 2003). El empleo de hEPO recombinante (rhEPO), es decir, como bioterapéutico de primera generación presenta la desventaja de la elevada frecuencia de dosificación al paciente para lograr el efecto clínico deseado (3 dosis semanales por vía subcutánea o intravenosa).

La secuencia de aminoácidos de *Aranesp*[®] difiere de hEPO en 5 residuos (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn, and Pro90Thr) de manera de contener dos nuevos sitios de N-glicosilación capaces de recibir oligosacáridos en los residuos Asn30 y Asn88. Esta molécula de hEPO hiperglicosilada presenta una masa molecular media de 37100 Da, un contenido de carbohidratos de 51 % y hasta 22 moléculas de AS que le confiere un pl de 3,3. En contraposición, la rhEPO exhibe una masa molecular de 30400 Da, un contenido de carbohidratos de 40 % y hasta 14 moléculas de AS (Egrie & Browne, 2001). Si bien se ha demostrado que el incremento en el número de moléculas de AS disminuye la afinidad por el receptor de hEPO y, en consecuencia, la actividad biológica *in vitro*, dicho aumento representa una característica crucial para la actividad *in vivo* de la nueva proteína. Así, las isoformas con mayor contenido en tal residuo ácido han mejorado las propiedades farmacocinéticas de hEPO, ejemplificadas por una superior vida media y una inferior velocidad de depuración plasmática. La inoculación de 100 U/kg de rhEPO o de una cantidad equimolar de la versión hiperglicosilada a pacientes sometidos a diálisis peritoneal, permitió concluir con respecto a tales parámetros en humanos (Macdougall *et al.*, 1999), observándose un incremento de 3 veces en la vida media terminal de esta última molécula con respecto a rhEPO (25,3 h vs. 8,5 h; es decir, una diferencia de 16,8 h). En este mismo trabajo, considerando la concentración sérica de cada molécula en función del tiempo, se obtuvo un área bajo la curva (AUC) significativamente superior para la variante hiperglicosilada ($291 \pm 7,6 \text{ ng}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}$ vs. $131,9 \pm 8,3 \text{ ng}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}$) y una correspondiente velocidad de depuración plasmática inferior ($1,6 \pm 0,3 \text{ ml}\times\text{h}^{-1}$ vs $4 \pm 0,3 \text{ ml}\times\text{h}^{-1}$) en comparación con la rhEPO.

Desde el punto de vista farmacológico, ambas proteínas se unen al receptor de células progenitoras eritroides. Tal interacción estimula la diferenciación a eritrocitos e inhibe procesos apoptóticos (Powell & Gurk-Turner, 2002). La versión hiperglicosilada presenta una actividad biológica *in vivo* 13 veces superior con respecto a rhEPO determinada como la habilidad para incrementar el hematocrito de ratones sanos. Es importante destacar que la afinidad de darbepoetina por el receptor de hEPO es inferior que la correspondiente afinidad de la rhEPO, sin que se traduzca en un descenso de la potencia evaluada *in vivo*. En tal sentido, se ha observado igual comportamiento al estudiar una misma entidad peptídica que porta diferente grado de glicosilación (Ceaglio *et al.*, 2010a; Mattio *et al.*, 2011). Por lo tanto, el descenso de la afinidad por el receptor debido a la mayor glicosilación no significa un impedimento para que las moléculas con superior contenido de glicanos sean empleadas como agentes terapéuticos, ya que numerosas evidencias demuestran el error que implica confiar en los ensayos *in vitro* para predecir la actividad biológica *in vivo* y los efectos terapéuticos de una molécula (Egrie *et al.*, 2003).

Corifolitropina alfa (Elonva®)

Biofarmacéutico de segunda generación obtenido mediante tecnología de hiper-O-glicosilación por adición del péptido C terminal de la subunidad β de la hCG a la subunidad β de la hFSH como se indicara con anterioridad. El bioterapéutico es utilizado en clínica, bajo la denominación comercial de Elonva (de propiedad de MSD, Alemania), por su capacidad de sostener la estimulación del folículo ovárico al imitar la actividad de la hormona hFSH pero con acción prolongada debido a la notable mejora de sus propiedades farmacocinéticas. De tal modo, la hormona hiperglicosilada es eliminada más lentamente respecto a la rhFSH, extendiéndose la vida media desde 27–41 h (rhFSH) hasta 59–82 h (corifollitropin) (Zandvliet *et al.*, 2015). Esta superior vida media de eliminación confirma el éxito obtenido durante el ciclo de tratamiento de estimulación ovárica controlada antes de realizar procedimientos de fertilización *in vitro* o inyección intracitoplasmática de espermatozoides por el cual una sola inyección subcutánea de la hormona hiperglicosilada es útil para iniciar y sostener durante una semana el crecimiento de múltiples folículos y, así, reemplazar las siete inyecciones diarias de rhFSH (Fauser *et al.*, 2009).

5.5. CONCLUSIÓN

La generación de nuevas variedades de proteínas humanas, basada en la aplicación de técnicas de glicoingeniería en general y mediante la técnica de hiperglicosilación, en particular, ha permitido avanzar en el desarrollo de nuevos bioterapéuticos de segunda generación que aportaron ventajas estructurales y funcionales a sus contrapartes no glicosiladas. La existencia de proteínas hiper-N-glicosiladas e hiper-O-glicosiladas en el mercado biofarmacéutico pone de relevancia la capacidad de la industria para afrontar tales desafíos en el vasto campo de la producción de proteínas recombinantes expresadas en células de mamífero. De este modo, la necesidad de encontrar soluciones a distintas patologías dirigidas hacia la mejora en la eficacia, estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de los bioterapéuticos, genera el motor para que las propuestas en glicoingeniería sigan un curso de crecimiento e innovación.

Referencias bibliográficas

- AHMAD, S., GROMIHA, M., FAWAREH, H. & SARAI, A. (2004). ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*, 5, 51. 10.1186/1471-2105-5-51
- ARICO, C., BONNET, C. & JAVAUD, C. (2013). N-glycosylation humanization for production of therapeutic recombinant glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.*, 988, 45–57. 10.1007/978-1-62703-327-5_4
- AUMILLER, J. J., MABASHI-ASAZUMA, H., HILLAR, A., SHI, X. & JARVIS, D. L. (2012). A new glycoengineered insect cell line with an inducibly mammalianized protein N-glycosylation pathway. *Glycobiology*, 22(3), 417–428. 10.1093/glycob/cwr160
- BENNETT, E. P., MANDEL, U., CLAUSEN, H., GERKEN, T. A., FRITZ, T. A. & TABAK, L. A. (2012). Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), 736–756. 10.1093/glycob/cwr182
- BOSQUES, C. J., COLLINS, B. E., MEADOR, J. W., SARVAIYA, H., MURPHY, J. L., DELLORUSSO, G., BULIK, D. A., HSU, I. H., WASHBURN, N., SIPSEY, S. F., MYETTE, J. R., RAMAN, R., SHRIVER, Z., SASISEKHARAN, R. & VENKATARAMAN, G. (2010). Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins. *Nat. Biotechnol.*, 28(11), 1153–1156. 10.1038/nbt1110-1153
- BREITLING, J. & AEBI, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 5(8), a013359. 10.1101/cshperspect.a013359
- CASTILHO, A., GATTINGER, P., GRASS, J., JEZ, J., PABST, M., ALTMANN, F., GORFER, M., STRASSER, R. & STEINKELLNER, H. (2011). N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. *Glycobiology*, 21(6), 813–823. 10.1093/glycob/cwr009
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., CONRADT, H. S., GRAMMEL, N., KRATJE, R. & OGGERO M. (2010a). Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *J. Biotechnol.*, 146(1–2), 74–83. 10.1016/j.jbiotec.2009.12.020
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & OGGERO, M. (2008). Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, 90(3), 437–449. 10.1016/j.biochi.2007.10.013
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & OGGERO, M. (2010b). Influence of carbohydrates on the stability and structure of a hyperglycosylated human interferon alpha mutein. *Biochimie*, 92(8), 971–978. 10.1016/j.biochi.2010.04.004
- CEAGLIO, N., GUGLIOTTA, A., TARDIVO, M. B., CRAVERO, D., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., & OGGERO, M. (2016). Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG beta-subunit. *J. Biotechnol.*, 221, 13–24. 10.1016/j.jbiotec.2016.01.018
- COLE, L. A. & KHANLIAN, S. A. (2007). Hyperglycosylated hCG: a variant with separate biological functions to regular hCG. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 260–262, 228–236. 10.1016/j.mce.2006.03.047

- CROXTALL, J. D. & MCKEAGE, K.** (2011). Corifollitropin alfa: a review of its use in controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. *BioDrugs*, 25(4), 243–254. 10.2165/11206890-000000000-00000
- CHAUHAN, J. S., RAO, A. & RAGHAVA, G. P.** (2013). In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS One*, 8(6), e67008. 10.1371/journal.pone.0067008
- CHEN, Y. Z., TANG, Y. R., SHENG, Z. Y. & ZHANG, Z.** (2008). Prediction of mucin-type O-glycosylation sites in mammalian proteins using the composition of k-spaced amino acid pairs. *BMC Bioinformatics*, 9, 101. 10.1186/1471-2105-9-101
- CHOI, B. K., WARBURTON, S., LIN, H., PATEL, R., BOLDOGH, I., MEEHL, M., D'ANJOU, M., PON, L., STADHEIM, T.A. & SETHURAMAN, N.** (2012). Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(3), 671–682. 10.1007/s00253-012-4067-3
- CHUANG, G. Y., BOYINGTON, J. C., JOYCE, M. G., ZHU, J., NABEL, G. J., KWONG, P. D. & GEORGIEV, I.** (2012). Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. *Bioinformatics*, 28 (17), 2249–2255. 10.1093/bioinformatics/bts426
- DE MEDEIROS, S. F. & NORMAN, R. J.** (2009). Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum. Reprod. Update*, 15(1), 69–95. 10.1093/humupd/dmn036
- DIETMAIR, S., HODSON, M. P., QUEK, L. E., TIMMINS, N. E., GRAY, P. & NIELSEN, L. K.** (2012). A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. *PLoS One*, 7(8), e43394. 10.1371/journal.pone.0043394
- DUMONT, J., EUWART, D., MEI, B., ESTES, S. & KSHIRSAGAR, R.** (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36(6), 1110–1122. 10.3109/07388551.2015.1084266
- DUROCHER, Y. & BUTLER, M.** (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6), 700–707. 10.1016/j.copbio.2009.10.008
- EGRIE, J. C. & BROWNE, J. K.** (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 16, Suppl. 3, 3–13.
- EGRIE, J. C., DWYER, E., BROWNE, J. K., HITZ, A. & LYKOS, M. A.** (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp. Hematol.*, 31(4), 290–299. 10.1016/S0301-472X(03)00006-7
- ELLIOTT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., AOKI, K., BRANKOW, D., BUCK, L., BUSSE, L., CHANG, D., FULLER, J., GRANT, J., HERNDAY, N., HOKUM, M., HU, S., KNUD-TEN, A., LEVIN, N., KOMOROWSKI, R., MARTIN, F., NAVARRO, R., OSSLUND, T., ROGERS, G., ROGERS, N., TRAIL, G. & EGRIE, J.** (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat. Biotechnol.*, 21(4), 414–421. 10.1038/nbt799

- FARES, F., GANEM, S., HAJOUJ, T. & AGAI, E.** (2007). Development of a long-acting erythropoietin by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin beta-subunit to the coding sequence of human erythropoietin. *Endocrinology*, 148(10), 5081–5087. 10.1210/en.2007-0026
- FARES, F., GUY, R., BAR-ILAN, A., FELIKMAN, Y. & FIMA, E.** (2010). Designing a long-acting human growth hormone (hGH) by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin beta-subunit to the coding sequence of hGH. *Endocrinology*, 151(9), 4410–4417. 10.1210/en.2009-1431
- FARES, F., HAVRON, A. & FIMA, E.** (2011). Designing a Long Acting Erythropoietin by Fusing Three Carboxyl-Terminal Peptides of Human Chorionic Gonadotropin beta Subunit to the N-Terminal and C-Terminal Coding Sequence. *Int. J. Cell. Biol.*, 275063. 10.1155/2011/275063
- FARES, F. A., SUGANUMA, N., NISHIMORI, K., LAPOLT, P. S., HSUEH, A. J. & BOIME, I.** (1992). Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(10), 4304–4308. 10.1073/pnas.89.10.4304
- FAUSER, B. C., MANNAERTS, B. M., DEVROEY, P., LEADER, A., BOIME, I. & BAIRD, D. T.** (2009). Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum. Reprod. Update*, 15(3), 309–321. 10.1093/humupd/dmn065
- FUKUTA, K., ABE, R., YOKOMATSU, T., KONO, N., ASANAGI, M., OMAE, F., MINOWA, M. T., TAKEUCHI, M. & MAKINO, T.** (2000). Remodeling of sugar chain structures of human interferon-gamma. *Glycobiology*, 10(4), 421–430. 10.1093/glycob/10.4.421
- FURUHASHI, M., SHIKONE, T., FARES, F. A., SUGAHARA, T., HSUEH, A. J. & BOIME, I.** (1995). Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) beta-subunit to the common alpha-subunit: retention of O-linked glycosylation and enhanced in vivo bioactivity of chimeric human CG. *Mol. Endocrinol.*, 9(1), 54–63. 10.1210/mend.9.1.7539107
- GAVEL, Y. & VON HEIJNE, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.*, 3(5), 433–442. 10.1093/protein/3.5.433
- GHADERI, D., ZHANG, M., HURTADO-ZIOLA, N. & VARKI, A.** (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 28, 147–175. 10.5661/bger-28-147
- GHASEMI, F., ZOMORODIPOUR, A., KARKHANE, A. A. & KHORRAMIZADEH, M. R.** (2016). In silico designing of hyper-glycosylated analogs for the human coagulation factor IX. *J. Mol. Graph Model*, 68, 39–47. 10.1016/j.jm gm.2016.05.011

- GROSSMANN, M., WEINTRAUB, B. D. & SZKUDLINSKI, M. W.** (1997). Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocr. Rev.*, 18(4), 476–501. 10.1210/edrv.18.4.0305
- GUGLIOTTA, A., CEAGLIO, N., RAUD, B., FORNO, G., MAURO, L., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2017). Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- α 2 potentiates HEK293 cells as biofactories. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 112, 119–131. 10.1016/j.ejpb.2016.11.012
- GUPTA, R. & BRUNAK, S.** (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput.*, 7, 310–322.
- HEFFNER, K. M., WANG, Q., HIZAL, D. B., CAN, Ö. & BETENBAUGH, M. J.** (2018). Glycoengineering of Mammalian Expression Systems on a Cellular Level. En *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (pp. 1–33). Springer: Berlin, Heidelberg 10.1007/10_2017_57
- IMBERTY, A. & PEREZ, S.** (1995). Stereochemistry of the N-glycosylation sites in glycoproteins. *Protein. Eng.*, 8(7), 699–709. 10.1093/protein/8.7.699
- JENSEN, P. H., KOLARICH, D. & PACKER, N. H.** (2009). Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. *FEBS J.*, 277(1), 81–94. 10.1111/j.1742-4658.2009.07429.x
- JEONG, Y. T., CHOI, O., LIM, H. R., SON, Y. D., KIM, H. J. & KIM, J. H.** (2008). Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in CHO cells by human glycosyltransferase expression. *J Microbiol Biotechnol.*, 18(12), 1945–1952. 10.4014/jmb.0800.546
- JONES, J., KRAG, S. S. & BETENBAUGH, M. J.** (2005). Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.*, 1726(2), 121–137. 10.1016/j.bbagen.2005.07.003
- JOSHI, L., MURATA, Y., WONDISFORD, F. E., SZKUDLINSKI, M. W., DESAI, R. & WEINTRAUB, B.D.** (1995). Recombinant thyrotropin containing a beta-subunit chimera with the human chorionic gonadotropin-beta carboxy-terminus is biologically active, with a prolonged plasma half-life: role of carbohydrate in bioactivity and metabolic clearance. *Endocrinology.*, 136(9), 3839–3848. 10.1210/endo.136.9.7544273
- JULENIUS, K., MOLGAARD, A., GUPTA, R. & BRUNAK, S.** (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology.*, 15(2), 153–164. 10.1093/glycob/cwh151
- KASTURI, L., CHEN, H. & SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.** (1997). Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.*, 323(Pt 2), 415–419. 10.1042/bj3230415
- KASTURI, L., ESHLEMAN, J. R., WUNNER, W. H. & SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.** (1995). The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 270(24), 14756–14761. 10.1074/jbc.270.24.14756

- KONG, Y., JOSHI, H. J., SCHJOLDAGER, K. T., MADSEN, T. D., GERKEN, T. A., VESTER-CHRISTENSEN, M. B., WANDALL, H. H., BENNETT, E. P., LEVERY, S. B., VAKHRUSHEV, S. Y. & CLAUSEN, H.** (2015). Probing polypeptide GalNAc-transferase isoform substrate specificities by in vitro analysis. *Glycobiology*, 25(1), 55–65. 10.1093/glycob/cwu089
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev. Biochem.*, 54, 631–664. 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215
- LEUNG, M.-Y., CARDENAS, G. A., ALMEIDA, I. C. & GERKEN, T. A.** (2014). *Isoform Specific O-Glycosylation Prediction (ISOGlyP)*. Version 1.2.
- LI, H. & D'ANJOU, M.** (2009). Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20(6), 678–684. 10.1016/j.copbio.2009.10.009
- MACDOUGALL, I. C., GRAY, S. J., ELSTON, O., BREEN, C., JENKINS, B., BROWNE, J. & EGRIE, J.** (1999). Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10(11), 2392–2395. 10.1046/j.1523-1755.2002.00474.x
- 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. 10.1002/btpr.633.
- MATZUK, M. M., HSUEH, A. J., LAPOLT, P., TSAFRIRI, A., KEENE, J. L. & BOIME, I.** (1990). The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin [corrected] beta-subunit. *Endocrinology*, 126(1), 376–383. 10.1210/endo-126-1-376
- MAZOLA, Y., CHINEA, G. & MUSACCHIO, A.** (2011). Glycosylation and Bioinformatics: current status for glycosylation prediction tools. *Biotecnología aplicada*, 28, 6–12.
- MELLQUIST, J. L., KASTURI, L., SPITALNIK, S. L. & SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.** (1998). The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, 37(19), 6833–6837. 10.1021/bi972217k
- MEURIS, L., SANTENS, F., ELSON, G., FESTJENS, N., BOONE, M., DOS SANTOS, A., DEVOS, S., ROUSSEAU, F., PLETS, E., HOUTHUYS, E., MALINGE, P., MAGISTRELLI, G., CONS, L., CHATEL, L., DEVREESE, B. & CALLEWAERT, N.** (2014). GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.*, 32(5), 485–489. 10.1038/nbt.2885
- MRAZEK, H., WEIGNEROVA, L., BOJAROVA, P., NOVAK, P., VANEK, O. & BEZOUSKA, K.** (2013). Carbohydrate synthesis and biosynthesis technologies for cracking of the glycan code: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 31(1), 17–37. 10.1016/j.biotechadv.2012.03.008

- NILSSON, I. & VON HEIJNE, G.** (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J. Biol. Chem.*, 275(23), 17338–17343. 10.1074/jbc.M002317200
- PATNAIK, S. K. & STANLEY, P.** (2006). Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. *Methods Enzymol.*, 416, 159–182. 10.1016/S0076-6879(06)16011-5
- PERLMAN, S., VAN DEN HAZEL, B., CHRISTIANSEN, J., GRAM-NIELSEN, S., JEPPESEN, C. B., ANDERSEN, K. V., HALKIER, T., OKKELS, S. & SCHAMBYE, H. T.** (2003). Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(7), 3227–3235. 10.1210/jc.2002-021201
- PETERSEN, B., PETERSEN, T. N., ANDERSEN, P., NIELSEN, M. & LUNDEGAARD, C.** (2009). A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct. Biol.*, 9, 51. 10.1186/1472-6807-9-51
- PETRESCU, A. J., MILAC, A. L., PETRESCU, S. M., DWEK, R. A. & WORMALD, M. R.** (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 14(2), 103–114. 10.1093/glycob/cwh008
- PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F.** (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev. Biochem.*, 50, 465–495. 10.1146/annurev.bi.50.070181.002341
- PIRON, R., SANTENS, F., DE PAEPE, A., DEPICKEER, A. & CALLEWAERT, N.** (2015). Using GlycoDelete to produce proteins lacking plant-specific N-glycan modification in seeds. *Nat. Biotechnol.*, 33(11), 1135–1137. 10.1038/nbt.3359
- POWELL, J., GURK-TURNER, C.** (2002). Darbepoetin alfa (Aranesp). *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)*, 15(3), 332–335. 10.1080/08998280.2002.11927861
- RUDD, P. M. & DWEK, R. A.** (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 32(1), 1–100. 10.3109/10409239709085144
- SAMOUDI, M., MINUCHEHR, Z., HARCUM, S. W., TABANDEH, F., OMID YEGANEH, N. & KHODABANDEH, M.** (2017). Rational design of glycoengineered interferon-beta analogs with improved aggregation state: experimental validation. *Protein Eng. Des. Sel.*, 30(1), 23–30. 10.1093/protein/gzw058
- SAMOUDI, M., TABANDEH, F., MINUCHEHR, Z., AHANGARI COHAN, R., NOURI INANLOU, D., KHODABANDEH, M. & SABERY ANVAR, M.** (2015). Rational design of hyper-glycosylated interferon beta analogs: a computational strategy for glycoengineering. *J. Mol. Graph Model*, 56, 31–42. 10.1016/j.jmgb.2014.12.001
- SCANLAN, C. N., RITCHIE, G. E., BARUAH, K., CRISPIN, M., HARVEY, D. J., SINGER, B. B., LUCKA, L., WORMALD, M. R., WENTWORTH, P. JR., ZITZMANN, N., RUDD, P. M., BURTON, D. R. & DWEK, R. A.** (2007). Inhibition of mammalian glycan biosynthesis produces non-self antigens for a broadly neutralising, HIV-1 specific antibody. *J. Mol. Biol.*, 372(1), 16–22. 10.1016/j.jmb.2007.06.027

- SCHULZ, B. L.** (2012). Beyond the sequence: Sites of N-glycosylation. Glycosylation. *IntechOpen*, Rijeka, Croatia. 10.5772/2917
- SETHURAMAN, N., STADHEIM, T. A.** (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17(4), 341–346. 10.1016/j.copbio.2006.06.010
- SHAKIN-ESHLEMAN, S. H., SPITALNIK, S. L. & KASTURI, L.** (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J. Biol. Chem.*, 271(11), 6363–6366. 10.1074/jbc.271.11.6363
- SHENTAL-BECHOR, D. & LEVY, Y.** (2009). Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19(5), 524–533. 10.1016/j.sbi.2009.07.002
- SINCLAIR, A. M. & ELLIOTT, S.** (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.*, 94(8), 1626–1635. 10.1002/jps.20319
- SONG, K., YOON, I. S., KIM, N. A., KIM, D. H., LEE, J., LEE, H. J., LEE, S., CHOI, S., CHOI, M. K., KIM, H. H., JEONG, S. H., SON, W. S., KIM, D. D. & SHIN, Y. K.** (2014). Glycoengineering of interferon-beta 1a improves its biophysical and pharmacokinetic properties. *PLoS One*, 9(5), e96967. 10.1371/journal.pone.0096967
- STEENTOFT, C., VAKHRUSHEV, S. Y., JOSHI, H. J., KONG, Y., VESTER-CHRISTENSEN, M. B., SCHJOLDAGER, K. T., LAVRSEN, K., DABELSTEEN, S., PEDERSEN, N. B., MARCOS-SILVA, L., GUPTA, R., BENNETT, E. P., MANDEL, U., BRUNAK, S., WANDALL, H. H., LEVERY, S. B. & CLAUSEN, H.** (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32(10), 1478–1488. 10.1038/emboj.2013.79
- TEJWANI, V., ANDERSEN, M. R., NAM, J. H. & SHARFSTEIN, S. T.** (2018). Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. *Biotechnol. J.*, 13(3), e1700234. 10.1002/biot.201700234
- TROUSDALE, R. K., YU, B., POLLAK, S. V., HUSAMI, N., VIDALI, A. & LUSTBADER, J. W.** (2009). Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril*, 91(1), 265–270. doi10.1016/j.fertnstert.2007.11.013
- VAN DEN STEEN, P., RUDD, P. M., DWEK, R. A. & OPDENAKKER, G.** (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33(3), 151–208. 10.1080/10409239891204198
- WANG, L. X. & LOMINO, J.V.** (2012). Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins. *ACS Chem. Biol.*, 7(1), 110–122. 10.1021/cb200429n
- YANG, Z., HALIM, A., NARIMATSU, Y., JITENDRA JOSHI, H., STEENTOFT, C., SCHJOLDAGER, K. T., ALDER SCHULZ, M., SEALOVER, N. R., KAYSER, K. J., PAUL BENNETT, E., LEVERY, S. B., VAKHRUSHEV, S. Y. & CLAUSEN, H.** (2014). The GalNAc-type O-Glycoproteome of CHO cells characterized by the SimpleCell strategy. *Mol. Cell. Proteomics*, 13(12), 3224–3235. 10.1074/mcp.M114.041541

- ZACCHI, L. F. & SCHULZ, B. L.** (2016). N-glycoprotein macroheterogeneity: biological implications and proteomic characterization. *Glycoconj. J.*, 33(3), 359–376. 10.1007/s10719-015-9641-3
- ZANDVLIET, A. S., PROHN, M., DE GREEF, R., VAN AARLE, F., MCCRARY SISK, C. & STEGMANN, B. J.** (2015). Impact of patient characteristics on the pharmacokinetics of corifollitropin alfa during controlled ovarian stimulation. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 82(1), 74–82. 10.1111/bcp.12939
- ZHOU, Q., SHANKARA, S., ROY, A., QIU, H., ESTES, S., MCVIE-WYLIE, A., CULM-MERDEK, K., PARK, A., PAN, C. & EDMUNDS, T.** (2008). Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(3), 652–665. 10.1002/bit.21598

6

Expresión de glicoproteínas recombinantes en diferentes sistemas

CLAUDIO PRIETO

6.1. INTRODUCCIÓN

La importancia de las glicoproteínas terapéuticas ha crecido rápidamente desde la aparición de la industria biotecnológica. Inicialmente, las mismas derivaban de fuentes naturales tales como sangre humana (factores de coagulación de la sangre y albúmina sérica), páncreas (insulina) y placenta (glucocerebrosidasa). Sin embargo, las preocupaciones sobre la pureza y consistencia del producto como así también el potencial de contaminación viral, resultaban un inconveniente difícil de resolver. Luego de 30 años de desarrollo, la bioingeniería molecular y celular permiten resolver esos inconvenientes mediante la producción de proteínas terapéuticas en forma recombinante.

Las modificaciones postraduccionales y, en particular, la glicosilación, juegan un papel decisivo en asegurar la función adecuada de las proteínas. Se sabe que la glicosilación tiene lugar en una gran variedad de clases de proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a: anticuerpos, hormonas proteicas, factores de crecimiento, enzimas, citoquinas y antígenos vacunales. Mientras que los anticuerpos de la clase IgG poseen un único sitio de glicosilación en el fragmento Fc, y en algunos casos un segundo sitio de glicosilación en el fragmento Fab, otras proteínas llevan una abundancia de sitios de glicosilación, protegiendo virtualmente la estructura peptídica del entorno extracelular. En este sentido, el entendimiento de los mecanismos de glicosilación ha adquirido un papel cada vez más importante en el desarrollo tanto de nuevos biológicos como de biosimilares. La glicosilación tiene una gran influencia en las características funcionales de una proteína. La activación completa de una célula por factores de crecimiento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, vida media, estabilidad y plegado, por nombrar algunos, se ha encontrado que dependen en gran medida de los patrones de glicosilación. La glicosilación es un proceso altamente complejo, que implica una red de varios cientos de enzimas y transportadores intracelulares, y —en contraste con la secuencia de aminoácidos codificada genéticamente de la proteína— varía con las capacidades de la línea celular e incluso del clon celular utilizado para la producción. El diseño del proceso de producción y purificación de glicoproteínas terapéuticas es clave para obtener un bioproducto consistente, lo que supone un desafío importante para los productores de glicoproteínas.

El rápido crecimiento del mercado biofarmacéutico mundial en los últimos años ha sido un buen indicador de la importancia de las glicoproteínas en la industria biotecnológica.

6.2. GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO PRODUCTOS BIOLÓGICOS

La mayoría de los productos biológicos aprobados por la FDA son glicoproteínas recombinantes. Estas proteínas han sido utilizadas para el tratamiento de numerosas enfermedades siendo que algunos de ellas aún están en fase de aprobación. La elección del sistema de expresión es un paso clave en la planificación de la producción de la proteína funcional ya que la glicosilación influirá en el rendimiento, la farmacocinética, la actividad biológica y la inmunogenicidad. Hasta el momento, la mayoría de las proteínas recombinantes son producidas utilizando sistemas de expresión tales como bacterias, levaduras, células de insectos y células de mamíferos. Cada uno de estos sistemas presenta significativas diferencias, principalmente todo lo relacionado con las modificaciones postraduccionales. La glicosilación es la modificación postraduccional más frecuente de las proteínas recombinantes y probablemente sea la que más impacte en la actividad biológica de las mismas. El 70 % de las proteínas terapéuticas están glicosiladas (Ghaderi *et al.*, 2012). En la Tabla 6.1 se describen algunas de las glicoproteínas terapéuticas recientemente aprobadas y la plataforma de producción. Para una mejor revisión se sugiere leer el Capítulo 1 del libro *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1674 de Mizukami *et al.*, 2018 (Swiech, 2018).

Tal como lo describe la Tabla 6. 1, las glicoproteínas recombinantes terapéuticas comprenden varias clases y son utilizadas para un amplio rango de enfermedades, entre ellas podemos citar desórdenes metabólicos, enfermedades autoinmunes, cáncer, etc. La clasificación puede realizarse de acuerdo con su función o aplicación. Se definen cuatro grupos:

- Grupo I: proteínas con actividad enzimática.
- Grupo II: proteínas con actividad *target* u orientadas.
- Grupo III: proteínas como vacunas.
- Grupo IV: proteínas para diagnóstico.

De manera comparativa con las drogas sintéticas, las proteínas recombinantes terapéuticas presentan algunas ventajas: alta especificidad y complejidad, mejor tolerancia y menor inmunogenicidad y, regulatoriamente, son más rápidas de aprobar que otras drogas. Comparativamente con proteínas derivadas de fuentes biológicas, como, por ejemplo, insulina (páncreas) y albúmina (plasma), las proteínas recombinantes permiten asegurar reproducibilidad, pureza, y bioseguridad induciendo a las compañías biofarmacéuticas a la producción de las mismas (Sethuraman & Stadheim, 2006).

TABLA 6.1. EJEMPLOS DE ALGUNAS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS RECOMBINANTES APROBADAS EN LOS ÚLTIMOS AÑOS

Año	Producto	Compañía	Uso clínico	Plataforma celular
2016	Zinplava® (bezlotoxumab)	Sharp & Dohme Limited	<i>Clostridium difficile</i>	CHO
	Taltz® (ixekizumab)	Eli Lilly Nederland B. V.	Psoriasis	CHO
	Anthim® (obiltoximab)	Elusys Therapeutics, Inc.	Antrax	NSO
2015	Darzalex® (daratumumab)	Janssen Biotech, Inc.	Mieloma múltiple	CHO
	Nuwiq® (Antihemophilic rFactor VIII)	Octapharma AB	Hemofilia A	HEK293F
	Repatha® (evolocumab)	Amgen Europe B. V.	Hipercolesterolemia	CHO
2014	Eloctate® (Antihemophilic rFactor VIII, FcFusion Protein)	Biogen Idec, Inc	Hemofilia A	HEK293
	Alprolix® (rFactor IX fused to a human IgG1 Fc domain)	Biogen Idec, Inc	Hemofilia B	HEK293
	Pelegridy® (peginterferon beta 1-a)	Biogen Idec, Inc	Esclerosis múltiple	CHO

En 1996, el término «especie proteica» fue introducido por Jungblut (Jungblut *et al.*, 1996) y cerró una brecha entre la función de una proteína y su estructura química como un enfoque necesario para expandir el dogma central de la biología molecular. Mientras que una proteína se refiere al gen que la codifica, una especie de proteína se define por su composición química y se considera la unidad más pequeña del proteoma. A partir del producto de la síntesis primaria postraducción del ARNm, todos los cambios estructurales debidos a modificaciones postraduccionales, degradación, transporte o procesamiento intracelular, así como cualquier combinación de estas modificaciones químicas, conducen a nuevas especies de una misma proteína.

La glicosilación es la unión covalente de restos de carbohidratos (glicanos) a aminoácidos seleccionados de la cadena de polipéptidos y es conocida por ser una de las modificaciones postraduccionales más comunes, complejas y versátiles. La glicosilación de proteínas es específica del tipo de célula, tejido y especie. A diferencia de otros procesos celulares, como la transcripción o la traducción, la biosíntesis de glicanos no está dirigida por un «molde» y, sin embargo, se realiza por la interacción secuencial de enzimas (glicosiltransferasas y glicosidasas). Además, las glicoproteínas generalmente exhiben macro y microheterogeneidad aumentando la diversidad del proteoma a un nivel incomparable con cualquier otra modificación postraducciona. La

macroheterogeneidad, también denominada ocupación variable «del sitio de glicosilación», describe que la glicosilación no es obligatoria en todos los sitios potenciales de glicosilación. Esto puede depender de la conformación de la proteína y la disponibilidad del sitio, la cinética enzimática, así como la célula huésped y su estado fisiológico. Grandes variaciones con respecto a la composición de monosacáridos, el enlace glicosídico o la ramificación de glicano pueden surgir adicionalmente de la microheterogeneidad que se refiere a la diversidad estructural de oligosacáridos en un sitio de glicosilación particular (Rosenlöcher *et al.*, 2016).

En 1988, el término «glicofomas» fue definido por Rademacher y colaboradores (Rademacher *et al.*, 1988) como subconjuntos discretos de una glicoproteína que comparte un esqueleto de polipéptidos idénticos pero difieren con respecto a la glicosilación. Las glicofomas tienen diferentes características físicas y bioquímicas que pueden conducir a la heterogeneidad funcional y también son dependientes de la plataforma celular. Por ejemplo, los monosacáridos terminales de glicanos, fucosas y ácidos siálicos tienen importantes impactos estructurales y funcionales relacionados con la vida media y actividad biológica de las glicoproteínas.

La formación de glicofomas también ocurre durante la producción de proteínas recombinantes. Esto es de particular interés en el campo de la salud ya que se usa una gran cantidad de glicoproteínas recombinantes como productos biofarmacéuticos. El mercado de las glicoproteínas terapéuticas, incluidos los anticuerpos, los factores de coagulación, las citocinas y las hormonas, es muy rentable y crece rápidamente cada año. El proceo de glicosilación se ve afectado directamente por el entorno intracelular y el cultivo celular. Esta variabilidad compleja que presentan las glicoproteínas representa un desafío importante con respecto al desarrollo de productos biofarmacéuticos glicosilados con propiedades consistentes, ya que diferentes glicofomas pueden ser importantes para su funcionalidad terapéutica. Por ejemplo, para la hormona eritropoyetina, se puede demostrar una disminución drástica de la actividad *in vivo* para las glicofomas no sialiladas en comparación con las variantes sialiladas (Fukuda & Lopez, 1989).

6.3. PLATAFORMAS DE PRODUCCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

La elección del modelo celular para producir glicoproteínas recombinantes es clave para obtener un sistema de producción funcional exitoso. Varios aspectos deben ser considerados, entre ellos: características de la célula productora, costos de producción, capacidad de producir y traducir transcritos de ARN, seguridad, eficacia, estabilidad cromosomal, estabilidad de producto, entorno bioquímico, etc.

TABLA 6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS DIFERENTES PLATAFORMAS DE PRODUCCIÓN

Células	Bacterias	Levaduras	Plantas	Insectos	Mamíferos	
					No humanos	Humanos
Crecimiento celular	Muy rápido	Rápido	Moderado	Moderado	Lento	
Requerimiento de cultivo	Mínimo Barato	Mínimo Barato	Mínimo Barato	Complejo Caro	Complejo Caro	
Riesgo de contaminación del producto	Elevado (endotoxinas)	Bajo	Bajo	Elevado (virus)	Elevado (virus)	
Transgénesis	Fácil Estable	Fácil Estable	Fácil a moderada	Moderada	Moderada Estable	
Productividad	Alta	Alta	Baja a moderada	Alta	Moderada a alta	
Modificaciones postraduccionales	Limitada	Glicosilación Hipermanosilación	Glicosilación (glicoformas específicas de plantas) No realizan sialilación	Glicosilación (glicoformas específicas de insectos) Presencia de residuos de alta manosa o pausimannosa No realizan sialilación	Glicosilación similar a la humana Presencia de epitopes inmunogénicos no humanos	Perfil de glicosilación humano

6.3.1. Bacterias

El primer producto biofarmacéutico aprobado (1982), insulina recombinante (Humulin® de Eli Lilly & Co.), se produjo en sistemas de expresión bacterianos (*E. coli*). Desde entonces, las bacterias se han utilizado para producir numerosas proteínas terapéuticas no glicosiladas aprobadas comercialmente, como enzimas, citoquinas y anticuerpos monoclonales bajo la forma de fragmentos Fv de cadena única scFv (del inglés, *single chain Fv fragments*). Esta plataforma celular presenta varias limitaciones para la producción de glicoproteínas recombinantes debido a la falta de maquinaria enzimática requerida para la glicosilación de proteínas. Por esta razón, los sistemas de expresión bacterianos tradicionalmente no son considerados para la producción de proteínas glicosiladas y complejas. Este escenario podría cambiar en los próximos años debido al descubrimiento de una maquinaria de N-glicosilación de proteínas en *Campylobacter jejuni* y su exitosa transferencia funcional a *E. coli* (Schwarz *et al.*, 2010). Si bien el progreso realizado en los últimos años con respecto a la glicoingeniería de *E. coli* es significativo,

todavía se necesitan mejoras para establecer un proceso de producción rentable, ya que los rendimientos actualmente alcanzados son insuficientes para fines comerciales (Pandhal & Wright, 2010).

6.3.2. Levaduras

Los sistemas de expresión basados en levaduras son considerados muy atractivos y se han usado ampliamente para la producción de proteínas recombinantes. Las levaduras se pueden cultivar en medios químicamente definidos, crecer rápidamente y alcanzar densidades muy altas en un corto período de tiempo, presentan una expresión robusta, se puede aumentar el volumen de fermentación a escala industrial y principalmente cuentan con mecanismos de glicosilación bien caracterizados (N-glicosilación).

Alrededor del 20 % de los productos biofarmacéuticos se produce en *S. cerevisiae*, incluida la insulina, algunas vacunas contra la hepatitis y la albúmina sérica humana. Su uso intensivo también está relacionado con el plegamiento adecuado de muchas proteínas humanas y la relativa facilidad de purificación ya que las proteínas producidas pueden ser secretadas al medio extracelular. Otro sistema basado en levaduras muy utilizado es *Pichia pastoris*. Este es considerado un sistema de expresión heterólogo exitoso con varias proteínas recombinantes en ensayos clínicos (Razaghi *et al.*, 2017) produced commercially in *Escherichia coli*. Efficient expression of h1FN_g has been reported once for *Pichia pastoris* (Wang *et al.*, 2014). Glicoproteínas recombinantes expresadas en levadura con aprobación de comercialización incluyen: una vacuna a subunidad de hepatitis B que usa antígeno de superficie de hepatitis B (Engerix B, GSK); factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante (Leuquina[®], Sanofi); factor de crecimiento recombinante derivado de plaquetas humanas (Regranex[®], OMJ Pharmaceuticals, Inc.) y vacuna a subunidad del virus del papiloma humano (Gardasil[®], MSD); (Meehl & Stadheim, 2014).

Si bien las levaduras tienen el potencial de realizar glicosilaciones (ver Figura 1.4), los N-glicanos hipermanosilados, con más de 100 residuos de manosa adicionales, afectan negativamente la vida media de las proteínas tras la administración de la misma pudiendo provocar reacciones inmunes adversas en los seres humanos. Se han realizado esfuerzos para modificar genéticamente las levaduras mediante la eliminación de los glicanos hipermanosilados endógenos, seguido de la introducción de los elementos necesarios para generar glicanos complejos sialilados similares a los humanos. El desarrollo de cepas «knockout» de *Pichia pastoris* en el gen *OCH1* (gen responsable del desencadenamiento de hipermanosilación), resultó en una reducción en el número de manosas en glicanos en comparación con una cepa de tipo salvaje (Hamilton y Gerngross, 2007; Meehl and Stadheim, 2014). En 2006, Merck adquirió GlycoFi (*Pichia pastoris* glicoingenierizada

para N-glicosilación) para sinergizar su producción biofarmacéutica en *Saccharomyces cerevisiae* (Gardasil®) con el fin de producir productos mejorados con costos inferiores a los obtenidos con líneas celulares de mamíferos (Beck & Reichert, 2012).

6.3.3. Células de plantas

Las células de plantas se proponen como una plataforma de producción alternativa para proteínas terapéuticas bioactivas ya que tienen varias ventajas, como la facilidad de ampliación o escalado para la producción industrial a un costo comparativamente bajo. Sin embargo, la N-glicosilación comparativamente con las células de humanos es distinta dando como resultado diferencias estructurales significativas del entorno de N-glicanos. Las plantas carecen del residuo bisectante GlcNAc, los residuos β 1-4-Gal, los AS y los residuos de α 1-6-Fucosa. Además, los N-glicanos de plantas pueden llevar residuos de β 1-2-Xylosa y α 1-3-Fucosa que están ausentes en humanos y por lo tanto son inmunogénicos. Además, mientras que los N-glicanos humanos de tipo complejo frecuentemente consisten en estructuras multiantenarias con más de dos ramas terminales, los N-glicanos en plantas normalmente solo tienen dos antenas (Gomord *et al.*, 2010; Varki *et al.*, 2009; ver Figura 1.4). Los productos bioterapéuticos glicosilados derivados de plantas que se encuentran actualmente en ensayos clínicos tales como la transferrina o la lisozima humanas todavía contienen glicosilación de plantas. Sin embargo, productos como la lisozima están diseñados para su administración en forma oral, lo que sugiere que las estructuras de glicanos vegetales no siempre son inmunogénicas y no obstaculizarán la aprobación y comercialización de la FDA (Boothe *et al.*, 2010). En los últimos años se logró un progreso significativo en plantas transgénicas modificadas genéticamente equipadas con diferentes componentes de la maquinaria de glicosilación de mamíferos, incluso permitiendo N-glicosilación multiantenaria y α -2,6 sialilada hasta cierto punto (Castilho *et al.*, 2011; Gomord *et al.*, 2010). Pero se necesitan mejoras adicionales para establecer plantas transgénicas, como una plataforma de producción confiable para glicoproteínas que llevan a cabo una glicosilación humanizada homogénea (Boothe *et al.*, 2010).

La producción de proteínas recombinantes terapéuticas utilizando plantas como plataforma es un enfoque relativamente nuevo en donde se plantea una reducción mayor al 50 % de la inversión de capital y el costo de los bienes en comparación con los sistemas de expresión de células de mamíferos (Nandi *et al.*, 2016). Las especies solanáceas dentro del género *Nicotiana*, específicamente *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Nicotiana benthamiana* (variedad australiana), se consideran en la actualidad las plataformas más apropiadas en la agricultura molecular. Las características ventajosas incluyen *i*) facilidad de cultivo y alta biomasa; *ii*) disponibilidad

de herramientas genéticas para la manipulación de rasgos y *iii*) aptitud para nuevas técnicas de fitomejoramiento (CRISPR / Cas9). *N. benthamiana* es en especial adecuada para producir proteínas recombinantes, y un aspecto significativo es que contiene una inserción natural en el gen de ARN polimerasa 1 dependiente de ARN (Bally *et al.*, 2015), lo que conduce a un nivel reducido de silenciamiento génico. Esta característica permite la utilización eficiente de vectores de expresión transitorios y una producción rápida (4-10 días) de proteínas de alto valor (hormonas, enzimas, anticuerpos) mediante transfección transitoria mediante agroinfiltración.

De manera reciente, un caso para destacar es el éxito de ZMapp, un cóctel de anticuerpos utilizado durante el brote de Ébola 2014-2015 (Qiu *et al.*, 2014), y la producción eficiente de vacunas contra la gripe estacional (D'Aoust *et al.*, 2010). Los rendimientos obtenidos y la escalabilidad del sistema la hacen adecuada para la producción industrial resultando en hasta 5 g de proteína recombinante / kg de biomasa y 10 millones de dosis de una vacuna por mes (Bendandi *et al.*, 2010).

En particular, las plantas como organismos eucariotas pueden ser incorporadas con muchos de los rasgos deseables de los mamíferos, manteniendo sus importantes ventajas de bioprocesamiento. Esto facilita la expresión de proteínas humanas complejas (por ejemplo, anticuerpos) con complejas modificaciones postraduccionales (por ejemplo, N- y O-glicosilación). Esta revisión se concentra en la capacidad de las plantas para producir proteínas con perfiles de glicosilación específicos. Un interés especial es la generación de glicofomas humanas con mayor homogeneidad, ya que esto difícilmente puede ser logrado por los huéspedes de expresión de mamíferos debido a su compleja maquinaria de glicosilación endógena. Esto es de especial interés para la industria biofarmacéutica, ya que la mayoría de las proteínas terapéuticas está glicosilada y es bien sabido que los perfiles de glicanos tienen un impacto significativo en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas. De hecho, se ha demostrado que ciertas funcionalidades de proteínas se pueden revertir, dependiendo del perfil de glicosilación. Ejemplos característicos son los anticuerpos IgG que exhiben actividades pro o antiinflamatorias, dependiendo de su perfil de glicosilación (Nimmerjahn & Ravetch, 2010).

El cultivo de células vegetales es una opción de producción interesante para productos biofarmacéuticos. Las células vegetales pueden realizar complejas modificaciones postraduccionales, y los sistemas se consideran seguros ya que no albergan ningún patógeno humano conocido ni endotoxinas bacterianas. Los productos recombinantes se acumulan principalmente en la vacuola de la planta, pero las proteínas más pequeñas pueden pasar a través de la pared celular hacia el entorno extracelular. Las células vegetales son totipotentes, lo que significa que cada célula tiene el potencial de formar una nueva planta completa y/o formar todos los tipos de células. El tamaño de una célula vegetal puede ser de hasta

100 μm de diámetro, que es muchas veces más grande que las bacterias y las células animales. A modo de comparación, el diámetro de *E. coli* es de 2 μm , y el diámetro de las células de mamíferos de aproximadamente 10 a 15 μm . Muchas células vegetales crecen muy lentamente, y el tiempo de duplicación para las células vegetales puede ser de varios días. Los medios de cultivo de células vegetales generalmente incluyen una fuente de carbono, suplementos orgánicos e inorgánicos, fitohormonas y una matriz de soporte, si es necesario. No se incluyen componentes de medios sensibles a la luz, a diferencia de muchos medios de cultivo de células animales. En pequeña escala, las células vegetales se pueden cultivar en matraces de agitación convencionales, y en mayor escala se han empleado varios diseños de biorreactores. Los ejemplos incluyen modificaciones de tanques agitados convencionales, biorreactores de un solo uso y biorreactores desechables diseñados a medida. El primer producto producido en cultivo vegetal Eleyso® (taliglucerasa alfa, Protalix BioTherapeutics) fue aprobado por la FDA en mayo de 2012. Eleyso® es una enzima producida en células de zanahoria genéticamente modificadas, para tratar la enfermedad de Gaucher tipo 1 (Lindskog *et al.*, 2018). Para una revisión ver «*Advanced Plant-Based Glycan Engineering*» (Montero-Morales & Steinkellner, 2018) y «*Plant protein glycosylation*» (Strasser, 2016).

Las células eucariotas comparten la capacidad de modificar proteínas por N-glicosilación. Se muestran ejemplos de estructuras de N-glicanos que se generan en diferentes plataformas de producción de glucoproteínas bioterapéuticas. Entre las células eucariotas, los primeros pasos de la N-glicosilación se producen en el RE. La maquinaria de glicosilación del RE está altamente conservada entre todas las especies y da como resultado la biosíntesis de Man₃GlcNAc₂ como estructura *core*. Todas las modificaciones adicionales del núcleo de N-glicano tiene lugar en el aparato de Golgi, con lo cual el repertorio de glicosilación varía mucho de una especie a otra. Por ejemplo, la levadura expresa principalmente estructuras de glicanos de alta manosa que albergan hasta 100 residuos de manosa en diferentes enlaces. Por el contrario, la mayoría de los N-glicanos que se encuentran en las proteínas de las células de insectos pertenece al tipo paucimannosa que representa la estructura central, pero en menor medida se han encontrado modificaciones adicionales por residuos adicionales de manosa, fucosa y galactosa. Las plantas superiores incluso sintetizan una porción significativa de glicanos de tipo complejo con dos antenas. Sin embargo, se adicionan con una elevada frecuencia residuos de xilosa que son altamente inmunogénicos en humanos. Por el contrario, los animales expresan principalmente N-glicanos de tipo complejo multiantenar y adicionan ácidos siálicos en las posiciones más externas de las cadenas de glicanos. Pero los humanos han perdido la capacidad de sintetizar dos de los principales epítopes de glicanos de mamíferos, Gal α 1-3Gal (alfa-Gal) y ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc).

6.3.4. Células de insectos

Los sistemas de expresión que utilizan células de insectos representan una adecuada alternativa a los sistemas bacterianos y de mamíferos. En células de insectos, los péptidos señales se clivan como en las células de mamíferos, los puentes disulfuro se forman en el retículo endoplásmico y las enzimas necesarias para el procesamiento proteolítico están disponibles. Además, líneas celulares de insectos establecidas y utilizadas para la producción de proteínas recombinantes pueden crecer hasta densidades más altas que las células de mamíferos, con lo cual menor será el volumen de cultivo necesario para la producción de la glicoproteína. Como ventaja las células de insectos son menos exigentes que las células de mamíferos y se pueden utilizar bajo condiciones estándar de cultivo y sin atmósfera de CO₂ (Vilcinskas & Kollewe, 2013).

Si bien la glicosilación de proteínas tiene lugar en todos los organismos eucariotas, los patrones de glicosilación difieren entre las especies. Estas diferencias son más prominentes entre eucariotas inferiores y superiores, pero también están presentes entre diferentes líneas celulares de mamíferos pudiendo influir en la solubilidad, vida media, actividad e interacciones con otras moléculas (ver Capítulo 2). La glicosilación en células de insectos es similar pero no idéntica a las células de mamíferos. Las líneas celulares de insectos más ampliamente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes son las células Schneider 2 (S2) de las últimas etapas embrionarias de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972) y células Sf-9 del tejido ovárico pupal del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977).

Debido al tipo de glicosilación de alta manosa y paucimannosa que se obtiene en las células de insecto, pocas proteínas terapéuticas se producen en este sistema, ya que esto compromete la bioactividad *in vivo* y podría inducir reacciones alérgicas. La ingeniería de esas células con glicosiltransferasas permite la producción de proteínas con azúcares similares a las células de mamífero. Las células de insectos también ofrecen una plataforma interesante para producir antígenos de vacunas o partículas similares a virus, mientras que los baculovirus diseñados que contienen promotores de mamíferos (bacmam) muestran un gran potencial como vectores genéticos para la transducción de células de mamíferos. Una vacuna contra el VPH (Virus del Papiloma Humano) autorizada se compone de una forma truncada de las principales proteínas de la cápside L1 de los tipos 16 y 18 del VPH expresadas en células High Five™ (Cervarix1) y muchas más (por ejemplo, Provenge®, Flublok®, Chimigen®) están en desarrollo o en fase clínica.

Un sistema muy conocido de producción de proteínas recombinantes en células de insectos es el sistema de células de insecto-baculovirus. Sin embargo, está claro que las capacidades de glicosilación de proteínas de las células de insecto infectadas con baculovirus no son equivalentes a las de los eucariotas superiores. Mientras que las glicoproteínas de mamíferos nativos a menudo tienen

N-glicanos de tipo complejo con ácidos siálicos terminales, las glicoproteínas recombinantes derivadas de células de insectos generalmente tienen cadenas laterales mucho más simples, conocidas como N-glicanos paucimannosídicos, en sitios normalmente ocupados por estructuras complejas, sialiladas terminalmente. Además, los N-glicanos derivados de insectos pueden contener residuos de fucosa en uniones α 1,3 que se sabe que son alergénicos. Estas diferencias estructurales entre los principales N-glicanos sintetizados por las células de insectos y mamíferos son serios problemas que han dificultado el uso del sistema de expresión de células de insecto-baculovirus para la producción de glicoproteínas recombinantes para al menos algunas aplicaciones farmacéuticas (Vilcinskas & Kollwe, 2013).

Un inconveniente serio es la falta de glicanos de tipo complejo con ácidos siálicos terminales en células de insectos. Por ejemplo, mientras que la transferrina humana tiene principalmente estructuras N-glicosídicas de tipo α 2,6-diantenarias y trisialil-triantenarias, la transferrina humana recombinante expresada en células de insectos contiene glicofomas de bajo peso molecular principalmente del tipo paucimannosídicas, con una falta completa de galactosa y ácidos siálicos (Ghaderi *et al.*, 2012). En consecuencia, las glicoproteínas humanas recombinantes expresadas en sistemas de células de insectos actualmente no son adecuadas para fines terapéuticos. Estas limitaciones principales pueden ser superadas por glicoingeniería de forma tal de permitir un procesamiento «mejorado» de N-glicanos y generar una glicosilación compleja como es la humana. Como ejemplo se puede describir el caso de las células de insectos Schneider-2 que producen N-glicanos de tipo completamente complejo, que carecen solo de ácidos siálicos terminales (Kim *et al.*, 2011).

Se han emprendido varios enfoques para comenzar a abordar estos problemas. Uno ha involucrado el desarrollo de condiciones de cultivo que podrían apoyar la producción de glicoproteínas recombinantes con N-glicanos más «auténticos», similares a los de los mamíferos, por líneas celulares de insectos que ya se utilizan como «huéspedes» para los vectores de baculovirus. Otro ha implicado la identificación de combinaciones alternativas de baculovirus-huésped naturales que podrían producir glicoproteínas recombinantes con N-glicanos más «humanizados». Otro enfoque más ha sido diseñar genéticamente vectores de baculovirus o sus huéspedes para codificar y expresar genes de mamíferos involucrados en los últimos pasos del procesamiento del N-glicano. Este enfoque ha producido nuevos sistemas de células de insecto-baculovirus que pueden producir glicoproteínas recombinantes más «humanizadas» (Shi and Jarvis, 2007).

6.3.5. Células de mamíferos

En la última década, más de cien nuevos productos biofarmacéuticos han sido aprobados y comercializados en los Estados Unidos y la Unión Europea.

El valor de mercado para estos productos biológicos se estimó recientemente en \$ 140 mil millones de dólares estadounidenses, con un total de más de doscientos productos terapéuticos. Una parte importante de estos productos son proteínas recombinantes, con un aumento constante en el número de ellas producidas en plataformas de expresión de líneas celulares de mamíferos. Esta tendencia se debe principalmente a la mayor atención dirigida a las modificaciones postraduccionales de estos productos biológicos, en particular hacia su estado de glicosilación. De hecho, se han realizado varios esfuerzos en los últimos años para comprender cómo la glicosilación puede influir en la actividad biológica de la proteína terapéutica. Los estudios han demostrado que los perfiles adecuados de glicosilación pueden mejorar las propiedades de las proteínas recombinantes, como aumentar su estabilidad y vida media en la circulación sanguínea y disminuir su inmunogenicidad (Lalonde and Durocher, 2017). Entre los sistemas de expresión basados en células de mamíferos, las células CHO son la línea celular más comúnmente utilizada para la producción de más del 70 % de proteínas biofarmacéuticas recombinantes, la mayoría de las cuales son anticuerpos monoclonales (mAb) (Durocher and Butler, 2009a).

En este contexto, el desarrollo de líneas celulares más eficientes productoras de proteínas recombinantes que cumplan con los requisitos industriales es de suma importancia. Como la eficacia y la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes se correlacionan directamente con sus modificaciones postraduccionales, las líneas celulares de mamíferos representan la opción preferida como sistema de expresión y 60–70 % de todos los productos biofarmacéuticos se basan actualmente en procesos de cultivo de estas células (Yusufi *et al.*, 2017). Sin embargo, los sistemas de expresión de mamíferos aún exhiben cuellos de botella en comparación con los sistemas de producción bacterianos o basados en levaduras con respecto a la capacidad de crecimiento, el tiempo de cultivo y el rendimiento del producto (Schmidt, 2004).

El mejoramiento constante de las células de mamíferos sigue siendo un desafío clave para satisfacer la creciente demanda de proteínas terapéuticas. Además, los sistemas de salud ya enfrentan enormes costos asociados con la creciente demanda de proteínas terapéuticas para satisfacer necesidades médicas no satisfechas. Los procesos de fabricación industrial de productos biofarmacéuticos dependen en gran medida de plataformas de producción basadas en células no caras y de alto rendimiento para maximizar los rendimientos de producción, pero también para reducir los costos asociados. Por lo tanto, se deben desarrollar e implementar nuevas estrategias para permitir procesos de producción basados en células de mamíferos de alto rendimiento rentables y eficientes. En general, existen diferentes oportunidades para contrarrestar las limitaciones de las células de mamíferos. Las características crecientes de crecimiento que conducen a una proliferación celular acelerada y/o una densidad celular máxima viable (vcd) se pueden lograr mediante optimizaciones de bioprocesos y medios (Yusufi *et al.*, 2017).

Así, el mejoramiento del rendimiento de las líneas celulares productoras, principalmente en células CHO, se ha logrado mediante la implementación de técnicas de ingeniería genética. Estos enfoques comprendían clásicamente la sobreexpresión de genes beneficiosos o la represión de productos génicos desventajosos por desactivación genómica o desactivación mediada por siRNA, etc. En particular, los ARN no codificantes evolucionaron recientemente como una novedosa herramienta de ingeniería celular de vanguardia que exhibe un alto potencial para revolucionar el desarrollo de la línea celular CHO. Estos esfuerzos pueden producir derivados de células CHO que superan a sus líneas celulares parentales en cuanto a crecimiento, resistencia a la apoptosis, metabolismo, productividad o la capacidad de expresar proteínas recombinantes con un perfil de glicosilación a medida.

Por lo tanto, la ingeniería de célula «huésped» representa una técnica poderosa para aumentar significativamente la eficiencia de los procesos de producción basados en CHO. Los siguientes tres temas proporcionan una visión general completa de los enfoques genómicos funcionales realizados con éxito para la ingeniería de células CHO en las últimas tres décadas. También presentaremos tecnologías novedosas e innovadoras que podrían contribuir a mejorar el rendimiento de las células CHO para establecer procesos de producción superiores de alto rendimiento en el futuro.

6.3.5.1. Líneas celulares de mamíferos no humanas

CHO (Chinese Hamster Ovary)

Las células CHO son ampliamente utilizadas para la producción de glicoproteínas debido a sus numerosas ventajas. Estas células pueden alcanzar una tasa de producción importante, son adecuadas para el cultivo industrial en suspensión a gran escala y pueden adaptarse para crecer en diversos medios de cultivo sin suero y químicamente definidos. Como las células CHO producen glicoproteínas recombinantes con glicanos similares a los humanos, los productos generados son más compatibles y bioactivos en los huéspedes humanos. Además, estas células son refractarias a la infección por virus humanos como los adenovirus, el herpes, la hepatitis, el VIH, el sarampión y la influenza, lo que incrementa la bioseguridad con fines de producción comercial. Esta disminuida susceptibilidad podría atribuirse al hecho de que muchos genes virales no se expresan en células CHO (Xu *et al.*, 2011).

Con el propósito de aumentar los rendimientos y las productividades específicas de los bioprocesos mediados por células CHO se han desarrollado y utilizado diferentes sistemas de amplificación génica (Durocher & Butler, 2009; Kim *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2013). Una de las características más importantes del sistema celular CHO es la facilidad de generar clones celulares diseñados para que sean capaces de expresar de manera estable un gen de interés con

rendimientos suficientes y una calidad aceptable para el uso en la industria biofarmacéutica humana. Esto se puede lograr luego de la inserción de genes específicos en el genoma de la célula mediante la integración específica del sitio o la integración aleatoria seguida de la amplificación de genes utilizando los sistemas de dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS).

Todo el «sistema de células CHO» abarca una variedad de diferentes líneas celulares que probablemente derivaron de una célula de ovario de hámster chino clonal e inmortalizada en forma espontánea, originalmente aislada en 1956 por Theodore Puck (Puck *et al.*, 1958). El hecho de que la primera línea celular CHO y todas las líneas celulares derivadas subsecuentemente sean deficientes en la síntesis de Pro apoya fuertemente la noción de un origen clonal común (Wurm y Hacker, 2011). Hoy en día, tres diferentes líneas celulares CHO se usan comúnmente para la fabricación de biofarmacéuticos: i) la línea celular CHO-K1, ii) la línea CHO-DXB11 con un knockout DHFR monoalélico y iii) la línea CHO-DG44 en la que ambos alelos DHFR fueron eliminados físicamente (Urlaub *et al.*, 1983; Wurm y Hacker, 2011) Davidson, and Siminovitch (1976).

CHO-K1: la línea celular CHO-K1 representa una de las líneas celulares clonales establecidas más tempranamente. En 2000, Lonza adaptó la línea celular original CHO-K1 para crecer en cultivo en suspensión y en medio sin suero, y más tarde desarrolló una sublínea denominada CHO-K1 SV (Wurm, 2013). La línea celular CHO-K1SV se utiliza principalmente en combinación con el exclusivo sistema de selección de GS donde el gen de interés se aporta a las células junto con una copia del gen GS (Zhang *et al.*, 2013) a basal medium was prepared by supplementing DMEM:F12:RPMI1640 (2:1:1. Las células estables se seleccionan en medio libre de Gln, que también se puede complementar con el inhibidor específico de GS, metionina sulfomixina (MSX) para aumentar la rigurosidad de la selección y elevar la productividad. Sin embargo, la inestabilidad clonal puede ser un problema en los clones de producción amplificados por MSX debido a reordenamientos cromosómicos. Esta observación también se ha realizado con frecuencia en las líneas celulares de producción de CHO-DG44 con deficiencia de dihidrofolato amplificado con metotrexato (MTX) (Lindskog *et al.*, 2018) .

CHO-S: a principios de la década de 1960, Theodore Puck notó que las subpoblaciones de células CHO podían crecer como un cultivo en suspensión no adherente. Aproximadamente diez años después, Larry Thompson y Raymond Baker mencionaron y describieron por primera vez el cultivo en suspensión de la línea celular CHO-S (Thompson & Baker, 1973). Es digno de mención que la adaptación de las células CHO para crecer en cultivo en suspensión marcó un cambio de paradigma en la tecnología de cultivo de células animales y finalmente allanó el camino para la fabricación a gran escala de proteínas terapéuticas recombinantes hasta una escala de 20 000 l utilizando biorreactores de tanque agitado. Hoy en día, las células CHO-S para producción en

suspensión pueden obtenerse comercialmente a partir de bancos cGMP. Sin embargo, una de las principales desventajas de las células CHO-S es que la línea celular tiende a formar grandes agregados en el cultivo en suspensión (Lindskog *et al.*, 2018).

CHO-DXB11: las células CHO deficientes en DHFR son auxótrofas triples para glicina, hipoxantina y timidina, y por lo tanto requieren la adición de estos nutrientes al medio de cultivo. Para obtener esta línea celular, que más tarde se denominó CHO-DXB11, las células CHO-K1 se mutagenizaron por irradiación gamma, creando una línea celular mutante que carece de actividad DHFR (Wurm, 2013) however, immortalized cells, characterized by a high degree of genetic and phenotypic diversity. As is known for any biological system, this diversity is enhanced by selective forces when laboratories (no sharing of gene pools). En particular, las células CHO-DXB11 tienen una eliminación física de un locus DHFR, mientras que el otro alelo lleva una mutación errónea del gen DHFR. La falta de actividad de DHFR hace que las células CHO-DXB11 sean altamente adecuadas para la transfección estable con vectores de administración de genes que además albergan un transgén en combinación con una copia funcional del gen DHFR. Las células transfectadas pueden seleccionarse de manera estable en medio de cultivo sin hipoxantina y timidina (HT), ya que la expresión de DHFR hace que las células sean capaces de sintetizar ADN en ausencia de los desoxirribonucleonucleidos mencionados anteriormente. CHO-DXB11 también fue la línea celular utilizada para la producción comercial del primer activador tisular del plasminógeno humano como proteína recombinante aprobada (tPA; comercializado bajo el nombre comercial Activase), por Genentech (Lindskog *et al.*, 2018).

CHO-DG44: con el propósito de obtener células CHO *knockout* en forma bialélica del gen DHFR, Urlaub y Chasin (1983) decidieron realizar rondas adicionales de mutagénesis utilizando la línea celular CHO original (Xu *et al.*, 2011). Así, estos esfuerzos finalmente llevaron al establecimiento de otra línea celular CHO deficiente en DHFR denominada CHO-DG44, donde ambos loci de genes DHFR fueron eliminados físicamente. Desde entonces, las células CHO-DG44 se han convertido en la línea celular huésped derivada de CHO más frecuentemente empleada para la producción industrial de productos biofarmacéuticos en todo el mundo. Una ventaja importante de las células CHO deficientes en DHFR que contribuyeron a su éxito es su capacidad para amplificar un transgén cuando las células transfectadas se tratan con el metotrexato análogo de folato (MTX). MTX inhibe la actividad de DHFR al unir competitivamente el sitio catalítico de la enzima DHFR evitando la conversión de dihidrofolato en tetrahidrofolato activo que se requiere para la síntesis de ADN. Un aumento gradual en la concentración de MTX en el medio de cultivo de células CHO deficientes en DHFR transfectadas de manera estable con un vector, que codifica un gen de interés, así como DHFR, agrega más presión de selección

a las células. En consecuencia, esto conduce a la amplificación genómica de DHFR y del gen de interés, lo que resulta en un número elevado de copias de transgenes y, por lo tanto, los grupos de células supervivientes generalmente exhiben una mayor productividad celular de la proteína recombinante (Wirth *et al.*, 1988). Sin embargo, la amplificación de genes mediada por MTX con un aumento concomitante en la producción de proteínas inevitablemente viene junto con importantes reordenamientos genómicos, y muy probablemente también con cambios en la expresión génica. Además, entre otros factores, se supone que las aberraciones genómicas inducidas por MTX son una de las fuerzas impulsoras de la inestabilidad clonal, que presenta un problema grave en esta plataforma celular. Sin embargo, las líneas celulares derivadas de CHO-DG44 todavía se usan con frecuencia en una gran cantidad de compañías farmacéuticas en todo el mundo.

En 2011 fue secuenciado el primer genoma CHO por Xu y sus colaboradores acelerando significativamente los esfuerzos en investigación y desarrollo para aplicaciones biotecnológicas (Xu *et al.*, 2011). Sin embargo, dado que las células CHO son inherentemente propensas a reordenamientos genómicos, fueron necesarios más esfuerzos de secuenciación, incluida la clasificación de cromosomas de antemano, para obtener una visión más detallada de las regiones genómicas (Lewis *et al.*, 2013). Además de la información del genoma, los datos de transcriptoma, miARNoma y proteoma estuvieron disponibles recientemente (Becker *et al.*, 2011). Más recientemente, los sitios de inicio de la transcripción se desentrañaron en el año 2014 (Jakobi *et al.*, 2014), lo que da lugar a análisis bioinformáticos detallados una vez que estos sitios de inicio finalmente se han introducido en la base de datos del genoma CHO disponible públicamente (www.Chogenome.org). En conjunto, todas estas valiosas contribuciones ayudaron significativamente a caracterizar mejor esta herramienta de trabajo biotecnológico y respaldaron sustancialmente los esfuerzos de investigación en ingeniería celular.

Para tener una idea más abarcativa del complejo mundo de las células CHO y su potencial biotecnológico se sugiere ver el trabajo de los investigadores Fisher, Handrick & Otte «The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives» (Fischer *et al.*, 2015).

Existen muchos ejemplos de glicoproteínas bioterapéuticas aprobadas por la Agencia de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) que actualmente son producidas en estas células. Varios mAbs como Siltuximab (SYLVANT®), Pertuzumab (PERJETA®) y Rituximab (RITUXAN®), así como otras proteínas como el activador del plasminógeno tisular (tPA, ACTILYSE®, ACTIVASE®) y la DNasa humana (PULMOZYME®) son solo algunos de los muchos ejemplos de bioterapéuticos generados en células CHO (para una lista actualizada, véase el trabajo de Dumont y colaboradores (Dumont *et al.*, 2016).

En la actualidad, más de la mitad de los productos biológicos aprobados son proteínas recombinantes producidas en células CHO. Entre estos

productos, cuatro mAbs, Daratumumab (DARZALEX®), Mepolizumab (NUCALA®) y Evolocumab / Alirocumab (REPATHA® / PRALUENT®) se usan para tratar el mieloma múltiple, el asma y la hipercolesterolemia, respectivamente (Health and Innovation, 2018). Aunque las células CHO poseen muchas ventajas para la producción de glicoproteínas, no pueden producir algunos tipos o patrones de glicosilación humana, tales como la α -2,6-sialilación y la α -1,3/4-fucosilación. Asimismo, las células CHO producen glicanos que no se producen en las células humanas, a saber, ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y galactosa- α 1,3-galactosa (α -gal), aunque estos se producen a niveles muy bajos (<2 % y <0,2 %, respectivamente). El sistema inmune humano puede producir anticuerpos contra estos glicanos que podrían contribuir a la inmunogenicidad y neutralización de los bioterapéuticos correspondientes. Las células CHO también tienen una capacidad limitada para producir proteínas recombinantes gamma-carboxiladas, como los factores de coagulación, aunque se han logrado algunas mejoras mediante el trabajo de ingeniería metabólica. Las proteínas que requieren un procesamiento proteolítico para la maduración pueden no estar completamente segmentadas y activas cuando se expresan en CHO. Por ejemplo, se demostró que la coexpresión de furina permite la producción de factor de Von Willebrand totalmente escindido y activo en un sistema de perfusión CHO a escala industrial y del dominio B del factor VIII de coagulación (Lalonde and Durocher, 2017).

BHK (Baby Hamster Kidney)

Las células de riñón de hámster bebé (BHK) son uno de los muchos tipos diferentes de células de vertebrados utilizados para la propagación de virus por infección y transfección. Las células BHK, como muchas otras, están disponibles en el banco celular ATCC (*American Type Culture Collection*), y muchos laboratorios mantienen sus propias líneas celulares individuales. BHK es una de las pocas líneas celulares de mamíferos que se puede cultivar fácilmente tanto de forma adherente como en suspensión. El crecimiento es modesto en comparación con otras líneas celulares de mamíferos utilizadas en procesos industriales. La línea celular BHK-21 se estableció en 1961 a partir de los riñones de 5 hámsteres sirios de la camada número 21 (Stoker & Macpherson, 1964). Desde este momento, esta línea celular ha sido un estándar de laboratorio para el crecimiento de innumerables virus y el estudio de muchos procesos biológicos.

Las líneas celulares BHK-21 se utilizan en la producción de los factores de coagulación sanguínea NovoSeven® (Factor VIIa) de Novo Nordisk, Helixate® (Factor VIII) de Aventis Behring y los productos de Factor VIII Kogenate® y Kovaltry® de Bayer. Todas estas glicoproteínas abundantemente glicosiladas y sulfatadas son factores de coagulación en humanos muy difíciles de producir y utilizadas para el tratamiento de pacientes hemofílicos (Dumont et

al., 2016). Las proteínas Kogenate® y Kovaltry® tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero los procesos y las líneas celulares de producción en ВНК-21 difieren. En el proceso de Kovaltry®, la célula ВНК-21 original utilizada en la fabricación de Kogenate® se ha modificado al introducir el gen de la proteína 70 de choque térmico humana (HSP70). HSP70 es una chaperona que se cree que aumenta la expresión de FVIII al facilitar el plegamiento adecuado de proteínas y mejorar la supervivencia celular al inhibir la apoptosis. Tanto Kogenate® como Kovaltry® se producen en procesos de perfusión utilizando volúmenes de biorreactor de hasta 500 L (Ishaque *et al.*, 2007). La mayoría de los procesos ВНК-21 se aprobaron antes o alrededor del año 2000, con la excepción de Kovaltry, que se aprobó en 2016.

También las células ВНК son muy utilizadas para la producción de vacunas virales como rabia y aftosa (Fernández Núñez *et al.*, 2016) by means of a combination of static and agitated culture systems. Critical parameters for static (liquid column height: 5, 10, 15 mm).

6.3.5.2. Líneas celulares de mamíferos humanas

La demanda de proteínas terapéuticas recombinantes aumenta significativamente año tras año. Existe una necesidad constante de mejorar los sistemas de expresión existentes y también desarrollar enfoques novedosos para enfrentar esta demanda. Las líneas celulares humanas han surgido como una alternativa nueva y poderosa para la producción de proteínas terapéuticas humanas porque se espera que este sistema de expresión produzca proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales más similares a su contraparte natural y reduzca las posibles reacciones inmunogénicas. Con el correr de los años la información disponible sobre el cultivo de células humanas para la producción de productos biofarmacéuticos es cada vez mayor. Estas células han demostrado una producción eficiente a escala de laboratorio y representan una herramienta muy valiosa para la industria farmacéutica siendo cada vez más utilizadas.

HEK (Human Embryonic Kidney)

La línea celular HEK293, derivada de riñón embrionario humano, son células que fueron transformadas con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5 y establecidas como línea celular estable hace más de 40 años (Graham *et al.*, 1977), sin embargo, solo en los últimos años ha sido ampliamente utilizada en la producción de proteínas recombinantes y vectores virales. Esta línea celular es probablemente la línea celular más utilizada para expresar proteínas recombinantes en estadios de investigación y desarrollo; no obstante, en 2014 se aprobó una gran cantidad de proteínas terapéuticas producidas en líneas celulares humanas HEK293, con cuatro nuevas glicoproteínas autorizadas por la FDA y EMA. rFVIII_{FC} (ALPROLIX®) y rFIX_{FC} (ELOCTATE®) son dos proteínas

utilizadas para la prevención de episodios hemorrágicos en personas con hemofilia A y B. Consisten en dominios de proteínas FVIII y FIX fusionadas a la porción Fc de la inmunoglobulina G1 (IgG1). rFVIII₁Fc tiene seis sitios de sulfatación de tirosina que son esenciales para su funcionalidad. Además, rFIX₁Fc tiene γ -carboxilación en sus primeros doce residuos de ácido glutámico, muy importante para su actividad. La expresión de estas glicoproteínas en HEK293 dio como resultado una mayor sulfatación de tirosinas y γ -carboxilación de Glu en comparación con las células CHO excluyendo cualquier α -gal y Neu5Gc de los productos manufacturados. Dulaglutida (TRULICITY®), otra proteína de fusión a Fc utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, se produce en células HEK293-EBNA1 y se aprobó en 2014. El rFVIII humano (NUWIQ®), un factor de coagulación de reemplazo para la hemofilia aprobado por EMA desde 2014 y por la FDA desde 2015 (Dumont *et al.*, 2016), se produce en la línea celular HEK293-F y ha mostrado un perfil de glicosilación similar al factor VIII derivado del plasma, también sin residuos de α -gal y Neu5Gc.

En otro sentido, las células HEK293 también han sido ampliamente utilizadas para la producción de vectores virales (adenovirus, lentivirus, retrovirus y virus adeno-asociados) con fines terapéuticos. Muchos de estos vectores producidos usando esta línea celular se encuentran actualmente en fase II y fase III de ensayos clínicos (Blessing *et al.*, 2019).

293E: células HEK293 recombinantes que expresan constitutivamente el antígeno nuclear del virus del Epstein Barr (EBNA) es actualmente la línea celular más ampliamente utilizada para la expresión en forma transiente de genes de interés en gran escala principalmente debido a su mayor productividad. A pesar de eso, las células HEK293 también expresan de manera estable la proteína de adenovirus 13 S E1a que se ha demostrado mejora significativamente la transcripción de promotores tales como citomegalovirus (CMV) (Gorman *et al.*, 1989). Otra razón muy importante para su amplia aplicación es el hecho de que estas células crecen fácilmente en cultivos en suspensión sin suero fetal bovino y existen varios clones adaptados al crecimiento en suspensión y cultivos libres de suero disponibles comercialmente para ser mejorados tanto en el campo de la investigación como en la industria. Debido a su fácil crecimiento y a procedimientos de transfección transitoria rápidos y de fácil implementación, estas células también son potencialmente adecuadas para su uso en plataformas de tipo HTRGE (high-throughput recombinant gene expression) (Chapple *et al.*, 2006).

PER.C6: esta plataforma celular de expresión de proteínas recombinantes se estableció a partir de retinoblastos embrionarios humanos (PER.C6) transformados con secuencias codificantes de las proteínas E1a y E1b de Ad5 (Gallimore *et al.*, 1986). Esta línea celular se desarrolló inicialmente para la producción segura de vectores adenovirales humanos recombinantes con fines terapéuticos. Tales vectores actualmente se usan como vacunas y en protocolos de terapias génicas. También, esta línea celular fue explotada

para la fabricación de vacunas clásicas, incluidas el virus influenza y virus West Nile y recientemente, las células PER.C6 han sido evaluadas para la producción de proteínas terapéuticas. Estas células crecen fácilmente en cultivo adherente y en suspensión alcanzándose densidades celulares del orden de 10^7 cel/ml en medios libre de suero fetal bovino y de componentes animales. Se ha demostrado que no se requiere amplificación de los genes insertados para obtener altos niveles de expresión y producción de proteínas recombinante, lo que ahorra tiempo en el desarrollo de las líneas celulares estables y proporciona una mayor estabilidad en ausencia de presión de selección (Yallop *et al.*, 2008)

Esta línea celular ha sido documentada y los bancos celulares cumplen con todos los requisitos reglamentarios pertinentes de Estados Unidos y la Comunicad Europea (Yallop *et al.*, 2008). Estas características hacen que las células PER.C6 sean una de las alternativas más avanzadas de líneas celulares humanas a las células CHO para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes. Probablemente, las células PER.C6 se convertirán en una plataforma importante para la fabricación de mAb recombinante. Muchas compañías ya han licenciado PER.C6 para uso a gran escala y para la producción interna de candidatos terapéuticos. Catorce productos basados en PER.C6 están en ensayos clínicos de fases I y II (Durocher & Butler, 2009).

CAP: la empresa biofarmacéutica CEVEC (Colonia, Alemania) ha desarrollado y patentado un nuevo sistema de expresión de proteínas con fines biofarmacéuticos basados en una plataforma celular de amniocitos humanos derivados de células de líquido amniótico obtenidas por amniocentesis. Los amniocitos humanos primarios fueron inmortalizados con los genes adenovirales E1 / PIX y seleccionados de acuerdo con su alta expresión de proteínas. Las líneas celulares CAP contienen la secuencia de nucleótidos 505–4079 del adenovirus tipo 5 que incluye los genes E1 y toda la secuencia PIX. Las células CAP están optimizadas para crecer en una variedad de formatos desde erlenmeyers hasta biorreactores en gran escala y pueden transfectarse de manera muy eficiente con reactivos de transfección disponibles comercialmente. Además, se estableció y certificó un banco maestro de células (MCB) de células CAP que crecen en suspensión de acuerdo con las pautas de ICH (del inglés, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) y la Farmacopea Europea, haciendo que estas células estén disponibles para la producción biofarmacéutica comercial.

La compañía destaca las siguientes ventajas de este sistema de expresión: producción de proteínas con modificaciones postraduccionales humanas; elevada actividad específica, reduciendo así las dosis de proteínas necesarias; ausencia de residuos inmunogénicos de carbohidratos no humanos; sialilación humana para una vida media mejorada; altos rendimientos de producción de proteínas complejas, reduciendo así los costos del procesamiento

downstream; cultivo en suspensión libre de suero y adecuado para la expresión de proteínas transitorias y estables.

Esta plataforma de expresión ya ha atraído el interés de la comunidad científica y el sector privado. CEVEC tiene un acuerdo de licencia mundial coexclusivo con Life Technologies Corporation, en el que ambas compañías cooperarán para ofrecer kits de expresión optimizados basados en las células CAP patentadas por CEVEC.

Finalmente, la glicosilación de proteínas es fundamental para una terapia eficaz mediada por glicoproteínas. El conocimiento sobre las estructuras precisas de carbohidratos presentes en las proteínas recombinantes ha revelado la importancia de las modificaciones postraduccionales para la funcionalidad de las proteínas terapéuticas. Estos bioterapéuticos glicosilados (anticuerpos, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y factores de coagulación) a menudo deben producirse en sistemas de expresión de mamíferos, porque la ubicación, el número y la estructura de los glicanos pueden influir en el rendimiento, la bioactividad, solubilidad, estabilidad frente a proteólisis, inmunogenicidad y tasa de depuración.

6.3.6. Ingeniería de vectores

Uno de los inconvenientes más comunes en la producción de glicoproteínas en células de mamíferos es la alta variabilidad entre diferentes clones. Si bien, inicialmente los niveles de producción de proteínas recombinantes son relativamente altos, la reducción de la expresión se observa con mucha frecuencia durante el cultivo celular prolongado. En consecuencia, mantener un alto nivel de expresión génica es un factor crítico en la expresión de genes heterólogos en células de mamíferos. Lograr clones con buena productividad y durante tiempos prolongados de cultivo es el principal desafío de la bioingeniería de células animales. Por lo tanto, una buena construcción del vector de expresión mediante ingeniería de vectores permitirá generar clones productores con mayor eficiencia.

La gran variabilidad y pérdida de estabilidad en los clones recombinantes es consecuencia del procedimiento de desarrollo de la línea celular. Esto puede ocurrir por la eliminación del transgén del genoma de la célula huésped que en su mayoría se somete a una amplificación del gen o bien por silenciamiento debido a heterocromatinización. El uso frecuente de un agente de selección mutagénico destinado a amplificar copias de transgenes puede conducir a rupturas cromosómicas y a la pérdida de copias transgénicas, que a menudo causa inestabilidad genética y expresión inestable. Por otro lado, en muchos casos la presión de selección debe mantenerse en el medio de cultivo, a pesar de sus desventajas, ya que la eliminación del agente de selección puede dar como resultado una disminución de la productividad de hasta el 80 %.

Cabe señalar que, como los vectores de expresión a menudo se introducen en el genoma de una célula huésped por integración aleatoria, el nivel de expresión transgénica depende del sitio de integración en el cromosoma. Con la debida atención al hecho de que la mayoría de los sitios genómicos son transcripcionalmente represivos o no activos, no es sorprendente que muchos clones sean incapaces de expresar altos niveles del transgén. El efecto represivo puede causar el silenciamiento epigenético de genes adyacentes por la desacetilación de histonas y la metilación del promotor del ADN transfectedo. Para evitar esto frecuentemente se suelen aplicar dos estrategias para preservar el ADN de la represión dependiente de la integración o los efectos de posición negativos. Una estrategia se basa en la incorporación de elementos de apertura de ADN encontrados en las regiones de borde de cromatina de un vector de expresión para proteger el gen de las influencias de cromatina circundantes. Otro método se basa en la integración o recombinación específica del sitio para conducir el transgén a un locus previamente especificado que es transcripcionalmente activo.

6.3.7. Elementos de apertura del ADN

Hay varios elementos de ADN comúnmente utilizados para superar el silenciamiento, conocidos como *insulators* o aisladores, regiones de control de locus (LCR, del inglés *Locus Control Region*), regiones nucleares de unión de matriz (S/MAR, del inglés *Scaffolds Matrix Attachment Regions*), elementos estabilizadores antirrepresores (STAR, del inglés *Stabilizing anti-repressor elements*), elementos de apertura de región de cromatina ubicua (UCOE, del inglés *Ubiquitous Chromatin-opening Elements*) y los elementos centrales o islas CpG (IE, del inglés *Island Elements*). Flanquear un transgén con estos elementos puede disminuir la variabilidad de la expresión clonal y conducir a una identificación más fácil de clones productores aceptables.

6.3.7.1. MAR y S/MAR

Entre los diferentes elementos abridores de la cromatina, los S/MAR son uno de los más utilizados. Se postula que estos elementos facilitan la unión de bucles de cromatina al armazón o matriz nuclear. Los S/MAR varían desde 300 pares de bases hasta varios pares de kilobases y alrededor del 70 % de su secuencia se compone de AT. Estos elementos pueden contener posibles orígenes de replicación (ORI), secuencias de estructura de triple hélice o H-DNA, puntos calientes de inserción de elementos retrovirales o *hot-spots*, etc.

Una estrategia simple para aumentar la expresión de proteína recombinante, es aprovechar la actividad de los elementos aislantes o separadores (*insulators*) e incorporarlos en cis a un vector de expresión en el sentido

ascendente del promotor/potenciador (Secuencia *Enhancer*) o en el sentido descendente de la poliadenilación (poliA) o ambos. Algunos estudios han demostrado la relación de la expresión de proteínas con la orientación y el número de copias de *insulators* o *s/MAR*. También hay un beneficio adicional del uso de *s/MAR* en ambos extremos de un gen reporter. Además, la adición del elemento *MAR* en un plásmido distinto (trans), junto con el vector de expresión, también puede aumentar la expresión génica recombinante hasta 10 veces más que el grupo de control. Por ejemplo, el uso de construcciones con dos copias de *s/MAR* en cis puede aumentar excepcionalmente el número de clones de alta expresión. Sin embargo, el uso de tres copias de *s/MAR* en cis no exhibió clones de mayor expresión o mejor estabilidad en comparación con el uso de dos copias. Entre los diferentes elementos *MAR*, la lisozima *MAR* (*CMAR*) del pollo y el interferón β -*MAR* humano (*IMAR*) revelaron un impacto más efectivo para aumentar la expresión del gen de interés en células transfectadas estables (Lai *et al.*, 2013). An average of 15 novel recombinant protein therapeutics have been approved by US Food and Drug Administration (FDA).

6.3.7.2. UCOE

Un elemento cromosómico de uso frecuente con islas CpG sin metilación son las regiones *UCOE*s. Estas normalmente se ubican cerca del sitio de inicio de la transcripción de genes que se expresan en forma ubicua. Los *UCOE*s proporcionan un alto nivel de expresión de los transgenes en células CHO y BHK-21 y mantienen la estabilidad de expresión durante más de 100 generaciones. Se evaluó el efecto estabilizante de estas regiones y la productividad de la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de amplificación MTX dentro de la línea celular CHO DG44. Se observó que las líneas celulares que contienen *UCOE* tienen características de crecimiento superiores, una mayor actividad transcripcional por copia de genes y una menor variación de clones en comparación con líneas celulares sin las secuencias *UCOE* (Betts *et al.*, 2015). Lo cual lo hace un elemento muy atractivo para su utilización en la expresión de transgenes. Una de sus desventajas lo representa el tamaño de estas secuencias ya que cuanto mayor es, más complejo resulta transfectar el plásmido o secuencia de interés. Sin embargo, con el tiempo se ha logrado reducir el tamaño de estas secuencias significativamente permitiendo de esta manera construir vectores más pequeños (Harraghy *et al.*, 2015).

6.3.7.3. Sistema DHFR -/+

Desde su descubrimiento en 1980, las células CHO deficientes en la enzima DHFR, (dihidrofolato reductasa) y por lo tanto incapaces de crecer en

medios carentes de purina y nucleótidos de timidina, se han usado para expresar y seleccionar una amplia gama de proteínas terapéuticas y anticuerpos. Las células CHO deficientes en DHFR han sido durante años las más comunes y exitosas para producir glicoproteínas terapéuticas en la industria biofarmacéutica. Para mejorar aún más la restricción de la selección, se agrega un fármaco, metotrexato (MTX), que inhibe la enzima DHFR, a concentraciones crecientes con el fin de abolir cualquier actividad de DHFR nativa restante y seleccionar solo transfectantes que hayan «amplificado» el gen en número de copias y por lo tanto la expresión de DHFR. Si bien se trata de un sistema muy eficiente, este sistema de selección tiene una serie de inconvenientes que los científicos han intentado superar en los últimos años. La selección de DHFR requiere un largo tiempo de desarrollo, ya que el proceso iterativo de aumento de las concentraciones de MTX y subclonación requiere hasta seis meses para generar una línea celular que exprese el transgén en un nivel deseable, lo que limita la capacidad de evaluar rápidamente y traer al mercado un nuevo candidato a fármaco. La estabilidad del gen amplificado también puede ser un problema, ya que se sabe que los genes amplificados no siempre son estables y pueden perderse con los sucesivos pasajes o generaciones. De la misma manera que con la selección de antibióticos, la presión selectiva durante la amplificación génica no depende de la expresión del transgén, sino de la DHFR y, por lo tanto, puede tener pérdidas, lo que permite que las células sobrevivan y pierdan o silencien el gen de interés, pero continúen expresando DHFR. Otro problema potencial con el sistema de selección DHFR es que puede crear mutaciones inesperadas en la célula anfitriona; por lo tanto, los aumentos en la expresión pueden deberse a mecanismos completamente desconocidos (Priola *et al.*, 2016). Asimismo, se ha informado que diferentes células CHO deficientes en DHFR (CHO-DG44 y CHO-DuxB11) muestran un crecimiento pobre en cultivos fed-batch incluso en medio suplementado con HT. Esto puede estar asociado con una consecuencia directa de la deficiencia de DHFR (Florin *et al.*, 2011).

6.3.8. Recombinación sitio específica

Si bien las estrategias tradicionales de transfección estable típicamente implican la integración aleatoria del transgén en los cromosomas, la recombinación específica de sitio ofrece una estrategia alternativa para desarrollar clones estables y de alta producción de una manera reproducible y predecible. Esto es posible mediante el uso de recombinasas que mejoran en gran medida la eficacia de recombinación en líneas celulares de mamíferos, en contraste con la baja eficacia de la recombinación homóloga tradicional. Este método, comúnmente llamado recombinación específica de sitio, requiere la generación inicial de una línea celular huésped marcada, antes de la introducción del gen de interés y

la recombinasa para la integración dirigida en el sitio genómico marcado de la línea celular huésped. Para generar la línea celular huésped marcada, un casete indicador flanqueado por secuencias diana cortas de ADN que actúan en cis reconocidas por recombinasas específicas se integran aleatoriamente en diferentes locus en el genoma mediante transfección estable. Con posterioridad, los clones de células transfectadas se analizan para detectar una alta expresión del gen indicador y, preferiblemente, una integración de copia única. Efectivamente, esto seleccionará clones que tengan el gen reportero integrado en regiones genómicas que promuevan una alta tasa de transcripción del gen reportero. La posibilidad de que el gen reportero se integre en estas regiones genómicas (también conocidos como puntos calientes genómicos o *hot-spots*) es baja ya que solo el 0,1 % del ADN genómico contiene secuencias transcripcionalmente activas. No obstante, una vez identificadas las líneas celulares que son muy buenas productoras del gen reportero, un vector que contiene el gen de interés y las mismas secuencias diana de ADN o correspondientes, y un vector de expresión separado para la recombinasa, se cotransfectan en la célula. Esto conduce a una recombinación de cadenas de ADN entre las secuencias reporteras integradas y la del gen de interés, mejorando así las probabilidades de que el gen de interés se integre en un punto caliente genómico en la línea celular. Uno de los sistemas más utilizados con este fin es el Flip-In™ System de Thermo Fisher Scientific.

Mediante esta tecnología es posible contar con diferentes clones potencialmente productores de glicoproteínas recombinantes. Una vez caracterizados en forma genética y bioquímica será más sencillo establecer una plataforma de clones productores (Priola *et al.*, 2016).

Referencias bibliográficas

- BECK, A., REICHERT, J. M. (2012). Marketing approval of mogamulizumab: A triumph for glyco-engineering. *MABs*, 10.4161/mabs.20996
- BECKER, J., HACKL, M., RUPP, O., JAKOBI, T., SCHNEIDER, J., SZCZEPANOWSKI, R., BEKEL, T., BORTH, N., GOESMANN, A., GRILLARI, J., KALTSCHMIDT, C., NOLL, T., PÜHLER, A., TAUCH, A., BRINKROLF, K. (2011). Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J. Biotechnol.*, 156, 227–235. 10.1016/j.jbiotec.2011.09.014
- BETTS, Z., CROXFORD, A. S., DICKSON, A. J. (2015). Evaluating the interaction between UCOE and DHFR-linked amplification and stability of recombinant protein expression. *Biotechnol. Prog.*, 31, 1014–1025. 10.1002/btpr.2083
- BLESSING, D., VACHEY, G., PYTHOUD, C., REY, M., PADRUN, V., WURM, F. M., SCHNEIDER, B. L., DÉGLON, N. (2019). Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.*, 13, 14–26. 10.1016/j.omtm.2018.11.004
- BOOTHE, J., NYKIFORUK, C., SHEN, Y., ZAPLACHINSKI, S., SZARKA, S., KUHLMAN, P., MURRAY, E., MORCK, D., MOLONEY, M. M. (2010). Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnol. J.*, 8, 588–606. 10.1111/j.1467-7652.2010.00511.x
- BUTLER, M., SPEARMAN, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 30, 107–112. 10.1016/j.copbio.2014.06.010
- CASTILHO, A., GATTINGER, P., GRASS, J., JEZ, J., PABST, M., ALTMANN, F., GORFER, M., STRASSER, R., STEINKELLNER, H. (2011). N-Glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. *Glycobiology*, 21, 813–823. 10.1093/glycob/cwr009
- CHAPPLE, S. D. J., CROFTS, A. M., SHADBOLT, S. P., MCCAFFERTY, J., DYSON, M. R. (2006). Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol.*, 6, 1–15. 10.1186/1472-6750-6-49
- DUMONT, J., EUWART, D., MEI, B., ESTES, S., KSHIRSAGAR, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36, 1549–7801. 10.3109/07388551.2015.1084266
- DUROCHER, Y., BUTLER, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20, 700–707. 10.1016/j.copbio.2009.10.008
- FERNÁNDEZ NÚÑEZ, E. G., LEME, J., DE ALMEIDA PARIZOTTO, L., DE REZENDE, A. G., DA COSTA, B. L. V., BOLDORINI, V. L. L., JORGE, S. A. C., ASTRAY, R. M., PEREIRA, C. A., CARICATI, C. P., TONSO, A. (2016). Approach toward an efficient inoculum preparation stage for suspension BHK-21 cell culture. *Cytotechnology*, 68, 95–104. 10.1007/s10616-014-9756-6
- FISCHER, S., HANDRICK, R., OTTE, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 33, 1878–1896. 10.1016/j.biotechadv.2015.10.015

- FLORIN, L., LIPSKE, C., BECKER, E., KAUFMANN, H.** (2011). Supplementation of serum free media with HT is not sufficient to restore growth properties of DHFR^{-/-} cells in fed-batch processes – Implications for designing novel CHO-based expression platforms. *J. Biotechnol.*, 152, 189–193. 10.1016/j.jbiotec.2011.02.002
- FUKUDA, M., LOPEZ, L.** (1989). Survival of Recombinant *The. The Lancet*, 73, 84–89.
- GALLIMORE, P. H., GRAND, R. J., BYRD, P. J.** (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res.*, 6, 499–508.
- GHADERI, D., ZHANG, M., HURTADO-ZIOLA, N., VARKI, A.** (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 28, 147–175. 10.5661/bger-28-147
- GOMORD, V., FITCHETTE, A. C., MENU-BOUAOUICHE, L., SAINT-JORE-DUPAS, C., PLASSON, C., MICHAUD, D., FAYE, L.** (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol. J.*, 8, 564–587. 10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x
- GORMAN, C. M., GIES, D., MCCRAY, G., HUANG, M.** (1989). The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be trans-activated by adenovirus early proteins. *Virology*, 171, 377–385. 10.1016/0042-6822(89)90605-3
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRN, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36, 59–72. 10.1099/0022-1317-36-1-59
- HAMILTON, S. R., GERNGROSS, T. U.** (2007). Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 387–392. 10.1016/j.copbio.2007.09.001
- HARRAGHY, N., CALABRESE, D., FISCH, I., GIROD, P.-A., LEFOURN, V., REGAMEY, A., MERMOD, N.** (2015). Epigenetic regulatory elements: Recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells. *Biotechnol. J.* 10, 967–978. 10.1002/biot.201400649
- HEALTH, A., INNOVATION, T.** (2018). *Advancing Health 2017 New Drug*.
- ISHAQUE, A., THRIFT, J., MURPHY, J. E., KONSTANTINOV, K.** (2007). Over-expression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion. *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 144–155. 10.1002/bit.21201
- JAKOBI, T., BRINKROLF, K., TAUCH, A., NOLL, T., STOYE, J., PÜHLER, A., GOESMANN, A.** (2014). Discovery of transcription start sites in the Chinese hamster genome by next-generation RNA sequencing. *J. Biotechnol.*, 190, 64–75. 10.1016/j.jbiotec.2014.07.437
- JUNGBLUT, P., THIEDE, B., ZIMMY-ARNDT, U., MULLER, E. C., SCHELER, C., WITTMANN-LIEBOLD, B., OTTO, A.** (1996). Resolution power of 2-DE and identification of proteins from gels. *Electrophoresis*, 17, 839–847.

- KIM, Y. K., KIM, K. R., KANG, D. G., JANG, S. Y., KIM, Y. H., CHA, H. J.** (2011). Expression of β -1,4-galactosyltransferase and suppression of β -N-acetylglucosaminidase to aid synthesis of complex N-glycans in insect *Drosophila* S2 cells. *J. Biotechnol.*, 153, 145–152. 10.1016/J.JBIOTEC.2011.03.021
- KRÄMER, O., KLAUSING, S., NOLL, T.** (2010). Methods in mammalian cell line engineering: From random mutagenesis to sequence-specific approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88, 425–436. 10.1007/s00253-010-2798-6
- LAI, T., YANG, Y., NG, S. K.** (2013). Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* (Basel), 6, 579–603. 10.3390/ph6050579
- LALONDE, M. E., DUROCHER, Y.** (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J. Biotechnol.*, 251, 128–140. 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028
- LEWIS, N. E., LIU, X., LI, Y., NAGARAJAN, H., YERGANIAN, G., O'BRIEN, E., BORDBAR, A., ROTH, A. M., ROSENBLUM, J., BIAN, C., XIE, M., CHEN, W., LI, N., BAYCIN-HIZAL, D., LATIF, H., FORSTER, J., BETENBAUGH, M. J., FAMILI, I., XU, X., WANG, J., PALSSON, B. O.** (2013). Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat. Biotechnol.*, 31, 759–765. 10.1038/nbt.2624
- LINDSKOG, E. K., FISCHER, S., WENGER, T., SCHULZ, P.** (2018). *Host Cells, Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier Ltd. 10.1016/B978-0-08-100623-8.00006-2
- MEEHL, M. A., STADHEIM, T. A.** (2014). Biopharmaceutical discovery and production in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 30, 120–127. 10.1016/j.copbio.2014.06.007
- MONTERO-MORALES, L., STEINKELLNER, H.** (2018). Advanced plant-based glycan engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, 1–8. 10.3389/fbioe.2018.00081
- PANDHAL, J., WRIGHT, P. C.** (2010). N-Linked glycoengineering for human therapeutic proteins in bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 32, 1189–1198. 10.1007/s10529-010-0289-6
- PRIOLA, J. J., CALZADILLA, N., BAUMANN, M., BORTH, N., TATE, C. G., BETENBAUGH, M. J.** (2016). High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production. *Biotechnol. J.*, 11, 853–865. 10.1002/biot.201500579
- PUCK, T. T., CIECIURA, S. J., ROBINSON, A.** (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.*, 108, 945–956. 10.1084/jem.108.6.945
- RADEMACHER, T., PAREKH, R., DWEK, R.** (1988). GL YCOBIOLOGY Rademacher, R. Parekh, and R. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 785–838.
- 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. 10.1016/j.biologicals.2016.09.015

- ROSENLÖCHER, J., SANDIG, G., KANNICHT, C., BLANCHARD, V., REINKE, S. O., HINDERLICH, S.** (2016). Recombinant glycoproteins: The impact of cell lines and culture conditions on the generation of protein species. *J. Proteomics*, 134, 85–92. 10.1016/j.jprot.2015.08.011
- SCHMIDT, F. R.** (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 363–372. 10.1007/s00253-004-1656-9
- SCHNEIDER, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 27, 353–365. vi - 27.
- SCHWARZ, F., HUANG, W., LI, C., SCHULZ, B. L., LIZAK, C., PALUMBO, A., NUMAO, S., NERI, D., AEBI, M., WANG, L. X.** (2010). A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat. Chem. Biol.*, 6, 264–266. 10.1038/nchembio.314
- SETHURAMAN, N., STADHEIM, T. A.** (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 341–346. 10.1016/j.copbio.2006.06.010
- SHI, X., JARVIS, D.** (2007). Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell System. *Curr. Drug Targets*, 8, 1116–1125. 10.2174/138945007782151360
- STOKER, M., MACPHERSON, I.** (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line ВНК21 and its Derivatives. *Nature*, 203, 1355–1357. <https://doi.org/10.1038/2031355a0>
- STRASSER, R.** (2016). Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 26, 926–939. 10.1093/glycob/cww023
- SWIECH, K.** (2018). *Recombinant Glycoprotein Production*. 10.1007/978-1-4939-7312-5
- THOMPSON, L. H., BAKER, R. M.** (1973). Isolation of Mutants of Cultured Mammalian Cells. *Methods Cell. Biol.*, 6, 209–281. 10.1016/S0091-679X(08)60052-7
- URLAUB, G., KÄS, E., CAROTHERS, A. M., CHASIN, L.A.** (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*, 33, 405–412. 10.1016/0092-8674(83)90422-1
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J., MCCAWLEY, P.** (1977). The establishment of two cell lines from the insect *spodoptera frugiperda* (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro*, 13, 213–217. 10.1007/BF02615077
- VILCINSKAS, A., KOLLEWE, C.** (2013). Production of Recombinant Proteins in Insect Cells. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 9, 255–271. 10.3844/ajbbsp.2013.255.271
- WIRTH, M., BODE, J., ZETTLMEISSL, G., HAUSER, H.** (1988). Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene*, 73, 419–426. 10.1016/0378-1119(88)90506-9
- WURM, F. M.** (2013). CHO quasispecies—Implications for manufacturing processes. *Processes*, 1, 296–311. 10.3390/pr1030296
- WURM, F. M., HACKER, D.** (2011). First CHO genome. *Nat. Biotechnol.*, 29, 718–720. 10.1038/nbt.1943

- XU, X., NAGARAJAN, H., LEWIS, N. E., PAN, S., CAI, Z., LIU, X., CHEN, W., XIE, M., WANG, W., HAMMOND, S., ANDERSEN, M. R., NEFF, N., PASSARELLI, B., KOH, W., FAN, H. C., WANG, JIANBIN, GUI, Y., LEE, K. H., BETENBAUGH, M. J., QUAKE, S. R., FAMILI, I., PALSSON, B. O., WANG, J. (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat. Biotechnol.*, 29, 735–741. 10.1038/nbt.1932
- YALLOP, C., CROWLEY, J., COTE, J., HEGMANS-BROUWER, K., LAGERWERF, F., GAGNE, R., MARTIN, J. C., OOSTERHUIS, N., OPSTELTEN, D. J., BOUT, A. (2008). PER. C6® Cells for the Manufacture of Biopharmaceutical Proteins. *Mod. Biopharm. Des. Dev. Optim.*, 3, 779–807. 10.1002/9783527620982.ch33
- YUSUFI, F. N. K., LAKSHMANAN, M., HO, Y. S., LOO, B. L. W., ARIYARATNE, P., YANG, Y., NG, S. K., TAN, T. R. M., YEO, H. C., LIM, H. L., NG, S. W., HIU, A. P., CHOW, C. P., WAN, C., CHEN, S., TEO, G., SONG, G., CHIN, J. X., RUAN, X., SUNG, K. W. K., HU, W. S., YAP, M. G. S., BARDOR, M., NAGARAJAN, N., LEE, D. Y. (2017). Mammalian Systems Biotechnology Reveals Global Cellular Adaptations in a Recombinant CHO Cell Line. *Cell. Syst.*, 4, 530–542.e6. 10.1016/j.cels.2017.04.009.
- ZHANG, H., WANG, H., LIU, M., ZHANG, T., ZHANG, J., WANG, X., XIANG, W. (2013). Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 65, 363–378. 10.1007/s10616-012-9488-4.

7

Producción a gran escala de glicoproteínas terapéuticas: *Upstream processing*

DIEGO FONTANA Y RICARDO KRATJE

7.1. INTRODUCCIÓN

Un biofármaco es —en general— una proteína, empleada con fines terapéuticos o de diagnóstico *in vivo*, y producido por células modificadas genéticamente (células recombinantes); es decir, un biofármaco no se obtiene tan solo mediante su extracción directa a partir de una fuente biológica nativa.

Los primeros productos —aprobados a comienzos de la década de 1980— se obtuvieron a partir de microorganismos recombinantes, principalmente *Escherichia coli* (*E. coli*), tales como la insulina y la hormona de crecimiento humanas. La primera glicoproteína recombinante aprobada para terapia humana fue el activador tisular del plasminógeno (Activase®; Genentech Inc.¹, San Francisco, California, Estados Unidos.; actualmente perteneciente a Roche; Basilea, Suiza), obtenido a partir de células del ovario de un hámster chino adulto (CHO, según su sigla en inglés derivada de *chinese hamster ovary*) en 1986. Desde comienzos de 2000 se hizo evidente el aumento constante en la aprobación de biofármacos producidos en sistemas de expresión basados en células de mamífero (cultivos celulares). Esta tendencia coincide con el aumento continuo de la proporción de moléculas que presentan modificaciones postraduccionales, en particular la glicosilación. Actualmente, hay más de 300 productos innovadores aprobados en todo el mundo para uso terapéutico humano, y aproximadamente 2400 productos innovadores y 188 biosimilares en diferentes etapas de desarrollo (Walsh, 2018).

Los productos biofarmacéuticos se han convertido rápidamente en la principal fuente de ingresos de muchas compañías farmacéuticas con ventas anuales de alrededor de 188 000 millones de dólares estadounidenses (USD), monto que equivale al mercado mundial de petróleo (Christel, 2017). Cabe destacar que el segmento de productos que experimentó la mayor tasa de crecimiento de ingresos anuales es el de los anticuerpos (que incluyen anticuerpos monoclonales desnudos, proteínas de fusión con fragmentos Fc de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, conjugados de anticuerpos y otros productos relacionados a anticuerpos). Así, el 30 % de los ingresos totales por la comercialización de biofármacos —USD 50 000 millones— corresponde a los seis productos de mayor venta, que son todos anticuerpos recombinantes producidos en cultivos celulares, tales como Humira® (AbbVie Inc.; North Chicago, Illinois, USA), Remicade® (Johnson

& Johnson; New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos), Enbrel® (Amgen; Thousand Oaks, California, Estados Unidos, y licenciado también a Pfizer Inc.; New York, New York, Estados Unidos), Rituxan®, Avastin® y Herceptin® (Roche).

La producción de glicoproteínas recombinantes terapéuticas fue de alrededor de 13 toneladas de ingrediente farmacéutico activo (IFA) en 2014, estimándose que este valor se duplicó para cubrir la demanda comercial en 2018 (Seymour & Ecker, 2017). Estos mismos autores informan que la capacidad mundial instalada en la actualidad —alrededor de 4,6 millones de litros de cultivos celulares en biorreactores— es suficiente para satisfacer la demanda anual. Además, consignan que la misma está concentrada en diez empresas, que en conjunto reúnen el 67 % de la capacidad mundial de cultivo de células animales, siendo líder la empresa Roche con 673 000 litros (con biorreactores de hasta 15 000 l). A su vez, la empresa Amgen —que se ubica en el ranking N° 6 con un volumen total de 204 000 litros, posee los biorreactores de mayor volumen de capacidad (20 000 l).

La productividad de las líneas celulares recombinantes ha aumentado en forma rotunda en las últimas tres décadas. En 1986, la máxima concentración celular alcanzada en un cultivo *batch* de 7 días en un biorreactor tipo tanque agitado era 2×10^6 cél/ml y la productividad cercana a 10 pg/cél/día, siendo el título de la glicoproteína recombinante alrededor de 50 mg/l (Wurm, 2004). En la actualidad, en cambio, se pueden alcanzar concentraciones celulares superiores a 1×10^7 cél/ml, con productividades específicas cercanas a 70 µg/cél/día y títulos en el rango de 3–13 g/l en dos semanas de cultivo (Goldstein *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2010). Este incremento del título de 60–250 veces se debió a diferentes motivos, entre los cuales se destacan: los aumentos sustantivos en los niveles de expresión de las células recombinantes logrados mediante técnicas de biología molecular, la optimización de los medios de cultivo, la mejora continua de los sistemas de cultivo en biorreactores y de su modo de operación. La combinación de estos logros permitió tanto la extensión del tiempo de cultivo como la mejora en la viabilidad y productividad celular.

7.2. CONSIDERACIONES GENERALES DE LOS CULTIVOS CELULARES EN BIORREACTORES

En el cultivo celular se debe tener en cuenta las principales propiedades biológicas de la célula animal, cuya forma y función, han sido «diseñadas» durante millones de años de evolución. Las células animales poseen una frágil membrana, un alto grado de diferenciación, un entorno natural que les permite alcanzar una elevada densidad celular (hasta 5×10^8 células por centímetro cúbico de tejido), un complejo sistema circulatorio para el aporte de nutrientes y para la remoción de productos del metabolismo. Requieren un efectivo control de las condiciones físicas del entorno (temperatura, pH,

etc.) y sistemas para la regulación externa mediante hormonas y factores de crecimiento. En consecuencia, un sofisticado sistema de cultivo *in vitro* deberá satisfacer los siguientes requerimientos (Leist *et al.*, 1990), a saber: i) Selección de una estrategia adecuada para el sistema de cultivo; ii) Diseño de un sistema de mezclado de las células; iii) Operación aséptica; iv) Identificación y cuantificación de los parámetros físicos (temperatura, viscosidad, fuerza de rozamiento) y químicos (pH, potencial redox, concentración de oxígeno disuelto y de productos metabólicos intermediarios y finales) del cultivo, y v) Profundo conocimiento del crecimiento celular y su regulación.

7.2.1. Tipo de crecimiento celular

El diseño de bioreactores para el cultivo de células animales depende fundamentalmente del tipo de crecimiento celular. Debe satisfacer los requerimientos de las dos formas principales de crecimiento, a saber: células que crecen en suspensión (cultivo en suspensión) o células cuyo crecimiento está supeditado a la adhesión previa a una superficie determinada (cultivo dependiente de superficie).

En el cultivo de células en suspensión, las células crecen libremente suspendidas en un medio líquido que carece de otros sólidos. Solo las células derivadas del sistema circulatorio (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) cumplen espontáneamente este comportamiento cuando se cultivan *in vitro*. No obstante, muchas de las líneas celulares adherentes de interés industrial, tales como células CHO, células derivadas de riñón de hámster bebé (BHK, según su sigla en inglés derivada de *baby hamster kidney*) y células derivadas de riñón de embrión humano (HEK, según su sigla en inglés derivada de *human embryonic kidney*) pueden ser adaptadas al crecimiento en suspensión (Beccaria *et al.*, 2000; Sinacore *et al.*, 2000).

Las células adherentes, en cambio, son células cuyo crecimiento está supeditado a la adhesión previa a una superficie determinada (cultivo dependiente de superficie o sustrato). La mayoría de las células animales son de este tipo, ya que en los tejidos del organismo ocurre la adherencia de las células a la matriz extracelular o a otras células vecinas, mediante un complejo entramado de moléculas —sobre todo proteínas y carbohidratos— que se disponen en el espacio intercelular. Estas proteínas, que son sintetizadas y secretadas por las propias células, comprenden a las integrinas, cadherinas y selectinas, entre otras. Su misión no implica únicamente consecuencias mecánicas para las células (como sujeción o resistencia a fuerzas de compresión o de estiramientos), sino que también actúan como mecano-transductores. Cuando se unen a sus «ligandos» extracelulares, los dominios citosólicos de las proteínas de adhesión pueden desencadenar procesos internos que afectan a la fisiología celular. Así, pueden interactuar con ciertas vías de señalización interna, afectar a la movilidad celular, provocar cambios en la expresión de

genes, alterar el ciclo celular, incluso pueden determinar la supervivencia de la propia célula (Pugacheva *et al.*, 2006; Ladoux & Mège, 2017). Por ello que es tan relevante el tipo de sustrato que se brinda a las células en los cultivos, en cuanto a la naturaleza química del material que está en contacto directo con las células, y —en algunos casos— este material debe estar recubierto con componentes de la matriz extracelular como, por ejemplo, el colágeno, para lograr una correcta adhesión. Para cada línea celular debe evaluarse el material que sea adecuado.

Ahora bien, de estos dos métodos de cultivo, únicamente el cultivo de células en suspensión brinda cultivos homogéneos. Sus principales ventajas son, por un lado, que la accesibilidad analítica durante todo el proceso es simple (posibilitando así el continuo monitoreo y control del entorno fisicoquímico en el cual las células se encuentran suspendidas) y, por otro lado, la fácil y directa obtención de muestras de la suspensión celular permite su adecuado seguimiento durante el cultivo y simplifica enormemente su escalado (Leist *et al.*, 1990). Es por ello que tanto el sector industrial como las autoridades sanitarias priorizan siempre el uso de cultivos en suspensión, siendo en la actualidad el método más comúnmente empleado para la producción de biofármacos.

7.2.2. Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las células en cultivo se utilizan diferentes medios de acuerdo con los requerimientos nutricionales de las mismas. El diseño de un medio de cultivo específico para el clon recombinante productor de la glicoproteína de interés, que maximice su crecimiento, optimice sus flujos metabólicos, aumente la productividad específica de la proteína y permita obtener una molécula con las modificaciones co- y postraduccionales adecuadas, es un imperativo durante la optimización del proceso productivo (Didier *et al.*, 2007; Didier *et al.*, 2009). La composición del medio así como las condiciones de cultivo (temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, etc.) empleadas en la preparación del inóculo (medio de crecimiento) pueden diferir de las utilizadas en la etapa final de elaboración del biofármaco (medio de producción).

Los componentes de las distintas formulaciones de los medios de cultivo incluyen una mezcla compleja de carbohidratos, aminoácidos, sales, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento (Altamirano *et al.*, 2015). La concentración salina del medio es isotónica (alrededor de 300 mOsm) y a menudo contiene bicarbonato, que actúa como sistema *buffer* en conjunto con el entorno de dióxido de carbono (5–10 %) en el cual se cultivan las células.

En general, el principal carbohidrato es glucosa, pero las células también pueden metabolizar Gal, Man y Fru. Sin embargo, el metabolismo de estas tres últimas fuentes de carbono/energía rinden más lentamente los precursores

necesarios para la vía de las pentosas fosfato; y es por ello que se dificulta el mantenimiento de un crecimiento exponencial de un cultivo suplementado exclusivamente con estas fuentes de energía.

Por otro lado, es conocido desde hace muchos años que la glutamina (y no la glucosa) es la mayor fuente de energía para las líneas celulares establecidas empleadas para la producción de biofármacos. Esto se debe al desacople resultante de la falta de actividad de las enzimas que conectan la glicólisis y el ciclo de Krebs (piruvato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa). Así, el piruvato y la forma reducida de la nicotina–adenina–dinucleótico (NADH) producidos durante la glicólisis se acumulan en altas concentraciones en el citoplasma, generándose —por acción de la enzima lactato deshidrogenasa— ácido láctico y la forma oxidada de la nicotina–adenina–dinucleótico (NAD⁺). No obstante, para un crecimiento eficiente se requiere que el ciclo de Krebs esté activo, ya que es la única vía que aporta suficientes equivalentes reducidos y moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Esto se logra al catabolizarse la glutamina en la matriz mitocondrial en una reacción catalizada por la glutaminasa, con la remoción inicial del grupo amido para dar amonio y glutamato. Este nuevo aminoácido formado puede ser sustrato de tres enzimas: la glutámico–deshidrogenasa, la alanina–aminotransferasa y la aspartato–aminotransferasa. En los tres casos se produce α -cetoglutarato, que es un intermediario del ciclo de Krebs y que se oxida completamente formando CO₂ y H₂O con la consecuente generación de energía. Cuando el glutamato es sustrato de la enzima glutámico–deshidrogenasa, se libera amonio directamente al medio de cultivo; cuando es sustrato de las transaminasas, el grupo amino se transfiere al piruvato (rindiendo alanina) o al oxalacetato (rindiendo aspartato).

En resumen, como consecuencia del desacople entre la glucólisis y el ciclo de Krebs se acumulan ácido láctico (con efectos deletéreos de acidificación y aumento de la osmolalidad del medio) y amonio (que produce glicosilaciones aberrantes con disminución del contenido de ácido siálico de todas las glicoproteínas producidas y, además, altera el crecimiento celular). El efecto deletéreo del amonio en la glicosilación ocurre a menores concentraciones que las necesarias para afectar el crecimiento celular. Es por ello que, en general, un punto crítico definido en el control del cultivo es el nivel de amonio, de manera de asegurarse que no afecte la glicosilación del biofármaco de interés.

Muchos cultivos deben ser suplementados con una concentración de suero para mantener el crecimiento celular. Uno de los suplementos más efectivos es el suero fetal bovino (SFB) debido a su elevado contenido en factores de crecimiento. Sin embargo, la inclusión de suero tiene muchas desventajas: elevado costo, posible fuente de contaminación, composición variable por ser una mezcla químicamente indefinida y dificultad en la purificación del producto por el agregado de proteínas, principalmente albúmina. Por estas razones, el uso de medios libres de suero y de otros componentes animales se ha convertido, desde hace varios años, en un procedimiento estándar

para el cultivo de la mayoría de las líneas celulares animales empleadas para la producción de biofármacos (Jäger *et al.*, 1991). En algunos casos, los medios de cultivo se suplementan con extractos vegetales para favorecer el crecimiento celular (Kim & Lee, 2009), pero ello genera el inconveniente de la variabilidad asociada a medios químicamente indefinidos. En el caso de emplear proteínas puras como aditivos en la formulación de medios, tales como factores de crecimiento, transferrina e insulina recombinantes, junto con otros componentes inorgánicos y orgánicos, el medio de cultivo se clasifica como químicamente definido. Si además, el medio carece de proteínas agregadas, entonces se lo define como medio libre de proteínas. Estos últimos medios poseen una composición y calidad que son conocidas y constantes. Ello permite una elevada reproducibilidad de los procesos, facilita el *down-stream processing*, y en algunos casos, reduce los costos de producción (Schröder *et al.*, 2004). Sin embargo, la adaptación de las líneas celulares a medios químicamente definidos no es siempre exitosa, y su uso puede afectar entonces en forma negativa el rendimiento global del proceso.

7.2.3. Modos de operación de los biorreactores

Se pueden aplicar dos modos diferentes de operación, y la máxima densidad celular que se alcanza —para un mismo clon en igual medio y en un dado biorreactor— dependerá de esa selección (Figura 7.1): modos discontinuos (lote o *batch*, lote repetido y lote alimentado o *fed-batch*) y modos continuos (sin retención celular o quimiostato, o con retención celular, también conocido como perfusión) (Ceaglio *et al.*; 2015).

Tyo y Spier (1987) acuñaron el término de «cultivos densos» para referirse específicamente a los cultivos en perfusión, en los cuales la densidad celular alcanzada puede ser próxima al de células totalmente empaquetadas, como las presentes en un tejido.

A. Para cultivos *batch*: $2-4 \times 10^6$ cél/ml, cultivos *fed-batch*: $6-8 \times 10^6$ cél/ml, cultivos en suspensión con retención celular (perfusión): $20-50 \times 10^6$ cél/ml, cultivo de células entrampadas y confinadas: $200-400 \times 10^6$ cél/ml. B. Esquemas descriptivos de los modos de operación de los biorreactores. C. Curva típica de crecimiento y viabilidad celular para un cultivo *batch* y *fed-batch*.

7.2.4. Modo discontinuo: cultivo por lote o *batch*

El cultivo *batch* es un modo de operación discontinuo (Figura 7.1 B, superior izquierda), y el crecimiento celular ocurre sin ningún suplemento adicional de nutrientes después de la inoculación de las células, salvo el agregado de oxígeno (para evitar su limitación) y la concomitante remoción de CO_2 . Por ello,

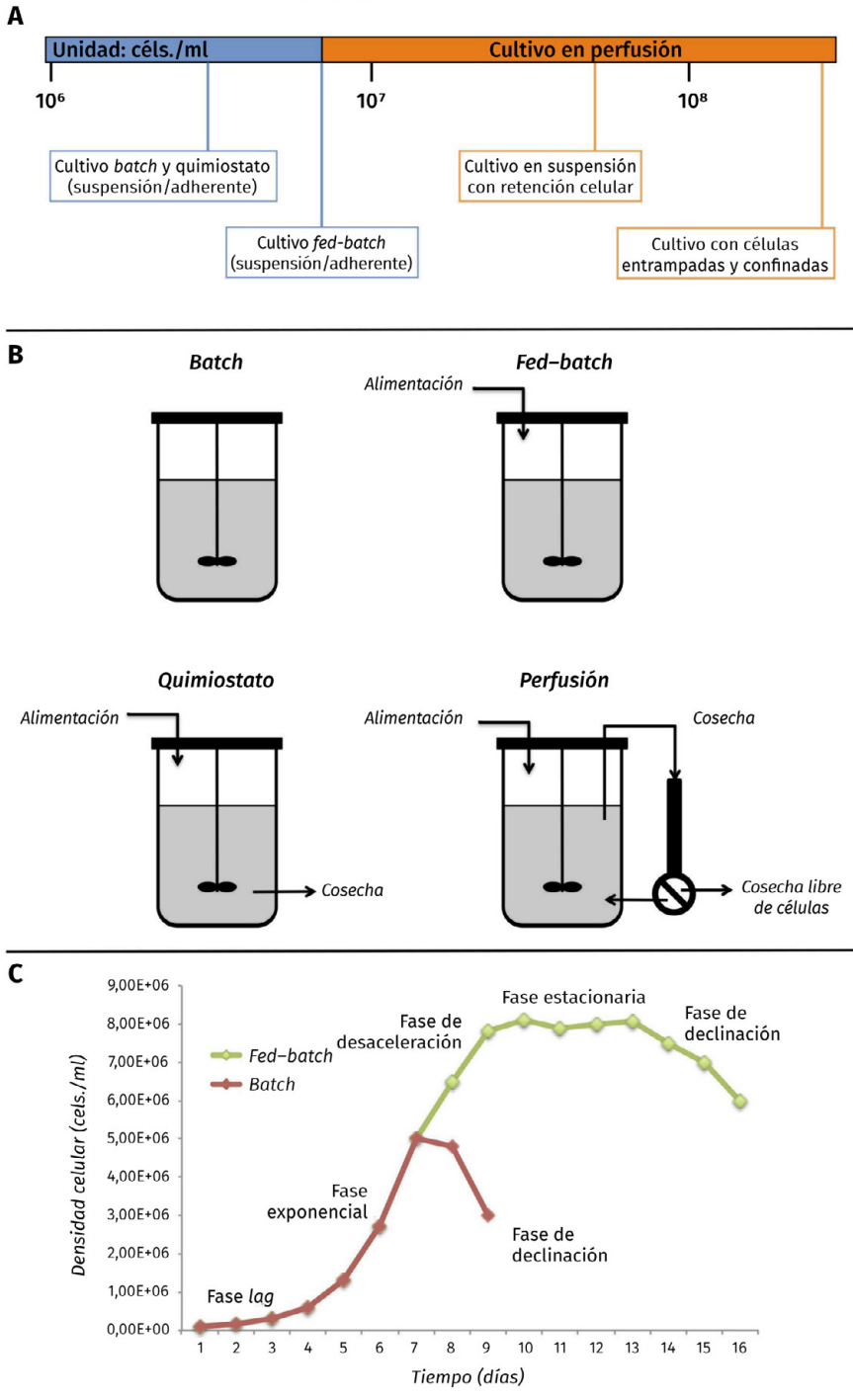


FIGURA 7.1. DENSIDAD CELULAR ALCANZADA SEGÚN EL MODO DE OPERACIÓN DE LOS BIORREACTORES

la definición de cultivo por lotes como un «sistema cerrado» es errónea. El oxígeno es un nutriente muy importante debido a su participación como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria que se realiza en las mitocondrias de la célula animal. Dado que su solubilidad en soluciones acuosas es muy baja (es liposoluble), es generalmente el primer compuesto limitante. Su solubilidad en agua es alrededor de 6,8 mg/l para 37°C y 1 atmósfera (equivalente a 0,21 mM). En caso de poder controlar la concentración de oxígeno disuelto (DO) —en general, para biorreactores más sofisticados—, se elige comúnmente una DO=40 % de saturación con aire, que es aproximadamente la tensión de DO media en los tejidos del organismo vivo. Mientras se metabolizan los sustratos, aumenta la población de células, formando el producto y otros metabolitos. El volumen se mantiene constante durante todo el proceso.

En la Figura 7.1 C se muestra el perfil de evolución de la concentración celular con el tiempo de cultivo. Después de la siembra, puede presentarse una fase *lag*, cuya duración depende de la edad del inóculo y de la velocidad de adaptación de las células al nuevo entorno. Posteriormente, las células entran en una fase de crecimiento exponencial, en la que muestran la tasa de crecimiento más alta; en general, entre 0,02 h⁻¹ y 0,04 h⁻¹, que corresponde a tiempos de duplicación de 35 h a 17 h, respectivamente. Durante esta fase —que puede durar hasta 5–6 días en un medio adecuado—, la concentración de nutrientes disminuye gradualmente, mientras que los metabolitos tóxicos se acumulan, por lo que el crecimiento celular puede inhibirse eventualmente, ya sea por la limitación de nutrientes (por ejemplo, glucosa, glutamina) y/o por la toxicidad de productos (por ejemplo, amoníaco, lactato) y, para el cultivo de células adherentes, también por falta de superficie disponible para adherirse. La sensibilidad de las células a estos factores define la densidad celular máxima que es posible alcanzar en un cultivo *batch*, que generalmente está en el rango de 2–4×10⁶ cél/ml. La densidad celular máxima se mantiene durante una fase estacionaria corta, que se extiende durante horas o un par de días, después de lo cual el cultivo entra en la fase de muerte celular principalmente por agotamiento de la glucosa y/o glutamina, y la viabilidad se reduce drásticamente a valores por debajo del 50 %.

El cultivo *batch* es el modo de operación más simple en términos de equipamiento y operación. Se considera un proceso confiable con bajo riesgo de contaminación o falla mecánica debido a la mínima perturbación desde el exterior en comparación con otros métodos de cultivo. Por estas razones se aplica a escala de laboratorio en frascos estáticos o agitados para caracterizar la cinética del crecimiento celular, la formación del producto y el consumo de sustrato y para evaluar la composición y el medio óptimos del cultivo en etapas tempranas en el desarrollo del proceso de producción del biofármaco. Además, el cultivo *batch* es el método de elección para la preparación del inóculo para biorreactores de escala pequeña e intermedia. Algunas industrias todavía emplean este modo de operación en escalas de producción de hasta 20 000 l.

Sin embargo, la principal limitación del cultivo por lotes es el bajo rendimiento celular que se puede alcanzar y, en consecuencia, la baja concentración del producto al final del proceso. Ello se debe al hecho de que las concentraciones iniciales de sustratos deben ser relativamente bajas por su solubilidad, osmolaridad y toxicidad, lo que da como resultado un rápido agotamiento de nutrientes e inhibición de la proliferación. Además, un cultivo *batch* se ejecuta a una alta productividad específica solo durante un corto período de tiempo, ya sea que el producto esté asociado o no al crecimiento. En el primer caso, la productividad específica aumenta junto con la tasa de crecimiento y la producción disminuye o finaliza cuando el cultivo entra en la fase estacionaria, que es el momento en que se produce la cosecha. En el segundo caso, la formación del producto aumenta cuando disminuye la tasa de crecimiento y la productividad máxima se alcanza durante la fase estacionaria, que solo dura un corto período en un cultivo discontinuo. Además, la calidad del producto deseado debe analizarse para definir el momento de la cosecha, porque las células están sometidas a condiciones ambientales que cambian continuamente durante todo el proceso y que pueden afectar la calidad del producto generado. Por otro lado, el rendimiento y la calidad del producto de interés pueden variar entre los diferentes lotes (falta de consistencia), que pueden acarrear problemas regulatorios.

7.2.4.1. Modo discontinuo: cultivo *batch* repetido

El enfoque más simple para mejorar la productividad de un proceso por lotes es llevar a cabo una variante conocida como lotes repetidos o reelaboración por lotes. Este modo de operación consiste en realizar un cultivo *batch* tradicional hasta el momento de la cosecha del producto, pero —en esta etapa del proceso— solamente se recoge una parte de la suspensión celular. La parte restante se deja en el biorreactor y funciona como inóculo para un nuevo ciclo de lotes, que se inicia volviendo a llenar el recipiente de cultivo con medio nuevo. Este procedimiento puede repetirse varias veces, pero muchas veces la densidad máxima de células suele ser menor en los sucesivos lotes y se suele observar una disminución en el crecimiento celular o la acumulación de productos. El punto crítico en esta operación es garantizar una alta viabilidad de la suspensión celular restante en el momento óptimo de la recolección. La productividad total de los ciclos de lotes repetidos se incrementa al reducir el tiempo y el costo de limpieza y esterilización del sistema de cultivo entre cada lote, acortando el tiempo en que el biorreactor no es productivo.

7.2.4.2. Modo discontinuo: cultivo por lote alimentado o *fed-batch*

La diferencia de este modo de operación en comparación con el lote es que uno o más nutrientes se añaden durante el cultivo, para reemplazar los

consumidos por las células. En el cultivo por lote alimentado (Figura 7.1 B, superior derecha), el recipiente de cultivo o biorreactor se llena con un volumen de medio de cultivo inferior al volumen máximo de trabajo y se inicia como lote. A medida que se consumen los sustratos, el cultivo se alimenta en forma continua o intermitente con medio fresco o con una solución concentrada que contiene los nutrientes claves, con un aumento correspondiente en el volumen del cultivo. Esta alimentación controlada tiene como objetivo cumplir con los requisitos nutricionales de las células con el fin de permitirles crecer durante un período prolongado de tiempo y, por lo tanto, lograr una mayor concentración del producto deseado. Dado que los nutrientes no se suministran por completo al comienzo del cultivo, no se encuentran problemas de osmolalidad o toxicidad, por lo que la alimentación permite que las células metabolicen más sustratos y aumenta la biomasa y el rendimiento del producto.

Comparado con los cultivos *batch*, el cultivo por lote alimentado se caracteriza por una fase de crecimiento más larga (que es particularmente importante en la producción de productos asociados al crecimiento), una mayor densidad de células viables ($6-8 \times 10^6$ cél/ml), una fase estacionaria más larga (lo que aumenta considerablemente la productividad de los productos no asociados al crecimiento) y una mayor concentración de producto (Figura 7.1C). La combinación de una densidad celular más alta durante un período de tiempo más prolongado da como resultado un aumento de la integral de densidad de células viables (parámetro conocido como IVCD, según su sigla en inglés derivada de *integral of viable cell concentration*) con un rendimiento del producto global más alto. Sin embargo, al igual que en el cultivo discontinuo, el medio usado no se retira del sistema, de modo que los metabolitos residuales tóxicos (principalmente lactato y amonio) se acumulan y, finalmente, el ambiente de cultivo se vuelve perjudicial para el crecimiento celular.

Diseñar la formulación adecuada de nutrientes y la estrategia de alimentación representa el desafío principal de un cultivo *fed-batch* con el objetivo de alcanzar altos títulos del producto de interés. Se deben indentificar los sustratos limitantes para ser suministrados en los niveles correctos en las etapas críticas del cultivo. Usualmente, las principales fuentes de carbono y energía, glucosa y glutamina, están incluidas en esta alimentación. Además, es posible que haya que restaurar otros componentes como lípidos, fosfatos o aminoácidos en el biorreactor. Si los sustratos limitantes del medio no pueden identificarse, como ocurre cuando se usan medios comerciales que incluyen hidrolizados, la alimentación puede ser simplemente el medio basal concentrado, excluyendo la mayoría de las sales para evitar problemas osmóticos. No obstante, siempre debe evitarse la acumulación de los principales productos tóxicos de desecho. Así, se han reportado diferentes estrategias que disminuyen exitosamente el nivel de lactato y amoníaco en cultivos celulares, como la optimización cuidadosa de la relación entre el nivel de glucosa y glutamina, la aplicación de un régimen optimizado para

mantener niveles bajos de glucosa/glutamina así como su sustitución total o parcial con sustratos metabolizados lentamente (Altamirano, 2004). Por otro lado, el análisis de flujos metabólicos también se ha empleado para identificar enzimas clave en la vía de utilización de glucosa/glutamina con el fin de diseñar enfoques de ingeniería genética para producir cantidades más bajas de metabolitos tóxicos (Dean & Reddy, 2012). Por ejemplo, la introducción del gen de la enzima piruvato carboxilasa presente en el citosol de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en células CHO, BHK y HEK ha demostrado mejorar la utilización de glucosa y limitar la producción de lactato y amoníaco, aunque estos cambios metabólicos arrojaron resultados mixtos con respecto al crecimiento celular y/o productividad (Irani *et al.*, 1999; Irani *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2003; Bollati-Fogolín *et al.*, 2004; Henry & Durocher, 2011).

La alimentación de nutrientes se puede realizar a través de diferentes estrategias, ya sea en forma de pulsos o en forma escalonada, a una tasa de flujo constante o, en forma más compleja pero precisa, como es el acoplamiento del flujo de la alimentación con el crecimiento exponencial. El objetivo principal de la estrategia de alimentación es garantizar el suministro correcto de nutrientes esenciales, evitando la acumulación de subproductos y la alta osmolalidad, en el momento adecuado y con la velocidad de alimentación de los nutrientes previamente optimizada.

La principal ventaja del cultivo en lotes alimentados es su capacidad para permitir la acumulación de productos en una alta concentración y su productividad volumétrica es relativamente alta. Con la optimización cuidadosa de la formulación y estrategia del alimento, la duración del cultivo puede extenderse hasta aproximadamente tres semanas y, comparado con un cultivo *batch*, la concentración del producto final puede aumentar hasta diez veces. Además, cuando se compara con el cultivo en perfusión, las ejecuciones son considerablemente más cortas y, por ello, la validación del proceso es más sencilla y se completa en menor tiempo. Aunque la operación *fed-batch* no se puede considerar tan simple como la de *batch*, su complejidad y los riesgos de contaminación son todavía moderados. Además, la fiabilidad y escalabilidad de este modo de cultivo es comparable a la del cultivo por lotes, con aplicaciones en escalas industriales de hasta 20 000 l. Se requiere de una menor inversión de capital y de experiencia técnica en comparación con el cultivo en perfusión. Una característica única del modo *fed-batch* es su flexibilidad, que refleja su facilidad para adaptarse a diferentes líneas celulares y productos, y es una de las razones por las que las empresas productoras de biofármacos eligen preferentemente este modo para la fabricación comercial a gran escala.

La principal desventaja del proceso de alimentación por lotes es el largo tiempo de residencia del producto en el biorreactor, lo que compromete su estabilidad y calidad. Como las moléculas sintetizadas al inicio del cultivo no se cosechan hasta el final del proceso, están continuamente expuestas a los cambios ocurridos en el cultivo, que pueden afectar adversamente la

consistencia del producto. Para la producción de glicoproteínas terapéuticas es esencial garantizar que se mantenga una calidad constante del producto entre lotes, ya que la glicosilación puede influir significativamente en la seguridad y eficacia clínica, la vida media plasmática y la respuesta inmune de muchas enzimas, hormonas y anticuerpos (Senger & Karim, 2007). Durante el cultivo en lote alimentado, el producto de interés, que generalmente es una proteína o una glicoproteína, se expone a proteasas y glicosidasas que pueden conducir a su degradación o inactivación con la consiguiente pérdida de actividad. Por esta razón, el lote alimentado se considera un proceso prohibido para la producción de proteínas que son inestables a la temperatura del cultivo o susceptibles a la acción de enzimas liberadas por las células muertas.

7.2.4.3. Modo continuo: cultivo sin retención celular o quimiostato

En un quimiostato (Figura 7.1B, inferior izquierda), la alimentación de medio fresco se añade a una tasa constante al biorreactor que contiene las células, y las células junto con el medio agotado se separan del cultivo a la misma velocidad, de modo que el volumen del cultivo se mantiene constante, y se alcanza un estado estacionario. El cultivo se inicia en modo *batch* y cuando los nutrientes están por debajo de los valores críticos, se inicia la alimentación de medio fresco y se recolectan las células y el medio consumido. El crecimiento se controla mediante la velocidad de flujo del suministro y cosecha del medio, conocida como tasa de dilución, que es la tasa de flujo del medio dividida por el volumen del cultivo. Cuando la tasa de crecimiento celular es igual a la tasa de dilución, se alcanza un estado estacionario y las concentraciones de células, nutrientes y productos permanecen constantes. Las condiciones de estado estacionario siempre se restauran si se produce un cambio, debido a la autorregulación del sistema de quimiostato. Así, por ejemplo, una disminución temporal en la concentración celular causará un aumento correspondiente en la tasa de crecimiento.

El cultivo tipo quimiostato es un sistema abierto en el que los nutrientes y el oxígeno disuelto se suministran constantemente y los productos del metabolismo y las células se eliminan continuamente, de modo que no hay inhibición del crecimiento celular y el cultivo se puede mantener durante un período de tiempo prolongado. Sin embargo, dado que las células que proliferan abandonan continuamente el sistema, solo se alcanzan concentraciones celulares relativamente bajas (hasta 2×10^6 cél/ml), con el correspondiente bajo rendimiento del producto de interés (Aehle *et al.*, 2011). Por esta razón, el cultivo continuo sin retención celular no se aplica en la industria, y de hecho, está prácticamente restringido para fines de investigación y desarrollo en pequeña escala.

7.2.4.4. Modo continuo: cultivo con retención celular o cultivo en perfusión

Como el quimiostato, la perfusión también es un sistema abierto con una alimentación continua de medio nuevo y una cosecha que se realiza a la misma velocidad, de manera que el volumen del biorreactor se mantiene constante. Sin embargo, a diferencia del quimiostato, las células no salen del sistema en la cosecha, sino que se retienen dentro del biorreactor por medio de un dispositivo especial de retención celular (Figura 7.1B, inferior derecha).

La perfusión intenta superar la principal limitación del quimiostato, referida al bajo rendimiento del producto alcanzado debido a las bajas densidades celulares logradas, ocasionados tanto por la pérdida de células en la corriente de salida como por el rango operativo limitado de la tasa de dilución para evitar el lavado del biorreactor. En el modo de perfusión, como las células se mantienen dentro del recipiente de cultivo, se pueden aplicar tasas de dilución significativamente mayores dando como resultado una mayor disponibilidad de nutrientes, de modo que se alcanzan mayores concentraciones de células (hasta 5×10^7 cél/ml en cultivos en suspensión), con un significativo aumento en el rendimiento del producto de interés (Hernández *et al.*, 2009). Si las condiciones de cultivo se mantienen en forma adecuada, el proceso de perfusión puede continuar durante un largo período de tiempo (semanas o meses) con cosechas continuas de medio gastado que contiene altas concentraciones de la proteína de interés. En nuestro laboratorio hemos aplicado con éxito el cultivo en perfusión para la producción de un biosimilar de eritropoyetina humana recombinante durante tres meses de cultivo (Beccaria *et al.*, 1999).

Se disponen de diferentes dispositivos de retención celular (Woodside *et al.*, 1998; Voisard *et al.*, 2003; Castilho & Medronho, 2002, 2008), que pueden ser ubicados en el interior o preferentemente en el exterior del biorreactor, tales como *spin-filter*, filtro tipo *cross-flow*, sedimentador oblicuo o vertical, hidrociclón, centrífuga continua, separador ultrasónico o un novedoso sistema externo consistente en un cartucho a base de fibra hueca operado con un flujo tangencial (TFF, según su sigla en inglés derivada de *tangential flow filtration*). A diferencia de la filtración de flujo normal, donde el medio se bombea a través de un filtro de membrana, en este caso se usa una bomba peristáltica para recircular el sobrenadante del cultivo celular sobre la superficie de la membrana permeable. Este modo de operación reduce el riesgo de taponamiento (*fouling*) del filtro. En TFF, el líquido y los compuestos con pesos moleculares inferiores al límite o *cut-off* de la membrana semipermeable pueden pasar a través de la misma (permeado), mientras que las moléculas más grandes se retienen (retenido). La filtración de flujo tangencial alternante (ATF, según su sigla en inglés derivada de *alternating tangential flow filtration*) utiliza la técnica TFF, pero una bomba de diafragma alterna la dirección del flujo sobre la superficie de la membrana. Esta tecnología fue desarrollada por la empresa Refine Technology (Pine Brook, New Jersey, Estados

Unidos; adquirida en 2014 por la empresa Repligen Corporation (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Dada su elevada *performance*, los sistemas ATF® son actualmente los de mayor uso en cultivos en perfusión, aplicables tanto en baja, media como alta escala. En baja escala, se emplea el ATF 2® en biorreactores de hasta 4 l para cultivos en suspensión y de hasta 10 l para cultivos de células adheridas a *carriers*. Para la alta escala, se dispone del ATF 10® aplicado para biorreactores de hasta 1 000 l en cultivos en suspensión y de hasta 5 000 litros para cultivos adherentes. En la Figura 7.2 se muestra el módulo ATF 6® acoplado a un biorreactor de 150 litros de capacidad.

En el cultivo en perfusión se puede lograr la más elevada densidad celular, la mayor productividad volumétrica y la duración de cultivo más larga con respecto a todos los demás modos de cultivo. Al igual que en el lote alimentado, se evita la limitación de nutrientes mediante el suministro continuo de medio. Pero, a diferencia del lote alimentado, los desechos celulares y los productos tóxicos se eliminan del sistema, lo que aumenta la longevidad del cultivo alcanzándose mayores concentraciones de células. Las proteasas y las glicosidasas liberadas al medio de cultivo por las células muertas también se retiran, por lo que se minimiza la inactivación, degradación y/o de-glicosilación de las glicoproteínas. Además, como el tiempo de residencia del producto secretado es muy corto (en el orden de las horas), el tiempo de exposición a condiciones operativas adversas (pH, temperatura y enzimas

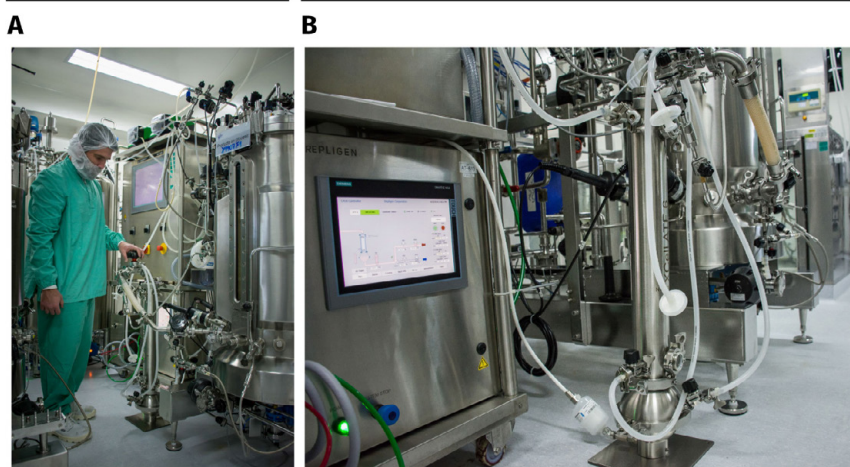


FIGURA 7.2. CULTIVO EN PERFUSIÓN CON UN DISPOSITIVO DE RETENCIÓN CELULAR EXTERNO. MÓDULO ATF 6® (REPLIGEN CORPORATION) ACOPLADO A UN BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO DE 150 LITROS DE CAPACIDAD.

FUENTE: FOTOGRAFÍA OBTENIDA POR SOFÍA GIORGETTI, BECARIA DOCTORAL DE CONICET EN EL CENTRO BIOTECNOLÓGICO DEL LITORAL (FBCB-UNL) HASTA 05/2020, Y CEDIDA GENTILMENTE PARA LA ILUSTRACIÓN DE ESTE CAPÍTULO. REPRODUCIDA CON EL PERMISO DE ZELLTEK SA

liberadas) es mínimo, lo que beneficia la pureza y calidad del producto. Es por ello que la perfusión es el modo de operación obligado para la producción de grandes cantidades de productos proteicos lábiles o inestables. La empresa Bayer (Leverkusen, Alemania) ha aplicado con éxito la tecnología de perfusión para la producción de factor VIII de coagulación (Boedeker, 2013). Otra ventaja de los sistemas de perfusión es que, debido a su alta productividad, el biorreactor puede ser hasta diez veces más pequeño para la producción de la misma cantidad de producto, por lo que en general se aplica en procesos industriales a escalas de hasta 2 000 litros.

Las principales desventajas del modo de perfusión son la mayor complejidad operativa, el tiempo prolongado de desarrollo y validación del proceso y el mayor riesgo de contaminación. El aspecto más complejo comparado con el lote alimentado es la introducción de dispositivos para la retención de células, especialmente a gran escala, que exigen un diseño de biorreactor más sofisticado por lo que el costo del equipamiento total es más caro. Sin embargo, las productividades más altas de los cultivos en perfusión permiten el uso de biorreactores mucho más compactos, con la consecuente disminución en el costo, y por lo cual se compensa parcialmente la situación adversa mencionada. Además, el riesgo de falla del equipo es alto debido a la posible obstrucción del dispositivo de retención. Finalmente, si bien hace unos años el riesgo de contaminación se consideraba alto debido al hecho de que la perfusión es un sistema abierto que opera continuamente durante largos períodos de tiempo, actualmente esta desventaja está superada debido a los sofisticados métodos con que se cuenta para establecer y controlar la esterilidad.

7.3. ESCALAMIENTO DE LOS CULTIVOS EN BIORREACTORES

Con respecto al escalamiento del proceso, Spier (1985) ha dividido los métodos de cultivo en dos grupos: aquellos en los cuales el *scale-up* se realiza mediante un aumento en el número de unidades (proceso múltiple) y, por otro lado, aquellos en los cuales se logra mediante la construcción de una unidad más grande (proceso único). Estos últimos ofrecen grandes ventajas, en cuanto a la reducción de personal y espacio físico; al mejor monitoreo y control de proceso, y al control más fácil de la contaminación, ya que se requieren menor número de operaciones.

El escalado del cultivo de células en suspensión es relativamente sencillo, y consiste en el pasaje de la suspensión celular a un biorreactor de mayor volumen, realizando la dilución simplemente con el agregado de medio de cultivo fresco. Se emplean generalmente biorreactores tipo tanque agitado o tipo *air-lift* (Chico Véliz *et al.*, 2008).

En cambio, para el escalado de células adherentes se debe aportar justamente una mayor «superficie» que sea disponible para las células en el biorreactor al cual se escala el cultivo. Para ello se han desarrollado diferentes métodos que tratan de reproducir lo que ocurre en los organismos vivos, donde las células se encuentran en altas densidades inmovilizadas en órganos y tejidos. Básicamente, existen dos técnicas para la inmovilización celular: cultivos de células confinadas (*immurement culture*) y de células atrapadas (*entrapment culture*). Los primeros implican la microencapsulación de células dentro de geles (Hübner, 2007) o el crecimiento de células dentro de compartimentos estancos, como es el caso del cultivo de células en cartuchos de fibra hueca (Davis, 2007). Para ambos casos también se pueden inmovilizar células de crecimiento en suspensión. Se deben operar en modo de perfusión, alcanzando las densidades celulares más altas que se registran en cultivos ($2-4 \times 10^8$ cél/ml; Figura 7.1A.). En los cultivos atrapados las células se retienen dentro de una matriz abierta a través de la cual el medio es capaz de fluir, como es el caso de células adheridas a la superficie de un soporte sólido (partícula o *carrier* sólido) o en los intersticios de un *carrier* macroporoso (Blüml, 2007; GE Healthcare Bio-Sciences, 2013). Dependiendo de la densidad del material que constituye los *carriers*, se emplean biorreactores tipo tanque agitado o sistemas lecho fijo o fluidizado (Pörtner & Platas Barradas, 2007; Kratje & Wagner, 1992; Kratje *et al.*, 1994). Cabe destacar que —aunque se logre una distribución uniforme de los *carriers* en el biorreactor— estos cultivos no son considerados estrictamente homogéneos dado que hacia el interior de los *carriers* porosos se genera siempre un gradiente de concentración de nutrientes y productos.

La empresa Baxter BioScience (Viena, Austria) alcanzó el mayor escalado del cultivo de células inmovilizadas a nivel industrial aplicada a la fabricación de vacunas contra la influenza basada en el cultivo de células Vero adherentes, empleando *carriers* porosos Cytodex-1® (GE Healthcare Bio-Sciences; Uppsala, Suecia) en un biorreactor tipo tanque agitado de 6 000 l (Chen & Chen, 2009).

7.3.1. Proceso de producción de un biofármaco

Cabe destacar que la «fábrica» de la glicoproteína es la célula recombinante, y es por ello que el cultivo celular ocupa un rol central en la fabricación del biofármaco. En la Figura 7.3 se muestra un esquema del proceso global de producción, que incluye el proceso biotecnológico de producción de la proteína humana recombinante o IFA y la etapa galénica de formulación del medicamento. Estos procesos deben llevarse a cabo bajo un estricto sistema de calidad conocido como normas de Buena Práctica de Manufactura (GMP, según su sigla en inglés derivada de *Good Manufacturing Practices*), que son obligatorias y definidas por la autoridad sanitaria de cada país.

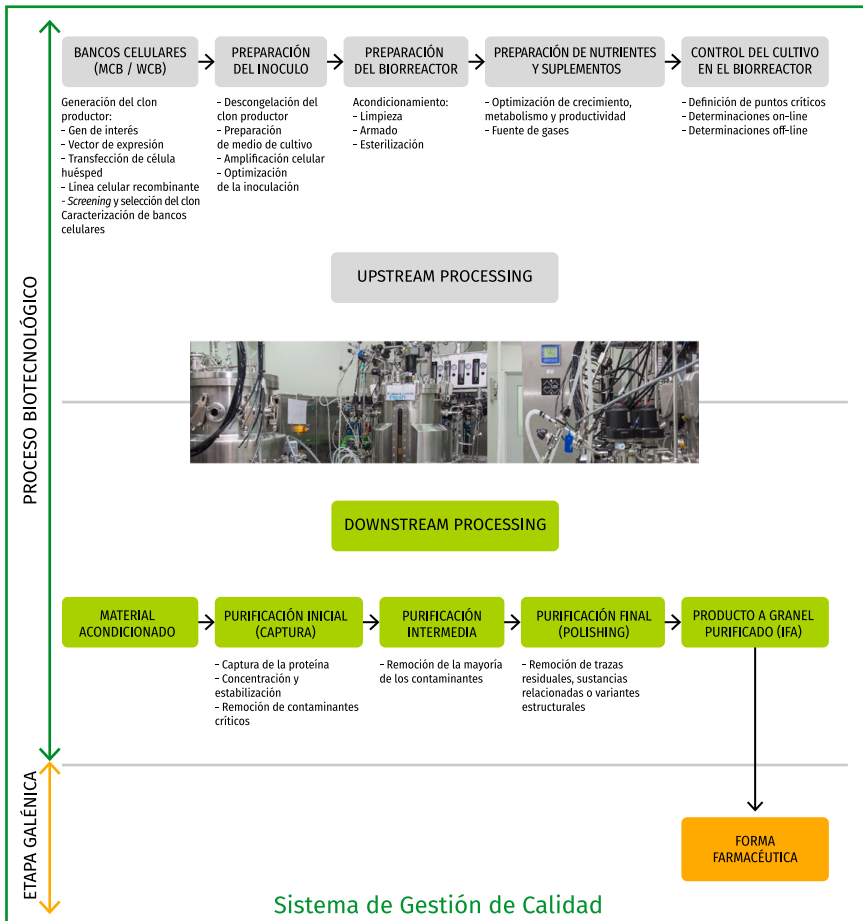


FIGURA 7.3. DIAGRAMA DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN BIOFÁRMACO

En Argentina rige la disposición ANMAT N° 2819/04 y modificaciones subsiguientes (norma N° 3602/2018) sobre Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos. Con referencia al proceso biotecnológico, el mismo se divide en dos etapas: el proceso que ocurre «aguas arriba» del cultivo en el biorreactor (en inglés: *upstream processing*) y el proceso de purificación o *downstream processing* (que se abordará en el próximo capítulo).

Para el *upstream processing* se indican las subetapas referidas a la generación de los bancos del clon productor, la preparación del inóculo, acondicionamiento del biorreactor, la preparación del medio y suplementos del cultivo, el control del cultivo y el cultivo en el biorreactor. En este apartado nos enfocaremos en diferentes aspectos de los cultivos celulares, considerando —separadamente cada uno de los pasos mencionados del *upstream processing*— como eje de conducción de la descripción.

El proceso global se encuentra enmarcado en un sistema de gestión de calidad obligatorio (Normas de Buenas Prácticas de Manufactura, GMP), que incluye el proceso biotecnológico de producción de la proteína humana recombinante o ingrediente farmacéutico activo (IFA) y la etapa galénica de formulación del medicamento.

7.3.2. Bancos celulares

Es probable que una o más propiedades de una línea celular cambien durante un período prolongado de pasajes (o subcultivos) continuos. Para garantizar la consistencia de las propiedades de una línea celular o de un producto derivado de ella, es necesario —por lo tanto— preservar (en general, por criopreservación) y caracterizar un *stock* de células como referencia. Este *stock* o banco celular consiste en una colección de recipientes apropiados (ampollas o criotubos), que contienen un número conocido de células provenientes de un único *pool* homogéneo de células preparadas en condiciones definidas, supendidas en un medio de criopreservación adecuado y sometidas a pruebas de caracterización. Estos recipientes pueden almacenarse durante años bajo condiciones definidas, tales como la fase de vapor o en la fase líquida a -196°C en nitrógeno líquido (Figura 7.4A). Posteriormente, a lo largo del programa de investigación, desarrollo o fabricación, los cultivos celulares siempre se descartan después de un número de pasajes definido y el material criopreservado se utiliza como semilla para reiniciar cultivos nuevos.

Aunque un número reducido de ampollas o criotubos de un solo banco celular puede ser suficiente para un pequeño programa de investigación, para garantizar la continuidad de una línea celular durante la fabricación de un producto biofarmacéutico, es recomendable preparar un sistema de banco de células en dos niveles. Este consiste en un banco de células maestro (MCB, según su sigla en inglés derivada de *master cell bank*) con un número definido de ampollas y bancos de células de trabajo (WCB, según su sigla en inglés derivada de *working cell bank*), cada uno derivado de forma idéntica de un único criotubo del MCB (Stacey, 2004; Bakhach, 2009; He, 2011).

En el caso de un proceso de producción como el esquematizado en la Figura 7.3, cada lote de producción se inicia con el descongelamiento de las células contenidas en un criotubo del WCB, que usualmente contiene 10 a 20 millones de células suspendidas en un volumen de 1 a 5 ml. Este paso requiere de experiencia y debe llevarse a cabo con sumo cuidado, para evitar que se genere un elevado nivel de muerte celular. Después de eliminar el crioprotector (generalmente dimetil-sulfóxido, DMSO), las células se suspenden en el medio de cultivo de crecimiento para iniciar así la expansión del cultivo celular para la preparación del inóculo.

7.3.3. Expansión celular – Preparación del inóculo

El objetivo principal de la expansión celular es alcanzar el número necesario de células viables para inocular el biorreactor de producción en el menor tiempo posible. Se utiliza un medio de cultivo que fue optimizado para la lograr la máxima reducción del tiempo de duplicación celular que rinda una población de células con elevada viabilidad (medio de crecimiento) y, en general, se lleva a cabo a temperaturas cercanas a 37°C, que es la temperatura óptima de crecimiento de las células animales.

Esta expansión celular se realiza en forma gradual, mediante sucesivos cultivos, que se prolongan únicamente hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento del cultivo en modo *batch*: primero en dispositivos de bajo volumen y luego en biorreactores de volumen de trabajo crecientes hasta llegar a la escala del biorreactor de producción (Figura 7.4). Para evitar la generación de una fase *lag*, cada cultivo se inicia con una concentración inicial de células viables adecuada, que en general está en el rango de $1-3 \times 10^5$ células por ml, dependiendo de la línea celular y del medio. Por la misma razón, las células se cosechan cuando se encuentran en la fase exponencial (antes de la fase de deceleración, ver Figura 7.1C) para iniciar el siguiente cultivo. Usualmente se emplean diferentes frascos de cultivo y biorreactores de escala intermedia para la propagación celular, con volúmenes de trabajo incrementados sucesivamente en un factor de alrededor de 10, de manera que toda la masa celular de la fase exponencial de un cultivo *batch* de un determinado paso sea suficiente como inóculo del biorreactor del siguiente paso. El número de los pasos de la amplificación depende de la escala final del biorreactor de producción.

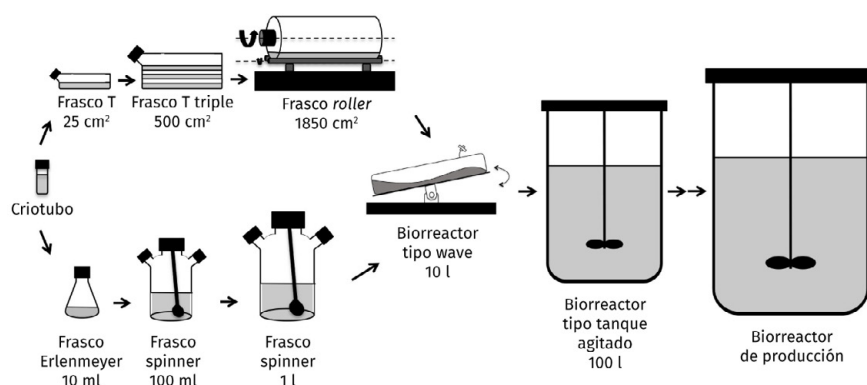


FIGURA 7.4. ESQUEMA DE LA EXPANSIÓN CELULAR GRADUAL PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la preparación del inóculo del biorreactor de producción se deben realizar varios pasos de expansión celular, cuyo número depende de la escala de producción, y comenzando siempre con el descongelamiento de las células contenidas en un criotubo del WCB. Se emplean diferentes tipos de frascos de cultivo y de biorreactores de escala intermedia para la propagación celular, dependiendo del tipo de crecimiento celular: cultivo dependiente de superficie (nivel superior del esquema) y cultivos en suspensión (nivel inferior del esquema).

Cabe aclarar en este punto que la definición de la escala de cultivo es relativa, ya que cada empresa define el volumen máximo del biorreactor de producción de su planta, de acuerdo con las expectativas de venta del biofármaco a producir y del rendimiento global del proceso de fabricación. Así, por ejemplo, para la empresa Amgen (2005) que ha instalado la planta BioNext (West Greenwich, Rhode Island, Estados Unidos) para la producción de etanercept (Enbrel®, producto innovador de Amgen) dotada con nueve biorreactores, cada uno con un volumen de 20 000 l, cuenta seguramente con un mayor número de pasos para la expansión celular que el número que requiere la empresa Zelltek (perteneciente al *holding* Mega Pharma —actualmente Mega Labs— de Montevideo (Uruguay), <http://www.amegabiootech.com>), también para la producción de etanercept (Enerceptan®, producto biosimilar desarrollado por el Consorcio Público Privado constituido por el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y las empresas Gemabiootech SA y Zelltek S.A.) que cuenta en su planta ubicada en el Parque Tecnológico del Litoral Centro (PTLC, Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina) con biorreactores de volumen de trabajo menor a 1 000 l.

7.3.4. Sistemas de cultivo de baja escala

La suspensión celular que resulta después del paso de recuperación de las células contenidas en un criotubo del WCB se dispensan usualmente en pequeños biorreactores, conocidos simplemente como frascos o botellas (Figura 7.5). En general son descartables y carecen de sistemas de monitoreo y control. El material plástico más empleado para estos contenedores es el poliestireno (como es hidrofóbico, debe ser sometido a un tratamiento químico o por radiación y para generar una superficie cargada para el anclaje celular), pero existen otros materiales tratados, que son aptos para el cultivo celular, como cloruro de polivinilo (PVC), policarbonato y politetrafluoroetileno (PTFE). A su vez, estos materiales pueden estar cubiertos con sustancias que favorecen la adherencia celular, como poli-D-lisina, colágeno u otros. Dada la gran diversidad y calidad de materiales disponibles se debe evaluar en cada caso la eficiencia de plaqueo y velocidad de crecimiento para la línea celular de nuestro interés (Freshney, 1994).

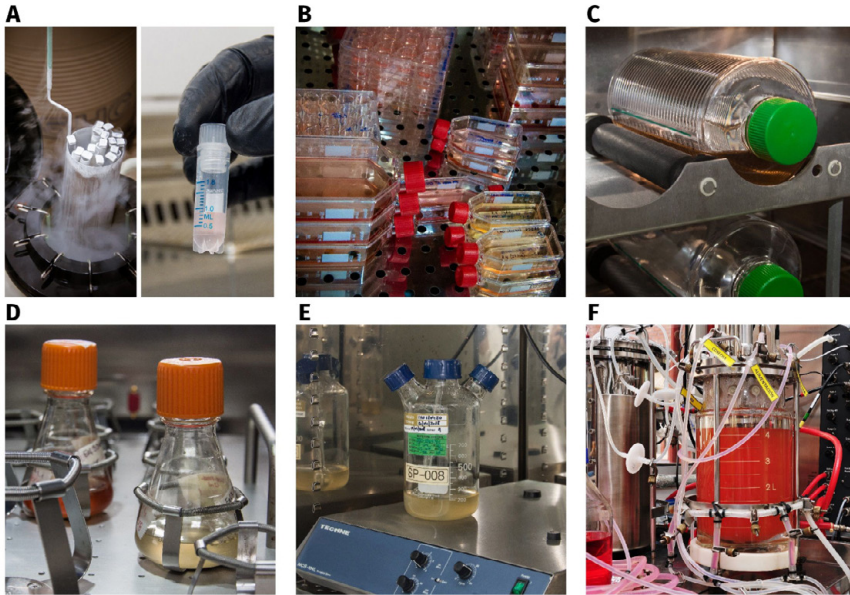


FIGURA 7.5. CRIOPRESERVACIÓN Y SISTEMAS DE CULTIVO EN BAJA ESCALA.

A. TANQUE CON NITRÓGENO LÍQUIDO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN CELULAR, PROVISTO DE CANASTAS CON CAÑAS (FOTO IZQUIERDA), EN LAS CUALES SE ALOJAN LOS CRIOTUBOS (FOTO DERECHA). **B.** DISTINTOS DISPOSITIVOS PARA EL CULTIVO ESTÁTICO EN ESCALA DE LABORATORIO (PLACAS MULTI-WELL Y FRASCOS T). **C.** FRASCOS ROLLER PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES COLOCADOS SOBRE RODILLOS (EN LA FOTO SE OBSERVA COMO CILINDROS NEGROS), QUE PERMITEN EL GIRO CONTINUO DE LAS BOTELLAS Y ASÍ ASEGURAR QUE LAS CÉLULAS PUEDAN CUBRIR TODA LA SUPERFICIE INTERNA DE LA MISMA. **D.** FRASCOS TIPO ERLENMEYER AGITADOS SOBRE UN AGITADOR ORBITAL. **E.** FRASCO TIPO SPINNER PROVISTO DE UN AGITADOR COLGANTE FORMADO POR UNA ESFERA DE VIDRIO QUE CONTIENE UN IMÁN. EL FRASCO SE COLOCA SOBRE UN AGITADOR MAGNÉTICO, QUE PERMITE EL MOVIMIENTO CIRCULAR DEL AGITADOR COLGANTE. **F.** BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO DE 5 LITROS PROVISTO DE UN SISTEMA DE PERFUSIÓN INTERNO TIPO SPIN-FILTER.

FUENTE: FOTOGRAFÍAS FUERON OBTENIDAS POR ILEANA DEL ROSARIO TOSSOLINI, BECARIA DOCTORAL DE CONICET EN EL CENTRO BIOTECNOLÓGICO DEL LITORAL (FBCB-UNL) HASTA 03/2019, Y CEDIDAS GENTILMENTE PARA LA ILUSTRACIÓN DE ESTE CAPÍTULO. REPRODUCIDAS CON EL PERMISO DEL CENTRO BIOTECNOLÓGICO DEL LITORAL (FBCB-UNL)

En esta escala, la manipulación de los cultivos se realiza en cabinas de flujo laminar para mantener la asepsia y los frascos/botellas se mantienen en estufas para regular y mantener constante la temperatura del cultivo. El sistema que se emplea depende del tipo de crecimiento celular. Así, para células adherentes se usan los frascos T y frascos *roller*, mientras que para los cultivos en suspensión se emplean preferentemente los frascos tipo *spinner* y frascos tipo Erlenmeyer. En estos sistemas de baja escala, la transferencia de oxígeno está limitada por la reducida interfase aire-líquido. Por ello, el volumen de medio que se emplea para cada uno de estos frascos debe ser

apropiado, para asegurar que la transferencia de oxígeno al medio de cultivo sea adecuada (en general, la altura de medio varía entre 0,3 cm y 0,4 cm).

Con el propósito de aumentar la superficie disponible para el cultivo de células adherentes se han desarrollado frascos T triples, frascos *roller* y sistemas multibandeja. Los frascos T triples tienen tres capas que le proporcionan un área de 500 cm², pero con el formato de los frascos T de 175 cm² para optimizar el espacio de las estufas. El uso de los frascos *roller* está diseñado de forma tal que las células puedan cubrir toda la superficie interna de la botella, con rodillos que —al hacer girar las botellas— aseguran que el medio de cultivo bañe a todas las células, aportándoles nutrientes y retirando desechos. El más conocido de los sistemas multibandeja es el llamado *Cell Factory*[®] de la empresa Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se disponen de dispositivos con 1 a 52 bandejas de poliestireno, con una superficie de 632 cm² por bandeja. Se proveen en forma estéril y con diferentes accesorios para facilitar su manipulación. Estos sistemas son una interesante alternativa para el escalado relativamente simple de cultivos celulares, ya que la eficacia de la adherencia es idéntica a la de los frascos de menor escala. En nuestro laboratorio hemos aplicado con éxito el cultivo de células CHO adherentes productoras de eritropoyetina humana recombinante en sistemas *Cell Factory*[®] provistas de 10 bandejas, efectuando dos recambios completos de medio de cultivo por semana, y manteniendo la monocapa de células productoras durante 120 días consecutivos de cultivo (Pereira Bacci *et al.*, 1999).

A pesar de que en los cultivos en frascos el rendimiento de producto es mucho más bajo que el alcanzado en cultivos optimizados en biorreactores, todavía hoy en día existen aplicaciones industriales que emplean esta metodología para la producción de biofármacos. En efecto, la empresa Amgen emplea aún la tecnología original de la década de 1980 basada en el cultivo de células CHO recombinantes en frascos *roller* para la producción de eritropoyetina (Epogen[®], producto innovador de Amgen). El escalado del proceso es muy simple (escalado múltiple), en el cual el número de frascos *roller* manipulados en forma paralela es el que determina la escala. Actualmente la producción de Epogen[®] es esencialmente un proceso robotizado en el cual todos los pasos críticos de manejo del cultivo —incluyendo la siembra de células, el llenado de las botellas con medio y la cosecha del sobrenadante de cultivo— son ejecutados sin intervención humana en ambientes estériles con aire filtrado (De Jesus & Wurm, 2011).

7.3.5. Sistemas de cultivo de mediana y alta escala

El volumen de trabajo de los reactores de mediana y alta escala depende de la definición de la escala de producción. En general, el último paso de la amplificación celular se realiza en un reactor con un volumen de trabajo equivalente a alrededor del 10 % del de producción. Para los sucesivos pasos

de este escalado se pueden emplear biorreactores de agitación tipo tanque agitado (de acero inoxidable o descartables de un único uso), con volúmenes crecientes (1 a 2 l, 10 a 20 l, 100 a 200 l y 1000 a 2000 l). Alternativamente, se pueden usar otros diseños de biorreactores descartables, como los de tipo *wave-mixed bioreactor* u *orbitally shaken bioreactor*. Dado la creciente importancia que ha adquirido el uso de los reactores de un solo uso o *single-use bioreactors* en la industria, los mismos se describirán separadamente en el siguiente apartado.

Como se mencionara *ut supra*, actualmente la producción de las glicoproteínas de los biofármacos es preferentemente llevada a cabo mediante el cultivo en suspensión de las células recombinantes, empleando biorreactores homogéneos tipo tanque agitado, operados en modo *fed-batch* o en forma continua en perfusión.

Las condiciones del cultivo en la etapa productiva pueden diferir de las usadas durante la expansión celular. Así, el medio de cultivo debe ser optimizado para favorecer la producción de la proteína de interés y para mantener la viabilidad celular durante largos períodos. Por otro lado, se ha reconocido que la temperatura es una variable ambiental clave en la optimización del proceso (Chuppa *et al.*, 1997). Mientras que la alta viabilidad a baja temperatura parece ser un fenómeno general, el efecto de la disminución de la temperatura en la productividad específica es claramente dependiente de la línea celular y de la proteína (Yoon *et al.*, 2003a, b). En nuestro laboratorio hemos observado para células CHO productoras del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humano recombinante que un descenso de la temperatura a 33°C permite reducir la velocidad de crecimiento, aumentar la viabilidad celular, mejorar la productividad celular y disminuir el metabolismo celular, sin afectar la calidad de la glicoproteína generada (Bollati-Fogolín *et al.*, 2004, 2005).

7.3.6. Biorreactores descartables

Durante el proceso de producción de un lote de un biofármaco los costos más significativos están conformados por la calificación y validación tanto de los equipos como de los pasos claves del bioproceso, siendo generalmente estos costos más elevados que la materia prima misma. Además, el tiempo invertido en estos requerimientos normativos es grande, lo cual también representa dinero. En este contexto es que durante las últimas décadas varias empresas han desarrollado sistemas de biorreactores de un solo uso (SUBs, según su sigla en inglés derivada de *single-use bioreactors*) o descartables, los cuales ya están previamente esterilizados, validados y calificados, cumpliendo las regulaciones requeridas y reduciendo significativamente los tiempos necesarios para la puesta en marcha del bioproceso (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2009). Otra ventaja que está asociada con esta tecnología

es que las instalaciones necesarias en una planta de producción (lo que se conoce en inglés como *footprint*) para la utilización de un sistema descartable son más sencillas que las requeridas para la instalación de un biorreactor de acero inoxidable, ya que no se requiere sistema de generación de vapor para esterilización *in situ*, como así también todo lo asociado a la limpieza del mismo. Las empresas que comercializan esta tecnología declaran que la instalación de sistemas SUBs en lugar de biorreactores de acero inoxidable puede reducir la inversión inicial entre un 50 % y 70 % cuando se está construyendo una planta.

Un biorreactor descartable consiste es una bolsa de plástico polimérico de múltiples capas (usualmente policarbonato, poliestireno, polietileno, polipropileno o etilvinilacetato), instalada sobre una estructura asociada a un sistema de control donde se puede monitorear la temperatura y otros parámetros fisicoquímicos, de la misma manera que es llevado a cabo en un tanque de acero inoxidable. Está claro entonces que la utilización de un SUB requiere una gasto extra en cada lote de producción asociada al consumible, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar los costos del bioproceso (Eisenkraetzer, 2014; Pollard & Kistler, 2017). Otro aspecto crucial a tener en cuenta es que una vez que se toma la decisión de adquirir un SUB de una marca determinada, luego será necesario comprar la bolsa siempre a ese mismo proveedor, ya que no es compatible la utilización de consumibles de otras marcas con un biorreactor determinado.

7.3.6.1. Biorreactores tipo tanque agitado descartables

El sistema de cultivo mayormente utilizado en la industria biofarmacéutica es el de tanque agitado y, para el caso de los biorreactores de un solo uso, las consideraciones generales para el control de parámetros de cultivo, a excepción de la transferencia de calor, se llevan a cabo de una forma muy similar que en los sistemas de acero. El mezclado se lleva a cabo con hélices plásticas (cada marca tiene su diseño particular) que forma parte de la estructura de la bolsa. Con respecto a las sondas de pH, oxígeno disuelto, temperatura y biomasa, los sistemas SUB están adaptados para utilizar las mismas sondas reutilizables que se utilizan en sistemas de acero inoxidable, aunque algunas marcas ofrecen bolsas que tienen sondas ópticas descartables, con un número limitado de lecturas para pH y oxígeno disuelto, haciendo aún más sencillo y rápido su instalación (Wilde *et al.*, 2009).

Existen varias empresas que ofrecen biorreactores tipo tanque agitado desechables. Entre las principales se encuentran: Hyclone (actualmente pertenece a Thermo Scientific), líder en el mercado actual y que dispone de la plataforma de HyPerforma®; Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos), que posee su sistema Mobius®; la empresa Sartorius (Göttingen, Alemania) cuenta con la plataforma BIOSTAT STR® y GE Healthcare

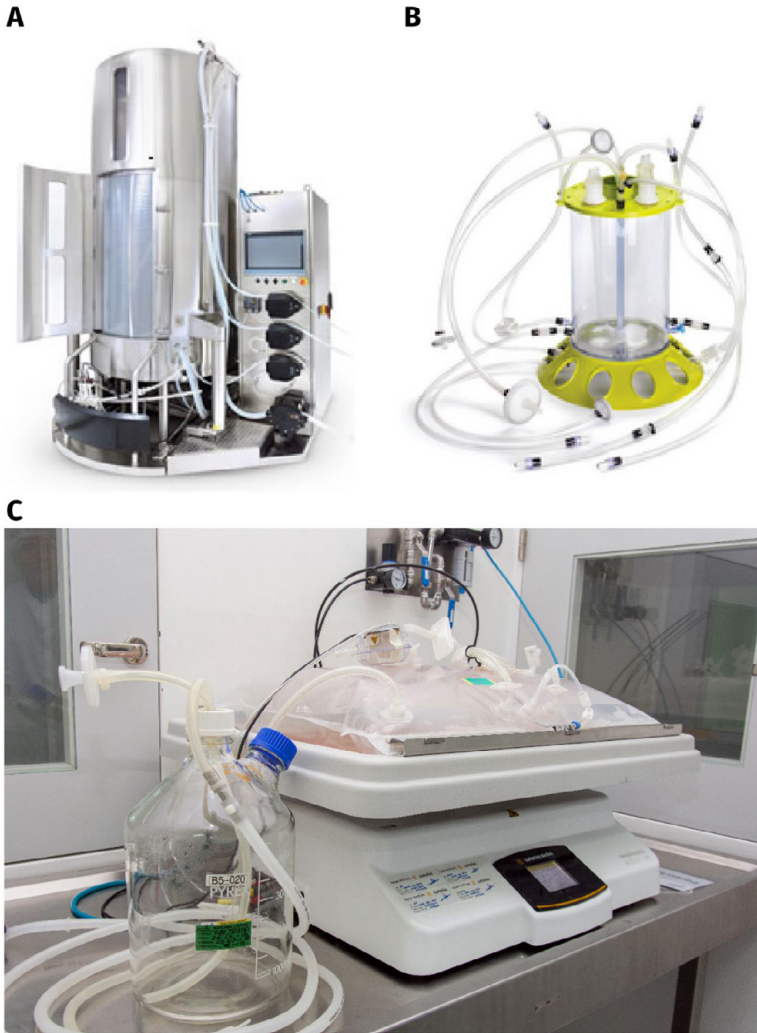


FIGURA 7.6. BIORREACTORES DESCARTABLES O SINGLE-USE BIOREACTORS

A. BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO PROVISTO DE UNA BOLSA DESECHABLE DE 2000 L DE CAPACIDAD UBICADA EN UN CONTENEDOR METÁLICO Y CONECTADA A LA TORRE DE CONTROL (MOBIUS® 2000 L SINGLE-USE BIOREACTOR; MERCK MILLIPORE).

B. BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO DESCARTABLE DE MESADA DE 3 L (MOBIUS®

3 L SINGLE-USE BIOREACTOR; MERCK MILLIPORE). **C.** SINGLE-USE WAVE-MIXED BIOREACTOR (BIOSTAT® RM 20|50; SARTORIUS) PROVISTA DE UNA BOLSA CON 10 L DE VOLUMEN DE TRABAJO (CULTIBAG® RM; SARTORIUS).

FUENTE: FOTOGRAFÍA OBTENIDA POR ILEANA DEL ROSARIO TOSSOLINI, BECARIA DOCTORAL DE CONICET EN EL CENTRO BIOTECNOLÓGICO DEL LITORAL (FBCB-UNL) HASTA 03/2019, Y CEDIDA GENTILMENTE PARA LA ILUSTRACIÓN DE ESTE CAPÍTULO. FIGURAS 7.6A Y 7.6B: RECUPERADAS DE [HTTP://WWW.MERCKMILLIPORE.COM/AR/ES](http://www.merckmillipore.com/ar/es) CON EL PERMISO DE MERCK ARGENTINA. FIGURA 7.6C REPRODUCIDA CON EL PERMISO DE ZELLTEK SA

(Little Chalfont, Reino Unido) ofrece Xcellerex XDR®, todas ellas con escalas productivas desde 50 l hasta 2 000 l para células de mamífero. Con respecto a la escala de I&D, normalmente se ofrecen SUB de mesada con recipientes plásticos de hasta 10 l, como por ejemplo Mobius® en baja escala, UniVessel® de Sartorius y BioBLU® *Single-Use Vessels* de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), entre otros.

7.3.6.2. Otros diseños de biorreactores descartables

Existen otros tipos de SUBs basados en la utilización de bolsas descartables que descansan sobre una plataforma horizontal. En este caso, la agitación del cultivo ocurre al mover el biorreactor completo, dado que la plataforma que soporta la bolsa está dotada de un movimiento tipo vaivén, que le confiere a la suspensión celular contenida en la bolsa una agitación en forma de «olas» (Figura 7.6C). Estos biorreactores son conocidos como *wave-mixed bioreactor* o *rocking motion bioreactors*, cuyo volumen de trabajo máximo corresponde hasta el 50 % del volumen total de la bolsa. La temperatura de la plataforma puede controlarse y, de esta manera, por contacto directo de la bolsa con la superficie de la plataforma es que se regula la temperatura del cultivo. El pH y la DO se miden en forma continua mediante sensores descartables que son parte de la bolsa. La disolución del oxígeno en el medio de cultivo —que se añade mediante insuflación de aire o una mezcla de gases en la cámara superior— es suficiente para sostener el crecimiento celular en forma adecuada (Klöckner *et al.*, 2014; Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2009) but practical and ethical considerations have hampered clinical application and research. In an attempt to overcome these issues, the conversion of somatic cells into pluripotent stem cells similar to ESCs, commonly termed nuclear reprogramming, has been a top objective of contemporary biology. More than 40 years ago, King, Briggs, and Gurdon pioneered somatic cell nuclear reprogramming in frogs, and in 1981 Evans successfully isolated mouse ESCs. In 1997 Wilmut and collaborators produced the first cloned mammal using nuclear transfer, and then Thomson obtained human ESCs from in vitro fertilized blastocysts in 1998. Over the last 2 decades we have also seen remarkable findings regarding how ESC behavior is controlled, the importance of which should not be underestimated. This knowledge allowed the laboratory of Shinya Yamanaka to overcome brilliantly conceptual and technical barriers in 2006 and generate induced pluripotent stem cells (iPSCs).

Es importante resaltar que en este tipo de biorreactores se pueden alcanzar cultivos de elevada viabilidad, dado que se evitan los efectos de *stress* sobre las células, que ocurren en los cultivos llevados a cabo en tanques agitados, y que están asociados tanto a la ruptura de las burbujas del gas incorporado a través del *sparger* como al movimiento de las hélices del agitador.

Normalmente estos SUBs se utilizan en la etapa de expansión celular llevada a cabo para la preparación del inóculo del biorreactor de producción, sea este desechable o no, simplificando significativamente esta tarea. Algunos ejemplos comerciales son WAVE Bioreactor® (GE Healthcare) y BIOSTAT® RM (Sartorius), con escalas de cultivo desde 100 ml hasta 200 l.

Finalmente, otro diseño de SUBs son aquellos en los cuales la agitación se realiza en forma orbital; en este caso también al mover el biorreactor completo (evitando el *stress* mecánico sobre las células). Para este diseño del biorreactor, la transferencia de oxígeno al cultivo —que también ocurre a través de la interfase aire-líquido de la cámara superior— es apropiada, permitiendo alcanzar cultivos de elevada viabilidad. Esto se ha logrado con los reactores conocidos como *orbitally shaken bioreactors* (Anderlei *et al.*, 2009; Eisenkraetzer, 2014; Müller *et al.*, 2005) cultivation of mammalian cells in suspension is an essential prerequisite. Typically, suspension cultures are grown in glass spinner flasks filled to less than 50% of the nominal volume. We propose a superior system for suspension cultures of mammalian cells based on orbital shaker technology. We found that square-shaped bottles (square bottles. Una empresa que ha desarrollado este tipo de tecnología hasta escalas productivas es Kühner AG (Birsfelden, Suiza), que cuenta con los modelos SB10-X, SB50-X y SB200-X de 10 l, 50 l y 200 l, respectivamente. Estos biorreactores utilizan bolsas descartables diseñadas para tal fin, como, por ejemplo, las bolsas Cultibag® ORB de Sartorius.

7.4. CONCLUSIONES

En los últimos años ha aumentado significativamente la comprensión de los procesos y el conocimiento sobre la bioingeniería para el cultivo de células animales. Especialmente con la introducción de los sistemas de biorreactores de un solo uso, existen actualmente una gran variedad de sistemas de cultivo disponibles. Sin embargo, el sistema más empleado a escala de producción continúa siendo el cultivo en suspensión de las células recombinantes, empleando biorreactores homogéneos de agitación tipo tanque agitado, ya sea como un sistema completo de acero inoxidable o como un sistema híbrido de tanque de acero inoxidable combinado con bolsas de un único uso o como un sistema completamente desechable.

En cuanto al modo de operación, la mayoría de las empresas priorizan el cultivo *fed-batch* al cultivo continuo en perfusión. Actualmente, solo alrededor del 20 % de los biofármacos se producen empleando la perfusión en el *upstream processing* (Hernandez, 2015). Sin embargo, de acuerdo con lo descrito por Konstantinov (2014), cabe esperar que en el futuro las empresas

biofarmacéuticas también opten por los procesos continuos, ya que este cambio ha ocurrido invariablemente en el pasado para todas las demás ramas de la industria (petróleo, fundición de acero, vidrio, alimentos, pulpa de madera, etc.) por los numerosos beneficios que brinda. En los bioprocesos continuos también se pueden contar con numerosas ventajas (Konstantinov & Cooney, 2015), que incluyen una mayor consistencia en la calidad del producto, el uso de tamaños de equipos más reducidos, una productividad volumétrica elevada con un flujo de proceso optimizado y ciclos de proceso menores, y costos de capital y operación más reducidos.

Referencias bibliográficas

- AEHLE, M.; KUPRIJANOV, A.; SCHAEPE, S.; SIMUTIS, R. & LUBBERT, A.** (2011). Increasing batch-to-batch reproducibility of CHO cultures by robust open-loop control. *Cytotechnology*, 63:, 41–47. 10.1007/s10616-010-9320-y
- ALTAMIRANO, C., PAREDES, C., ILLANES, A., CAIRO, J. J. & GÒDIA, F.** (2004) Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110, 171–179. org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.004
- ALTAMIRANO, C., BERRÍOS, J. & VERGARA, M.** (2015). Nutrient Media for Cell Culture Technology. En Hauser, H. & Wagner, R. (Eds.), *Animal Cell Biotechnology* (pp. 368–388), Walter de Gruyter GmbH, Berlín, Alemania.
- AMGEN** (2005). BioNext Project: new Enbrel manufacturing plant. <https://www.pharmaceutical-technology.com/projects/westgreenwich/>
- ANDERLEI, T., CESANA, C., BÜRKI, C., DE JESUS, M., KÜHNER, M., WURM, F. & LOHSER, R.** (2009). Shaken Bioreactors Provide Culture Alternative. <https://www.genengnews.com/magazine/122/shaken-bioreactors-provide-culture-alternative/3092/>
- BAKHACH, J.** (2009). The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 5(3), 119–126. 10.4161/org.5.3.9583
- BECCARIA, A. J., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (1999). Optimization of a Perfused Stirred Tank Bioreactor Process for rhEPO Production. En Gavilondo, J. V., Ayala, M. & Acevedo, B. (Eds.), *Advances in Modern Biotechnology* (Vol. 17, pp. 1), Elfos Scientiae, Havana, Cuba.
- BECCARIA, A. J., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (2000). Desarrollo de una estrategia de producción de rhEPO en un biorreactor de agitación. *FABICIB*, 4, 87–101. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v4i1.646>
- BLÜML, G.** (2007). Microcarrier Cell Culture Technology. En Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols* (Vol. 24, Cap. 5, pp. 149–178), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. 10.1007/978-1-59745-399-8
- BOEDEKER, B.** (2013). Recombinant Factor VIII (Kogenate®) for the Treatment of Hemophilia A: The First and Only World-Wide Licensed Recombinant Protein Produced in High-Throughput Perfusion Culture. En Knäblein J. (Ed.), *Modern Biopharmaceuticals: Recent Success Stories* (pp. 429–443), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania. <https://doi.org/10.1002/9783527669417.ch19>
- BOLLATI-FOGOLÍN, M., WAGNER, R., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 109, 179–191. 10.1016/j.jbiotec.2003.10.035

- BOLLATI-FOGOLÍN, M., FORNO, G., NIMTZ, M., CONRADT, H. S., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnology Progress*, 21, 17–21. 10.1021/bp049825t
- CASTILHO, L. R. & MEDRONHO, R. A.** (2002). Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 74, 129–169. https://doi.org/10.1007/3-540-45736-4_7
- CASTILHO, L. R. & MEDRONHO, R. A.** (2008). Animal cell separation. En Castilho, L.R., Moraes, Â. M. & Augusto, E. F. P. (Eds.), *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Cap. 11, pp. 273–293), Taylor & Francis Group, Abingdon, Reino Unido. <https://doi.org/10.4324/9780203895160>
- CEAGLIO, N., BOLLATI-FOGOLÍN, M., OGGERO, M., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (2015). High Cell Density Cultivation Process. En Hauser, H. & Wagner, R. (Eds.), *Animal Cell Biotechnology* (pp. 427–454), Walter de Gruyter GmbH, Berlín, Alemania.
- CHEN, T. & CHEN, K.** (2009). Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. *International Journal of Biology*, 1(2), 41–47. 10.5539/ijb.v1n2p41
- CHICO VÉLIZ, E., RODRÍGUEZ, G. & FIGUERO CARDERO, A.** (2008). Bioreactor for animal cells. En Castilho, L. R., Moraes, Â. M. & Augusto, E. F. P. (Eds.), *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Cap. 9, pp. 221–258), Taylor & Francis Group, Abingdon, Reino Unido. <https://doi.org/10.4324/9780203895160>
- CHRISTEL, M.** (2017). Pharm Exec’s Top 50 Companies 2017. *Pharmaceutical Executive*, 37(6). www.pharmexec.com
- CHUPPA, S., TSAI, Y., YOON, S., SHACKLEFORD, S., ROZALES, C., BHAT, R., TSAI, G., MATANGUIHAN, C., KONSTANTINOV, K. & NAVEH, D.** (1997). Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 328–338. 10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<328::AID-BIT10>3.0.CO;2-D
- DAVIS, J. M.** (2007). Hollow Fiber Cell Culture. En Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols* (Vol. 24, Cap. 16, pp. 337–352), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. 10.1007/978-1-59745-399-8
- DEAN, J. & REDDY, P.** (2012). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 1735–1747. 10.1002/bit.24826.
- DE JESUS, M. & WURM, F. M.** (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 184–188. 10.1016/j.ejpb.2011.01.005
- DE WILDE, D., NOACK, U., KAHLERT, W., BARBAROUX, M. & GRELLER, G.** (2009). Bridging the gap from reusable to single-use manufacturing with stirred, single-use bioreactors. *BioProcess International*, 7, 36–41. <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/bridging-the-gap-from-reusable-to-single-use-manufacturing-with-stirred-single-use-bioreactors-184154/>

- DIDIER, C., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & GOICOECHEA, H. C.** (2007). Crossed mixture design and multiple response analysis for developing complex culture media used in recombinant protein production. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 86, 1–9. 10.1016/j.chemolab.2006.07.007
- DIDIER, C., FORNO, G., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & GOICOECHEA, H. C.** (2009). Novel chemometric strategy based on the application of artificial neural networks to crossed–mixture design for the improvement of recombinant protein production in continuous culture. *Analytica Chimica Acta*, 650, 167–174. 10.1016/j.aca.2009.07.051
- EISENKRAETZER, D.** (2014). Bioreactors for Animal Cell Culture. En Hauser, H. & Wagner, R. (Eds.), *Animal Cell Biotechnology* (pp. 389–426), Walter de Gruyter GmbH, Berlín, Alemania.
- ELIAS, C. B., CARPENTIER, E., DUROCHER, Y., BISSON, L., WAGNER, R. & KAMEN, A.** (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and Trichoplusia insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology Progress*, 19, 90–97. 10.1021/bp025572x
- FRESHNEY, R. I.** (1994). The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. En Freshney, R. I. (Ed.), *Culture of animal cells: a manual of basic technique* (pp. 71–103), Wiley–Liss, Inc., Nueva York, USA <https://doi.org/10.1002/jctb.280450414>
- GE HEALTHCARE BIO–SCIENCES AB** (2013). Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods. Uppsala, Suecia. www.gelifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2016/07/023.8_Microcarrier-Cell-Culture.pdf
- GOLSTEIN, A., MOLINA, O. & WONG, M.** (2017). Towards Flexible Single–use Biomanufacturing: Key Technologies Needed and Lessons Learned. *Repligen* (Waltham, Massachusetts, USA). <https://www.repligen.com/files/8314/9080/9455/2.Goldstein.pdf>
- HE, X.** (2011). Thermostability of Biological Systems: Fundamentals, Challenges, and Quantification. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 5, 47–73. 10.2174/1874120701105010047
- HENRY, O. & DUROCHER, Y.** (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK–293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic Engineering*, 13, 499–507. 10.1016/j.ymben.2011.05.004
- HERNÁNDEZ, L. Y., CASTRO, D., VITÓN, P., PÉREZ, O. & RODRÍGUEZ, M.** (2009). Modelación de la cinética de crecimiento del cultivo en perfusión de células de mamíferos. *Biotecnología Aplicada*, 26, 226–231. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522009000300006
- HERNANDEZ, R.** (2015). Continuous Manufacturing: A Changing Processing Paradigm. *BioPharm International*, 28(4), 20–27. <http://www.biopharminternational.com/continuous-manufacturing-changing-processing-paradigm>
- HUANG, Y.–M., HU, W. W., RUSTANDI, E., CHANG, K., YUSUF–MAKAGIANSAR, H. & RYLL, T.** (2010). Maximizing productivity of CHO cell–based fed–batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1400–1410. 10.1002/btpr.436

- HÜBNER, H.** (2007). Cell Encapsulation. En Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols* (Vol. 24, Cap. 6, pp. 179–191), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. 10.1007/978-1-59745-399-8
- IRANI, N., WIRTH, M., VAN DEN HEUVEL, J. & WAGNER, R.** (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 238–246. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:4<238::AID-BIT5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:4<238::AID-BIT5>3.0.CO;2-6)
- IRANI, N., BECCARIA, A. J. & WAGNER, R.** (2002). Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology*, 93, 269–282. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00409-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00409-6)
- JÄGER, V.** (1991). Serum-free media suitable for upstream and downstream processing. En: Spier, R.E., Griffiths, J.B. & Meignier, B. (Eds.), *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture* (pp. 155–166), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, Gran Bretaña. 10.1007/978-94-011-0257-5
- KIM, S. & LEE, G.** (2009). Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 639–648. 10.1007/s00253-009-1903-1
- KLÖCKNER, W., DIEDERICHS, S. & BÜCHS, J.** (2014). Orbitally Shaken Single-Use Bioreactors. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 138, 45–60. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45158-4>
- KONSTANTINOV, K. B.** (2014, diciembre). *Towards Integrated Continuous Bioprocessing for the Production of Therapeutic Proteins*. Conferencia inaugural presentada en el Tercer Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO 2014). Forno, G., Trombert, A. & Kratje, R. (Orgs.), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.
- KONSTANTINOV, K. B. & COONEY, C. L.** (2015). White paper on continuous bioprocessing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(3), 813–820. <https://doi.org/10.1002/jps.24268>
- KRATJE, R. & WAGNER, R.** (1992). Evaluation of production of recombinant human interleukin-2 in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 233–242. <https://doi.org/10.1002/bit.260390216>
- KRATJE, R., REINMANN, A., HAMMER, J. & WAGNER, R.** (1994). Cultivation of Recombinant Baby Hamster Kidney Cells in a Fluidized Bed Bioreactor System with Porous Borosilicate Glass. *Biotechnology Progress*, 10, 410–420. 10.1021/bp00028a011
- LADOUX, B. & MÈGE, R.-M.** (2017). Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 743–757. 10.1038/nrm.2017.98
- LEIST, C. H., MEYER, H.-P. & FIECHTER, A.** (1990). Potential and problems of animal cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*, 15(1–2), 1–46. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90049-H](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90049-H)

- MÜLLER, N., GIRARD, P., HACKER, D. L., JORDAN, M., WURM, F. M.** (2005). Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 400–406. 10.1002/bit.20358
- PEI, D., XU, J., ZHUANG, Q., TSE, H.-F. & ESTEBAN, M.** (2010). Induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine and biology. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 123, 127–141. 10.1007/10_2010_72
- PEREIRA BACCI, D., PEROTTI, N., ETCHEVERRIGARAY, M. & KRATJE, R.** (1999). Evaluation of rhEPO production in Nunc™ cell factories. En Gavilondo, J. V., Ayala, M. & Acevedo, B. (Eds.), *Advances in Modern Biotechnology* (Vol. 17, pp. 41), Elfos Scientiae, Havana, Cuba.
- POLLARD, D. & KISTLER, C.** (2017). Disposable Bioreactors. En Larroche, C., Sanroman, M.A. & Guocheng Du, G. (Eds). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls* (pp. 353–379), Elsevier B.V., Amsterdam, Países Bajos. 10.1016/B978-0-444-63663-8.00012-4
- PÖRTNER, R. & PLATAS BARRADAS, O. B. J.** (2007). Cultivation of Mammalian Cells in Fixed-Bed Reactors. En Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols* (Vol. 24, Cap. 17, pp. 353–369), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. 10.1007/978-1-59745-399-8
- PUGACHEVA, E. N., ROEGIERS, F. & GOLEMIS, E. A.** (2006). Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(5), 07–515. 10.1016/j.ceb.2006.08.014
- SCHRÖDER, M., MATISCHAK, K. & FRIEDL, P.** (2004). Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *Journal of Biotechnology*, 108, 279–292. 10.1016/j.jbiotec.2003.12.005
- SENGER, R. S. & KARIM, M. N.** (2007). Optimization of fed-batch parameters and harvest time of CHO cell cultures for a glycosylated product with multiple mechanisms of inactivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 378–390. 10.1002/bit.21428
- SEYMOUR, P. & ECKER, D. M.** (2017). *Global Biomanufacturing Trends, Capacity, and Technology Drivers: Industry Biomanufacturing Capacity Overview*. www.americanpharmaceuticalreview.com
- SINACORE, M. S., DRAPEAU, D. & ADAMSON, S. R.** (2000). Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Molecular Biotechnology*, 15(3), 249–257. 10.1385/MB:15:3:249
- SPIER, R. E.** (1985). Monolayer Growth Systems: Heterogeneous Unit Processes. En: Spier, R. E. & Griffiths, J. B. (Eds.), *Animal Cell Biotechnology* (Vol. 1, pp. 243–263), Academic Press Ltd., Londres, Gran Bretaña. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00213-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00213-X)
- STACEY, G.** (2004). Fundamental Issues for Cell-Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs. En Fuller, B. J., Lane, N. & Benson, E. E. (Eds.), *Life in the Frozen State* (pp. 437–452), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- TRUJILLO-ROLDÁN, M. A. & VALDEZ-CRUZ, N. A.** (2009). The Use of Disposable Bioreactors in the Biopharmaceutical Industry and Its Implications on Engineering. *Revista de Ingeniería Dyna*, 76, 275–283. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49612069027>

- TYO, M. A. & SPIER, R. E.** (1987). Dense cultures of animal cells at the industrial scale. *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 514–520. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90079-2)
- VOISARD, D., MEUWLY, F., RUFFIEUX, P. A., BAER, G. & KADOURI, A.** (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 751–765. [10.1002/bit.10629](https://doi.org/10.1002/bit.10629)
- WALSH, G.** (2018). Biopharmaceuticals benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136–1145. [10.1038/nbt.4305](https://doi.org/10.1038/nbt.4305)
- WOODSIDE, S. M., BOWEN, B. D. & PIRET, J. M.** (1998). Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. *Cytotechnology*, 28, 163–175. [10.1023/A:1008050202561](https://doi.org/10.1023/A:1008050202561)
- WURM, F. M.** (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 1393–1398. [10.1038/nbt1026](https://doi.org/10.1038/nbt1026)
- YOON, S. K., SONG, Y. L. & LEE G. M.** (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 289–298. [10.1002/bit.10566](https://doi.org/10.1002/bit.10566)
- YOON, S. K., KIM, S. H. & LEE, G. M.** (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of Anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 19, 1383–1386. [10.1021/bp034051m](https://doi.org/10.1021/bp034051m)

8

Producción a gran escala de glicoproteínas terapéuticas: *Downstream processing*

IGNACIO AMADEO

8.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la fabricación de glicoproteínas (GP) con fines terapéuticos utiliza típicamente células genéticamente modificadas como fuente productora, las cuales son cultivadas generalmente en biorreactores utilizando un medio de cultivo apropiado. Si bien existen otras fuentes para su obtención como el plasma humano y los animales o plantas transgénicos, el objetivo de este capítulo apunta al estudio y descripción de todas las etapas que se encuentran «aguas abajo» una vez que se dispone de la GP obtenida por cultivo celular.

Mientras que lo que se conoce en inglés como *Upstream Processing* (USP) hace referencia al proceso que genera las proteínas glicosiladas crudas a partir del cultivo de células modificadas genéticamente, lo que se describe como *Downstream Processing* (DSP), es lo que define el producto final.

El DSP hace referencia a todas las etapas de recuperación y purificación del producto, incluyendo la evaluación del control de calidad, la estabilidad de los diferentes intermediarios y del producto final. Se trata, por lo tanto, de una secuencia de operaciones unitarias diversas que posibilita el aislamiento de un único «tipo de proteína» a partir de una mezcla compleja, en la cual no solo se encuentran otras proteínas sino macromoléculas de diferente naturaleza fisicoquímica como por ejemplo ADN, endotoxinas, lípidos y material particulado de diferentes tamaños. Durante estas etapas se van removiendo contaminantes críticos, y se van introduciendo otros componentes que colaboran en la propia purificación. Por esta razón, los métodos utilizados en el DSP son cruciales para la seguridad del producto y, en la industria, las áreas para ejecutar dichas tareas deben tener una calidad de aire superior a la empleada para el USP (10 000 versus 100 000). Para proteínas recombinantes de uso terapéutico en humanos, el grado de pureza debe alcanzar y/o exceder frecuentemente el 99 % (P/P), y algunas impurezas particulares como el ADN o las endotoxinas suelen presentar un límite superior permitido en el rango de ppm (Niazi, 2006).

Diferentes análisis económicos estiman que el costo del DSP a nivel de planta productora puede alcanzar hasta el 80 % del costo global de manufactura (Ramakrishnan *et al.*, 2000).

8.2. ABORDAJES PARA EL DESARROLLO DEL DSP

Es posible distinguir dos abordajes para realizar el desarrollo del DSP, los métodos que no emplean algoritmos (no algorítmicos) y aquellos que si lo utilizan (métodos algorítmicos). Los primeros incluyen los métodos heurísticos (empíricos), los cuales constituyen un conjunto de reglas metodológicas no necesariamente forzosas que sugieren o establecen como proceder y que problemas evitar, mientras que los segundos emplean modelos matemáticos y simulaciones en software especializados.

Ambos enfoques implican la ejecución de experimentos, en mayor número para los métodos no algorítmicos (Nfor *et al.*, 2009). En este capítulo nos referiremos exclusivamente a los primeros.

8.2.1. Métodos heurísticos

Los métodos heurísticos se basan en el uso del conocimiento previo de los procesos, normalmente sistematizados en forma de «reglas generales», muy útiles para diseñar el DSP. A continuación se enumera una serie de reglas generales a ser tenidas en cuenta para desarrollar un proceso de purificación: (1) conocer las propiedades de la GP de interés (lo cual incluye su perfil de estabilidad y los diversos factores que pueden alterar su estructura 3D) y de las impurezas críticas a fin de simplificar la selección y optimización de las etapas del proceso; (2) desarrollar métodos analíticos para la detección de la GP de interés y también para las impurezas críticas; (3) reducir al mínimo etapas de cambio de buffer, las cuales al no añadir en general un grado de purificación proteico podrían desnaturalizar la GP a purificar; (4) minimizar el uso de aditivos, ya que deberán ser removidos en las etapas subsiguientes; (5) eliminar las impurezas críticas (proteasas) en las etapas iniciales; (6) introducir métodos que utilicen diferentes principios fisicoquímicos para la separación; (7) reducir al máximo el número de etapas porque disminuye el rendimiento global y prolonga el tiempo del proceso y (8) combinar las diferentes etapas de manera de reducir la necesidad de tener que acondicionar la muestra entre una etapa y la siguiente. El diseño debe ser lo más simple posible (Grasselli, 2005).

8.2.2. Abordaje experimental

Para desarrollar un proceso de purificación completo es necesario realizar un gran número de experimentos. Tradicionalmente estos se llevaban a cabo a escala de laboratorio, y sobre la base de prueba y error. Como resultado se requerían cantidades significativas de material y se ensayaban pocas opciones o condiciones del proceso.

Dada la intensa presión que existe en la industria para que el desarrollo del proceso sea lo más rápido posible se han desarrollado métodos para monitorear condiciones a gran velocidad (HTS: *High Throughput Screening*). Las grandes compañías biofarmacéuticas (Amgen, Wyeth, Merck-Serono) combinan la miniaturización de los experimentos con tecnología robótica a fin de reducir costos y tiempo (Nfor et al, 2009). Estos métodos permiten realizar un gran número de experimentos en una escala muy pequeña y utilizando cantidades mínimas de material. Además, se pueden combinar con experimentos diseñados estadísticamente (Diseño de Experimentos, DoE) para reducir el número de ensayos de *screening*. Un diseño de experimentos es una serie de corridas en las cuales se realizan cambios intencionales y simultáneos en las variables de entrada (factores) en uno o más niveles y se analizan el efecto que estos tienen sobre la salida (respuesta). La ventaja que tiene este enfoque es que permite conocer si existe interacción entre los factores, las cuales suelen ser muy frecuentes y no suelen ser detectadas con el método tradicional de variar un factor a la vez. El DoE contempla una amplia variedad de estrategias experimentales dentro de las cuales tenemos el diseño factorial completo, diseño factorial fraccionado y diseños superficie de respuesta. Al utilizar DoE, se requiere un número de experimentos relativamente bajo para determinar la influencia de diversos parámetros y para identificar los más significativos.

El mayor desafío que presentan los métodos de elevada velocidad (HTS) y los DoE es el manejo y análisis del gran número de muestras y datos experimentales que se generan.

8.2.3. Utilización de plataformas de purificación (para GP con etiqueta)

Una vez que un proceso de purificación económicamente viable ha sido desarrollado para un dado producto proteico, el mismo podría ser utilizado como plataforma tecnológica o templado para intentar el DSP de otro producto que se encuentre dentro de la misma categoría, aprovechando su similitud fisicoquímica. El ejemplo típico lo constituyen los anticuerpos monoclonales (mAbs) y las proteínas de fusión con la fracción cristalizable (Fc) de una inmunoglobulina (Ig) humana, los cuales contienen por lo menos dos etapas cromatográficas, la cual incluye la cromatografía de afinidad a proteína A (CAPA) como etapa de captura y al menos dos etapas ortogonales para realizar el pulido y asegurar la remoción de posibles partículas virales. La Figura 8. 1 muestra una plataforma de purificación propuesta para mAbs y proteínas de fusión con la fracción Fc (Shukla *et al.*, 2007).

Este concepto surgió debido al gran crecimiento que se produjo en los últimos años en el mercado global de mAbs, lo cual transformó a estos en el tipo de producto dominante dentro del campo biofarmacéutico. Esto indujo una competencia entre las diferentes compañías productoras que aceleraron

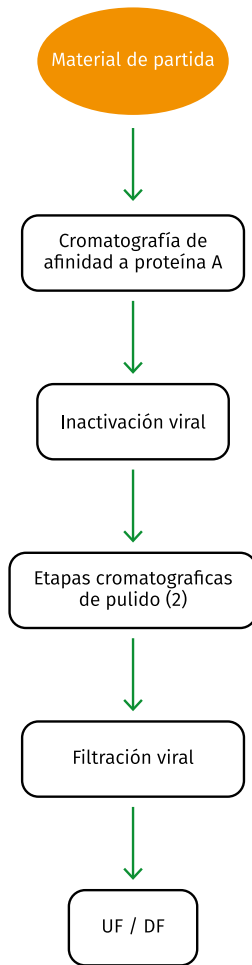


FIGURA 8.1. PLATAFORMA DE PURIFICACIÓN PROPUESTA PARA MABS

sus desarrollos. Entre las ventajas de utilizar este abordaje de plataforma se incluyen ahorros en tiempo y esfuerzo, flexibilidad durante el desarrollo, una mayor armonización de prácticas entre los diferentes sitios de una compañía biotecnológica y sobre todo una definición temprana de lo que será el proceso comercial.

Dado que la cascada de purificación suele ser más o menos fija (aunque no rígida), el trabajo de optimización incluye el mejoramiento de las etapas individuales. La plataforma de purificación de mAbs ha ido evolucionando en la última década incorporando resinas de afinidad a proteína A con mayor capacidad dinámica, ligandos recombinantes que presentan resistencia a soluciones alcalinas (NaOH) para el CIP (*cleaning in place*). Por otra parte, se ha incorporado la cromatografía en membrana para la segunda o tercera etapa.

8.3. ESTRATEGIAS DE PURIFICACIÓN PARA GP SIN ETIQUETA

Mientras que los mAbs, los anticuerpos policlonales (pAbs) y las proteínas con etiquetas o marcas de afinidad pueden ser capturados utilizando protocolos de cromatografía de afinidad (CA), las proteínas sin etiqueta requieren protocolos de purificación de múltiples pasos. En general, estos últimos casos corresponden a glicoproteínas provenientes de fuentes naturales o cultivos que las producen sin una etiqueta, ya sea porque esta interfiere con su función, su plegamiento o por cuestiones regulatorias relacionadas a la aprobación para su uso comercial.

8.3.1. Estrategia de tres etapas

Dado que las proteínas en su estado nativo presentan conformaciones específicas responsables de la función biológica de la macromolécula, dicha estructura debe mantenerse durante todo el procedimiento de purificación a fin de obtener un rendimiento razonable del producto. Dada la complejidad de las GP y de los materiales de partida, en la mayoría de los casos son necesarios varios pasos para obtener un producto altamente purificado y homogéneo. El desarrollo de una estrategia de purificación es un proceso que lleva mucho tiempo y contiene pasos secuenciales que se deben sincronizar, a fin de reducir o evitar operaciones intermedias de acondicionamiento. Con el

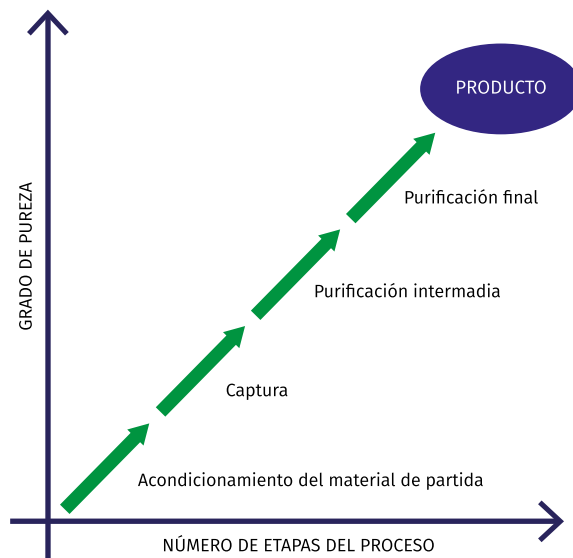


FIGURA 8.2. ETAPAS DE LA ESTRATEGIA CPIYP

objeto de simplificar este desarrollo, en los últimos años se ha popularizado la estrategia de purificación global conocida como Captura, Purificación intermedia y Purificación final o Pulido (CPIYP), ver Figura 8.2. Cada una de estas etapas puede tener una o más operaciones unitarias, las cuales pueden ser tanto cromatográficas como no cromatográficas. Otra de sus características es que cada etapa procesa un material de partida llamado genéricamente intermediario ($n-1$) y genera un nuevo intermediario (n), con mayor grado de pureza, que se transforma en el intermediario de partida para la siguiente etapa (Hagel *et al.*, 2008).

Esta estrategia ofrece directrices acerca de cómo combinar los métodos de purificación de la mejor manera para alcanzar los objetivos fijados. Es necesario aclarar que esta estrategia no significa que necesariamente todos los protocolos deben tener estas tres etapas. El proceso finaliza con el acondicionamiento final / formulación y, en algunos casos, con la liofilización del producto.

A continuación, se describen las características de cada uno de los pasos indicados en la Figura 8.2.

8.3.1.1. Acondicionamiento de la muestra

La preparación o acondicionamiento del material de partida es el punto inicial de la estrategia de purificación. El propósito de esta etapa inicial es la obtención de una solución clarificada en donde la proteína a purificar se encuentre solubilizada y estabilizada.

Si el paso de captura es un método cromatográfico convencional, es condición *sine qua non* que dicha solución no contenga material particulado (a menos que se emplee la tecnología de lecho expandido), puesto que los mismos pueden obstruir la resina cromatográfica al bloquear los espacios muertos entre las partículas.

Esta preparación o acondicionamiento de la muestra se suele realizar no solo con el material de partida de la purificación sino antes del comienzo de cada operación unitaria con el objeto de que la muestra que sale de una etapa (intermediario n) pueda ingresar a la siguiente en las condiciones apropiadas para la misma. La Tabla 8.1 resume diferentes técnicas utilizadas para acondicionar los intermediarios.

8.3.1.2. Etapa de captura

El objetivo principal de la fase de captura es aislar lo más rápidamente posible la GP de interés de contaminantes críticos como proteasas, glicosidasas, concentrarla y transferirla a un entorno que le permita conservar la potencia o actividad biológica, esto es estabilizarla. La concentración del

TABLA 8.1. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ACONDICIONAR LA MUESTRA PARA DIFERENTES OPERACIONES UNITARIAS

Técnica	Comentarios
Filtración	Para remover material particulado y coloides. La muestra debe atravesar un filtro compatible de 0,45 μm antes de ser aplicada en una columna cromatográfica. La filtración debe realizarse inmediatamente antes de la cromatografía debido a que se puede producir precipitación o cambio de viscosidad con el tiempo. Estas etapas tienen que ser validadas de manera apropiada.
Centrifugación / microfiltración	Para remover células, restos celulares o material particulado.
Dilución	Para reducir la conductividad o viscosidad (siempre que el volumen de muestra no sea excesivamente grande).
Ultrafiltración (UF)	Para realizar el cambio de buffer o concentrar la muestra.
Precipitación	Utilizado como etapa de separación grosera y concentración.
Auxiliares del procesamiento	Normalmente son componentes agregados de manera intermitente (en modo <i>batch</i>) a intermedios crudos a fin de remover material particulado y compuestos hidrofóbicos.
Añadir DNAsa	Para degradar fragmentos de ADN y ARN y reducir la viscosidad.

producto implica reducir significativamente los volúmenes, lo cual redundará en un gran ahorro en resina cromatográfica y soluciones buffer de las etapas subsiguientes.

En este estadio se vuelve especialmente importante disponer de una elevada velocidad de procesamiento a fin de acotar los tiempos de proceso. El tiempo de procesamiento es un factor crítico puesto que los sobrenadantes de cultivo y los homogenatos de células crudas contienen proteasas y glicosidas que al actuar sobre sus sustratos reducen la recuperación del producto y generan productos de degradación que pueden resultar muy difíciles de remover posteriormente.

Para alcanzar este fin se trabaja con resinas que permitan flujos rápidos y elevada capacidad de carga dinámica. Las condiciones de trabajo se deben seleccionar de manera de inducir la adsorción de la proteína de interés y evitar al máximo la unión de impurezas. De este modo, se maximiza la capacidad de unión de la proteína de interés a la resina. Al producirse la adsorción se reduce la probabilidad de interacción entre las proteasas y los enlaces intramoleculares susceptibles de la proteína blanco. La maximización de la

velocidad y la capacidad se hará a expensas de la resolución. No obstante, a menudo, es posible lograr una resolución considerable, debido a que muchos de los componentes del material de partida tendrán diferencias fisicoquímicas notables con la GP de interés. La elución se suele realizar mediante un salto, obteniéndose una solución conteniendo GP concentrada con un grado de purificación moderado.

La baja conductividad de la mayoría de los caldos de cultivo u homogenatos celulares hace que las proteínas puedan ser adsorbidas empleando CA, intercambio iónico o modo mixto en la mayoría de los casos.

8.3.1.3. Etapa de purificación intermedia

El objetivo principal es remover la mayor cantidad de impurezas mayoritarias, fundamentalmente otras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas y, eventualmente, partículas virales. Dependiendo de las características del material de partida y de cuan eficiente fue la etapa de captura, esta etapa intermedia podría eliminarse.

En esta etapa, la velocidad deja de ser un factor crítico, debido a que ya se removieron factores destructivos del producto, y a que el volumen de muestra fue reducido en la etapa anterior. En cambio, la capacidad sigue siendo un factor importante, porque puede haber cantidades significativas de impurezas que disminuyan la misma. La selectividad también es importante y a diferencia de la fase de captura en donde se consigue durante la adsorción, acá se alcanza optimizando las condiciones de elución cromatográfica (por ejemplo, elución en gradiente). Esto permite obtener una buena resolución.

El resultado final es la presencia de impurezas en cantidades mínimas (5–15 % del total de proteínas), o sustancias estrechamente relacionadas con la GP de interés que pueden ser variantes estructurales de la misma.

8.3.1.4. Etapa de purificación final

El objetivo de esta es doble; por un lado, obtener el producto final en el nivel de pureza requerido removiendo trazas de impureza y, por otro, acondicionar la GP purificada para su uso inmediato o almacenamiento. En general, el intermediario que llega a la etapa de purificación final contiene solamente trazas de impurezas y muy probablemente GP que han sido modificadas durante el procedimiento de purificación (especies oxidadas, deamidadas o agregadas). Los agregados de mayor PM han adquirido mayor importancia en los últimos años debido a su asociación con una mayor inmunogenicidad del producto. En otros casos, los contaminantes son variantes estructurales con microheterogeneidades de la GP de interés, como por ejemplo, variantes con diferentes patrones de glicosilación o truncadas (ya sea por una biosíntesis deficiente o por el efecto de proteasas durante el proceso).

Debido a lo expuesto previamente el método de separación debe ser capaz de discriminar estos contaminantes, por lo cual se coloca el énfasis en la

resolución, e incluso puede ser necesario sacrificar la recuperación en aras de mejorar el grado de pureza. Las pérdidas de muestra en esta etapa son más costosas que en etapas previas, por lo cual se torna necesario escoger un método que ofrezca la mayor recuperación posible.

Al finalizar esta etapa puede haber ajustes de condiciones (concentración, pH, aditivos estabilizantes) que permitirán la utilización final del producto o su almacenamiento en condiciones óptimas de estabilidad.

8.3.2. Consideraciones de estabilidad

Dado que las proteínas tienen estructuras 3D únicas que mantienen su conformación por fuerzas relativamente débiles (Van der Waals, iónicas, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno), los cambios del medio que tienen lugar durante los acondicionamientos o diferentes etapas del procesamiento pueden desestabilizar estas fuerzas y provocar la desnaturalización

TABLA 8.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA Y SUS EFECTOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA

Parámetro	Comentarios
Concentración	Concentraciones demasiado bajas pueden limitar la capacidad de equilibrio en cromatografías de naturaleza adsorptiva.
Conductividad	La fuerza iónica afecta la solubilidad de la proteína y su unión a intercambiadores iónicos. Puede ocurrir precipitación muy lenta en el tiempo, que transforma gradualmente una solución límpida en otra que bloquea los filtros, por ejemplo.
Tiempos de espera	La estabilidad de la muestra es función del tiempo. Puede haber diferencias en los tiempos de espera entre la escala de laboratorio y piloto.
pH	Afectará la solubilidad de la GP, su estabilidad y su habilidad para unirse a intercambiadores iónicos. El pH también influye el potencial redox de la solución.
Potencial redox	Influye la estabilidad de los puentes disulfuro. En condiciones reductoras, los enlaces disulfuro se abren, resultando en la aparición de grupos tioles libres. El potencial redox es función del pH.
Temperatura	Influye el pH, la fuerza iónica y el potencial redox. La estabilidad de la proteína es función de la temperatura. Las enzimas proteolíticas son menos activas a bajas temperaturas.
Viscosidad	Las muestras viscosas presentan dificultades para ser filtradas y aplicadas en columnas cromatográficas.
Volumen	A medida que aumenta la escala, el incremento de volúmenes torna necesario una logística particular para su manejo adecuado.

y precipitación. Por esta razón, es importante comprobar los límites de estabilidad de la GP de interés. En general, las proteínas son más inestables a medida que se encuentran con mayor grado de pureza.

La Tabla 8. 2 resume los efectos potenciales de algunos parámetros del proceso sobre la estabilidad proteica.

Un buen plan para la evaluación de la estabilidad en diferentes condiciones debería incluir: (1) estabilidad en diferentes condiciones de pH entre 2 y 10 en pasos de 1 unidad; (2) estabilidad a la fuerza iónica: entre 0 y 2 M NaCl y 0 a 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en pasos de 0,5 M; (3) estabilidad en presencia de solventes orgánicos como ACN y etanol entre 0 y 50 % en pasos de 10 %; (4) estabilidad a diferentes temperaturas de conservación y (5) estabilidad y proteólisis a temperatura ambiente. Lo óptimo para evaluar todo esto de manera conjunta es realizar un diseño factorial (Grasselli, 2015).

TABLA 8.3. COSOLVENTES E IMPUREZAS QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LOS INTERMEDIARIOS DURANTE LA PURIFICACIÓN

Cosolventes e impurezas	Comentarios
Restos celulares	Incrementa la presión de la columna y bloquea los filtros.
Ácidos nucleicos (ADN, ARN)	Incrementa la viscosidad.
Enzimas	Las proteasas pueden degradar la GP de interés y las sialidasas remover el ácido siálico terminal de la fracción oligosacárida.
Sales	Incrementan la conductividad (fuerza iónica) de la solución, lo cual podría producir tanto el efecto de <i>salting-in</i> como <i>salting-out</i> . Afecta significativamente la cromatografía de afinidad (CA), intercambio iónico (CII) e interacción hidrofóbica (CIH).
Detergentes no iónicos	Afectan la CA, CIH y la Cromatografía de fase reversa (CFR). Se unen fuertemente a la GP.
Detergentes iónicos	Afecta la CII, CIH, CFR y la CA. Se une fuertemente a la GP.
Detergentes zwitterónicos	Afecta la CII, CIH, CFR y la CA. Se une fuertemente a la GP.
Solventes orgánicos	Pueden causar precipitación. Afecta la CIH y la CFR. Volúmenes grandes requieren disponer de sitios de almacenamiento a prueba de explosiones.
Agentes antiespuma	Son utilizados durante la fermentación para reducir la formación de espuma. Son componentes de naturaleza hidrofóbica que se unen a matrices hidrofóbicas.
Carbohidratos	Raramente afectan las etapas de purificación.
Lípidos / Lipoproteínas	Presentan naturaleza hidrofóbica. Pueden afectar todos los modos cromatográficos debido a su unión irreversible a la matriz.
Compuestos coloreados	Con elevada frecuencia se unen irreversiblemente a las matrices cromatográficas.

Este conocimiento es de una enorme importancia ya que las condiciones de cada etapa (captura, intermedia y pulido) deben seleccionarse en la ventana de estabilidad de la proteína y en condiciones que sean compatibles con cada técnica separativa, sea esta cromatográfica o no cromatográfica.

Por otra parte, también se debe considerar que la estabilidad de la GP a purificar puede ser afectada por la presencia de cosolventes y otras impurezas (Tabla 8.3).

8.4. IDONEIDAD DEL SISTEMA (SYSTEM SUITABILITY)

La limpieza es un paso fundamental y obligatorio de cualquier proceso farmacéutico que garantiza la calidad de los productos fabricados. Incluye todas las operaciones para remover residuos visibles o microscópicos hasta un límite preestablecido y aceptable. En la industria farmacéutica se utilizan tres tipos de limpieza: manual, semiautomática o totalmente automática contando cada una con ventajas y desventajas. Actualmente hay una tendencia a reducir al mínimo la intervención humana para superar la falta de reproducibilidad de la limpieza manual. Existen dos tipos de limpiezas automáticas, CIP (*Clean in Place* o limpieza «in situ») y COP (*Clean out Place* o limpieza fuera de lugar). El primero utiliza soluciones conteniendo agentes de limpieza que se introducen en el equipamiento de modo automático sin necesidad de desmontar cada una de sus partes. El COP consiste en sacar los elementos de un equipo y llevarlos a cuartos de lavado, donde un tanque lleva a cabo la limpieza de los mismos por ciclos, utilizando diferentes soluciones de limpieza. La FDA (1998) recomienda el uso de CIP para limpiar equipos y tanques de almacenamiento con el fin de reproducir exactamente el mismo procedimiento cada vez. Dada la naturaleza del material de partida para el DSP (sobrenadante de cultivo crudo), se vuelve particularmente importante controlar la contaminación microbiana y disponer de métodos que permitan realizar una sanitización, es decir una reducción de la población microbiana global (*bioburden*) luego de cada ciclo operativo.

Por esta razón, poder realizar tanto el CIP como la sanitización del equipamiento en donde se llevan a cabo las operaciones unitarias (cromatógrafos, columnas, detectores en línea, etc.) es clave en el diseño de procedimientos de purificación de GP terapéuticas a escala industrial.

El NaOH es un agente ampliamente utilizado tanto para la limpieza como la sanitización de resinas cromatográficas y sistemas asociados. Como agente de limpieza ha demostrado ser muy efectivo para remover proteínas y ácidos nucleicos (ya que saponifica las grasas y disuelve las proteínas precipitadas gracias a su poder hidrolizante, el cual se incrementa en presencia de iones cloruro). Como agente de sanitización tiene el poder de inactivar la mayoría de las bacterias, virus, levaduras, hongos y endotoxinas siendo este proceso

dependiente de su concentración, del tiempo de contacto y de la temperatura. Por estas razones, en la industria es una práctica habitual añadir NaCl a soluciones de NaOH para combinar limpieza con sanitización. El NaOH presenta la ventaja de ser eficaz, tener bajo costo, facilidad de detección, remoción y disposición final. Por supuesto que como cualquier otro agente se debe asegurar previamente la compatibilidad con los sistemas y las resinas utilizadas (GE Healthcare, 2014).

La limpieza de las columnas cromatográficas es particularmente difícil debido a la incapacidad para alcanzar las velocidades lineales recomendadas para poder limpiarlas de un modo eficiente. Consecuentemente, el diseño mecánico de la columna juega un rol importante en la facilidad para su limpieza posterior. La geometría de flujo y la configuración de los sellos deben evitar que haya porciones de líquido que permanezcan estáticos durante la operación normal. Todas las áreas de la columna tienen que ser barridas con velocidad suficiente y también consistente para asegurar una limpieza y sanitización efectiva. Se debe trabajar con columnas que posean una certificación del fabricante que declare que la misma es «sanitizable» y que las autoridades regulatorias acepten esta declaración. Dichas columnas son diseñadas para distribuir la fase móvil de manera uniforme a través del lecho empaquetado (tanto en el pistón como en la parte inferior), y evitar zonas líquidas estancadas. Presentan diseño sanitario, lo cual permite que puedan ser limpiadas y sanitizadas fácilmente siguiendo las guías de la FDA que utilizan protocolos típicos con soluciones de NaOH (Niazi, 2006).

8.5. DEPURACIÓN (CLEARANCE) DE PARTÍCULAS VIRALES

Los cultivos de células eucariotas y los mAbs derivados de hibridomas presentan el riesgo de contaminación con partículas retrovirales o virus adventicios. Por esta razón, un requerimiento crítico para la liberación y comercialización de productos biotecnológicos y biológicos es el perfil de seguridad viral; en este sentido la ausencia de virus (o para ser más preciso su no detección) es determinante para las agencias regulatorias internacionales incluyendo a la FDA y la EMA. Como principal referencia se encuentra la guía Q5A, publicada por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) en 1997, donde se establecen los requerimientos mínimos para reducir el riesgo de contaminación viral en productos biotecnológicos (ICH Topic Q5A).

La contaminación viral puede provenir del material de partida para el DSP (cosecha cruda), o ser introducido durante el proceso a partir de algún insumo / error humano. En el primer caso se habla de virus relevantes, mientras que en el segundo de una contaminación adventicia. Es por esto, que la regulación actual requiere que además de las acciones preventivas (como caracterización del banco celular maestro, monitoreo de ciertos insumos

críticos, uso de materias primas de origen no animal, procedimiento de finales de producción, etc.) se demuestre la capacidad del procedimiento de purificación para depurar partículas virales que son objeto de preocupación para ese producto en particular. Los métodos aceptados para la depuración de partículas virales son la inactivación y la remoción; la inactivación viral es la pérdida irreversible de capacidad infectiva mientras que la remoción es la reducción en el número de partículas virales.

Dada las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los virus y su reactividad *in vitro* es difícil adoptar métodos generales para la depuración de partículas virales. Sin embargo, esta puede ser lograda por la acción de diferentes etapas que ya forman parte del proceso de purificación o por la introducción deliberada de etapas adicionales con capacidad para inactivar/ remover dichas partículas. La Tabla 8.4 enumera las tecnologías disponibles para realizar la depuración de eventuales partículas virales.

Dentro de las tecnologías que ya forman parte del DSP, se encuentran las etapas cromatográficas (la mayoría de los procesos tiene 2 o 3), las cuales en general poseen un elevado poder de remoción. Tanto la cápside de partículas virales desnudas como la membrana de partículas envueltas están constituidas por diferentes proteínas, por lo cual, la partícula viral podría comportarse como cualquier otra proteína presente en la muestra a ser purificada. Sin embargo, dada las grandes diferencias entre las partículas virales, no se puede confiar exclusivamente en estos métodos para removerlas de manera

TABLA 8.4. TECNOLOGÍAS HABITUALES PARA ASEGURAR DEPURACIÓN DE EVENTUALES PARTÍCULAS VIRALES*

Métodos de inactivación		Métodos de remoción	
<i>Métodos químicos</i>	pH ácido (< 3,8)	<i>Precipitación</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , ácido caprílico, etc.
	Acción de solventes (S), detergentes (D) o combinados (S/D)		
			<i>Cromatografía</i>
		<i>Filtros</i>	VireSolve® Pro (Millipore), DV20 (Pall), Planova™ (Asahi Kasei)
<i>Métodos físicos</i>	Luz UV-C, 254 nm (tecnología UVivatec®)		

*SE INDICAN SOLO AQUELLAS APTAS PARA SU EMPLEO EN EL DSP

definitiva. Se ha observado que el grado de reducción es dependiente del tipo de resina (modo cromatográfico), de las condiciones utilizadas durante la separación, y de las características del producto a purificar. Normalmente, los intercambiadores aniónicos son muy efectivos para remover partículas virales trabajando en el modo *flowthrough* o unión/elución. Otro aspecto en donde las autoridades regulatorias han puesto el foco es demostrar que un proceso cromatográfico continua siendo eficiente para remover partículas virales conforme avanza el número de ciclos de uso (Challener, 2015).

Por las razones expuestas previamente suelen introducirse etapas adicionales, entre las que se encuentran los tratamientos de inactivación por pH ácido, con solventes (S), detergentes (D), combinados (S/D), la filtración con dispositivos para remover partículas virales (antiguamente llamados nanofiltros) o la irradiación con luz UV-C.

El tratamiento con pH ácido (3,0–3,6) ha demostrado ser efectivo para inactivar partículas virales envueltas sobre todo de gran tamaño, pero no partículas desnudas. No obstante, siempre se debe validar, ya que los resultados son diferentes dependiendo sobre todo de la temperatura y el tiempo de contacto, otros factores pueden ser el tipo de ácido y la concentración del buffer. Presenta la ventaja de poder integrarse fácilmente en un proceso de purificación existente (típicamente luego de la elución a pH ácido de una CA, por ejemplo, afinidad a proteína A). Los solventes orgánicos al igual que los detergentes disuelven la envoltura o desintegran la nucleocápside viral. Este método es muy eficiente con los virus envueltos, pero inefectivo contra los virus desnudos. La estrategia de inactivación dependerá de la tolerancia del producto al pH ácido, a la presencia de detergente y al efecto que tenga la metodología sobre otros componentes de la muestra (Niazi, 2006).

La filtración funciona a través de dos mecanismos: exclusión por tamaño y adsorción retentiva de partículas virales. La exclusión por tamaño ocurre debido a una restricción geométrica o espacial ofreciendo un método predecible de remoción de partículas que no se encuentra directamente influenciado por las condiciones de filtración. Por el contrario, existe un número de factores dependientes del proceso (por ejemplo, carga, hidrofobicidad, pH, fuerza iónica) que influyen la adsorción en un modo menos controlado. Tanto la exclusión por tamaño como la adsorción suelen operar en diferentes grados. Los filtros de profundidad, con características de intercambio aniónico son muy eficientes para remover partículas virales (Niazi, 2006).

UVivatec® es una tecnología de inactivación viral promovida por Sartorius Stedim Biotech basada en la irradiación de la muestra con luz UV-C. La muestra atraviesa una serpentina de cuarzo durante un tiempo de residencia muy corto en la cual es sometida a irradiación controlada de luz a 254 nm que destruye el genoma viral. No obstante, se pueden generar radicales libres que podrían dañar la GP, aunque esto puede ser minimizado con el uso de antioxidantes. Esta tecnología es muy efectiva tanto para virus pequeños y

desnudos (20 nm) como virus de mayor tamaño (> 50 nm), siempre que la GP mantenga su integridad estructural (Schmidt *et al.*, 2007).

La expectativa regulatoria es que el DSP posea dos tecnologías ortogonales para depurar partículas virales como mínimo y por lo menos, una tecnología eficiente para virus pequeños y no envueltos como el parvovirus. Esto implica que exista por lo menos un método de inactivación y uno de remoción viral. Este diseño del DSP hace que las plantas de producción con certificación cGMP se encuentren divididas típicamente en un área en donde se supone que las partículas virales podrían potencialmente estar presentes (cosecha y etapa de captura cromatográfica) y otra/s área/s potencialmente libre de virus (etapa de pulido final).

8.6. TÉCNICAS SEPARATIVAS

Los métodos de separación explotan las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de la GP de interés en relación al resto de los componentes presentes en la mezcla cruda, tanto proteicos como no proteicos (Tabla 8.5). Estas propiedades incluyen: forma, tamaño, carga neta, punto isoeléctrico,

TABLA 8.5. BASES FISICOQUÍMICAS DE LOS MÉTODOS DE SEPARACIÓN MÁS COMUNES

Separación	Base de la separación	Resolución
Precipitación		
Sulfato de amonio	Solubilidad	Escasa
Solventes orgánicos	Solubilidad	Escasa
Polietilenimina	Carga, tamaño	Escasa
Isoeléctrica	Solubilidad, pI	Escasa
Por afinidad	Reconocimiento molecular	Escasa
Partición en fases		
En dos fases acuosas (ATPP)	Solubilidad, hidrofobicidad	Escasa / mediana
En tres fases	Solubilidad, hidrofobicidad	Escasa / mediana
Cromatografía		
CII (CIA / CIC)	Carga / distribución cargas	Elevada
CIH	Hidrofobicidad	Elevada
CFR	Hidrofobicidad, tamaño	Elevada
CA	Reconocimiento molecular	Elevada
CEM	Tamaño, forma	Elevada

distribución de cargas, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad de unión por algún ligando, afinidad por iones metálicos, modificaciones postraduccionales y secuencias o estructuras específicas. Aprovechando estas variaciones en las propiedades físicas y químicas, empleando técnicas de fraccionamiento cromatográficas y no cromatográficas es posible diseñar un proceso de purificación integrado y escalable.

En general, la cromatografía es la operación unitaria principal y más utilizada para diseñar un proceso de purificación de proteínas robusto. Dentro de estas, la CA es la técnica más específica y efectiva para realizar la purificación dado que explota el principio de reconocimiento molecular, es decir, la habilidad de macromoléculas activas de formar complejos específicos y reversibles con ligandos de afinidad.

8.6.1. Buffers y solventes

En general se utiliza un gran número de buffers y solventes orgánicos en las diferentes operaciones unitarias asociadas al DSP. El rango útil de los buffers debería estar en el rango del $pK_a \pm 1$. Los solventes se eligen en función de su compatibilidad con la GP y las resinas cromatográficas utilizadas. La Tabla 8.6 enumera los sistemas buffers más utilizados junto con las condiciones naturales de su empleo.

8.6.2. Separaciones no cromatográficas

En los últimos años se han realizado intentos para desarrollar operaciones separativas no cromatográficas para el DSP de proteínas en gran escala. Entre las mismas se mencionan la precipitación, la extracción en dos fases acuosas (ATPS), la cristalización y los procedimientos que emplean membranas. Esta tendencia apunta a reducir o eliminar las separaciones cromatográficas, aunque hasta ahora no se ha logrado. Estos procedimientos se han probado exitosamente en algunos procesos no farmacéuticos en donde el volumen a procesar es particularmente elevado. Algunos autores suponen que podrían ser útiles en el futuro debido a los mayores títulos de GP involucrados en los materiales de partida para la purificación y los grandes volúmenes de biorreactores modernos diseñados para satisfacer una demanda creciente. Estos métodos de separación de «baja tecnología» son excelentes para manejar grandes volúmenes de muestra, ya que remueven rápidamente gran cantidad de líquido. Estos desarrollos podrían posibilitar una reducción de costos, tiempo de procesamiento y pérdidas en el rendimiento (Gronemeyer *et al.*, 2014). No obstante, como se mencionó previamente los métodos cromatográficos siguen constituyendo el corazón de las operaciones unitarias en el DSP.

TABLA 8.6. SISTEMAS BUFFERS UTILIZADOS HABITUALMENTE DURANTE EL DSP

Sistema buffer	pKa	dpKa/dT	Observaciones
Acetato de sodio	4,76	-0,0002	La especie ácida es suministrada como ácido acético glacial ($\rho = 1,058 \text{ g/ml}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Se trata de un ácido corrosivo y sus vapores irritantes.
Amoníaco	9,25	-31	Volátil. Los vapores son dañinos. Se prepara a partir de cloruro o bicarbonato de amonio.
Ácido bórico	9,23	-0,008	Utilizado frecuentemente en combinación con Tris y pocas veces como buffer único.
Carbonato/ bicarbonato	6,35	-0,0055	Se debe trabajar a $\text{pH} \geq 7,5$ para evitar liberación de CO_2 (g).
	10,33	-0,009	
Ácido cítrico / citrato de sodio	3,14		Se utiliza en el rango 3 a 7.
	4,76		
	6,39		
Etanolamina (2-aminoetanol)	9,50	-0,029	Líquido tóxico, inflamable, corrosivo y viscoso con olor desagradable.
Glicina	2,35	-0,002	Asegurarse que el aminoácido no es de origen animal. Posee una amina primaria reactiva. También es utilizado como fuente de carbono y nitrógeno en cultivos celulares. Interfiere en el ensayo de Bradford para determinar proteínas.
	9,78	-0,025	
HEPES	7,66	-0,014	Más comúnmente utilizado en los medios de cultivo celular.
Fosfato de sodio	2,15	0,0044	Reacciona con iones metálicos divalentes. Pueden ocurrir cambios en el pH en muestras que se congelan en estos buffers.
	7,20	-0,0028	
	12,33		
Tris-HCl – Tris (hidroximetil) aminometano	8,06	-0,028	Elevada sensibilidad a la temperatura, posee una amina primaria reactiva, influencia mediciones de pH (electrodo de plata), inhibe algunas enzimas, ejerce efectos indeseables sobre algunos sistemas biológicos.

8.6.3. Separaciones cromatográficas

8.6.3.1. Métodos adsortivos

La mayoría de los métodos para la purificación preparativa involucra a la cromatografía líquida de baja presión. Para ello, se utilizan diferentes ligandos adsortivos inmovilizados en una matriz cromatográfica que permita una interacción fisicoquímica diferencial con los componentes de la muestra. La selección de las diferentes resinas se realiza sobre la base del estudio de las propiedades fisicoquímicas de la GP a purificar y del resto de los componentes

de la muestra, buscando sus principales diferencias (ver Tabla 8.5). Además de los resultados experimentales, en la decisión sobre qué modo cromatográfico utilizar se debe considerar, desde un primer momento, otros factores cualitativos, que pueden ser determinantes como: (1) costo de la resina; (2) número de ciclos operativos útiles; (3) requerimientos regulatorios de los organismos de control que otorgan la licencia para vender el producto; (4) cuestiones ambientales relativas a la disposición de reactivos químicos que se utilizan (sulfato de amonio, acetonitrilo) y (5) necesidad de operaciones unitarias adicionales para llevar a cabo ese proceso cromatográfico.

Un proceso de cromatografía adsorbtiva (CAD) consta de una serie de subetapas que corresponden a: (a) equilibrado de la columna que posibilita dejar el ligando en las condiciones óptimas de interacción, (b) carga o siembra del material a procesar, (c) eliminación de los componentes no adsorbidos o adsorbidos débilmente (lavado), (d) elución de los componentes adsorbidos mediante la modificación de las condiciones, (e) limpieza y regeneración de la columna (Grasselli, 2015).

Los diferentes tipos de CAD tendrán diferentes ligandos inmovilizados, por lo que las soluciones de adsorción, lavado, elución, limpieza y regeneración serán específicas en cada caso de acuerdo con la interacción que tiene lugar con la GP de interés. Se describirá a continuación las ventajas y desventajas de cada uno de los modos cromatográficos. Para ahondar en la temática se sugiere consultar bibliografía especializada.

8.6.3.2. Cromatografía de intercambio iónico (CII)

La CII separa las proteínas conforme a diferencias en su carga neta y/o densidad de cargas superficiales. La separación se basa en la interacción reversible entre la proteína cargada y un ligando de carga eléctrica opuesta que se encuentra en la fase estacionaria.

Este tipo de cromatografía se ha convertido en la técnica más utilizada industrialmente para la purificación de GP a causa de sus numerosas ventajas (robustez, elevada capacidad, gran poder resolutivo y excelente escalabilidad). Es utilizada tanto para la etapa de captura, como de purificación intermedia y pulido; permite alcanzar una elevada resolución (solo superada por la CFR); el empleo de solventes orgánicos, urea y detergentes no afecta su eficiencia; es una técnica flexible y las muestras que presentan concentraciones de proteína bajas pueden ser aplicadas directamente sin que se produzca una pérdida significativa.

Entre las desventajas se incluyen la baja adsorción para muestras que presentan fuerzas iónicas de moderadas a elevadas, la presencia de elevada fuerza iónica en las fracciones eluidas cuando se utiliza la elución salina, pH localizados extremos durante la elución que podrían afectar la estabilidad de la proteína, pH no controlado durante la elución que podría producir precipitación dentro de la resina y el hecho que algunas GP puedan presentar un patrón de purificación complejo (Niazi, 2006).

8.6.3.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

La CIH separa las proteínas según diferencias en su hidrofobicidad superficial, mediante interacciones reversibles con ligandos hidrofóbicos que se encuentran inmovilizados en el soporte cromatográfico. Este fenómeno de adsorción tiene lugar en un ambiente que favorece la interacción hidrofóbica, como lo es una solución acuosa con elevada concentración de sal (típicamente Na_2SO_4 entre 1–2 M y NaCl hasta 3 M).

Este tipo de cromatografía presenta las ventajas de ser fácil de operar, escalable, robusta y permite aplicar materiales de partida (intermediarios) con elevada fuerza iónica, por lo cual suele ser utilizada en la etapa de purificación intermedia y pulido. Por otra parte, permite el empleo de solventes orgánicos y detergentes sin afectar su performance. Suele ser muy útil para remover agregados debido a las propiedades de hidrofobicidad diferencial entre estos y la variante monomérica.

8.6.3.4. Cromatografía de modo mixto o multimodal (CMM)

En los últimos años se han desarrollado ligandos duales o de modo mixto que presentan más de un tipo de interacción con la proteína a purificar. Los más frecuentes son los que combinan la interacción iónica e hidrofóbica de manera simultánea (otros suman también la afinidad), en donde dependiendo de las condiciones experimentales una de las interacciones puede ser exacerbada y la otra minimizada. Esto aumenta la selectividad y especificidad de adsorción/elución en un único paso cromatográfico. Desde el punto de vista químico estos ligandos tienen estructuras químicas perfectamente definidas, lo cual constituye una ventaja desde el punto de vista regulatorio.

8.6.3.5. Cromatografía de Fase Reversa (CFR)

Al igual que la CIH, este modo cromatográfico utiliza ligandos hidrofóbicos asociados a una fase estacionaria, por lo cual ambas técnicas comparten el mismo principio fisicoquímico de separación.

Una de las principales diferencias radica en la densidad de ligando. En la CFR los grupos hidrofóbicos (cadenas alifáticas de diferente longitud C₄, C₆, C₈) están densamente unidos a la matriz (silica o poliestireno), permitiendo la interacción con muchos aminoácidos hidrofóbicos de una proteína que, dada la presencia de solvente orgánico, puede estar más o menos desplegada. La segunda diferencia es que si bien la elución ocurre por reducción de la polaridad del solvente (como en la CIH), el rango de polaridades es diferente. En este caso, la fase móvil es una mezcla de agua, algún modificador orgánico para reducir la polaridad (etanol, acetonitrilo, 2-propanol, metanol) y algún

aditivo que asegure que las especies a purificar no se encuentren cargadas durante la separación. Dado que las GP son polielectrolitos sus cargas deben ser neutralizadas para trabajar con solventes orgánicos. Uno de los más utilizados es el ácido trifluoroacético (TFA).

La principal ventaja de la CFR es su elevadísima resolución, lo cual permite discriminar variantes estrechamente relacionadas con la proteína de interés y su tolerancia a intermediarios con alta fuerza iónica. Por estas razones es una excelente técnica de pulido, muy raramente utilizada en la etapa de purificación intermedia y nunca en la de captura.

Entre las desventajas relativas al proceso se tiene el uso ineludible de solventes orgánicos, la necesidad de utilizar equipamiento más sofisticado y de introducir una etapa adicional para realizar el cambio de buffer. Los solventes podrían desnaturalizar la GP de interés o afectar su solubilidad. Por otra parte, al tratarse de sustancias inflamables requieren que las plantas dispongan de un área de almacenamiento especial a prueba de explosiones (Niazi, 2006). Por estas razones, a nivel industrial la CFR está tendiendo a ser remplazada por otras alternativas. Por otra parte, existe una mayor oferta de nuevos ligandos (multimodal) para cromatografía de baja presión, que requiere equipamiento menos sofisticado, y con prestaciones similares.

8.6.3.6. Cromatografía de afinidad (CA)

La purificación por afinidad requiere de un ligando específico / seudoespecífico inmovilizado en una matriz cromatográfica. Este ligando tiene que: (1) poder interactuar de manera específica con la GP de interés a través de una unión reversible, y (2) poder ser inmovilizado covalentemente a una matriz cromatográfica (fase estacionaria) conservando su afinidad de unión específica. Según el ligando inmovilizado es posible diferenciar interacciones específicas, como (1) antígeno-anticuerpo, (2) IgG/proteína de fusión que presenta fracción Fc-Proteína A, (3) GP-lectinas, de otras interacciones denominadas seudoespecíficas la cual utiliza ligandos sintéticos que mimetizan interacciones biológicas, por ejemplo los colorantes triazínicos, el grupo fenilboronato y los metales inmovilizados en un grupo quelante.

En cualquiera de los casos se logra una elevada especificidad de unión, por lo cual este modo cromatográfico altamente selectivo es ideal como etapa de captura inicial. Entre las desventajas se encuentran su inhabilidad para separar variantes derivadas de la GP, la imposibilidad de utilizar NaOH para realizar la limpieza/sanitización y su elevado costo (las dos últimas aplican para los ligandos proteicos bioespecíficos).

Los parámetros más importantes a tener en cuenta en una CA son la especificidad y la fuerza de la interacción. La primera será función del sistema GP-ligando, mientras que la segunda de un parámetro termodinámico, la constante de disociación (K_d). Idealmente, el valor de K_d para la pareja

GP–ligando debe estar en el intervalo de 10^{-5} a 10^{-8} M. Interacciones con $K_d > 10^{-4}$ M, no permitirán buenas recuperaciones, ya que no tendrá lugar una adsorción completa sino que, debido a la debilidad de la interacción se producirá un desplazamiento de la GP a lo largo de la columna a medida que se aplique la muestra. Esto ocurre particularmente en el caso de muestras diluidas. Valores elevados de $K_d < 10^{-8}$ M, por ejemplo la afinidad entre una hormona y su receptor, dificultará la elución de la GP por su gran afinidad. En general, el proceso de adsorción en CA ocurre en condiciones fisiológicas, mientras que la elución depende fuertemente del tipo de interacción ligando–GP. La elución se obtiene en el mejor de los casos modificando la composición de la solución. La segunda posibilidad es modificar el pH o añadir agentes caotrópicos, la tercera opción es utilizar un competidor del ligando o de la proteína. No existe una solución de elución de aplicación general para todas las resinas de afinidad (Grasselli, 2015). Es importante guiarse por las instrucciones del fabricante e información extraída de la bibliografía científica y/o patentes de proceso.

8.6.3.7. Métodos no adsortivos (Cromatografía de Exclusión Molecular, CEM)

En este proceso cromatográfico la separación de los solutos tiene lugar sin existir una interacción real entre los componentes de la muestra y la resina cromatográfica, o sea que no tiene lugar (idealmente) un fenómeno de adsorción. Es por esto, que este tipo de cromatografía se clasifica como «no adsortiva».

Se trata de un proceso de elevada resolución basado en la diferencia en forma y tamaño molecular cuya principal característica es que no es afectado significativamente por cambios en el buffer de corrida, a menos que el pH, la fuerza iónica o la composición de las sales alteren la estabilidad de la GP a purificar.

Dentro de sus principales ventajas se encuentran la remoción efectiva de agregados de elevado PM (altamente deseable en etapa de pulido), recuperaciones elevadas debido a que la separación se realiza en condiciones muy suaves y que no existe interacción con la fase estacionaria, y que al operarse en condiciones isocráticas no es necesario un reequilibrado luego de cada ciclo de operación. Entre sus desventajas se encuentra su baja capacidad (el volumen de muestra no debería exceder el 5 % del volumen de resina), el elevado costo de las resinas, tiempos operativos prolongados (ya que los flujos suelen ser bajos) y que la muestra de salida siempre sufre una dilución (Niazi, 2006).

En general la CEM es utilizada al final del DSP, ya que además de remover agregados de mayor PM y contaminantes más pequeños (variantes degradadas o fragmentos), puede realizar simultáneamente un cambio de buffer a uno adecuado para su acondicionamiento final.

Referencias bibliográficas

- CHALLENGER, C.** (2015). Selecting the Right Viral Clearance Technology. *Biopharm International*, 28, (11), 49–52.
- FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION** (1998, March). *Guidance for Industry Manufacturing, Processing, or Holding Active Pharmaceutical Ingredient*.
- GE HEALTHCARE** (2014). Use of sodium hydroxide for cleaning and sanitization of chromatography media and systems. *Application note*, 18–1124–57 AI.
- GRASSELLI, M. Y MAFFIA, P.** (Eds.) (2015). *Proteínas puras. Entre el laboratorio y la industria. Colección nuevos enfoques en ciencia y tecnología*. Universidad Nacional de Quilmes.
- GRONEMEYER, P., DITZ, R. AND STRUBE, J.** (2014). Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 1(4), 188–212. <https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188>
- HAGEL L., JAGSCHIES G. AND SOFER G.** (2008). *Handbook of Process Chromatography. Development, Manufacturing, Validation and Economics*. 2nd. edition. London, UK, Academic Press.
- ICH TOPIC Q5A (R1)**. Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin
- LABROU, N. E.** (2014). Protein purification: an overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), 1129, 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1
- NFOR, B., VERHAERT, P, VAN DER WIELEN, HUBBUCH, L., AND OTTENS M.** (2009). Rational and systematic protein purification process development: the next generation. *Trends in Biotechnology*, 27(12), 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.09.002>
- NAIAZI, S.; TAYLOR & FRANCIS** (Eds.) (2006). *Handbook of Biogeneric Therapeutic Proteins. Regulatory, Manufacturing, Testing and Patent Issues*. Boca Raton: CRC Press.
- RAMAKRISHNAN, A. AND SADANA A.** (2000). Economics of bioseparation processes. *Separation Science and Technology*, 2, 667–685. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(00)80065-3)
- SCHMIDT, S. AND KAULING, J.** (2007). Process and Laboratory Scale uv Inactivation of Viruses and Bacteria Using an Innovative Coiled Tube Reactor. *Chemical Engineering & Technology*, 30(7), 945–950. <https://doi.org/10.1002/ceat.200700056>
- SHUKLA, A. A., HUBBARD, B., TRESSEL, T., GUHAN, S., & LOW, D.** (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 848(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.026>

9

Fundamentos de la cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC-PAD)

Determinación estructural de glicoproteínas

ALICIA S. COUTO

9.1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, la purificación y el análisis de hidratos de carbono involucró el uso de técnicas como filtración en geles, cromatografía de afinidad (por ejemplo, lectinas) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En esta última técnica se utilizaron columnas de fase reversa con resinas alquílicas o fases amino para la separación de monosacáridos neutros y cromatografía de par iónico para oligosacáridos (Honda, 1984, Hicks, 1988; Huber & Bonn, 1995). Las columnas de celite-carbón que habían sido utilizadas para la separación de hidratos de carbono no pudieron ser aplicadas en HPLC dado su fragilidad a la presión.

Así, existen en el mercado numerosas columnas de HPLC aplicables al análisis de azúcares con diferentes grados de entrecruzamiento, diferentes formas iónicas y tamaños de partículas de las fases estacionarias y también de diferentes largos, aplicables a la separación de monosacáridos y oligosacáridos y que utilizan en general como fase móvil acetonitrilo: agua. Más recientemente, sistemas cromatográficos de interacción hidrofílica usando columnas basadas en empacados de fase unida a sílica con fases móviles de acetonitrilo: agua, también han sido utilizadas para la separación de hidratos de carbono. Sin embargo, este modo de HPLC puede tener desventajas como la inestabilidad y corto tiempo de vida de las fases unidas y la pobre selectividad y eficiencia de las columnas (Corradini *et al.*, 2012).

Debido a que los hidratos de carbono no absorben a longitudes de onda ultravioleta, el método de detección más utilizado es el índice de refracción. Si bien de esta forma se han podido separar oligosacáridos neutros, oligosacáridos que difieren en las ramificaciones y oligosacáridos conteniendo ácido siálico, no se logra la separación de oligosacáridos que difieran en el tipo de unión:

por ejemplo, $\text{Glc}(1\text{-}2)\text{Glc}$, $\text{Glc}(1\text{-}3)\text{Glc}$ y $\text{Glc}(1\text{-}4)\text{Glc}$

Otra metodología muy utilizada es la cromatografía gas-líquido, pero dado que los azúcares no son volátiles, exige una etapa previa de derivatización. (Reinhold, 1972; Laine *et al.*, 1972) También se ha acoplado el uso de cromóforos

o fluoróforos con el fin de aumentar la sensibilidad de detección (Muramoto *et al.*, 1987; Rosenfelder *et al.*, 1985; Takemoto *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985). En forma más reciente, aparecen en la literatura ejemplos de separaciones de hidratos de carbono que utilizan electroforesis capilar.

Sin embargo, con el fin de mejorar las separaciones y facilitar el análisis de azúcares se desarrolló una técnica de HPLC que utiliza resinas básicas y eluyentes de alto pH (1-4) (Hardy *et al.*, 1988). La separación se basa en la pequeña acidez que presentan los hidratos de carbono (Frahm *et al.*, 1959) y se combina con un detector de pulso amperométrico que no requiere derivatizaciones y que permite la detección de los azúcares en el orden de pico y nanomoles (Rockin *et al.*, 1983). Así, en la Figura 9.1 se observa una separación de monosacáridos y en la Figura 9.2, la separación de oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de fetuina. Nótese que aún dentro de cada grupo de oligosacáridos mono, di, tri y tetrasialilados, se distinguen especies que tienen diferencias solo en los tipos de unión y que se detectan como picos diferentes.

Un equipo de cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) consta de las siguientes partes: módulo de eluyentes, bomba, inyector, columna de separación, detector electroquímico y la computadora para adquisición de datos (Figura 9.3).

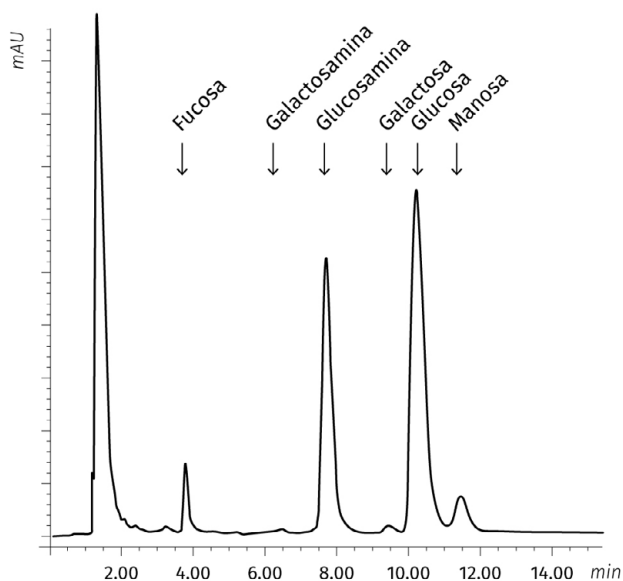


FIGURA 9.1. ANÁLISIS POR HPAEC-PAD DE UNA MEZCLA DE MONOSACÁRIDOS

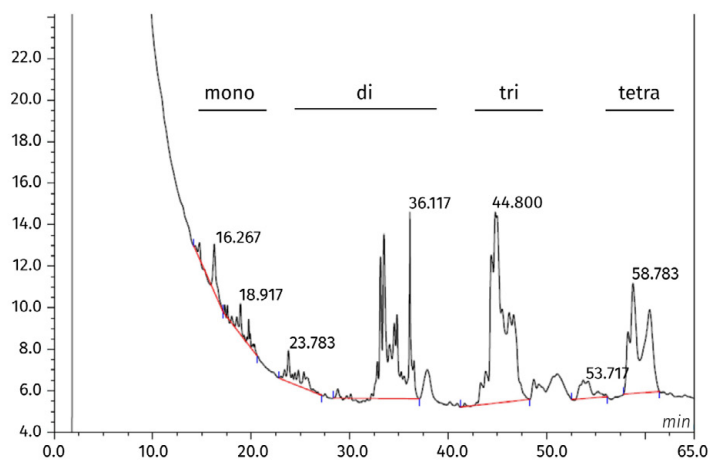


FIGURA 9.2. ANÁLISIS POR HPAEC-PAD DE UNA MEZCLA DE OLIGOSACÁRIDOS SIALILADOS OBTENIDOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE FETUINA

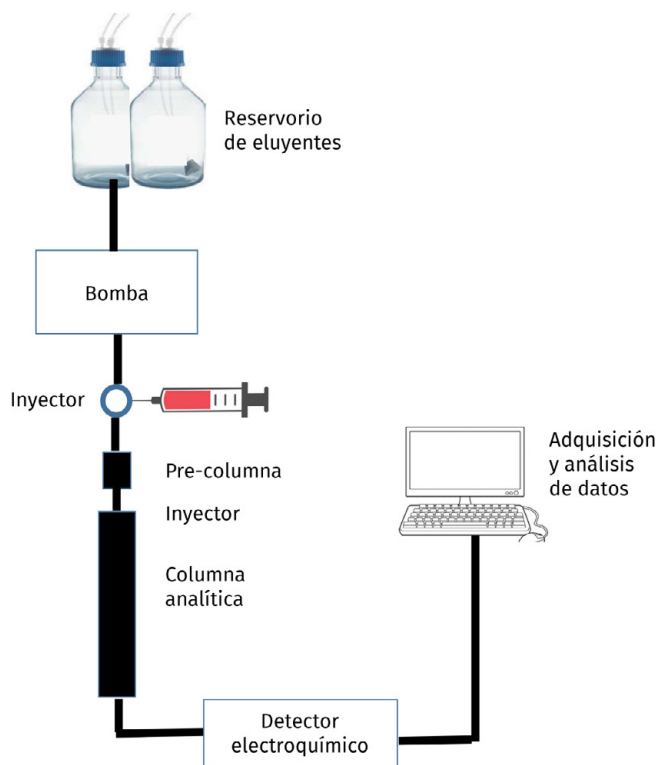


FIGURA 9.3. ESQUEMA DE LAS PARTES CONSTITUYENTES DE UN EQUIPO DE HPAEC-PAD

9.2. FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN

Dijimos que la separación se basa en la baja acidez que presentan los hidratos de carbono. Si bien los azúcares no son ácidos, el OH anomérico es el más ácido debido a los efectos inductivos del O del anillo y por estabilización del anión por puente hidrógeno con el OH del C-2. Por lo tanto, en ausencia del OH de C-2 (2-desoxiazúcares) la acidez disminuye (Rendelman, 1973). Si no existe H anomérico (alditoles, glicósidos), la acidez de los H decrece en el orden 2-OH >> 6-OH > 3-OH > 4-OH. (Roberts *et al.*, 1971, Paskach *et al.*, 1991).

A continuación, se listan las constantes de disociación de algunos monosacáridos comunes.

TABLA 9.1. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN DE ALGUNOS MONOSACÁRIDOS COMUNES (EN AGUA A 25 °C) (RENDELMAN, 1973)

Azúcar	pKa
Galactosa	12,39
Glucosa	12,28
Xilosa	12,50
Manosa	12,08
Fructosa	12,03
Sorbitol	13,60
α-metil glucósido	13,71

Si recordamos el concepto cromatográfico de Factor de capacidad (retención): $K'_i = t_{r_i} - t_o / t_o$ (donde t_{r_i} = tiempo de retención del compuesto i y t_o = tiempo muerto), en una resina de intercambio aniónico fuerte: a valores decrecientes de pKa los K'_i serán crecientes.

Se puede generalizar que las cetosas dan K'_i similares a las aldosas correspondientes y que los polioles presentan K'_i que aumentan con el número de C (sin embargo, con aldosas hay muchas excepciones).

Si vemos en oligosacáridos, la influencia de la acidez del OH-1 del extremo reductor es menor:

TABLA 9.2. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN (EN AGUA A 25 °C) Y FACTORES DE CAPACIDAD DE ALGUNOS OLIGOSACÁRIDOS COMUNES

	Oligosacáridos	pKa	K'
Maltosa	Glc α (1-4) Glc	11,74	6,87
Lactosa	Gal β (1-4) Glc	12,22	2,87
Sacarosa	Glc (1-2) β Fru	12,62	3,30
Rafinosa	Gal α (1-6) Glc α (1-2) β Fru	12,74	5,54

Por el contrario, el tipo de unión glicosídica y la estructura conformacional son factores importantes en la separación. Para series relacionadas de oligosacáridos (por ejemplo, glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetra) si se grafican los $\ln K'$ versus la longitud de cadena dan líneas rectas con pendientes características (Koizumi *et al.*, 1989).

Esto significa que, si partimos de glucosa podremos predecir aproximadamente el tiempo de elución de la maltosa y la maltotriosa (serie de la Glucosa α 1-4). Lo mismo si partimos de xilosa, podremos esperar tiempos de retención mayores para la xilobiosa y la xilotriosa. Si en cambio partimos de sorbitol, que tiene un factor de capacidad menor, toda la serie de maltitol, maltotriitol, etc., se retendrá menos que la maltosa y la maltotriosa. Por lo tanto, ha sido posible resolver isómeros de oligosacáridos neutros con uniones 1-3, 1-4 y 1-6 (Hardy & Townsend, 1988; Lee, 1990) así como oligosacáridos liberados de glicoproteínas (Townsend & Hardy, 1991; Rohrer *et al.*, 2013).

Por otra parte, también oligosacáridos ácidos fueron eficientemente separados en condiciones convencionales mostrando que en HPAEC, las separaciones son rápidas y con gran resolución (Tsuji *et al.*, 1982; Troy *et al.*, 1987). Existen trabajos donde han podido resolver oligosacáridos conteniendo hasta 50 unidades de ácido galacturónico (Hotchkiss & Hicks 1990).

9.3. COLUMNAS

Dado que se trabaja a altos pH, la fase fija de las columnas no puede ser de sílica. Se utiliza un copolímero de estireno-divinilbenceno.

Los materiales tradicionales utilizados en HPLC son macroporosos y, por lo tanto, la difusión es lenta, la transferencia de masa es escasa, los picos son anchos y como se trabaja a baja presión máxima, los tiempos en general son largos. Para evitar esos inconvenientes se desarrollaron resinas peliculares poliméricas no porosas que garantizan un rápido transporte de masa, una rápida difusión, alta estabilidad entre pH 0-14 y excelente estabilidad mecánica. Las columnas más comunes empleadas para HPAEC específicamente

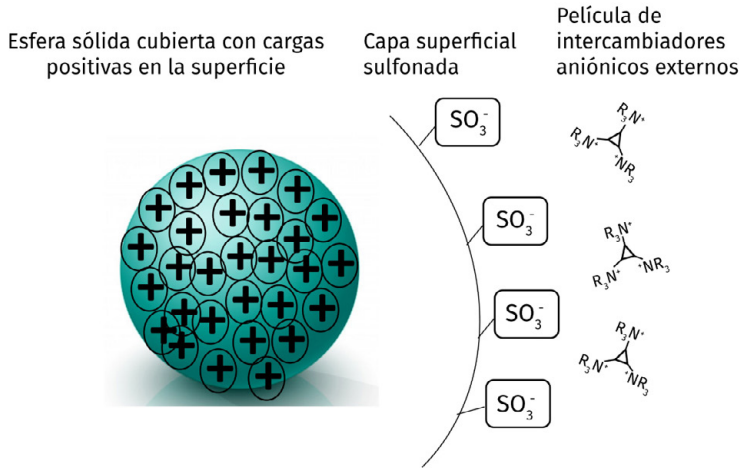


FIGURA 9.4. PARTÍCULA DE LA FASE FIJA CON SUS TRES CAPAS: CORE INERTE, REGIÓN SUPERFICIAL SULFONADA Y MICROBEADS INTERCAMBIADORES

diseñadas para la cromatografía de intercambio aniónico de hidratos de carbono son fabricadas por Dionex (Sunnyvale, CA, USA; ahora Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Las partículas de la fase fija constan de tres capas: un *core* o corazón inerte no poroso; una región superficial sulfonada y capas externas ligadas permanentemente de intercambiadores aniónicos, *microbeads* submicrométricas lo que garantizan un elevado nº de sitios intercambiadores en una superficie pequeña, una alta capacidad de carga y baja difusión (Figura 9.4).

De esta forma se han desarrollado diferentes columnas para separaciones específicas de diferentes hidratos de carbono:

CARBOPAC PA-1 (PA-10, P-20)	monosacáridos neutros y ácidos aminoazúcares
CARBOPAC PA-100 (PA-200)	isómeros estructurales de bajo PM oligosacáridos polisacáridos complejos
OMNIPAC PAX-100	analitos iónicos en general

Existen diferencias en el diámetro de las partículas, el % de divinilbenceno y grado de entrecruzamiento, el diámetro y % de entrecruzamiento de los *microbeads* de látex y la capacidad de carga.

9.4. ELUYENTES

- Como eluyente principal, se utiliza *agua desionizada desgasificada*. Se llama reactivo grado tipo 1 y debe tener una resistividad mayor a 17.8 MΩ/cm. Debe estar libre de impurezas iónicas, orgánicas, microorganismos y agente particulados > 0.2mm. No se recomienda utilizar agua grado HPLC en botella siendo lo más recomendable utilizar agua denominada Milli Q.
- Las separaciones en general se llevan a cabo en *soluciones de NaOH*. La solución madre no se debe preparar a partir de NaOH en pellets debido a que se encuentran muy carbonatados y cambia la fuerza iónica del eluyente. Es aconsejable preparar las soluciones a partir de soluciones comerciales de NaOH 50 % (p/p). Se debe, en todos los casos, evitar la carbonatación y por lo tanto se aconseja minimizar el tiempo de exposición al aire y utilizar botellas frescas en recipientes plásticos. Como el carbonato se acumula en general sobre las paredes y el fondo del recipiente, no es aconsejable volcar desde el recipiente, sino pipetear la cantidad necesaria, sin tocar los bordes.
- *Soluciones de acetato de sodio*. Se usan gradientes crecientes de acetato de sodio o combinados de NaOH y NaAcO. La sal cambia la fuerza iónica del eluyente y la ionización del analito. En algunos casos se utilizan también gradientes reversos (por ej., para separar Gal de Xil) o gradientes ternarios. Las soluciones se preparan a partir de NaAcO anhidro o trihidratado con agua desionizada. Se filtran por membranas de 0.2 mm para evitar particulados y se desgasifican.
- En el caso de las columnas Omnipac PAX-100 que precisan mínimo 1 % solvente orgánico se utilizan solvente grado HPLC. Los solventes más utilizados son metanol, etanol y acetonitrilo. Las mezclas con agua deben hacerse antes de llevarlas al equipo para minimizar la formación de burbujas. Y en los casos de utilizar acetonitrilo e NaOH se aconseja no hacer soluciones del acetonitrilo en la base ya que el solvente orgánico se descompone dando acetato y amoníaco.
- Las soluciones se colocan en los reservorios de plástico, asegurándose que los tubos con filtros en línea lleguen al fondo y queden inmersos en la solución. Se presuriza y desgasifica con helio para prevenir burbujas. Puede también utilizarse argón o nitrógeno. Si el sistema no se encuentra desgasificado convenientemente podemos tener problemas en el funcionamiento de la bomba, en la detección o incluso tener escasa resolución de los analitos por carbonatación del eluyente.
- Los pasos a seguir serían:
 1. preparación del eluyente y colocación en el reservorio;
 2. desgasificación por vacío o sonicación (aprox. 5 min);
 3. colocación del reservorio en el equipo, sin agitar;
 4. cerrar el reservorio, presurizar, pasar Helio a aprox. 7 psi durante 20 min;
 5. llenar el sistema con c/u de los eluyentes por separado (*priming*).

9.5. BOMBAS

Estos equipos presentan una bomba (DX-300; DX-3000) que puede mezclar cuatro eluyentes diferentes, a flujos controlados y composiciones controladas. Existen columnas de 4 mm de diámetro interno (analíticas); de 9 mm de diámetro interno (preparativas) y también columnas denominadas microbore para separaciones más exigentes. Las bombas están preparadas para trabajar con flujos de 0,1 a 10 ml/min, con presión máxima de 5000 psi.

Se puede realizar separaciones isocráticas o con gradiente y la bomba permite utilizar gradientes lineales, cóncavos o convexos.

Se utiliza un programa de a pasos determinado por tiempos que se controla en forma remota con una interfase desde la computadora.

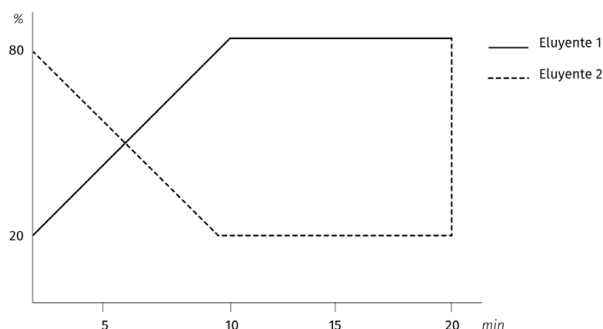


FIGURA 9.5. ESQUEMA DE UN PROGRAMA DE A PASOS

El mantenimiento de la bomba es importante. Se deben lavar los pistones diariamente con agua. Si el equipo no se utiliza por más de tres días se aconseja pasar agua por las 4 válvulas. Se recomienda chequear pérdidas de la bomba y de la tubería, cambiar los filtros de los eluyentes periódicamente y la lubricación regular cada 6 meses de los pistones para que operen suavemente (esto último realizado por personal experto).

9.6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

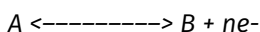
Se recomienda filtrar las muestras por membranas de 0.4 mm para remover partículas, evitar concentraciones salinas muy altas pues son eluyentes fuertes y no inyectar más de 10 nanomoles de un analito en una columna analítica. Las inyecciones son en general de 10 a 50 ml a través del *loop* correspondiente.

9.7. DETECTOR

El uso en tándem del detector de pulso amperométrico con el HPAEC es una ventaja extrema. Esto evita la necesidad de derivatización pre- o poscolumna y es uno de los métodos más sensibles de medición de hidratos de carbono.

El detector es una celda electroquímica que consta de una fuente (potenciómetro) y tres electrodos. Se aplica una secuencia repetitiva de tres potenciales (E_1, E_2, E_3) durante pulsos de tiempo (t_1, t_2, t_3) y se mide la corriente generada por oxidación o reducción del analito sobre la superficie del electrodo de trabajo. Esta corriente es proporcional a la concentración del analito en la solución. Se puede optimizar: la sensibilidad, la reproducibilidad y la selectividad.

La corriente es generada porque las sustancias son oxidadas o reducidas sobre la superficie del electrodo de trabajo. Si hay oxidación, los e^- se transfieren al electrodo de trabajo, se genera una corriente positiva (anódica). Si en cambio se produce una reducción, los electrones se transfieren del electrodo de trabajo a las moléculas electroactivas. Se genera una corriente negativa (catódica). La elección de los potenciales a aplicar se determina por voltametría.



Donde A y B son las especies en equilibrio en la superficie del electrodo

Si $E_{app} = E$ $[B] = [A]$

Si $E_{app} > E$ $[B] > [A]$, el analito se oxida y se genera corriente anódica.

Si $E_{app} < E$ $[B] < [A]$, el analito se reduce y se genera corriente catódica.

El proceso sería una voltametría hidrodinámica: el pasaje de una solución conteniendo un analito y un electrolito soporte a través de un electrodo de trabajo por bombeo de la solución. Se aumenta el potencial aplicado y se mide la corriente resultante (Figura 9.6).

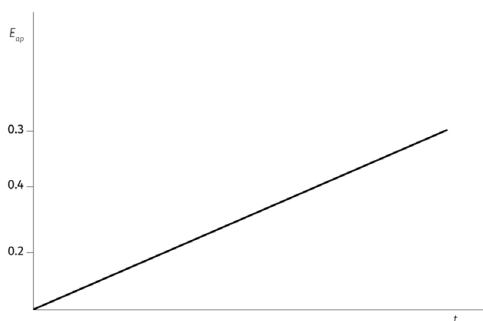


FIGURA 9.6. GRÁFICO DE POTENCIAL APLICADO *VERSUS* TIEMPO

Veamos qué sucede si solo tengo A en solución y el potencial para la oxidación de A es +0,4 V con respecto a un electrodo de referencia.

A 0,2 V la E_{app} es más negativa que E^0 , por lo tanto, se favorece reducción de B a A. Como la solución solo tiene A, no hay reacción. Por lo tanto, la [A] en el electrodo es igual a [A] en el total de la solución y la corriente es cero.

Si el E_{app} es aumentado, la relación de B hacia A aumenta. Por ejemplo:

$$A \text{ 0,4 V } E_{app} = E$$

La [A] = [B] en la superficie del electrodo, pero como la solución circula, la [A] se mantiene. Es decir que a pocos milímetros de la superficie del electrodo, la [A] es constante. La distancia entre el electrodo y el punto en el que la concentración de A es igual a la concentración de A en la solución se denomina zona de difusión. El transporte de A a la superficie del electrodo es vía difusión, o sea existe un gradiente de concentración.

Cuando el potencial es aumentado a 0,6V la concentración de A en la superficie del electrodo es 0. Todas las moléculas que llegan al electrodo se oxidan a B. Por lo tanto, la corriente es limitada por la velocidad de difusión. Se la llama «corriente límite». En ese momento:

$$I = n \times F \times A \times D \times [a]$$

Donde: F, es la constante de Faraday

A, es el área del electrodo

D, es el coeficiente de difusión

[A], es la concentración de A en la solución

Sin embargo, en este caso, estamos en una voltametría cíclica, donde el potencial es aplicado de a pasos:

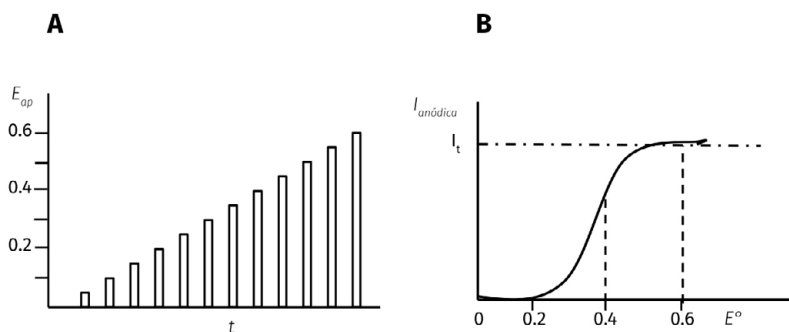


FIGURA 9.7 POTENCIAL APLICADO DE A PASOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (A). CORRIENTE ANÓDICA EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL APLICADO (B)

Es decir, de 0 – 0,2 V no hay reacción
 0 – 0,4 V [A] = [B] sup del electrodo A se oxida
 0 – 0.6 V [A] sup del electrodo = 0

Después del pulso, la corriente medida es alta y decrece a medida que las moléculas difunden como se ve en la Figura 9.7.

La corriente total es la suma de dos corrientes: la corriente de Faraday y la corriente de carga (capacitancia entre la interfase electrodo-solución) Para discriminar entre las dos, se retrasa la medición de la corriente un pequeño tiempo (ej. 20 mseg). Así, se maximiza la relación Faraday/carga.

Luego del retraso se mide la corriente durante un período de tiempo.

La corriente se renueva con el nuevo pulso y existe un circuito que suaviza el salto de un pulso a otro. Se usan tiempos de medición desde 16,7 ms a 200 ms. Los tiempos más largos mejoran relación señal/ruido.

Por lo tanto, el E1 se aplica durante 240 ms y se mide durante 200 ms.

Una vez determinado el potencial para que la reacción suceda por voltametría se usa amperometría para detectar. Los azúcares presentan un máximo de respuesta en un rango pequeño de potenciales aplicados. Por lo tanto, el mismo potencial se puede aplicar a todos los azúcares. Si se usa un solo potencial, es lo que se denomina amperometría fija. En un principio existieron detectores de este tipo, pero el electrodo se ensuciaba muy fácilmente. Por eso se aplican 3 potenciales, tal como se muestra en la Figura 9.8 (Koizumi *et al.*, 1989).

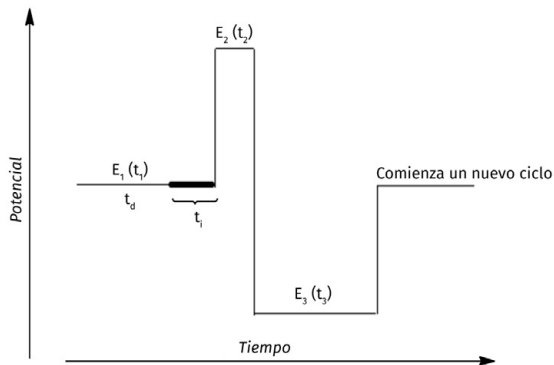


FIGURA 9.8. SECUENCIA REPETITIVA DE POTENCIALES APLICADOS AL ELECTRODO DE TRABAJO

E1 cerca del potencial de oxidación, E2 muy positivo para limpiar el electrodo y E3 muy negativo para reducir el óxido de Au. Las reacciones que sufren los azúcares se indican en la Figura 9.9.

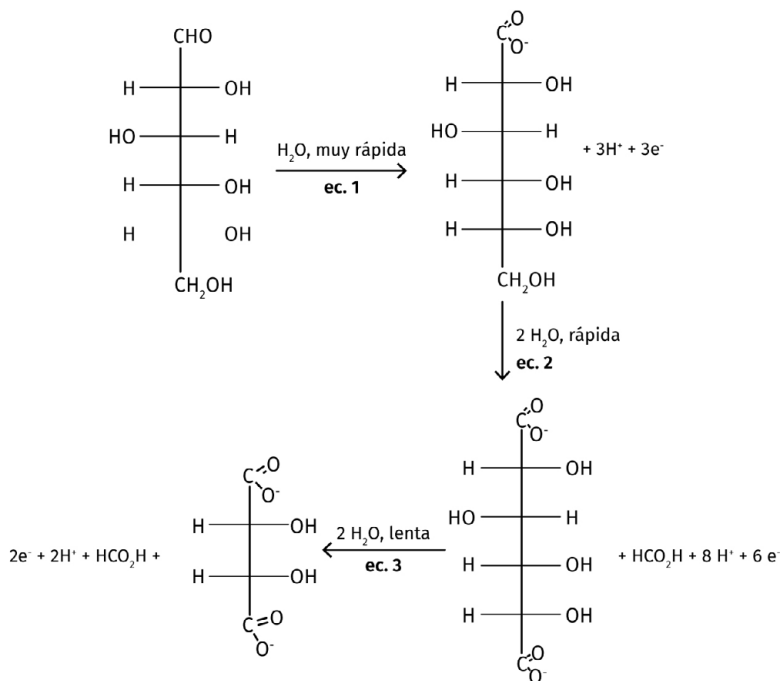
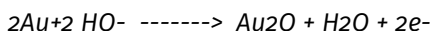


FIGURA 9.9. REACCIONES QUE SUFREN LOS AZÚCARES EN EL ELECTRODO DE TRABAJO

Con el E_1 sucede la ecuación 1 (Figura 9.9), con E_2 , las ecuaciones 2 y 3 (Figura 9.9) y con E_3 la reacción de recuperación del electrodo:



Las celdas constan de tres electrodos: un electrodo de trabajo que en general es de oro, pero puede ser también de plata, platino o carbón, un electrodo de referencia Ag/AgCl y un *counter* electrodo de acero inoxidable.

Los azúcares oxidados pueden eliminarse del electrodo con un potencial muy negativo que solo dura 10 ms inmediatamente antes de aplicar el potencial de activación positivo y luego negativo.

Existen varios trabajos describiendo la optimización de los potenciales aplicados y los tiempos de cada uno para diferentes analitos (LaCourse, 1997; Johnson & LaCourse, 1992).

La mejora en la reproducibilidad de la detección de hidratos de carbono a largos tiempos puede alcanzarse aplicando una secuencia de cuatro potenciales al electrodo de trabajo en lugar de tres (Rocklin *et al.*, 1998). En esta secuencia se utiliza un potencial muy negativo para mantener limpio y uno positivo para activar la superficie del electrodo de oro sin causar corrosión

del mismo. Esta secuencia de cuatro potenciales maximiza la relación señal/ruido, mostrando límites de detección similares a los que se obtienen con la secuencia de tres potenciales, pero mejorando ampliamente la reproducibilidad a tiempos largos.

Cuidados a tener con la celda del detector:

1. cerrar la celda al final del día;
2. pulir el electrodo periódicamente;
3. lavar los componentes de la celda;
4. chequear pérdidas.

El ruido debe ser mínimo debido a las variaciones de flujo. Se debe evitar la turbulencia por ejemplo, debido a variaciones de temperatura.

Existen otros detectores que amplían la posibilidad de trabajo. Por ejemplo, el denominado ED-40 es detector electroquímico, de conductividad, de amperometría fija, de amperometría pulsada y de voltametría cíclica y, además, monitorea pH para la detección. Se puede adicionar un detector UV-visible variable o uno denominado AD-20, de doble haz programable.

9.8. SUPRESOR (NEUTRALIZADOR)

El uso de membranas supresoras para el desalado se inició en 1989 (Spellman *et al.* 1989). El intercambio de Na^+ por H_3O^+ en la membrana supresora se lleva a cabo en el interior de un par de membranas de intercambio catiónico separadas por la cámara del eluyente.

El método involucra el desalado de las muestras en línea (Basa & Spellman, 1990; Thayer *et al.*, 1998). En este caso se utiliza un supresor aniónico. Provee una alta capacidad de supresión agregando mínimo volumen muerto. Existen supresores para columnas de 4 mm y de 2 mm de diámetro. Consta de un módulo de supresión y una fuente de corriente.

En el interior del módulo supresor se observan 2 compartimentos regenerantes y un compartimiento del eluyente separados por membranas de intercambio iónico. Es decir, hay un canal de flujo regenerante y un canal de flujo de eluyente en lados opuestos de la membrana y estos van a contracorriente

En las cámaras regenerantes están los electrodos. Por lo tanto, se aplica un potencial y el agua de los agentes regenerantes es electrolizada aportando H^+ que pasan por la membrana para la reacción de neutralización. De esta forma, el eluyente se convierte en una forma poco ionizada. A su vez, para mantener el balance de carga los eluyentes catiónicos pasan hacia la zona regenerante.

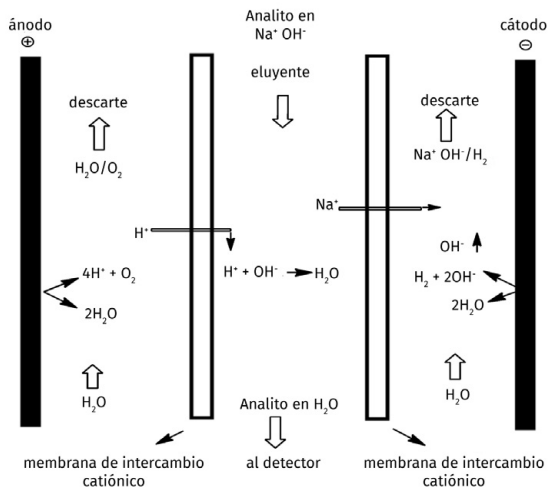


FIGURA 9.10. REACCIONES EN EL MÓDULO DE SUPRESIÓN

9.8.1. Modo de autosupresión reciclada

Utiliza el eluyente de la celda como fuente de agua para la cámara de regeneración. No se utiliza fuente de agua externa. Para ello, el eluyente luego de pasar por la celda de detección es redirigido a la entrada del regenerante. En este caso la fuente de agua contiene el analito diluido, pero al ser mínimas las cantidades del analito, no afectan.

En este caso, la cantidad de agua fluyendo es limitada por el flujo del eluyente. No se debe utilizar cuando hay solventes en el sistema.

9.8.2. Autosupresión con fuente externa de agua

Necesita una fuente constante de agua deionizada de una botella presurizada con un flujo aprox. 5–10 ml/min. Debe colocarse un regulador de presión para el reservorio. En este caso, la cantidad de agua que fluye es independiente del flujo del eluyente y se maneja desde el regulador de presión. Cualquier análisis que se haga con el reciclado puede hacerse en modo externo.

9.8.3. Autosupresión química

Se usa ácido sulfúrico como regenerante en lugar de corriente aplicada y agua desionizada.

El ácido se adiciona desde una botella presurizada.

La capacidad supresora aumenta a medida que aumenta el flujo de agua a través de las cámaras regenerantes. A mayor flujo de agua, mayor capacidad supresora. Se calcula que el flujo externo debe ser aproximadamente 10–15 ml/min para columnas de 4 mm y de 5–7 ml/min para columnas de 2 mm.

La supresión se controla por dos factores: a) la presión aplicada al reservorio de agua; b) la corriente elegida en la unidad.

Luego que la corriente es aplicada, el flujo cae debido a la formación de gases en las cámaras regenerantes. Es importante ajustar la presión para dar el flujo necesario a una dada corriente. En estos casos NO se debe cerrar la salida de gases ya que se forman pequeñas cantidades de H_2 .

Cuando se elige la corriente: a mayor conductividad del eluyente, se necesita aplicar mayor corriente para alcanzar supresión total (depende de la naturaleza del eluyente y de su concentración).

A mayor flujo utilizado en la separación, se requiere mayor corriente. Si la corriente es muy baja, puede no remover totalmente los contraiones de la muestra aun cuando el contraión del eluyente pueda ser removido totalmente. Por otra parte, utilizar una corriente muy alta puede crear una línea de base con mucho ruido.

En general se requiere una corriente menor para columnas de 2 mm que para las de 4 mm.

Cuidados: las membranas deben estar siempre hidratadas Si se deja de usar el supresor por un tiempo, hay que rehidratar antes de comenzar el análisis.

Se sabe que la concentración dinámica regenerante debe ser aprox. 6–8 veces la concentración dinámica del eluyente para una correcta supresión. Así un cálculo aproximado es:

$$7 \times [\text{eluyente mM}] \times (\text{flujo ml/min}) = [\text{regenerante mM}] \times (\text{flujo regenerante ml/min})$$

Ejemplo: si se utiliza un eluyente: 50 mM NaOH con un flujo de 1,5 ml/min se debe usar como regenerante: 50 mM H_2SO_4 a un flujo de 10 ml/min.

9.8.4. Supresor catiónico (no para Hidratos de carbono)

En este caso la solución catiónica del regenerante será hidróxido de tetrabutamonio (TBAOH). Puede utilizarse KOH o $(CH_3)_4NOH$, pero dan peores líneas de base en conductividad. No se aconseja el uso de $Ba(OH)_2$ ya que puede precipitar.

9.9. ALGUNOS EJEMPLOS DE ANÁLISIS

9.9.1. Determinación de fibra dietaria soluble

En la Figura 9.11, panel A, se observa una muestra corrida en una columna Carbo-pack P-200 (4 x 250 mm) con la precolumna correspondiente utilizando un gradiente de NaAcO desde una solución de 50 mM NaOH en ausencia del mismo hasta un solución de 250 mM NaAcO conteniendo 50 mM NaOH en 40 minutos con flujo 0,4 ml/min.

En el Panel A se observa la comparación de la muestra original y la muestra tratada con α -amilasa pancreática/amiloglucosidasa, observándose la desaparición de algunos componentes presumiblemente, oligosacáridos con uniones α -D-(1,4).

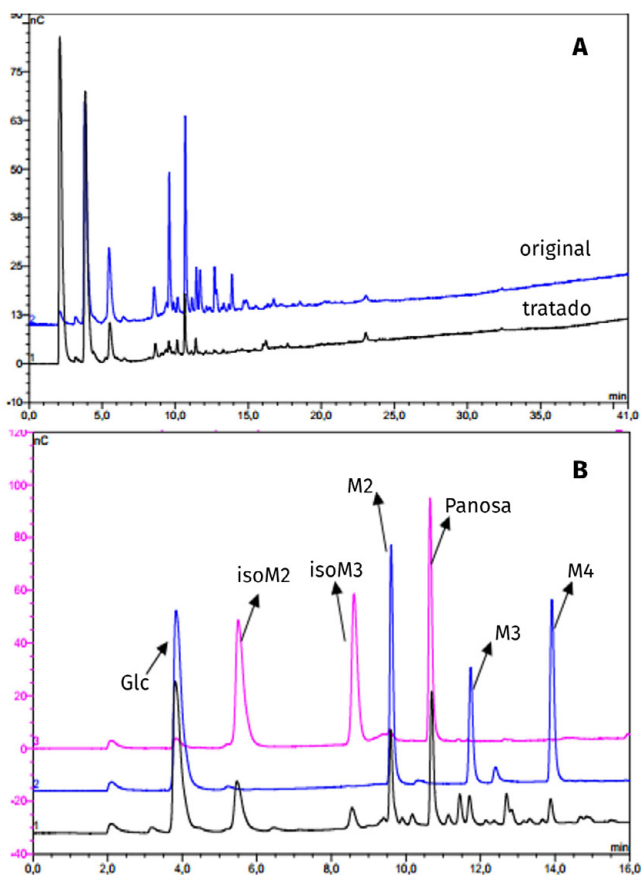


FIGURA 9.11. DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETARIA SOLUBLE

En el panel B se observa una magnificación de la zona de 0 a 16 min de la muestra tratada de A en comparación con diferentes testigos comerciales. Se observa el enriquecimiento en oligosacáridos con uniones α -D-(1,6) considerados fibra dietaria soluble.

Es de destacar que, en los últimos años, se ha popularizado la aplicación de esta técnica para la determinación de hidratos de carbono en alimentos y se han desarrollado variadas aplicaciones para análisis de rutina de alimentos (Corradini *et al.*, 2012).

9.9.2. Comparación del perfil de N-oligosacáridos de un anticuerpo monoclonal y un biosimilar

Muestras de un anticuerpo monoclonal (standard A) y un biosimilar (muestra) se trataron con PNGasa F, la proteína se separó por un Ultrafree McFilter (MW 5000) y la fracción de oligosacáridos liberados se llevaron a seco, se redisolviéron en agua y se analizaron en una columna Carbopack P-200 con precolumna correspondiente. Se utilizó un programa con NaOH 100 mM durante toda la corrida y durante 2 min, luego un gradiente de NaAcO de 0 a 8 mM durante 9 min, a 45 mM durante 11 minutos, a 180 mM durante 14 minutos y a 300 mM durante 9 minutos; flujo 0,25 ml/min.

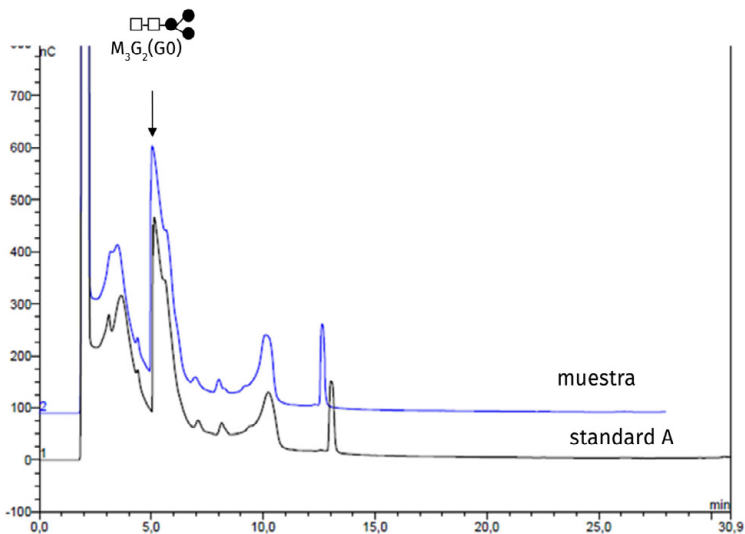


FIGURA 9.12. COMPARACIÓN DEL PERFIL DE N-OLIGOSACÁRIDOS DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL Y UN BIOSIMILAR

En la Figura 9.12 se puede observar que no se detectan diferencias entre ambos perfiles y que el componente principal coincide con un testigo comercial de Man_3G_2 (Go).

9.9.3. Otros

La digestión con exoglicosidasas ha sido muy utilizada para el análisis estructural de glicoconjugados. En este tipo de análisis la técnica de HPAEC–PAD es extremadamente útil ya que se puede detectar la aparición del monosacárido producto de la hidrólisis, el oligosacárido más corto producto de la digestión y la desaparición del oligosacárido sustrato en una sola corrida cromatográfica (Weitzhandler *et al.* 2009).

También ha sido muy útil para el análisis de oligosacáridos de polisacáridos derivados de matrices extracelulares (Rothenhöfer *et al.*, 2015).

9.10. CONCLUSIONES

Una de las mayores ventajas de la técnica de HPAEC–PAD es su capacidad de separar oligosacáridos sin necesidad de derivatización. Esto disminuye el tiempo y esfuerzo de la preparación de las muestras mejorando la consistencia del análisis. Usualmente con un detector bien mantenido se consigue una sensibilidad de 10 pmoles. La compatibilidad de la detección electroquímica con gradientes de elución, acoplado a la alta selectividad de las fases estacionarias, permite la separación de mezclas de azúcares simples, oligo- y polisacáridos que pueden ser separados con alta resolución en una sola corrida.

Esta metodología por lo tanto es ideal para el análisis de glicoproteínas producidas por la tecnología recombinante que necesita condiciones de control muy rigurosas. El método es el más utilizado por su velocidad, alta resolución y fácil automatización.

Referencias bibliográficas

- BASA, L. J., & SPELLMAN, M. W.** (1990). Analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 499, 205-220. 10.1016/S0021-9673(00)96974-7
- CORRADINI C., CAVAZZA A., & BIGNARDI C.** (2012). High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Article ID 487564, 10.1155/2012/487564
- FRAHN, J. L., & MILLS, J. A.** (1959). Paper ionophoresis of carbohydrates. *Aust J. Chem.*, 12, 65-89. 10.1071/CH9590065
- HARDY, M. R. & TOWSEND, R..R.** (1988). Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3289-3293. 10.1073/pnas.85.10.3289
- HARDY, M. R., TOWSEND, R. R., & LEE, Y.C.** (1988). Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 170, 54-62. 10.1016/0003-2697(88)90089-9
- HICKS, K. S.** (1988). High Performance Liquid Chromatography of Carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46, 17-72. 10.1016/S0065-2318(08)60164-X
- HONDA, S.** (1984). High-performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, 140, 1-47. 10.1016/0003-2697(84)90130-1
- HOTCHKISS, A. T., & HICKS, K. B.** (1990). Analysis of oligogalacturonic acids with 50 or fewer residues by high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 184, 200-206. 10.1016/0003-2697(90)90669-z
- HUBER, C. G. & BONN, G. K.** (1995). HPLC of carbohydrates with cation and anion-exchange silica and resin-based stationary phases, in *Carbohydrate Analysis, Journal of Chromatography Library*, 58, 147-180, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- JOHNSON, D. C. & LACOURSE, W. R.** (1992). Pulsed electrochemical detection at noble metal electrodes in liquid chromatography. *Electroanalysis*, 4, 367-380. 10.1002/elan.1140040404
- KOIZUMI, K., KUBOTA, Y., TANIMOTO, T., & OKADA, Y.** (1989). High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-glucosyl oligosaccharides and -polysaccharides (polymerization degree greater than or equal to 50) with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.*, 464, 365-373. 10.1016/S0021-9673(00)94254-7
- LACOURSE, W. R.** (1997). Origins of pulsed potential cleaning. In *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography* (pp. 6-8), New York: John Wiley & Sons,.

- LAINE, R. A. ESSELMAN, W. J. & SWEELEY, C. C.; GINSBURG, V. (Ed.),** (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates in *Methods in Enzymology* (Vol 28, pp. 159-167), Academic Press New York.
- LEE, Y. C.** (1990). High-performance anion-exchange chromatography for Carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.*, 189, 151-162. 10.1016/0003-2697(90)90099-u
- LIN, J. & WU, S. S.** (1987). Synthesis of dabsylhydrazine and its use in the chromatographic determination of monosaccharides by thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 59, 1320-1326. 10.1021/ac00136a014
- MURAMOTO, K., GOTO, R., & KAMIYA, K.** (1987). Analysis of reducing sugars as their chromophoric hydrazones by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 162, 435-442. 10.1016/0003-2697(87)90416-7
- PASKACH, T. J., LIEKER, H. P., REILLY, P. J., & THIELECKE, K.** (1991). High performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quarternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydr. Research*, 215, 1, 1-14. 10.1016/0008-6215(91)84002-V
- REINHOLD, V.; HIRS C. H. & TIMASHEFF, S. N. (Eds)** (1972). Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. *Methods in Enzymology*, 25, pp. 244-249. Academic Press New York. 10.1016/S0076-6879(72)25021-2
- RENDELMAN, J. A.** (1973). Carbohydrates in Solution. *Advances in Chemistry, Ser.* (117), Washington, D. C. Amer. Chem. Soc., pp. 51-68.
- ROBERTS, E. J., WADE, C. P., & ROWLAND, S. P.** (1971). Effect of base concentration upon the reactivities of the hydroxyl groups in methyl D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, 17, 393-399. 10.1016/S0008-6215(00)82547-1
- ROCKLIN, D., CLARKE, A. P. & WEITZHANDLER, M.** (1998). Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrates via a new quadruple-potential waveform. *Analytical Chemistry*, 70, 8, 1496-1501. 10.1021/ac970906w
- ROCKLIN, R. D., & POHL, C. A.** (1983). Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 6, 1577- 1590. 10.1080/01483918308064876.
- ROHRER, J. S., BASUMALLICK, L., & HURUM, D.** (2013). High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection for carbohydrate analysis of glycoproteins. *Biochemistry (Mosc)*, 78(7), 697-709. 10.1134/S000629791307002X.
- ROSENFELDER, G., MORGELIN, M., CHANG, J. Y. SCHNENBERGER, C. A., BRAUN, D. G. & TOWBIN H.** (1985). Chromogenic labeling of monosaccharides using 4'-N,N-dimethylamino-4-aminoazobenzene. *Anal. Biochem.*, 147, 156-165. 10.1016/0003-2697(85)90022-3

- ROTHENHÖFER, M., GRUNDMANN, M., BERNHARDT, G., MATYSIK, F.-M., & BUS-CHAUER, A.** (2015). High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, 988, 106–115. 10.1016/j.jchromb.2015.02.027
- SPELLMAN, M. W., BASA, L. J., LEONARD, C. K., CHAKEL, J. A. & O'CONNOR J. V.** (1989). Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 14100–14111.
- TAKEMOTO, H. HASE, S. & IKENATA T.** (1985). Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 145, 245–250. 10.1016/0003-2697(85)90357-4
- THAYER, J. R., ROHRER, J. S., AVDALOVIC, N., & GEARING, R. P.** (1998). Improvements to in-line desalting of oligosaccharides separated by High -pH anion exchange chromatography with pulse amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 256(2), 207–16. 10.1006/abio.1997.2519
- TOWSEND, R. R. & HARDY, M. R.** (1991). Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-pH anion exchange chromatography. *Glycobiology*, 1, 139–147. 10.1093/glycob/1.2.139
- TROY, F. A., HALLENBECK, P. C., MCCOY, R. D. & VIMR, E. R.** (1987). Detection of polysialosyl-containing glycoproteins in brain using prokaryotic-derived probes. In Ginsburg, V. (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 138, pp. 169–185), Academic Press, San Diego, CA. 51, 52. 0.1016/0076-6879(87)38014-0
- TSUJI, T., YAMAMOTO, K., KONAMI, Y., IRIMURA, T., & OSAWA, T.** (1982). Separation of acidic oligosaccharides by liquid chromatography: application to analysis of sugar chains of glycoproteins. *Carbohydr. Res.* 109, 259–269. 10.1016/0008-6215(82)84043-3
- WEITZHANDLER, M., ROHRER, J., THAYER, J.R., & AVDALOVIC, N.** (1998). HPAEC-PAD Analysis of monosaccharides released by exoglycosidase digestion using the CarboPac MA1. *Methods Mol. Biol.* 76, 71–78. 10.1385/0-89603-355-4:71

10

Métodos espectroscópicos para el análisis de glicoproteínas

MARIANELA MASIN Y CARLOS W. BERTONCINI

10.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de glicoproteínas demanda el conocimiento de una variedad de aspectos estructurales que, en su conjunto, contribuyen a la descripción de su relación estructura–función. A partir de la búsqueda de propiedades estructurales de la cadena polipeptídica y sus glicanos conjugados, es posible inferir, por ejemplo, el impacto de la pérdida de grupos glicosídicos en la estabilidad de una glicoproteína, el cambio en su funcionalidad debido a mutaciones o incluso el efecto funcional de la unión de un ligando. Debido a esto, los estudios estructurales de glicoproteínas son un punto de partida habitual en el descubrimiento y desarrollo de fármacos contra virus, bacterias y otros agentes patógenos, así como en el diseño de nuevas proteínas terapéuticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes.

Los estudios estructurales toman una especial relevancia en la demostración de biosimilitud y el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas producidas por biotecnología. En la demostración de biosimilitud es necesario realizar un ejercicio de comparabilidad exhaustivo que permita asegurar la similitud en la estructura de una glicoproteína biosimilar respecto de la glicoproteína de referencia. Este ejercicio de comparabilidad también debe realizarse luego de implementarse todo tipo de cambios en los procesos de manufactura de la glicoproteína. Es por esto que las herramientas que brindan información sobre la estructura de proteínas son fundamentales en el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas, permiten detectar posibles alteraciones en la estabilidad y agregación del producto farmacéutico, ya sea por adición de excipientes o durante el tiempo de duración del producto.

El objetivo de este capítulo es brindar al lector una introducción a las distintas metodologías biofísicas basadas en el uso de espectroscopia molecular que comúnmente se emplean en la caracterización de la relación estructura–función en glicoproteínas. El capítulo hace especial énfasis en aquellas herramientas espectroscópicas que proveen información crítica para la caracterización de glicoproteínas terapéuticas, como el dicroísmo circular, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la espectroscopia de fluorescencia.

10.2. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS Y EL PROCESO DE PLEGAMIENTO

La estructura de una proteína está codificada en su cadena polipeptídica (secuencia de aminoácidos), que adopta su estado energéticamente más estable por medio de un mecanismo denominado plegamiento. Este proceso de plegamiento comienza ya desde el mismo momento en que la cadena naciente asoma de los ribosomas. Generalmente asistido por otras proteínas llamadas chaperonas, el proceso de plegamiento permite a la cadena polipeptídica explorar un espacio conformacional reducido hasta alcanzar el estado plegado. El estado plegado es aquella conformación de la cadena polipeptídica que posee mayor estabilidad (menor energía libre) gracias a una suma de fuerzas electrostáticas, exclusión del solvente, enlaces puente de hidrógeno, puentes disulfuro y contactos de largo alcance.

El estado plegado que adopta una proteína no es siempre el mismo. Si bien es la conformación energéticamente más estable que puede adoptar la cadena polipeptídica, el hecho de que esta se pliegue al instante inmediato posterior a ser sintetizada hace que el proceso sea fuertemente influenciado por el entorno celular particular que experimenta una proteína al momento de la síntesis. La influencia del entorno en el mecanismo de plegamiento es tan importante que se postula que el entorno «empuja» y «acompaña» a la cadena polipeptídica en el camino hacia alcanzar la estructura más estable, haciendo que ciertas conformaciones «permitidas» sean pobladas y evitando que se pueblen otras conformaciones «prohibidas» (Fersht y Daggett, 2002). Sin embargo, en el transcurso de la búsqueda del estado plegado es frecuente que la cadena polipeptídica adopte conformaciones parcialmente plegadas que puedan direccionar el proceso no hacia el estado plegado, sino hacia intermediarios plegados de forma aberrante y con cierta estabilidad marginal. Tales intermediarios parcialmente plegados son idénticos en secuencia y peso molecular a las proteínas plegadas, pero difieren en su nivel de actividad, unión a ligandos, estabilidad en solución y sensibilidad a proteasas, entre otras características. Además, estos intermediarios parcialmente plegados suelen facilitar la formación de oligómeros y otras estructuras agregadas, que habitualmente son tóxicas para la célula y despiertan respuestas de estrés, como un incremento en la actividad de chaperonas y en la degradación de proteínas (Figura 10.1).

Es pertinente mencionar que, de hecho, la secuencia de una proteína y la maquinaria de protección celular han coevolucionado para evitar que al plegarse la cadena polipeptídica se adopten estos intermediarios parcialmente plegados y causen la muerte celular. Cuando por ingeniería genética se altera la secuencia de una proteína por mutación sitio-dirigida a fin de modificar su actividad biológica, o se crea artificialmente una quimera por combinación de dos cadenas polipeptídicas, se considera solamente el estado plegado de las proteínas, sin tomar en consideración el posible impacto de los cambios

introducidos en el proceso de plegamiento. Debido a esto, es habitual que diseños de proteínas *in silico* fracasen al momento de ser transferidos a la producción de una proteína exógena en un hospedero celular, ya que no encuentran las condiciones adecuadas para alcanzar el estado plegado.

En el contexto de la producción heteróloga de glicoproteínas, en donde se fuerza a un sistema celular eucariota a producir grandes cantidades de una proteína exógena, es habitual que los mecanismos de protección celular frente a proteínas parcialmente plegadas o desplegadas se vean sobrepasados (Hartl *et. al.*, 2011). Esto produce la acumulación de intermediarios de plegamiento que con frecuencia se degradan parcialmente, oligomerizan y agregan como cuerpos de inclusión. La población de intermediarios parcialmente plegados trae como consecuencia una pérdida significativa del rendimiento del proceso productivo y serias dificultades en el *downstream* durante la purificación del producto. Más aún, en relación con la producción de glicoproteínas terapéuticas, los agregados pueden producir reacciones inmunológicas graves en aquellos pacientes tratados con el producto, si los agregados no son removidos durante el proceso de purificación.

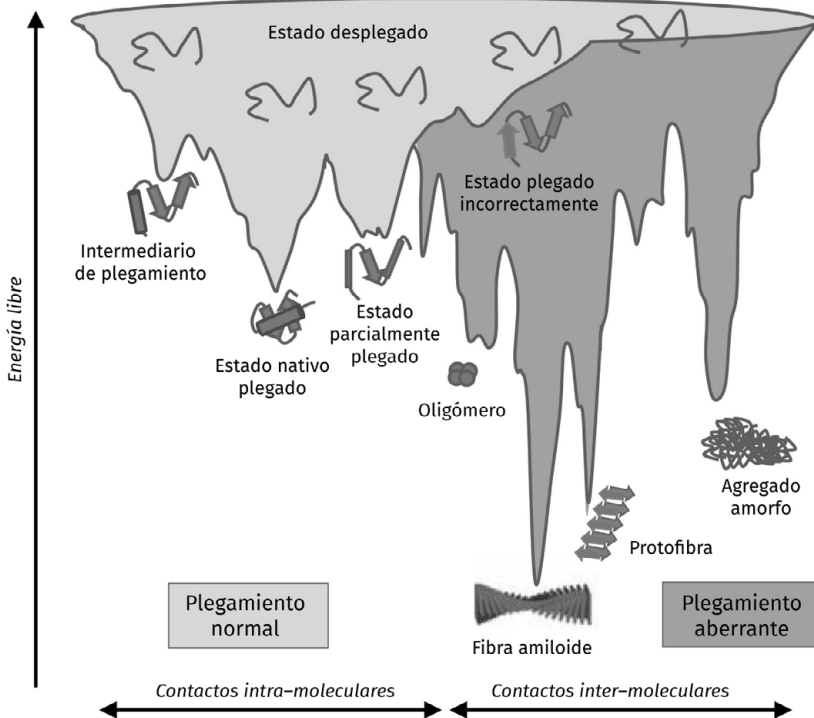


FIGURA 10.1. PLEGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE GLICOPROTEÍNAS. DESCRIPCIÓN PICTÓRICA DE LOS POSIBLES CAMINOS DE PLEGAMIENTO QUE PUEDE SEGUIR UNA CADENA POLIPEPTÍDICA PARA ALCANZAR EL ESTADO NATIVO PLEGADO

Resulta entonces de primordial relevancia en la optimización de todo proceso de producción de glicoproteínas la caracterización estructural no solo de los productos principales sino también de los secundarios, incluyendo especies parcialmente plegadas, agregadas y productos de degradación. Afortunadamente existe una gran variedad de métodos biofísicos para el análisis y caracterización de las propiedades estructurales de glicoproteínas.

El estado nativo plegado es el estado energéticamente más favorable (menor energía libre) en las condiciones del medioambiente celular. Sin embargo, a lo largo del proceso de plegamiento, los polipéptidos pueden estabilizarse de forma transiente alcanzando estados parcialmente plegados. En ausencia de mecanismos adecuados para plegar nuevamente o degradar estos intermediarios parcialmente plegados es que pueden poblarse y estabilizarse estructuras oligoméricas o agregados que son más estables que el estado nativo plegado. Estas estructuras plegadas incorrectamente son frecuentemente tóxicas para las células productoras de glicoproteínas y, si no se remueven durante la purificación de un producto bioterapéutico, pueden causar reacciones inmunológicas en pacientes.

10.3. MÉTODOS BIOFÍSICOS EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS

Existen cuatro niveles de estructura posibles de alcanzar para una proteína. La *estructura primaria* es la secuencia lineal de aminoácidos que da origen a la cadena polipeptídica. La *estructura secundaria* se forma durante el proceso de plegamiento por interacción entre regiones contiguas que se estabilizan como hélices α o láminas β , mediante la formación de enlaces puente de hidrógeno. La *estructura terciaria* se adopta concomitantemente con la secundaria durante el mismo proceso de plegamiento, empaquetando las diferentes unidades de estructura secundaria y orientando las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos hacia el interior del núcleo plegado. En este proceso se acercan regiones distantes en la cadena polipeptídica y, en algunos casos, se estabiliza la topología tridimensional de la proteína a través de la formación de enlaces disulfuro. Finalmente, la *estructura cuaternaria* involucra la interacción entre dos o más cadenas polipeptídicas plegadas para dar origen a proteínas multiméricas, como es el caso de anticuerpos, complejos enzimáticos y receptores multiméricos de membrana, entre otros (Dill *et al.*, 2008).

Debido a la elevada complejidad que presentan las glicoproteínas, la caracterización de su estructura demanda de una combinación de metodologías analíticas. Estas metodologías se complementan a fin de determinar los diferentes niveles de estructura, primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Tabla 10.1).

La *estructura primaria* de glicoproteínas puede ser estudiada por metodologías químicas, como la degradación de Edman, o métodos de degradación enzimáticos acoplados a espectrometría de masas de alta resolución. La composición de glicanos se determina a través de metodologías de degradación enzimática o derivatización química, acoplados a métodos cromatográficos con detectores de fluorescencia o de espectrometría de masas.

Los métodos de caracterización de la *estructura secundaria y terciaria* de proteínas se clasifican en métodos de baja y alta resolución. Los métodos de baja resolución proveen una huella de la estructura de la proteína y permiten inferir rápidamente su estado plegado o desplegado, así como estimar la cantidad de estructura secundaria o si la estructura terciaria está perturbada. Entre estos métodos puede mencionarse la espectroscopia de dicroísmo circular, la espectroscopia de fluorescencia, la espectroscopia infrarroja y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear en 1 y 2 dimensiones.

Los métodos de alta resolución proveen información a nivel atómico acerca del estado de plegamiento y estructura de una proteína, posibilitando la descripción de un modelo estructural tridimensional. Existen tres métodos con la capacidad de proveer este tipo de información de alta resolución, la difracción de rayos X, la espectroscopia por resonancia magnética nuclear heteronuclear (NMR) y la criomicroscopía electrónica (Cryo-EM). Puede considerarse además a la espectroscopia por resonancia electrónica paramagnética (EPR) como un cuarto método, aunque altamente específico, que provee información espacial de distancia en el caso de proteínas con centros activos compuestos por átomos metálicos.

En lo que respecta a las metodologías disponibles para el estudio de la *estructura cuaternaria* de glicoproteínas, se utilizan principalmente electroforesis, cromatografía líquida de exclusión molecular, ultracentrifugación analítica, espectrometría de masas y microscopía de fuerza atómica. Existen también metodologías espectroscópicas para evaluar la estructura cuaternaria de glicoproteínas, basados en la dispersión de radiaciones, tales como la dispersión dinámica o estática de luz y la dispersión de rayos X de ángulo pequeño. Se ha desarrollado también una metodología de espectroscopia de resonancia magnética nuclear capaz de inferir el estado oligomérico de una proteína a partir de la medición de su coeficiente de difusión, llamada NMR con gradiente de campo pulsado.

10.4. METODOLOGÍAS ESPECTROSCÓPICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

De todas las metodologías descriptas en el punto anterior, el foco de este capítulo serán aquellas metodologías analíticas que habitualmente se utilizan para indagar la estructura de glicoproteínas mediante el uso de radiaciones

TABLA 10.1. MÉTODOS BIOFÍSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

Estructura	Métodos biofísicos
Primaria	<p><i>Químicos</i> Degradación de Edman acoplada a cromatografía líquida</p> <p><i>Enzimáticos</i> Degradación acoplada a cromatografía líquida y Espectrometría de Masas de Alta Resolución</p>
Secundaria / terciaria	<p><i>Baja Resolución</i> Dicroísmo Circular Fluorescencia Infrarroja Resonancia Magnética Nuclear Homonuclear.</p> <p><i>Alta Resolución</i> Difracción de Rayos X Crio-Microscopía Electrónica Resonancia Magnética Nuclear Heteronuclear</p>
Cuaternaria	<p><i>Metodologías de separación física</i> Electroforesis Cromatografía Líquida de Exclusión Molecular Ultracentrifugación Analítica Espectrometría de Masas Microscopía de Fuerza Atómica.</p> <p><i>Metodologías espectroscópicas</i> Dispersión Dinámica o Estática de Luz Dispersión de Rayos X de ángulo pequeño</p>

electromagnéticas, lo que comúnmente se conoce con el nombre de espectroscopia. La versatilidad del uso de las espectroscopias radica fundamentalmente en tres factores. Por un lado, la variedad de fuentes de radiaciones electromagnéticas disponibles para interactuar con la materia, capaces de obtener haces de muy alta energía, en algunos casos pulsados y con alta precisión en la longitud de onda y frecuencia. Por otro lado, existe una variedad de transiciones nucleares, electrónicas y moleculares que pueden manifestarse en proteínas por interacción de estas radiaciones con los átomos, con los enlaces entre estos átomos, con las moléculas de aminoácidos o incluso con la cadena polipeptídica (Figura 10.2). Por último, los avances en electrónica y digitalización de señales han permitido detectar, con muy alta sensibilidad, las señales emitidas a partir de la interacción de las fuentes de radiación con la materia.

En función de la naturaleza de las transiciones causadas por las radiaciones, las espectroscopias pueden clasificarse en:

- *Espectroscopias de absorción*: son aquellas en las que el átomo, enlace o molécula absorbe radiación a una determinada longitud de onda característica. Esta absorción de energía promueve electrones o espines nucleares

de un estado basal a un estado excitado. Este fenómeno de absorción perturba la radiación incidente sobre la muestra de forma tal que la radiación resultante pierde los componentes absorbidos y permite la identificación de la frecuencia absorbida. Estas espectroscopias incluyen la UV-Visible, Infra-Roja (IR), Dicroísmo Circular (CD) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR). La cantidad de energía absorbida es función de la abundancia de los grupos que absorben, con lo cual las espectroscopias de absorción son, en general, cuantitativas. En espectroscopías de absorción los detectores de radiación se sitúan, generalmente, en la misma dirección del haz incidente (Figura 10.2).

- *Espectroscopias de emisión:* son aquellas en las que un grupo de átomos o moléculas (fluoróforos) absorben radiación electromagnética de una determinada frecuencia, promoviendo electrones de un estado basal a un excitado (longitud de onda de excitación). Los electrones promovidos regresan al estado basal (relajación) a través de la emisión de una radiación electromagnética con una frecuencia diferente a la de excitación (longitud de onda de emisión). Entre estas espectroscopias se incluyen la Fluorescencia y la Fosforescencia. Este estado excitado tiene una larga vida media (10^{-9} a 10^7 s para fluorescencia y 10^{-3} a 10^{-2} s para fosforescencia). La emisión de esta radiación electromagnética en forma de fluorescencia es altamente sensible al entorno de los fluoróforos, y a la presencia de otros grupos fluorescentes en la cercanía, con lo cual el rendimiento cuántico de un fluoróforo no es constante. Esta sensibilidad hace que en general la fluorescencia no sea una espectroscopia cuantitativa. En la espectroscopia de emisión los detectores de radiación se sitúan perpendicularmente a la dirección del haz incidente (Figura 10.2).
- *Espectroscopías de dispersión:* son aquellas en las que la radiación electromagnética incide sobre los átomos, moléculas o macromoléculas y se miden las características de la radiación que se dispersa o difracta. Mediante este fenómeno es posible evaluar las características macroscópicas de oligómeros o agregados de las proteínas que, por su tamaño de 10^{-9} a 10^{-6} m, dispersan luz incidente de similar longitud de onda (10^{-7} m para dispersión de luz visible). La dispersión de luz puede ser dinámica (DLS, un solo detector) cuando determina el coeficiente de difusión de una macromolécula, o estática cuando evalúa el peso molecular y tamaño de la misma (SLS, arreglo de varios detectores). Utilizando radiaciones de mayor energía y menor longitud de onda (10^{-9} a 10^{-11} m para dispersión de rayos X en ángulo pequeño, SAXS), es posible determinar densidades electrónicas que permiten evaluar las características microscópicas de la morfología de estos oligómeros o agregados. Mientras que las dos técnicas anteriores se llevan a cabo en solución, en la difracción de rayos X, en cambio, se necesita la presencia de una proteína en estado sólido ordenada en un cristal. Cuando los rayos X inciden sobre una proteína cristalizada, la radiación electromagnética es difractada por los electrones de los átomos por ser

su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico (10^{-10} m). El haz de rayos X difractado contiene entonces información sobre la posición y tipo de átomos sobre el cual ha incidido. Por esta razón la difracción de rayos X es capaz de proveer información atómica tridimensional que permite reconstruir la estructura de una proteína con resolución atómica. En la espectroscopía de dispersión la detección del haz resultante de la interacción se realiza en múltiples direcciones (Figura 10.2).

A continuación, trataremos en mayor detalle los aspectos fundamentales de tres de estas metodologías que habitualmente se utilizan para monitorear la preservación de la estructura en la producción y el control de calidad de glicoproteínas de uso industrial o farmacéutico.

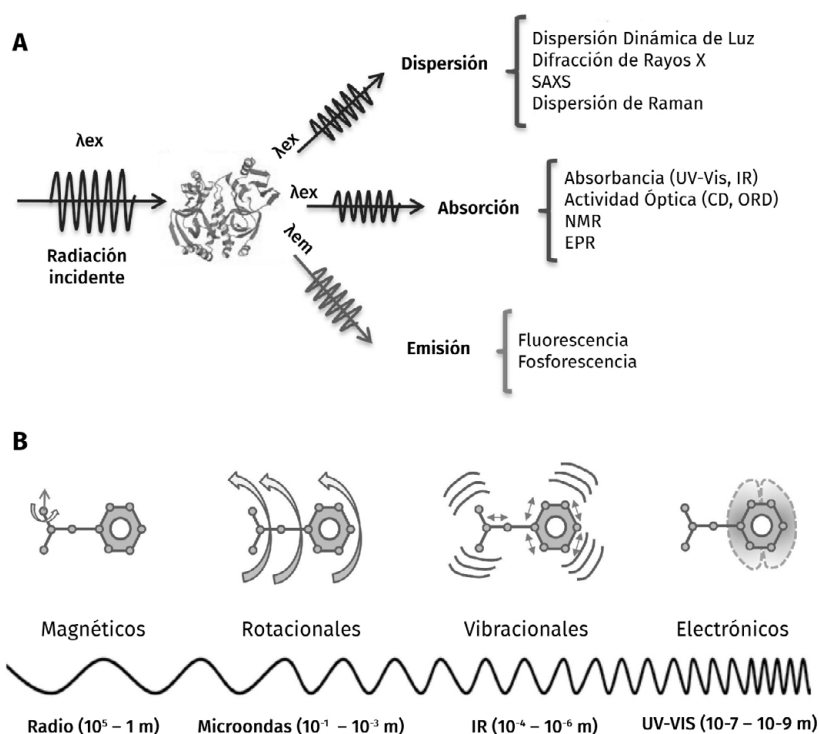


FIGURA 10.2. USO DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS. **A.** EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DE LAS TRANSICIONES CAUSADAS POR LAS RADIACIONES, LAS ESPECTROSCOPIAS PUEDEN CLASIFICARSE EN ESPECTROSCOPIAS DE ABSORCIÓN, ESPECTROSCOPIAS DE EMISIÓN, O ESPECTROSCOPIAS DE DISPERSIÓN. **B.** ES POSIBLE CARACTERIZAR DIFERENTES TIPOS DE TRANSICIONES NUCLEARES, ELECTRÓNICAS Y MOLECULARES QUE PUEDEN MANIFESTARSE EN PROTEÍNAS POR INTERACCIÓN DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS CON LOS ÁTOMOS, CON LOS ENLACES ENTRE ESTOS ÁTOMOS, CON LAS MOLÉCULAS DE AMINOÁCIDOS O INCLUSO CON LA CADENA POLIPEPTÍDICA

10.4.1. Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) mide la diferencia de absorción de una muestra entre una radiación electromagnética incidente que es circularmente polarizada en dos sentidos. En biomoléculas, la espectroscopía de CD permite estudiar arreglos atómicos y moleculares que tengan quiralidad, es decir que sean ópticamente activos, como el enlace peptídico, los anillos aromáticos presentes en los aminoácidos Tyr, Phe y Trp y los puentes disulfuro. Las propiedades quirales confieren diferentes características de absorción en función del sentido de polarización de la radiación incidente. Esta herramienta espectroscópica es de suma utilidad para caracterizar rápidamente el contenido de estructura secundaria de una glicoproteína y verificar su estado de estructura terciaria o plegamiento correcto (Kelly *et al.*, 2005). El enlace peptídico absorbe diferencialmente la luz circularmente polarizada en función del arreglo tridimensional que adopta el sistema electrónico conjugado de los orbitales π que lo componen. De acuerdo con la estructura secundaria en la que esté inmerso el enlace peptídico, ya sea hélice α , lámina β o de *random coil*, los electrones en los orbitales π pueblan diferentes estados energéticos que absorben radiación electromagnética a diferentes longitudes de onda. Estas transiciones posibles ocurren entre 190 a 250 nm, con lo cual pueden ser observadas observables utilizando radiaciones electromagnéticas del espectro ultravioleta lejano.

Cuando el enlace peptídico adopta un arreglo tridimensional de lámina β se observa una banda de absorción positiva alrededor de 195 nm y una banda de absorción negativa a 215 nm. Por el contrario, el enlace peptídico en un arreglo tridimensional de hélice α dará una banda de absorción positiva a 190 nm y una banda de absorción negativa con dos picos a 208 y 222 nm (Figura 10.3A). La presencia de la conformación de *random coil* estará dada por una fuerte banda de absorción negativa a 195 nm. El espectro de CD para evaluar la estructura secundaria de una proteína se colecta entre 190 y 250 nm, y el resultado es un espectro de absorción que representa la mezcla de los diferentes picos de absorción, ponderado por la abundancia relativa de cada una de las conformaciones estructurales en la cadena polipeptídica. Con el conocimiento de la composición de la estructura de una proteína es posible deconvolucionar el espectro de CD en los componentes individuales de estructura secundaria. Esto permite emplear a un espectro de CD como valioso indicador del contenido de estructura secundaria de proteínas y detectar rápidamente el impacto de mutaciones, ligandos o solventes en la conformación de la misma (Greenfield, 2006).

El sistema orbital conjugado de los anillos aromáticos presentes en los aminoácidos Tyr, Phe y Trp también posee quiralidad. Esta característica es aprovechada en la espectroscopía de CD para evaluar el entorno estructural en el cual se encuentran estos aminoácidos. Debido a su hidrofobicidad, los aminoácidos aromáticos suelen estar excluidos del solvente, conformando

el núcleo central de la proteína, lo que los convierte en excelentes reporteros del estado plegado. Phe y Tyr se caracterizan por bandas de absorción negativas alrededor de 265 a 275 nm, mientras que Trp muestra una banda de absorción positiva entorno a los 280–290 nm, todas transiciones que ocurren en el ultravioleta cercano (Figura 10.3B). Debido a esta característica, para evaluar el arreglo estructural de los aminoácidos aromáticos es necesario coleccionar un espectro de absorción entre 250 y 300 nm, en el llamado uv-cercano, en contraposición con las bandas de absorción del enlace peptídico, que se consideran uv-lejano.

En su conjunto, las características de las bandas de absorción de CD son una huella dactilar del estado plegado de una glicoproteína, y cualquier perturbación de esta conformación puede ser detectada por cambios sutiles en el mismo, aún en ausencia de cambios significativos de estructura secundaria.

Por medio de espectroscopia de CD también es posible la determinación de la temperatura de *melting* (T_m) de una cadena polipeptídica, lo que es particularmente útil para caracterizar el estado plegado de una glicoproteína. En un experimento de titulación por temperatura, la T_m es la temperatura que caracteriza la transición desde el estado plegado al estado desplegado (50 % plegado y 50 % desplegado). Empleando un equipo de CD con control de temperatura es posible tomar espectros de CD a varias temperaturas y caracterizar la evolución de la glicoproteína desde el estado plegado al estado desplegado, monitorizando la transformación de los elementos de estructura secundaria en *random coil*. Un ajuste global a las curvas de titulación por temperatura permite calcular la T_m , que es una característica que se asocia con el estado plegado, con su energía libre y su estabilidad. Si dos proteínas con la misma secuencia primaria tienen T_m diferentes, entonces se puede inferir que su estabilidad es diferente, así como la energía libre de su estado plegado, y por ende su estructura también lo será (Figura 10.3C) (Martin y Bayley, 2002). En el caso de proteínas termosensibles, en las que el experimento de incrementar la temperatura causa agregación, es posible llevar a cabo los estudios de transición del estado plegado al estado desplegado por medio de la adición de agentes caotrópicos como urea o cloruro de guanidinio.

Un ejemplo de la aplicación de dicroísmo circular para la caracterización de glicoproteínas terapéuticas es el estudio realizado en eritropoyetina por Kerwin y colegas para el laboratorio Amgen (Estados Unidos) (Deechongkit, 2006). El objetivo del trabajo ha sido detectar las posibles diferencias estructurales entre la eritropoyetina Epogen de Amgen y Eprex de Ortho Biotech Products (Estados Unidos), aplicando una variedad de técnicas biofísicas para el análisis comparativo de las mismas. Los investigadores realizaron estudios comparativos de CD en el uv lejano y cercano, pudiendo observar pequeñas modificaciones en el comportamiento espectroscópico, sugiriendo en Eprex un menor contenido helicoidal (5 % conforme a las bandas de absorción en el uv lejano) y cambios en la exposición al solvente del Trp64 (cambios en las bandas de absorción de CD en el uv cercano) respecto de Epogen. Estos

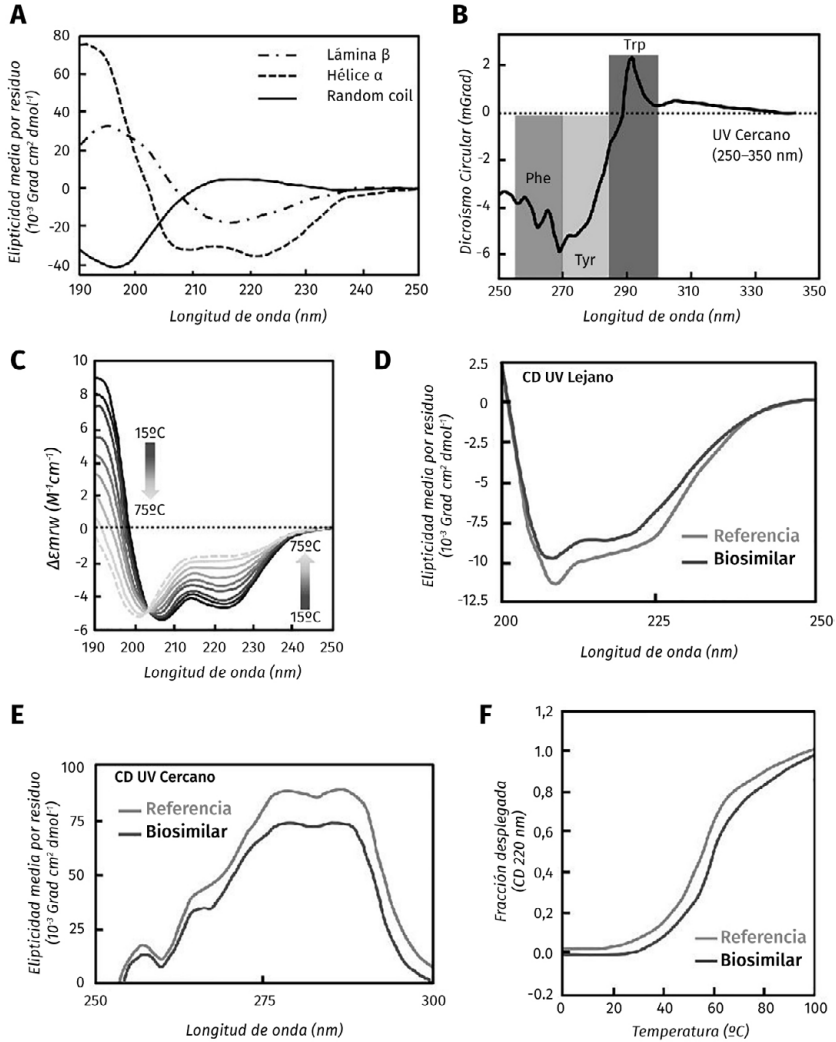


FIGURA 10.3. DICROÍSMO CIRCULAR EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS A. ESPECTRO DE CD EN EL UV LEJANO DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS PURAS QUE PUEDEN ADOP-TAR LOS POLIPÉPTIDOS (HÉLICE- α , LÁMINA- β Y RANDOM COIL). B. ESPECTRO DE CD EN EL UV CERCAÑO DONDE SE MUESTRAN LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DISTINTIVAS DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS TRIPTÓFANO (TRP), FENILALANINA (PHE) Y TIROSINA (TYR). C. TITULACIÓN POR TEMPERATURA DE UNA PROTEÍNA MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE SU T_M UTILIZANDO CD. NÓTESE LA TRANSICIÓN DEL ESTADO PLEGADO AL DESPLEGADO. D. EJEMPLO DEL USO DE CD EN EL UV LEJANO PARA DETECTAR CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD ENTRE DOS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS (REFERENCIA Y BIOSIMILAR). E. EJEMPLO DEL USO DE CD EN EL UV CERCAÑO PARA DETECTAR CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD ENTRE DOS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS (REFERENCIA Y BIOSIMILAR). F. TITULACIÓN POR TEMPERATURA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DEMOSTRANDO QUE CAMBIOS CONFORMACIONALES PUEDEN SER EVIDENCIADOS A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE LA T_M POR MEDIO DE CD

cambios sugieren que Eprex posee una conformación estructural levemente diferente que Epogen. Esto se confirma al evaluar el comportamiento de ambas proteínas en experimentos de desplegamiento causado por temperatura, en donde Eprex demuestra tener una similar T_m pero no demuestra ser igualmente reversible, probablemente debido a una mayor tendencia a la formación de agregados a altas temperaturas (Figuras 10.3D, 3E y 3F).

10.4.2. Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) es una metodología de absorción de radiación electromagnética que permite obtener información acerca de las conformaciones estructurales de glicoproteínas con alta resolución (Marion, 2013). A diferencia de las espectroscopias ópticas, en las cuales las transiciones energéticas se manifiestan a nivel de los electrones, en NMR son los espines nucleares los que absorben y liberan energía. Para que puedan ocurrir estas transiciones nucleares es necesario que los espines estén polarizados (alineados) bajo un campo magnético de muy alto campo (10^8 a 10^9 Hz). Cuanto mayor sea el campo magnético mayor es la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado basal, con lo cual se incrementa significativamente la resolución del espectrómetro de NMR (Figura 10.4A). Tales campos magnéticos, de aproximadamente 10^5 a 10^6 veces el campo magnético de la tierra, son creados a través del uso de imanes especialmente contruidos con materiales superconductores que trabajan sumergidos en Helio líquido. Debido a esto los equipos de resonancia magnética nuclear son altamente costosos de adquirir y mantener.

No todos los núcleos atómicos son susceptibles de magnetizarse ya que, para hacerlo, deben contener un número impar de protones o neutrones. En proteínas, el átomo más comúnmente utilizado para NMR es el hidrógeno (^1H , también llamado protón) y luego le siguen el carbono (^{13}C) y el nitrógeno (^{15}N). Debido a su baja abundancia isotópica, para poder detectar carbono y nitrógeno en NMR de proteínas es necesario recurrir al enriquecimiento isotópico suplementando los medios de cultivo con precursores químicos enriquecidos como el cloruro de amonio ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$), sulfato de amonio ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), glucosa ($^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) o metanol ($^{13}\text{CH}_3\text{OH}$). Esto hace que la obtención de muestras para NMR también sea costosa, por lo que habitualmente se recurre a experimentos homonucleares en donde el único núcleo que se detecta es el hidrógeno (^1H), conocidos como espectros de NMR de protones.

El experimento de NMR consta de tres partes, una primera parte en donde se excita el sistema a través de un pulso de radiación electromagnética. En general, la mayoría de los experimentos de NMR de protones comienza con la excitación del sistema a través de los protones, que son los espines más abundantes. La segunda parte involucra a las transiciones de los espines en el estado excitado. A diferencia de las espectroscopias ópticas, el estado

excitado de un núcleo tiene una vida media con una duración de 10^9 veces más larga (orden de segundos), debido a que la energía se pierde (relaja) muy lentamente. Esta larga vida media permite, de similar modo a la espectroscopia de fluorescencia, que el estado excitado sea reportero no solo de la estructura de una proteína sino de la dinámica de las transiciones conformacionales que ocurren en ese tiempo, como por ejemplo el plegamiento de la cadena polipeptídica, aspectos funcionales como catálisis enzimática o unión a receptores.

Además, en NMR es posible transferir la energía del estado excitado (magnetización) de un núcleo vecino a otro, de forma altamente específica por medio de pulsos cortos de radiofrecuencia. Esto hace que la magnetización del estado excitado «salte» de un núcleo a otro y que se «cargue» de las características del entorno electrónico que experimenta no solo el núcleo que excitamos sino también varios núcleos en el entorno. De este modo es posible lograr experimentos de NMR multidimensionales tanto homonucleares (si la magnetización se transfiere entre átomos de la misma naturaleza) como heteronucleares (si la transferencia es entre átomos de diferente naturaleza). Es habitual que en el estudio de biomoléculas se realicen experimentos homonucleares de 2 y 3 dimensiones, y experimentos heteronucleares de 2, 3 y 4 dimensiones. Cada dimensión contiene información de un núcleo en particular que se correlaciona con otro núcleo gracias a la transferencia de magnetización que ocurrió en el estado excitado. Esta correlación entre dos núcleos se visualiza en un espectro bidimensional de NMR como un cruce de las frecuencias de absorción de ambos núcleos (*crosspeak*). La transferencia de magnetización se logra de un modo altamente específico que posibilita, por ejemplo, identificar los picos de absorción que pertenecen a cada átomo de cada aminoácido de la proteína o grupo funcional del glicano, si se trata de una glicoproteína. Esto posibilita obtener el mapeo preciso y con alta resolución de la estructura de una proteína o un glicano (Marion, 2013).

El último paso en la espectroscopia de NMR es la detección de la energía que libera el estado excitado. Al excitarse todos los átomos de la misma naturaleza simultáneamente, y dada la complejidad de las frecuencias que se correlacionan entre sí durante el transcurso del estado excitado, en NMR se detecta una multitud de frecuencias al mismo tiempo. Debido a que el ^1H es el átomo más abundante, previo a la detección se transfiere toda la magnetización nuevamente hasta los protones, que son los núcleos que se detectan con mayor sensibilidad. El detector detecta todas las frecuencias que decaen libremente (*Free Induction Decay*, o FID) que son convertidas a un espectro de NMR por medio de una transformada de Fourier. La transformada de Fourier extrae la información individual de frecuencias de cada uno de los núcleos resonantes que han participado del experimento de transferencia de magnetización.

En NMR, las frecuencias de absorción (o resonancia) de cada espín nuclear bajo la acción de un determinado campo magnético externo son influenciadas

por el entorno electrónico único que experimenta cada átomo. Estas frecuencias de absorción son altamente sensibles a cambios en los enlaces de cada átomo, en su conformación estructural y en las características de los átomos cercanos. Con el fin de independizar las frecuencias de absorción (picos) del campo magnético externo, en los espectros de NMR se convierten las frecuencias de absorción (Hz) a una escala universal llamada desplazamiento químico (δ). El desplazamiento químico de cada núcleo se referencia al Tetrametilsilano (TMS) que por convención tiene un desplazamiento químico $\delta=0$. En una proteína, el desplazamiento químico de ^1H puede tomar valores entre 0 y 10 ppm en función del enlace en el cual esté participando el protón (H–N, H–C) y dependiendo de si tiene otros protones cerca, si forma parte de un sistema conjugado aromático o participa de un enlace puente de hidrógeno, siendo un indicador de estructura secundaria (Figura 10.4B). El desplazamiento de ^{15}N para las amidas toma habitualmente valores entre 100 y 135 ppm, y está influenciado principalmente por la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido y, en menor medida, por la estructura secundaria que adopta la cadena polipeptídica. Para ^{13}C es posible observar desplazamientos químicos de 20 a 200 ppm en una proteína, dependiendo el átomo al cual esté unido el carbono (C–O, C–N, C–C, C–H, C–H₂ o C–H₃). Los desplazamientos químicos de los carbonos C α y C β son excelentes reporteros del tipo de aminoácido al cual pertenecen y de la estructura secundaria que adopta el mismo en la cadena polipeptídica plegada.

En glicoproteínas, el mismo fenómeno de absorción de radiación electromagnética que permite la caracterización de la estructura de la fracción proteica por NMR posibilita también el estudio estructural de los glicanos conjugados (Battistel *et al.*, 2014). La NMR de glicoproteínas permite identificar la naturaleza de los glicanos presentes directamente en la proteína glicosilada, habitualmente mediante los desplazamientos químicos de ^1H , que son característicos para cada glúcido. Generalmente los experimentos de identificación de glicanos por NMR demandan la comparación con patrones de glúcidos conocidos y se complementan con experimentos de deglicosilación enzimática y separación de glicanos por HPLC (Figura 10.4C). En la web hay disponibles bases de datos con desplazamientos químicos de carbohidratos que permiten la rápida asignación de un espectro de ^1H NMR de glicanos y así lograr su identificación, como CASPER (<http://www.casper.organ.su.se/casper/>) y SWEETDB (<http://www.glycosciences.de/sweetdb/>). CASPER realiza una predicción de los desplazamientos químicos de ^1H para un glúcido a partir de su secuencia y estructura, SWEETDB, por el contrario, identifica un glúcido a partir de los picos del espectro de NMR de ^1H o ^{13}C .

Es así que, mediante el monitoreo de los desplazamientos químicos de ^1H , ^{15}N o ^{13}C , es posible detectar sutiles cambios en la estructura de una proteína, la unión de un ligando, la modificación en la estructura de un glicano o el efecto de un excipiente en la formulación de una glicoproteína terapéutica. En la mayoría de los casos estas perturbaciones detectadas en los

desplazamientos químicos pueden ser localizadas con muy alta resolución, a nivel de aminoácidos o glúcidos individuales. Esto convierte a la NMR en una herramienta espectroscópica que brinda información única para caracterizar la estructura de glicoproteínas. En el análisis de glicoproteínas terapéuticas, la NMR de ^1H es habitualmente empleada para comparar rápidamente la estructura en solución de diferentes lotes de un producto, siendo una valiosa herramienta en las etapas de formulación y durante el control de calidad (Visser, 2013; Ghasriani, 2016). Mediante el uso de NMR de ^1H es posible también comprobar que el patrón de glicosilación del producto bioterapéutico es constante lote a lote, o frente a cambios en medios de cultivos o clones productores, detectándose diferencias muy sutiles en los patrones de glicosilación (Figura 10.4D). La NMR también resulta fundamental durante el ejercicio de biosimilitud, en el cual se busca la comparación de un biosimilar con su referencia, para posibilitar el registro abreviado de proteínas terapéuticas. En muchos casos se ha utilizado no solo NMR homonuclear de ^1H sino también heteronuclear, recurriendo a experimentos complejos de correlación ^1H - ^{15}N y ^1H - ^{13}C . Con este fin se han enriquecido isotópicamente diversas glicoproteínas terapéuticas, como eritropoyetina y anticuerpos monoclonales (Poppe, 2014).

Existen, sin embargo, ciertas limitaciones en el uso de NMR para el estudio de glicoproteínas. La principal limitación es el tamaño molecular, donde se hace evidente un fenómeno de rápida relajación de los estados excitados, lo que afecta severamente el ancho de línea de los picos del espectro de NMR. Esto es notorio en proteínas de tamaños mayores a los 30 kDa. Además, con el incremento de tamaño aumenta la complejidad del espectro, y ya no es posible resolver los picos de resonancias individuales. Para contrarrestar estos inconvenientes se han desarrollado metodologías específicas de supresión de señales por deutерación (cambio de ^1H por ^2D), metodologías de marcación isotópica selectiva de ciertos aminoácidos y pulsos especiales de RMN que permiten su aplicación a sistemas de 100 a 150 kDa.

10.4.3. Fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es la herramienta espectroscópica más antigua y versátil que existe para el estudio de proteínas y, al mismo tiempo, una de las que más ha evolucionado en la última década. Empleando espectroscopia de fluorescencia, a partir de las perturbaciones espectrales en aminoácidos aromáticos se han estudiado hace más de 50 años las primeras transiciones estructurales en proteínas. En los años 90, gracias a la ingeniería de proteínas, las mutaciones sitio dirigidas y los equipos de *stopped flow*, mediante espectroscopia de fluorescencia fue posible comprobar experimentalmente las teorías que permiten explicar actualmente el plegamiento de proteínas. Ya en la última década, la síntesis química de fluoróforos altamente fluorescentes y su conjugación química sitio específica sobre aminoácidos

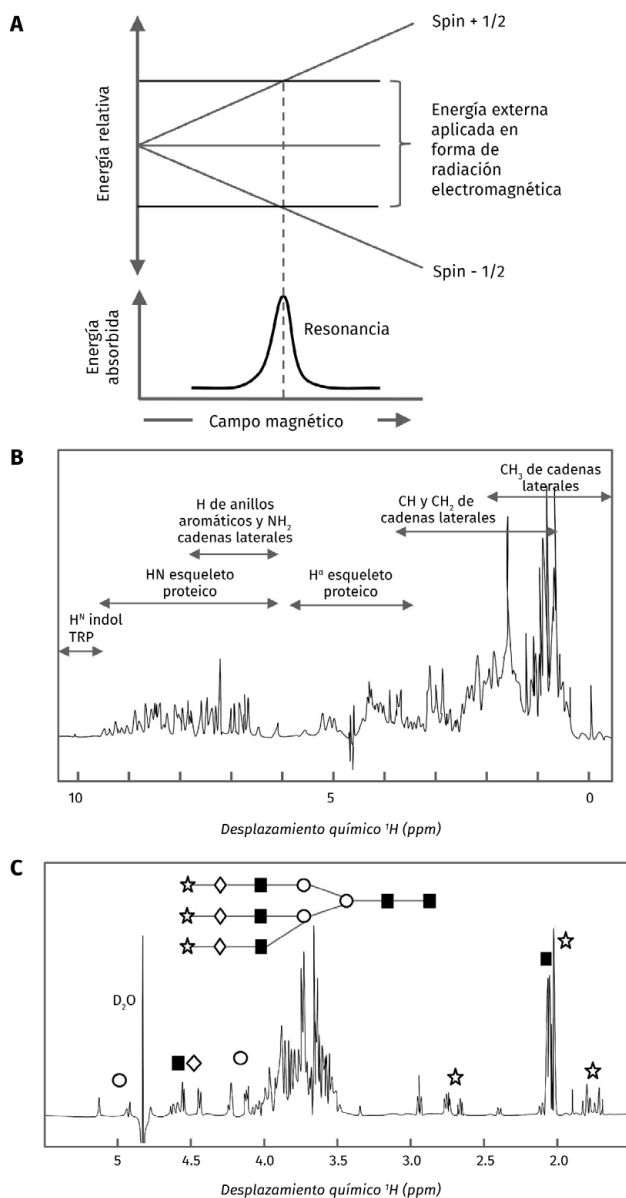


FIGURA 10.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS. **A.** DESDOBLAMIENTO DE LOS ESPINES NUCLEARES (SPIN $+1/2$ Y $-1/2$) DE UN ÁTOMO SUSCEPTIBLE A UN CAMPO MAGNÉTICO. EN NMR, EL PICO DE ABSORCIÓN SE MANIFIESTA CUANDO SE ALCANZA LA ENERGÍA QUE PERMITE LA TRANSICIÓN DE UN SPIN DE UN ESTADO BASAL A UN ESTADO EXCITADO (ENERGÍA DE RESONANCIA). PARA QUE PUEDAN OCURRIR ESTAS TRANSICIONES NUCLEARES ES NECESARIO QUE LOS ESPINES ESTÉN POLARIZADOS (ALINEADOS) BAJO UN CAMPO MAGNÉTICO DE MUY ALTO CAMPO (108 A 109 HZ). **B.** DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS CARACTERÍSTICOS PARA LOS PROTONES (^1H) DEL ESQUELETO PROTEICO EN UN EXPERIMENTO MONODIMENSIONAL DE NMR. **C.** EJEMPLO DE DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS CARACTERÍSTICOS DE LOS GLÚCIDOS EN UN EXPERIMENTO MONODIMENSIONAL DE NMR DE GLICOPROTEÍNAS

permitió el estudio del mecanismo de plegamiento de proteínas a nivel de moléculas individuales, tanto *in vitro* como *in vivo* empleando microscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos (Royer, 2006).

La fluorescencia es el resultado de un proceso en tres etapas de absorción y emisión de energía que ocurre en moléculas con características fisicoquímicas especiales llamadas fluoróforos. En la primera etapa, denominada *excitación*, el fluoróforo absorbe un fotón a la longitud de onda λ_{ex} , que promueve un electrón a un estado excitado. En la segunda etapa, durante el *estado excitado*, que dura típicamente entre 1 a 10×10^{-9} seg, el fluoróforo disipa energía de forma no radiante, por interacción con el medio que lo rodea (solvente, aminoácidos, ligandos, etc.), por cambios conformacionales (dinámica), o por transferencia de energía en resonancia (FRET). Esta disipación de energía lleva al fluoróforo hasta un estado excitado de menor energía que el estado excitado original (proceso de relajación). En la tercera y última etapa, llamada *emisión*, el fluoróforo se libera de la energía restante emitiendo un fotón con una longitud de onda λ_{em} . El fotón que se emite es de menor energía que el que se absorbe, debido a la energía disipada en el estado excitado, y por lo tanto la longitud de onda de emisión será siempre mayor a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$). Esta diferencia de longitud de onda entre los fotones de emisión y excitación se conoce como «*Stokes shift*» y es una propiedad característica de cada fluoróforo (Lakowicz, 2006).

Debido a su larga vida media, el estado excitado de un fluoróforo es muy sensible a una gran variedad de procesos inherentes al plegamiento de proteínas, como las alteraciones conformacionales, cambios en la estabilidad del estado plegado, unión a ligandos, procesos catalíticos, y hasta cambios en el estado de oligomerización de una proteína. Estas perturbaciones son sensadas por los fluoróforos excitados durante el proceso de relajación, disipando menor o mayor cantidad de energía de forma no radiante, y, en algunos casos, modificando el tiempo de vida media del estado excitado. Tales perturbaciones se manifiestan en una variación de la cantidad de energía que es emitida, alterándose tanto la posición de λ_{em} como la intensidad del pico de emisión.

De modo similar a la espectroscopia por CD, el sistema orbital conjugado de los anillos aromáticos que poseen los aminoácidos Tyr, Phe y Trp es susceptible a ser utilizado en espectroscopia de fluorescencia. Los aminoácidos aromáticos pueden ser excitados a través de la absorción de longitudes de onda entre 265 a 290 nm, y emiten fluorescencia a 275 nm (Phe), 300 nm (Tyr) y 350 nm (Trp) (Figura 10.5A y 10.5B). Estas características fluorescentes son particularmente útiles para evaluar el entorno en el cual se encuentran inmersos estos aminoácidos, transformándose en pruebas intrínsecas de la estructura de una proteína. Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos aromáticos son excelentes reporteros del estado plegado ya que por su hidrofobicidad suelen estar excluidos del solvente, empaquetados en el núcleo central de la proteína. Cuando una proteína sufre alteraciones en su estructura debido a la pérdida de su estabilidad, oxidaciones o degradación,

se producen cambios conformacionales que impactan en el empaquetamiento de las cadenas aromáticas de una proteína (Figura 10.5C y 10.5D). Tales cambios modifican los mecanismos de relajación de los fluoróforos y la vida media del estado excitado, que se detecta como cambios en la emisión de la fluorescencia. Estos cambios pueden ser a nivel de la intensidad de fluorescencia (número de fotones emitidos) o en la posición del máximo de absorción (cambios en la frecuencia del pico de emisión).

Por medio de la espectroscopia de fluorescencia es posible caracterizar el estado plegado de una glicoproteína mediante la determinación de la temperatura de melting (T_m), también de forma análoga a la espectroscopia de CD. La conducción de un experimento de titulación por temperatura permite la medición de su T_m , parámetro que caracteriza la transición desde el estado plegado al estado desplegado (50 % plegado y 50 % desplegado). Mediante el uso de un espectrofluorímetro con control de temperatura se toman espectros a varias temperaturas monitorizando la exposición de los aminoácidos aromáticos, generalmente Trp, desde un entorno hidrofóbico (proteína plegada) a un entorno hidrofílico (proteína desplegada) (Figura 10.5E y 10.5F). Un ajuste global de los espectros de fluorescencia a diferente temperatura permite calcular la T_m , que es una característica que se asocia con el estado plegado de una proteína. Para proteínas con dos o más Trp en su secuencia es posible deconvolucionar las contribuciones de cada uno de los aminoácidos, permitiendo estudiar características en el mecanismo de plegamiento (Deechongkit, 2006; Garidel *et. al.*, 2008).

Para el estudio de la T_m por fluorescencia es posible recurrir al uso de sondas fluorescentes extrínsecas. Las sondas fluorescentes son pequeñas moléculas orgánicas hidrofóbicas con sistemas conjugados de electrones que poseen un mayor rendimiento cuántico, absorbiendo mayor energía y emitiendo un mayor número de fotones. Las sondas extrínsecas se adicionan a la solución que contiene la proteína y al interaccionar regiones de aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente, se modifican las características fotofísicas de la sonda, lo que se manifiesta en un incremento del número de fotones emitidos o cambios en las características del espectro de fluorescencia. En general, las sondas extrínsecas son útiles en experimentos de determinación de T_m , ya que al desplegarse una cadena polipeptídica se exponen al solvente aquellos aminoácidos hidrofóbicos, incrementándose el número de regiones sobre las cuales las sondas pueden interaccionar (Hawe, 2008). También es posible convertir fluoróforos extrínsecos en fluoróforos intrínsecos, conjugándolos a proteínas de modo sitio específico, por acoplamiento mediante reacción química *in vitro* con los residuos Lisina, Arginina o Cisteína. Este tipo de conjugaciones permite, entre otros usos, el marcado fluorescente de anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección específica de otras proteínas en preparados de tejidos o células en cultivo.

Los fluoróforos extrínsecos son de suma utilidad en el análisis de los glicanos conjugados a glicoproteínas. Mediante reacciones químicas es posible

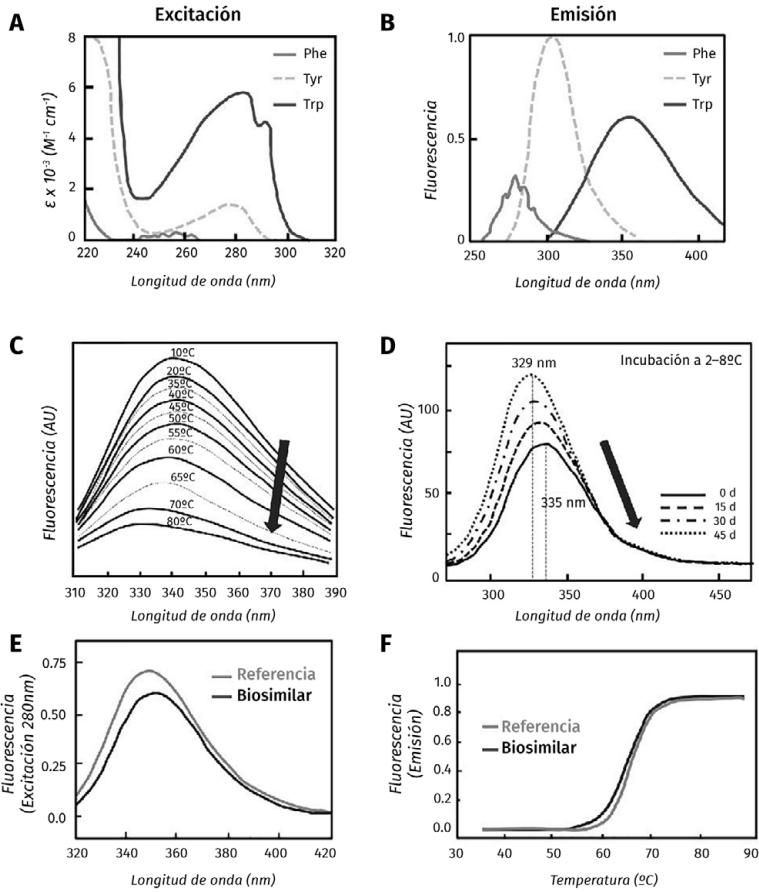


FIGURA 10.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS. **A.** CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE EXCITACIÓN DE LOS SISTEMAS ORBITALES CONJUGADOS PRESENTES EN LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS NATURALMENTE PRESENTES EN PROTEÍNAS. LOS MISMOS PUEDEN SER EXCITADOS A TRAVÉS DE LA ABSORCIÓN DE LONGITUDES DE ONDA ENTRE 265 A 290 NM. **B.** CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE EMISIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS PRESENTES EN PROTEÍNAS. UNA VEZ EXCITADOS, LOS MISMOS SE RELAJAN EMITIENDO FLUORESCENCIA A 275 NM (PHE), 300 NM (TYR) Y 350 NM (TRP). **C.** EJEMPLO DEL USO DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS COMO REPORTEROS DEL ESTADO DE PLEGAMIENTO DE UNA PROTEÍNA MODELO. A MEDIDA QUE SE INCREMENTA LA TEMPERATURA SE DESNATURALIZA LA PROTEÍNA Y LOS RESIDUOS AROMÁTICOS SE EXPONEN AL SOLVENTE, LO QUE DISMINUYE SU INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA. **D.** USO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS COMO REPORTEROS DE LA PÉRDIDA DE ESTABILIDAD DE UNA GLICOPROTEÍNA TERAPÉUTICA CON EL TIEMPO (SHELF LIFE). CON EL PASO DEL TIEMPO LA PROTEÍNA PIERDE ESTABILIDAD Y COMIENZA A DESNATURALIZARSE O DEGRADARSE, LO QUE SE VISUALIZA POR MEDIO DE UNA DISMINUCIÓN EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA. **E Y F.** USO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD DE BIOSIMILARES. ES POSIBLE LA COMPARACIÓN DIRECTA DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (**E**) O LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE MELTING (T_M) EN UN EXPERIMENTO DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA. [CONTINÚA EN PÁG. SGTE.]

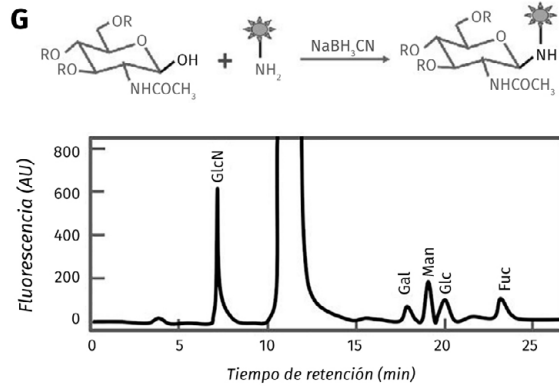


FIGURA 10.5. [CONTINUACIÓN] G. DERIVATIZACIÓN ESPECÍFICA DE GLÚCIDOS CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS DEL TIPO ABA (2-AMINO BENZÓICO (ABA). LA CONJUGACIÓN CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS Y SU POSTERIOR DETECCIÓN POR MEDIO DE HPLC ACOPLADO A DETECTOR DE FLUORESCENCIA PERMITE LA CUANTIFICACIÓN PRECISA DE LOS GRUPOS GLICANOS PRESENTES EN GLICOPROTEÍNAS CON MUY ALTA SENSIBILIDAD

derivatizar carbohidratos específicamente con fluoróforos extrínsecos. En particular, se puede mencionar la derivatización con ácido 2-aminobenzóico (ABA), Diamino-metilendioxibenceno (DMB) y Fenilendiamina (OPD) (Anumula, 2006). La conjugación con fluoróforos extrínsecos permite la cuantificación precisa de los grupos glicanos presentes en glicoproteínas. Luego de su reacción con el fluoróforo, los glicanos se escinden de la proteína por medio de reacciones de deglicosilación, y la mezcla de glicanos se separa por medio de cromatografía líquida de alta performance acoplada a un detector de fluorescencia (Figura 10.5G). La identificación y cuantificación de los componentes de mezclas complejas de glicanos se realiza por comparación del perfil cromatográfico con cromatogramas de sustancias patrones de glúcidos derivatizados del mismo modo. Debido a la simpleza en su implementación y alta reproducibilidad del método, esta técnica se emplea rutinariamente en el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas para corroborar la composición relativa de glicanos del producto, así como su estabilidad a lo largo de las operaciones de purificación y formulación.

10.5. PERSPECTIVAS A FUTURO DE LAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Los avances tecnológicos ocurridos durante la última década en áreas como la nanotecnología, superconductores, fuentes láser y capacidad computacional de cálculo, entre otros, han posibilitado el avance de las metodologías biofísicas para el estudio de proteínas, permitiendo avizorar su pronta aplicación al

análisis estructural de glicoproteínas. Posiblemente, tales adelantos permitirán trasladar el uso de las espectroscopias desde el tubo de ensayo a un entorno celular o incluso hasta un organismo vivo. En lo que respecta a las nuevas metodologías de espectroscopia de fluorescencia, el uso de proteínas fluorescentes como fluoróforos intrínsecos ha permitido expandir la aplicación de la espectroscopia de fluorescencia al estudio de glicoproteínas en un contexto celular complejo. Metodologías basadas en microscopía láser confocal permiten el estudio de la expresión, localización y dinámica celular de glicoproteínas fusionadas a proteínas fluorescentes en células vivas e, incluso, dentro de organismos complejos como *C. elegans* o pez cebra (Zhang, 2002). En el contexto celular, también es posible acoplar fluoróforos extrínsecos de forma específica a proteínas de fusión que portan una secuencia determinada, como el sistema FLASH/ReASH, que se acopla específicamente a motivos tetracisteína del tipo CysCysProGlyCysCys (Roberti, 2007). Más recientemente, se logró la incorporación directa de aminoácidos artificialmente fluorescentes en proteínas gracias a la expansión del código genético por técnicas de ingeniería genética. Empleando tRNAs mutados, que modifican la interpretación de los codones del mRNA, es posible incorporar un aminoácido no natural, químicamente modificado para ser fluorescente, en una determinada posición de la cadena polipeptídica (Xie y Schultz, 2006). Debido a que estos fluoróforos conjugados tienen un muy alto rendimiento cuántico, se facilita el estudio del plegamiento y estabilidad de proteínas en un contexto celular, incluso a nivel de moléculas individuales, mediante el uso de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos (FLIM) o resolución de distancias del orden de 20 nm (STED, STORM, PALM) (Sahl *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista del desarrollo a futuro de la espectroscopia por NMR, el uso de criosondas, que permiten incrementar significativamente la sensibilidad de los experimentos, ha posibilitado la caracterización de la estructura de proteínas en el contexto celular (NMR *in vivo*). Por medio de la microinyección o la electroporación, es posible estudiar el comportamiento de proteínas marcadas isotópicamente dentro de células eucariotas vivas y estructuras más complejas como oocitos de *X. laevis* (Selenko *et al.*, 2006). Por medio de estas metodologías se ha podido demostrar a nivel celular como ocurren modificaciones postraduccionales en proteínas, como por ejemplo la fosforilación (Smith *et al.*, 2015). Es previsible entonces, que muy pronto sea posible estudiar mecanismos de glicosilación de proteínas directamente en el contexto celular por NMR *in vivo* (Valverde *et al.*, 2019). Otro adelanto muy importante, con aplicación directa al estudio de glicoproteínas, es la espectroscopia de NMR de estado sólido en proteínas de membrana. Empleando NMR de estado sólido se ha reportado la estructura intacta de proteínas de membrana de origen bacteriano en bicapas lipídicas, como por ejemplo el complejo translocador de proteínas de mitocondrias (TSPO) o la proteína Proteorodopsina, una proteína transmembrana con 7 segmentos helicoidales embebidos en la bicapa lipídica (Jaipuria *et al.*, 2017; Lalli *et al.*, 2017). La ventaja del NMR de estado

TABLA 10.2. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ESTRUCTURA Y CONFORMACIÓN EN GLICOPROTEÍNAS

Técnica	Detección	Ventajas	Desventajas
Dicroísmo Circular	Estructura secundaria/ terciaria	Cuantitativo/ Detecta hélices α , lámina β y random coil	Sensible a interferencias por composición del <i>buffer</i>
Espectroscopia Infra-Roja	Estructura secundaria	Cuantitativo/ Detecta estructuras de lámina β	Sufre de interferencias
Fluorescencia	Estructura terciaria/ hidrofobicidad	Altamente sensible	Cualitativo
Calorimetría de Barrido Diferencial	Estabilidad térmica	Sensible	Cualitativo
Espectroscopia de Masas con Intercambio de Deuterio	Conformaciones dinámicas/ Interacciones moleculares	Específico	Costoso/ Equipamiento sofisticado
Resonancia Magnética Nuclear	Estructura tridimensional	Cuantitativo/ Elevada resolución	Muy Costoso/ Equipamiento sofisticados
Ultracentrifugación Analítica	Oligómeros/ Agregados	Cuantitativo	Lento
Dispersión Dinámica de Luz	Agregados de alto peso molecular	Sensible	Cualitativo/ Baja resolución
Cromatografía de Exclusión Molecular con Dispersión Estática de Luz	Oligómeros/ Agregados	Rápida/ Determinación directa del peso molecular	Poco sensible a cambios conformacionales
Electroforesis de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	Agregados	Bajo costo	Baja resolución

sólido respecto del estado líquido es que en sólidos no existen impedimentos por el tamaño de las proteínas que se puedan caracterizar. Es posible avizorar entonces que próximamente se conocerán estructuras de glicoproteínas eucariotas intactas en membranas lipídicas.

10.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se han tratado los aspectos más básicos y relevantes de tres de las metodologías espectroscópicas que se emplean habitualmente para el análisis de la estructura y control de calidad de glicoproteínas, principalmente

enfocados en el uso industrial o farmacéutico. Existen en la bibliografía compendios de cada una de estas técnicas que amplían la descripción de sus fundamentos físicos o aplicaciones, y en particular para el caso de proteínas terapéuticas (Houde y Berkowitz, 2014). En la práctica es necesario el uso de una variedad de técnicas complementarias para la caracterización de la estructura de glicoproteínas. A modo de resumen, en la Tabla 10.2 se comparan las principales características de los métodos que se utilizan para la caracterización de glicoproteínas.

Un tópicos de activo debate entre los laboratorios productores de glicoproteínas terapéuticas y las agencias regulatorias de los países de alta vigilancia sanitaria es el margen de aceptabilidad en los cambios en la estructura de las glicoproteínas terapéuticas, que pueden ser evidenciados por el uso de estas técnicas (Schiestl *et al.*, 2011; Berkowitz *et al.*, 2012). Debido a la naturaleza de las células en cultivo, es frecuente detectar pequeños cambios estructurales de un producto biotecnológico entre lote y lote. Estos cambios estructurales pueden no tener impacto en la actividad terapéutica de una glicoproteína o en la afinidad por un ligando, pero sí podrían afectar la estabilidad en una matriz biológica, su tendencia a formar agregados o su susceptibilidad a degradación, modificando su perfil farmacocinético. Del mismo modo, el uso de ciertos excipientes podría no influir directamente en la estructura de la glicoproteína terapéutica, pero si afectar su estabilidad a largo plazo, afectando el plazo de validez del producto formulado. La presencia de estructuras cuaternarias, como oligómeros y agregados puede causar reacciones inmunogénicas que reduzcan la eficacia del tratamiento o incluso pongan en peligro la vida de un paciente. Por esta razón, y en palabras de la FDA, antes de poder asegurar la calidad o biosimilaridad de una glicoproteína terapéutica es necesario evaluar el «peso completo de la evidencia», para lo que se requiere emplear una variedad de metodologías analíticas complementarias (Kirchhoff *et al.*, 2017).

Referencias bibliográficas

- ANUMULA, K.R.** (2006). Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem.*, 350(1), 1–23. 10.1016/j.ab.2005.09.037.
- BATTISTEL, M. D., AZURMENDI, H. F., YU, B. & FREEDBERG, D. I.** (2014). NMR of glycans: shedding new light on old problems. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 79, 48–68. 10.1016/j.pnmrs.2014.01.001
- BERKOWITZ, S. A., ENGEN, J. R., MAZZEO, J. R. & JONES, G. B.** (2012). Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 11(7), 527–40. 10.1038/nrd3746
- DEECHONGKIT S., AOKI K.H., PARK S.S. & KERWIN B.A.** (2006). Biophysical comparability of the same protein from different manufacturers: a case study using Epoetin alfa from Epogen and Eprex. *J Pharm Sci.* 5(9):1931–43. 10.1002/jps.20649.
- DILL K.A., OZKAN S.B., SHELL M.S. & WEIKL T.R.** (2008) The Protein Folding Problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37:289–316. 10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558.
- FERSHT A.R. & DAGGETT V.** (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* 108(4):573–82. 10.1016/S0092-8674(02)00620-7.
- GARIDEL P., HEGYI M., BASSARAB S. & WEICHEL M.** (2008). A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biotechnol J.* 3(9–10):1201–11. 10.1002/biot.200800091.
- GHASRIANI H, HODGSON D.J., BRINSON R.G., MCEWEN I, BUHSE L.F., KOZLOWSKI S., MARINO J.P., AUBIN Y. & KEIRE D.A.** (2016). Precision and robustness of 2D-NMR for structure assessment of filgrastim biosimilars. *Nature Biotechnol.* 34(2):139–41. 10.1038/nbt.3474.
- GREENFIELD, N. J.** (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890. 10.1038/nprot.2006.202.
- HARTL F.U., BRACHER A. & HAYER-HARTL, M.** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332. 10.1038/nature10317
- HAWE A., SUTTER M. & JISKOOT W.** (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res.* 25(7):1487–99. 10.1007/s11095-007-9516-9.
- HOUE D.J. & BERKOWITZ S.A.** (2014). *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*. 1st Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-0-444-59573-7. 10.1016/C2012-0-01163-5.

- JAIPURIA G., LEONOV A., GILLER K., VASA S.K., JAREMKO Ł., JAREMKO M., LINSER R., BECKER S. & ZWECKSTETTER M.** (2017) Cholesterol-mediated allosteric regulation of the mitochondrial translocator protein structure. *Nat Commun.* 30; 8:14893. 10.1038/ncomms14893.
- KELLY S.M., JESS T.J. & PRICE N.C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* 1751(2):119–39. 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- KIRCHHOFF C.F., WANG X.M., CONLON H.D., ANDERSON S., RYAN A.M. & BOSE A.** (2017). Biosimilars: Key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol Bioeng.* 114(12):2696–2705. 10.1002/bit.26438.
- LAKOWICZ J.R.** (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer-Verlag. Boston, MA. ISBN 978-0-387-31278-1. 10.1007/978-0-387-46312-4.
- LALLI D., IDSO M.N., ANDREAS L.B., HUSSAIN S., BAXTER N., HAN S., CHMELKA B.F. & PINTACUDA G.** (2017). Proton-Based Structural Analysis of a Heptahelical Transmembrane Protein in Lipid Bilayers. *J Am Chem Soc.* 139(37):13006–13012. 10.1021/jacs.7b05269.
- MARION D.** (2013) An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics.* 12(11):3006–25. 10.1074/mcp.O113.030239.
- MARTIN S.R. & BAYLEY, P.M.** (2002). Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy. En: Vogel H.J. (eds) *Calcium-Binding Protein Protocols: Volume 2: Methods and Techniques*. *Methods in Molecular Biology*, 173. Springer, Totowa, N.J. 10.1385/1-59259-184-1:043.
- POPPE L., JORDAN J.B., LAWSON K., JERUMS M., APOSTOL I. & SCHNIER P.D.** (2013). Profiling formulated monoclonal antibodies by ¹H NMR spectroscopy. *Anal Chem.* 85(20):9623–9. 10.1021/ac401867f.
- ROBERTI M.J., BERTONCINI C.W., KLEMENT R., JARES-ERIJMAN E.A. & JOVIN T.M.** (2007). Fluorescence imaging of amyloid formation in living cells by a functional, tetracysteine-tagged alpha-synuclein. *Nat Methods.* 4(4):345–51. 10.1038/nmeth1026.
- ROYER C.A.** (2006). Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev.* 106(5):1769–84. 10.1021/cr0404390.
- SAHL S.J., HELL S.W. & JAKOBS S.** (2017). Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(11):685–701. 10.1038/nrm.2017.71.
- SCHIESTL M., STANGLER T., TORELLA C., CEPELJNIK T., TOLL H. & GRAU R.** (2011). Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol.* 29(4):310–2. 10.1038/nbt.1839.
- SELENKO, P., SERBER, Z., GADEA, B., RUDERMAN, J., & WAGNER, G.** (2006). Quantitative NMR analysis of the protein G B1 domain in *Xenopus laevis* egg extracts and intact oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32), 11904–11909. 10.1073/pnas.0604667103.
- SMITH M.J., MARSHALL C.B., THEILLET F.X., BINOLFI A., SELENKO P. & IKURA M.** (2015). Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments. *Curr Opin Struct Biol.* 32:39–47. 10.1016/j.sbi.2015.02.003.

- VALVERDE P, QUINTANA JI, SANTOS JI, ARDÁ A, JIMÉNEZ-BARBERO J.** (2019). Novel NMR Avenues to Explore the Conformation and Interactions of Glycans. *ACS Omega*. 4(9):13618-13630. 10.1021/acsomega.9b01901
- VISSEER J., FEUERSTEIN I., STANGLER T., SCHMIEDERER T., FRITSCH C. & SCHIESTL M.** (2013). Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs*. 27(5):495-507. 10.1007/s40259-013-0036-3.
- XIE J. & SCHULTZ P.G.** (2006). A chemical toolkit for proteins—an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(10):775-82. 10.1038/nrm2005.
- ZHANG J., CAMPBELL R.E., TING A.Y. & TSIEN R.Y.** (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(12):906-18. 10.1038/nrm976.

11

Espectrometría de masas para la caracterización de glicoproteínas

RONALDO MOHANA BORGES

11.1. INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (EM) es una de las técnicas analíticas más poderosas, que tiene aplicación en todas las áreas de las Ciencias. Más recientemente, adquirió fundamental importancia en las grandes áreas de las Ciencias de la Vida, en particular, en el análisis de biomoléculas a gran escala. Con el gran esfuerzo tecnológico invertido en equipos con elevado poder de resolución, precisión y sensibilidad, actualmente, es posible desentrañar el proteoma de un organismo en pocos días o semanas. Sin embargo, la EM de biomoléculas no está restringida solamente al estudio protéico. Por el contrario, ha sido intensamente utilizada en estudios a gran escala (liposomas), de glúcidos (glicoma) y de metabolitos (metaboloma) proporcionando información química para la mejor comprensión de los aspectos bioquímicos de un sistema biológico de forma más detallada. En este capítulo, se abordarán los conceptos básicos de EM y su aplicación en la caracterización de glicoproteínas.

11.1.1. Principios de la técnica

La EM se basa en la formación de iones en la fase gaseosa (positiva o negativamente cargado) que pueden aislarse eléctrica o magnéticamente en función de su relación masa-carga (m/z). Como se ejemplifica en la Figura 11.1, en un espectro de EM, la coordenada x representa los valores de m/z , mientras que el eje y indica el recuento total de iones (del inglés TIC, total ion counts). Para las moléculas en una banda baja de masa molecular (<1000 Da), su transferencia de la fase líquida a la gaseosa es relativamente simple. Por eso mismo, la cromatografía gaseosa acoplada a la EM (CG-EM) fue una de las primeras combinaciones analíticas de gran éxito. Por otro lado, por no ser volátiles, las macromoléculas no se transfieren al estado gaseoso con facilidad, lo que requiere métodos de ionización de alta energía tal como la ionización por impacto de electrones (IE). Sin embargo, este tipo de ionización genera una gran fragmentación de la macromolécula, dificultando así la interpretación de los espectros de masas. Para evitar este problema, dos métodos denominados de ionización blanda (del inglés, *soft ionization*) fueron desarrollados en la década de 1980, convirtiéndose en los principales

métodos de ionización utilizados en el análisis de macromoléculas por EM. Se trata de ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI) (del inglés, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) y ionización por electrospray (ESI) (del inglés, *electrospray ionization*).

11.2. CONFIGURACIÓN GENERAL DE LOS ESPECTRÓMETROS DE MASAS

Los espectrómetros de masas pueden dividirse en cinco partes principales:

- **INYECCIÓN DE LA MUESTRA:** lugar donde la muestra se inserta en el equipo. Puede ser una placa metálica, una jeringa o conectada a una salida de HPLC.
- **IONIZACIÓN:** lugar donde ocurre la ionización de las moléculas en el estado gaseoso. Hay varios métodos de ionización pero los más utilizados para el análisis de macromoléculas (moléculas no volátiles) son el MALDI y el ESI.
- **ANALIZADOR DE MASAS:** lugar donde ocurre la separación de las moléculas en función de su razón masa / carga. Es también el lugar donde es posible realizar fragmentaciones de iones. Hay varios tipos de analizadores en el mercado que, en general, están dispuestos en secuencia (tándem) para ampliar significativamente la capacidad de separación y análisis de los iones.

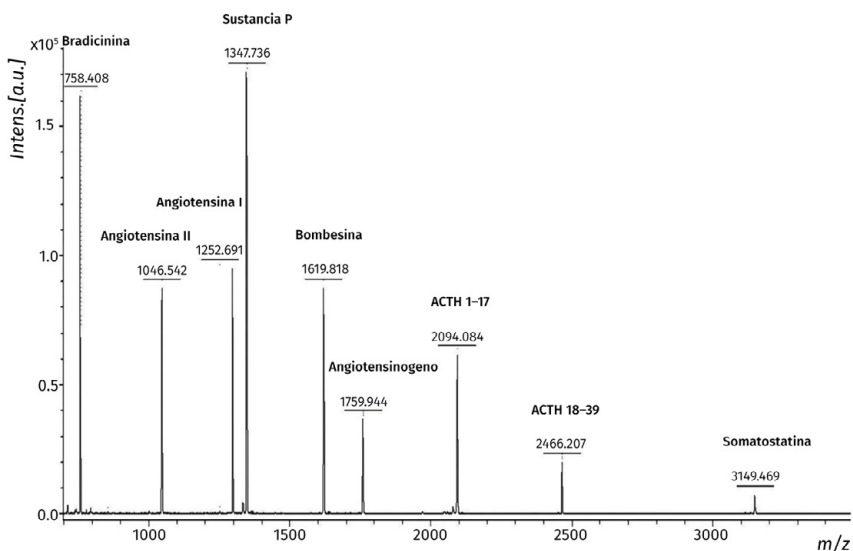


FIGURA 11.1. ESPECTRO DE MASAS: SE ANALIZÓ POR MALDI-MS UNA MEZCLA DE PÉPTIDOS USANDO ÁCIDO α -CIANO-4-HIDROXICINÁMICO (HCCA) COMO MATRIZ, EN UN ESPECTRÓMETRO CON CONFIGURACIÓN MALDI-TOF/TOF. TODOS LOS IONES MOSTRADOS SE PRESENTAN EN LA FORMA $[M+H]^+$

- **DETECTOR:** lugar donde los iones separados son detectados y convertidos en informaciones eléctricas.
- **SISTEMA COMPUTACIONAL DE DATOS:** local donde ocurre la conversión de los impulsos eléctricos captados por el detector en señal digital y producción de los espectros de masas. Es responsable de controlar todo el instrumento.

Es importante resaltar que los lugares de ionización, analizador (es) de masas y el detector están bajo alto vacío para minimizar la colisión de los iones formados con moléculas del aire. Debido a su importancia, a continuación se describen en más detalle los métodos de ionización y los tipos de analizadores de masas.

11.3. PRINCIPALES FORMAS DE IONIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

11.3.1. Ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI)

La técnica de MALDI se realiza en dos etapas:

- En la primera etapa, la muestra se disuelve una solución que contiene compuestos orgánicos de baja masa molecular, denominados matrices, que deben tener una alta absorción en la longitud de onda de la luz emitida por el láser. (El láser ultravioleta de N_2 es el más usado, con emisión a 337 nm y ancho de pulso de pocos nanosegundos). Esta mezcla debe estar seca antes del análisis para obtener una dispersión casi homogénea de la muestra en la matriz, y en forma de cristal, para minimizar la formación de *clusters* de moléculas presentes en esta muestra.
- En la segunda etapa, la mezcla muestra–matriz se coloca bajo alto vacío en la región de la fuente del espectrómetro. En este momento, ocurre el fenómeno de ablación de esta mezcla por un intenso pulso de láser de corta duración (Karas & Krüger, 2003). Aunque este fenómeno no es completamente comprendido, se sabe que la irradiación por láser induce un rápido calentamiento de los cristales de la matriz, llevando una parte de ellos a la ablación para producir una nube de matriz en el estado gaseoso (Dreisewerd, 2003).

Dentro de los posibles mecanismos de ionización de la muestra ya sugeridos en la literatura, los más aceptados son transferencia de protones en el estado sólido antes de la desorción o transferencia de protones en la fase gaseosa a partir de moléculas de matriz fotoionizadas. Los iones formados en el estado

gaseoso se aceleran por campo electrostático dentro del espectrómetro. Una de las grandes ventajas de este método de ionización es la formación de iones monocargados positiva o negativamente. En algunos casos, se pueden observar iones con dos cargas (y algunos casos menos comunes, iones con tres cargas). Otra gran ventaja del MALDI es la pequeña cantidad de fragmentos formados durante el proceso de ionización. Un punto negativo en el MALDI es el protocolo de preparación de muestra que, por ser un proceso empírico, puede tener significativo impacto en la calidad de los resultados. La elección de la matriz de UV depende del tipo de clase de muestra a analizar. Así en la literatura existe una extensa lista de compuestos orgánicos usados en innumerables aplicaciones para EM. Las más comunes se indican en la Tabla 11.1 (de Hoffmann & Stroobant, 2013).

TABLA 11.1 MATRICES DE MALDI COMÚNMENTE UTILIZADAS

Tipo de muestra	Matriz	Abreviatura
Proteínas / Péptidos	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico	CHCA
	ácido 2,5-hidroxibenzoico	DHB
	ácido 3,5-Dimetoxi-4- hidroxicinámico	SA
Oligonucleótidos	trihidroxiacetofenona	THAP
	ácido 3-hidroxicolínico	HPA
Carbohidratos	ácido 2,5-hidroxibenzoico	DHB
	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico	CHCA
Lípidos	ácido 2,5-hidroxibenzoico	DHB
	2-mercaptobenzotiazol	MBT
Moléculas orgánicas	ácido 2,5-hidroxibenzoico	DHB

Existen diversos protocolos de preparación de muestras en la literatura y en Internet, pero el de la gota seca es el más comúnmente usado (El-Aneed, Cohen, & Banoub, 2009). Se trata de la mezcla de una solución saturada de matriz con un pequeño volumen de la muestra. Entonces, una pequeña gota (de 0,5 a 2 μ l) de esta mezcla se aplica en la placa de MALDI, que generalmente es una placa metálica con ubicaciones delineadas para la aplicación de la muestra. Después de la evaporación del solvente y el secado de la gota con la formación de cristales a temperatura ambiente, la placa de MALDI conteniendo las muestras se inserta dentro del espectrómetro. Cabe resaltar que MALDI es relativamente más tolerante a la contaminación por sales, tampones, detergentes, etc., en comparación con otros métodos de ionización.

11.3.2. Ionización por electrospray (ESI)

Con muchas ventajas sobre el MALDI, ESI se volvió muy utilizado en los diversos espectrómetros de masas, principalmente por su capacidad para permitir una conexión en línea a la salida del cromatógrafo líquido de alto rendimiento (HPLC). Esta conexión posibilita el análisis de muestras complejas que pueden ser previamente separadas por diferentes métodos cromatográficos, disminuyendo la complejidad de análisis de los espectros. Si bien fue desarrollada en el año 2000 por el Dr. John Fenn para el análisis de proteínas en solución, actualmente, ESI ha sido utilizado en el análisis de diferentes clases de moléculas incluso de pequeñas moléculas polares (Fenn, Mann, Meng, Wong, & Whitehouse, 1989).

La aplicación de ESI en el análisis de macromoléculas grandes se debe a su característica fundamental de producir múltiples cargas en las mismas, reduciendo aparentemente la masa molecular de estas y haciendo que el ion formado pueda ser analizado en espectrómetros con baja banda de masas (<2–3 kDa). Además, los iones multicargados aumentan la sensibilidad en el detector (Cech & Enke, 2001b). Usando algoritmos de deconvolución, se puede obtener la masa exacta de macromoléculas grandes, siempre y cuando tengan varios grupos ionizables. En la Figura 11.2 se muestran a modo de ejemplo del efecto del tamaño de las moléculas sobre la resolución de los picos los espectros de masas de las proteínas ubiquitina bovina (PM = 8564,572) y enolasa bovina (PM = 46668,432).

Las proteínas ubiquitina (A–C) y enolasa (D–F) bovinas se analizaron por inyección directa en un espectrómetro de masas con configuración ESI–FT–ICR (A, D). Espectros de masas de las proteínas (A) e enolasa (D). Las flechas indican los picos ampliados en B y E en los que se evidencia la resolución

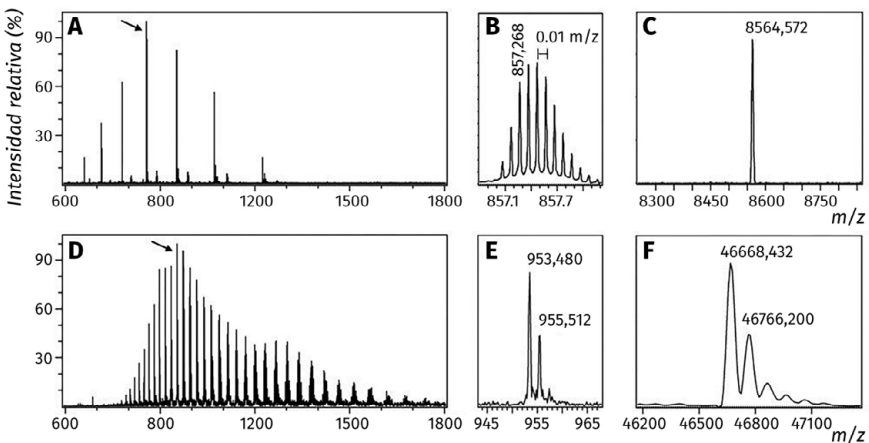


FIGURA 11.2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS INTACTAS

isotópica para la ubiquitina (B), cuya diferencia de masa del pico seleccionado permite asignar una carga de +10 para la envoltura isotópica del detalle. Por el contrario, no se observa envoltura isotópica para la enolasa (E). (C, F) Espectros deconvolucionados a partir de los observados en A y D respectivamente, en los que se observa la masa molecular neutra de las proteínas ubiquitina (C) y enolasa (F).

ESI se produce a partir de la aplicación de un campo eléctrico fuerte, a presión atmosférica, a un líquido que pasa a través de un tubo capilar en un flujo bajo (generalmente 1–10 $\mu\text{l}/\text{min}$). El campo eléctrico se obtiene a partir de una diferencia de potencial de 3–6 kV entre este capilar y un contraelectrodo, separados por 0,3–2 cm, produciendo campos eléctricos en el orden de 10^6 V/m (Cech & Enke, 2001a, de Hoffmann & Stroobant, 2013). Este campo induce una acumulación de carga en la superficie del líquido ubicada en la punta del capilar, que se rompe para formar gotitas altamente cargadas, formando lo que llamamos el cono de Taylor. Un gas inyectado coaxialmente a un flujo bajo permite la dispersión del spray limitada en el espacio. Estas gotitas pasan, entonces, o a través de una cortina de gas inerte calentado, en general nitrógeno, o a través de un capilar calentado para remover las últimas moléculas de disolvente (de Hoffmann & Stroobant, 2013), haciendo que la gota se contraiga y su carga aumente por unidad de volumen.

Para calcular la masa molecular de la macromolécula en alta resolución, se debe observar la distribución isotópica de los picos vecinos, que deben diferir entre sí en 1 Da. Para iones con múltiples cargas, la distancia observada entre los picos es $1/z$, haciendo que se pueda calcular su estado de carga (tal como se muestra en la Figura 11.2). Para espectros con pocos picos, este cálculo es relativamente fácil de realizar. Sin embargo, para espectros más complejos con muchos picos que se superponen, se vuelve fundamental el uso de algoritmos de deconvolución para que se pueda calcular con precisión la masa molecular del compuesto.

Otra característica importante del ESI es su sensibilidad a la concentración de la muestra y no a la cantidad total inyectada en la fuente. Como regla general, los flujos bajos inyectan menos muestra y tampón en la fuente, lo que reduce la contaminación. Así, para una misma cantidad de muestra, una columna de HPLC con menor diámetro, y el uso de flujos más bajos, aumentan la sensibilidad porque la concentración de muestra en el eluido aumenta. En esta dependencia de concentración, las modificaciones del ESI, llamada nanospray (nESI), son cada vez más comúnmente usadas. Esta utiliza flujos mucho más pequeños en el rango de décimas de nanolitros por minuto, y lleva los límites de detección al rango de los atomoles (10^{18} moles) (Emmett & Caprioli, 1994; Wilm *et al.*, 1996).

11.4. PRINCIPALES ANALIZADORES DE MASAS

11.4.1. Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador de masas por tiempo de vuelo (del inglés, *time of flight*, TOF) separa los iones después de la aceleración por acción del campo eléctrico en la fuente, de acuerdo con la velocidad con la que se mueven dentro de un tubo libre de campo eléctrico. De esta forma, los iones con razones m/z más pequeñas vuelan más rápidamente por el tubo, alcanzando el detector antes que iones con m/z mayores. Esta correlación se puede calcular numéricamente a partir de la ecuación [1], en la que la razón m/z es directamente proporcional al cuadrado del tiempo (t).

$$t^2 = \frac{m}{z} \times \left(\frac{L^2}{2eV} \right) \quad \text{Ec. (1)}$$

donde L es la longitud del tubo de vuelo; e es la carga del electrón y V es el potencial de aceleración del ion (de Hoffmann & Stroobant, 2013).

El TOF se combina muy bien con fuentes de ionización de tipo pulsada, como es el caso del MALDI. De hecho, los espectrómetros de masas del modelo MALDI-TOF (o MALDI-TOF-TOF) son bastante populares y muy robustos teniendo aplicación no solo en el área de macromoléculas sino también en la de polímeros y en la de microbiología (identificación de microorganismos). Una gran ventaja del analizador TOF es su eficiencia de transmisión, que tiene como consecuencia una sensibilidad muy alta, de forma que sustancias (incluso proteínas) ya fueron detectadas en el rango de los atomoles. La otra gran ventaja del TOF en relación a otros analizadores es que no presenta límite superior de detección de masa, habiendo sido descrito su uso para detectar moléculas con masas superiores a 200 kDa (Moniatte, van der Goot, Buckley, Pattus, & van Dorsseleer, 1996).

Aunque el MALDI es la fuente de ionización más ampliamente usada en combinación con el TOF, conlleva pérdidas de resolución y de exactitud en masas grandes porque la extracción y la velocidad de los iones producidos no ocurren exactamente de la misma forma y ni al mismo tiempo para todos los iones en el estado gaseoso. De esta forma, iones que presentan exactamente la misma relación m/z llegan al detector en tiempos diferentes. Para evitar este problema, un modo de operación llamado extracción pulsada tardía (del inglés, *delayed pulsed extract*) fue desarrollado en el cual un retraso extra de tiempo fue agregado entre la formación y la extracción de los iones (Watson & Sparkman, 2013). Así, los iones se dejan a expandir en una región ausente de campo eléctrico y, después de un período de tiempo en el rango de ns a μ s, se aplica un pulso de voltaje para extraer los iones fuera de la fuente. Los iones con la misma relación m/z pero con mayor energía cinética serán

extraídos primero, mientras que los de menor energía cinética quedarán más tiempo bajo el efecto de este pulso extra en alto voltaje, transmitiendo más energía cinética para estos iones. Como consecuencia, los iones con energías cinéticas diferentes acabarán llegando prácticamente al mismo tiempo al detector, aumentando así la resolución de los picos.

Otro método para aumentar la resolución másica es el uso de reflectores electrostáticos llamados de reflectrón, que crean un campo eléctrico retardador que funciona como un espejo de iones al generar su deflexión y enviarlos de regreso a través del tubo de vuelo (Watson & Sparkman) 2013). El reflectrón está situado al final del tubo de vuelo del lado opuesto a la fuente de ionización. En esta configuración, el detector se encuentra más cerca de la fuente de ionización, pero fuera del eje del haz de iones, formando un pequeño ángulo entre estos haces que llegan y salen del reflectrón. En resumen, el reflectrón corrige la dispersión de la energía cinética de iones con la misma razón m/z , ya que esos iones con mayor energía cinética penetran más profundamente en el reflectrón que los con menor energía, quedando así más tiempo dentro de él. Como el haz de iones tiene su sentido obligatoriamente invertido a causa del reflectrón, los iones más lentos quedan delante de los iones más rápidos, alcanzando ambos el detector al mismo tiempo. Este método aumenta considerablemente la resolución de MALDI-TOF, pero disminuye la sensibilidad e impone un límite superior de una banda de masa (<4 – 5 kDa) a partir de la cual el reflectrón pierde su funcionalidad (de Hoffmann & Stroobant, 2013).

Otra característica muy importante de los espectrómetros de masas del tipo MALDI-TOF-TOF es la posibilidad de fragmentación de iones (llamados de iones precursores) en fragmentos menores que pueden ser usados en su caracterización e identificación como si fueran un juego de rompecabezas. Para ello, tenemos una configuración de espectrómetros de masas en tándem (del inglés *tandem mass spectrometry*), que amplía significativamente el poder de análisis y la identificación estructural de biomoléculas, pudiendo existir la combinación secuencial de diferentes tipos de analizadores. En el caso de MALDI-TOF-TOF, las fragmentaciones de iones pueden ocurrir en dos lugares distintos:

- i. El primero de ellos es en la fuente de ionización, llamada *in-source decay* (ISD). Debido al alto potencial eléctrico necesario para el proceso de ionización, los iones pueden fragmentarse de forma que tanto estos iones, ahora llamados iones precursores, como los fragmentos de estos iones llegarán al detector en tiempos distintos por tener diferentes razones m/z , aunque ambos tengan la misma energía cinética luego de la aceleración. La desventaja de la ISD es la imposibilidad de determinar que iones precursores generaron los fragmentos detectados, principalmente si la muestra es una mezcla de moléculas.

- ii. La fragmentación puede ocurrir después de la fuente de ionización, lo que puede generar iones precursores con energía cinética tan alta que lleva a la formación de iones metaestables que acaban fragmentándose a lo largo del tubo de vuelo antes de alcanzar el detector. Este tipo de fragmentación se conoce como *post-source decay* (PSD). En este método, es posible seleccionar individualmente cual de los precursores se fragmenta a la vez, usando portones de deflexión (del inglés, *deflection gates*) entre la fuente de ionización y el reflectrón. Así, solo los iones precursores de interés y sus respectivos fragmentos de iones pasarán por esta puerta y entrarán en el reflectrón, alcanzando finalmente el detector (de Hoffmann & Stroobant, 2013; Watson & Sparkman, 2013).

11.4.2. Analizador del tipo Cuadrupolo (Q)

A diferencia del analizador TOF, que se basa en el tiempo de vuelo para la separación de iones, el analizador cuadrupolo (Q) se basa en la estabilidad de su trayectoria en campos eléctricos oscilantes de acuerdo con su razón m/z (de Hoffmann & Stroobant, 2013, Watson & Sparkman, 2013). Este tipo de analizador está formado por cuatro, seis u ocho bastones circulares o hiperbólicos perfectamente paralelos. Los bastones están cargados eléctricamente siendo que los diametralmente opuestos están con la misma carga mientras que los adyacentes están con cargas opuestas. Así, un ion positivo entrando en el espacio del cuadrupolo es repelido por los bastones de la misma carga y atraído por los de carga negativa. Si la polaridad de los bastones es invertida antes de que el ion alcance este bastón, cambiará de dirección tratando de permanecer en la región central del cuadrupolo.

Los iones que se mueven en el eje z (paralelo a los bastones) están bajo el efecto de un campo eléctrico total compuesto de un campo alternado cuadrupolar sobrepuesto a un campo eléctrico constante, ambos resultantes de aplicación de potenciales sobre los bastones (Ecuación 2):

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \text{ y } -\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t) \quad \text{Ec. (2)}$$

donde Φ_0 representa el potencial aplicado a los bastones, ω es la frecuencia angular (en radianes por segundo = $2\pi v$, donde v es la frecuencia del campo de radiofrecuencia, RF), U y V son respectivamente el voltaje del potencial aplicado y la amplitud del voltaje RF (March & Hughes, 1989). Las bandas de trabajo son de 500 a 2000 V para U y de 0 a 3000 V a V . Después de varias operaciones matemáticas que involucran ecuaciones de movimiento, llegamos a dos ecuaciones matemáticas [Ecuaciones 3 y 4] que expresan el comportamiento de iones en un analizador cuadrupolos:

$$U = a_u \frac{m}{z} \frac{\omega^2 r_0^2}{4e} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$V = q_u \frac{m}{z} \frac{\omega^2 r_0^2}{4e} \quad \text{Ec. (4)}$$

donde a_u y q_u son parámetros de un diagrama que representa el área de estabilidad del ion dentro de un cuadrupolo, u representa el eje x o y , y r representa la mitad de la distancia que separa los bastones diametralmente opuestos (de Hoffmann & Stroobant, 2013). El segundo término de ambas ecuaciones es constante para un dado instrumento cuadrupolo. La primera conclusión de las ec. (3) y (4) es que U y V son proporcionales a la razón m/z . La segunda es la formación de un área triangular delimitada por los valores de U y V que reflejan la estabilidad del ion dentro de un cuadrupolo. Así, la exploración a lo largo de una línea que mantiene constante la razón U/V permite la detección sucesiva de diferentes masas, siempre y cuando esta línea se mantenga dentro del área de estabilidad. Y cuanto mayor es la inclinación de la línea mejor es la resolución del cuadrupolo. De esta forma, ajustando los voltajes U y V se puede estabilizar la trayectoria de iones de interés mientras que los otros iones tienen sus trayectorias desestabilizadas de forma que chocan en el bastón. Por otro lado, si $U = 0$, todos los iones tendrán trayectorias estables si bien V está dentro de los límites del área de estabilidad. En este caso, el cuadrupolo sirve como un transmisor de iones sin la capacidad de separarlos. Un punto negativo de este tipo de analizador es el hecho de que la mayor razón m/z detectada es de casi 4000 Da, trayendo una limitación considerable en la banda de masa para los instrumentos (March & Hughes, 1989).

Una de las grandes ventajas de los analizadores cuadrupolos es la posibilidad de combinación en tándem de forma que cada uno de ellos tenga una función diferente. El más conocido es el espectrómetro de masas del tipo triple-cuadrupolo (QqQ). Los Q —con la letra mayúscula (Q1 y Q3)— corresponden a los analizadores de masas mientras q —con la letra minúscula (q2)— tienen las funciones de transmisión de iones entre Q1 y Q2 y de célula de colisión con gases inertes. En esta configuración, existe la posibilidad de realizar 3 tipos de análisis:

- En el Q1 se pueden seleccionar los iones de interés, fragmentándolo en el q2 y analizando los iones producidos en el Q3.
- En el Q3 se ajusta para detectar un solo fragmento de ion mientras la exploración de masas ocurre en el Q1.
- Hay escaneo de masas en ambos Q1 y Q3, pero hay una diferencia de masas que se ajusta entre ellos, de forma que se pueda monitorear pérdida de masa neutra resultante de la fragmentación de un ion. Es decir, monitoreamos un determinado ion en función de la diferencia de masa entre el ion precursor y el fragmento de su ion.

11.4.3. Analizadores de tipo Ion Trap 3D y 2D (lineal)

Desarrolladas a principios de la década de 1960, las trampas de iones (del inglés ion traps – IT) es un analizador que utiliza un campo eléctrico oscilatorio para el almacenamiento de iones. El IT en tres dimensiones (IT-3D) fue el primer modelo desarrollado (actualmente llamado de captura de Paul) en el que un electrodo circular en conjunto con dos tapas (caps) elipsoides tanto en la parte superior como debajo de él es controlado por un campo cuadrupolar de RF que almacena los iones (Stafford, 2002). Más recientemente desarrollado, la trampa de iones en dos dimensiones, también llamada trampa de iones lineales, LIT (del inglés *linear ion trap*) es formada por un cuadrupolo conteniendo 4 bastones delimitados por lentes en cada extremidad que refleja los iones de un lado a otro dentro del LIT. Así, los iones están confinados en la dimensión radial por un campo cuadrupolar y en la dimensión axial por un campo eléctrico en las extremidades del LIT (Douglas, Frank, & Mao, 2005).

El cuadrupolo tridimensional del IT-3D está formado por la superposición de los potenciales continuos y alternados de forma que los iones de todas las masas queden en una trampa con una trayectoria tridimensional. Los iones de una determinada masa son entonces expelidos del IT-3D a partir de la aplicación de una frecuencia resonante a lo largo del eje z. Así, a diferencia del analizador cuadrupolo, en el cual los potenciales son ajustados para que solamente los iones con una determinada masa pasen a través de los bastones, en el analizador IT los iones de diferentes masas quedan almacenados dentro de él y son expulsados de acuerdo con sus masas. Sin embargo, el confinamiento de iones con la misma carga lleva a una repulsión entre ellos y, en consecuencia, una expansión de su trayectoria con el tiempo. Para evitar la pérdida de iones a causa de esta expansión, se debe reducir su trayectoria manteniendo una presión de gas helio que quita exceso de energía de los iones por colisión (la presión usada es en el rango de 0,13 Pa).

De forma análoga a los analizadores cuadrupolos, el potencial Φ_0 es la suma de los potenciales continuos (U) y alternado (V) y se aplica en el electrodo circular. Y la combinación entre ellos define un área en el diagrama de potencial (U, V) en que los iones de una determinada masa tienen una trayectoria estable.

11.4.4. Analizadores de tipo Orbitrap

El analizador orbitrap fue desarrollado por Makarov en 1996 y patentado por la empresa Thermo Electron Corporation y se ha vuelto muy popular actualmente por su alto poder de resolución, sensibilidad y exactitud (Hu *et al.*, 2005, Makarov, 2000). El orbitrap es una trampa de iones bajo el efecto de un campo electrostático, siendo la razón masa/carga obtenida a partir de la Transformada de Fourier (FT), que transforma la señal eléctrica en la escala

de tiempo en frecuencia, que es entonces convertida en razón m/z . El gran diferencial de este analizador es su formato geométrico, que se compone de dos electrodos. El electrodo externo tiene un formato de un barril cortado en dos partes iguales y con un pequeño intervalo entre estas partes. El electrodo interno tiene un formato de un huso (*spindle*) y se ubica en la parte central del analizador. La entrada de los iones ocurre a través de un orificio existente en el electrodo externo (que funciona como tierra) mientras que el electrodo interno queda bajo el efecto de un campo electrostático de varios kilovoltios (alrededor de 3000 V) de carga opuesta a los iones. Esta gran diferencia de voltaje DC y el formato de huso del electrodo interno hacen que los iones inyectados con una energía cinética de algunos kiloelectrovoltios (alrededor de 1600 eV) oscilen en una trayectoria espiral alrededor del electrodo interno haciendo un movimiento en zig-zag en torno al eje z . El formato del orbitrap produce una distribución de potencial cuadro-logaritmo cuya ecuación (Ec. 5) es dada por:

$$U(r,z) = \frac{k}{2} (z^2 - \frac{r^2}{2}) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left(\frac{r}{R_m} \right) + C \quad \text{Ec. (5)}$$

donde r y z son las coordenadas cilíndricas ($z = 0$ que es el eje de simetría del campo), C es una constante, k es la curvatura del campo, R_m es el radio (de Hoffmann & Stroobant, 2013). Considerando el gradiente de voltaje en la dirección z , podemos reducir la ecuación al primer término (Ec. 6):

$$\frac{\partial U(r,z)}{\partial z} = kz \quad \text{Ec. (6)}$$

Reestructurando la Ec. (5) e incluyendo la fuerza de campo eléctrico en función del tiempo, tenemos:

$$F_z = m \frac{d^2z}{dt^2} = -q \frac{\partial U}{\partial z} = -qkz \text{ ou } \frac{d^2z}{dt^2} = -\frac{q}{m} kz \quad \text{Ec. (7)}$$

Al insertar la ecuación de energía (8) definida por:

$$qE_z = \left(\frac{m}{2} \right) \left(\frac{dz_0}{dt} \right) \quad \text{Ec. (8)}$$

Obtenemos la solución para la Ec. (9):

$$z(t) = z_0 \cos \omega t + \sqrt{\left(\frac{2E_z}{k} \right)} \sin \omega t \quad \text{Ec. (9)}$$

Donde

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{q}{m}\right)k} \quad \text{Ec. (10)}$$

Dos conclusiones derivadas de la ecuación son que la frecuencia de oscilación de los iones es dependiente de la razón m/z pero independiente de la energía cinética de los iones inyectados en el orbitrap (Ecuación 10). De esta forma, la oscilación de los iones cerca del electrodo externo genera una corriente eléctrica en función del tiempo que es convertida por FT en frecuencia que, a su vez, es transformada en espectros de masas a partir de la Ecuación 10. Es posible, por lo tanto, variar el tiempo de detección de la señal, llevando una variación proporcional en la resolución másica; es decir, cuanto mayor sea el tiempo, mayor será la resolución. Por eso, el poder de resolución de los modelos actuales de orbitrap supera un millón.

11.4.5. Analizadores del tipo resonancia ciclotrónica de iones (ICR)

El analizador ICR se basa en la influencia de un campo magnético fuerte sobre el movimiento de iones, manteniéndolos en una trayectoria circular (ciclotrónica) perpendicular al eje de este campo (Hartmann & Wanczek, 2012), desarrollado por Sommer en 1949. Para que los iones mantengan sus trayectorias estables dentro de la célula ICR, las fuerzas centrípeta (F) y centrífuga (F') (Ecuaciones 11 y 12) deben ser iguales:

$$F = qvB \quad F' = \frac{mv^2}{r} \quad \text{Ec. (11) y (12)}$$

De forma que:

$$qvB = \frac{mv^2}{r} \quad qB = \frac{mv}{r} \quad \text{Ec. (13)}$$

Convirtiendo la velocidad a la frecuencia de acuerdo con la Ec. (14):

$$v = \frac{v}{2\pi r} \quad \text{Ec. (14)}$$

Tenemos que la velocidad angular (ω_c) es igual a:

$$\omega_c = 2\pi v = \frac{v}{r} = \frac{q}{m}B \quad \text{Ec. (15)}$$

A partir de esta ecuación, podemos concluir que:

- i. $A\omega_c$ solo depende de la proporción de masa/carga y del campo magnético.
- ii. La energía cinética de los iones no afecta a su frecuencia, sino que aumenta el radio de su trayectoria dentro de la célula ICR.
- iii. El radio de la trayectoria de un determinado ion aumenta de acuerdo con su velocidad hasta que resulte mayor que el radio de la célula ICR, momento en que se expulsa fuera de ella.

Así, al irradiar una onda electromagnética con la misma frecuencia de un ion en el ciclotrón, este ion absorbe la energía por resonancia, aumentando su energía cinética y, consecuentemente, el radio de su trayectoria. Si esta trayectoria está muy cerca de las paredes de la célula ICR, que funcionan como electrodos, el ion induce una corriente perpendicular al eje de esta trayectoria, que podrá ser medida a lo largo del tiempo, produciendo así una señal eléctrica oscilatoria de frecuencia angular ω_c inversamente proporcional a la razón de peso/carga del ion. Como las frecuencias de todos los iones cercanos a las paredes de la ICR se detectan al mismo tiempo, la señal eléctrica medida es la combinación de ω_c de cada ion, generando en la práctica un FID (del inglés, *free induction decay*), que se convierte en la escala de frecuencia angular por FT. Considerando la Ec. (15), la ω_c se convierte automáticamente en razón de masa/carga. De esta forma, mientras la trayectoria de un determinado ion sea estable dentro de la célula ICR, será detectado durante todo el tiempo de adquisición de la señal, generando espectros de masas con altísima resolución y sensibilidad. De hecho, FTMS ICR son los espectrómetros de masas que presentan el mayor poder de resolución másica, pudiendo llegar hasta 15 millones (en $m/z = 400$ Da). En la mayoría de los casos, el número de iones no debe exceder de 10^6 , ya que el efecto de *space charge* comienza a aparecer (de Hoffmann & Stroobant, 2013).

Otra característica interesante del FTMS ICR es la posibilidad de suministrar energía para excitar solamente una determinada frecuencia correspondiente a la trayectoria del ion de interés, aproximándolo a las paredes de la célula ICR, mientras que la trayectoria de los otros iones no es afectada o desestabilizada de forma a expulsarlos de la célula. Esto permite el aislamiento y, consecuentemente, la caracterización del ion de interés, incluso aumentando considerablemente su resolución másica. Además, el aislamiento de iones permite su fragmentación por colisión con gas inerte inyectado en la célula o por excitación por irradiación de electrones (ECD, ver a continuación). Este proceso produce fragmentos que también orbitan con frecuencia proporcional a su razón m/z y que pueden ser aislados y fragmentados sucesivamente produciendo espectros MS^n , sin la necesidad de recargar iones provenientes de la fuente de ionización, ya que el método de detección es no destructivo.

11.4.6. Instrumentos híbridos (espectrometría de masas en tándem) y métodos de fragmentación

Actualmente, es muy común la comercialización de instrumentos denominados híbridos que combinan dos o más analizadores en tándem. El objetivo es potenciar las características positivas y minimizar las negativas de cada uno. En general, el primer analizador funciona como espectrómetro, un segundo funciona como lugar de fragmentación y/o filtro de masas y el tercero también como espectrómetro. Este tipo de espectrómetro de masas en tándem es generalmente denominado MS-MS o MS². Como ejemplo de este tipo de configuración podemos citar el triple cuadrupolo, QqQ. Mientras que hay otros instrumentos que se basan en analizadores en tiempo (ion Trap, TOF, orbitrap e ICR) que funcionan tanto como espectrómetros como células de fragmentación ya que la energía de los iones dentro de los analizadores puede ser aumentada hasta su fragmentación, generando fragmentos que se analizan también dentro de esta misma célula. Además, en algunos analizadores en tiempo (ion Trap e ICR), un determinado ion puede ser aislado en función de la energía aplicada de forma de desestabilizar la trayectoria de los otros iones que se expulsan fuera del analizador. Una vez aislado, este ion puede ser fragmentado y los fragmentos generados pueden ser identificados dentro de este mismo analizador. Este proceso puede continuar sucesivamente hasta que las señales de los fragmentos generados ya no se detectan (en este caso tenemos el MSⁿ, en el que n representa el número de ciclos de fragmentación). También es muy común instrumentos con un analizador cuadrupolo instalado antes de un analizador de tiempo (por ejemplo, qTOF), que funciona como una célula de fragmentación y/o filtro de masas.

Por su función muy importante en la identificación de la estructura de las moléculas, la fragmentación de los iones pasó a ser una herramienta poderosa encontrada en casi todos los espectrómetros de masas modernos, que pueden presentar uno o más métodos diferentes de fragmentación:

- a) *Collision-activated decomposition* (por sus siglas en inglés, CAD) o *collision-induced dissociation* (por sus siglas en inglés, CID): método de fragmentación más común, CID se basa en la colisión de un ion previamente seleccionado con moléculas de un gas inerte (en general He o Ar) inyectado en la cámara de colisión (en general un cuadrupolo). El choque entre el gas y el ion eleva la energía interna de este, activándolo. Esta activación, que puede ocurrir con alta o baja energía dependiendo del analizador, lleva a la descomposición del ion en fragmentos menores, que pueden ser detectados en el segundo analizador de masas.
- b) Fotodección o IRMPD (*infrared multiphoton dissociation*): la energía emitida por un haz de láser (en general, en la región del infrarrojo, que es de baja energía) es absorbida por el ion seleccionado, lo que eleva su energía interna hasta promover su fragmentación en el estado

gaseoso. La gran ventaja de este método es la posibilidad de excitar solamente iones que absorben energía en la longitud de onda de emisión del láser. Este método es más utilizado en analizadores de masas de tipo de captura e ICR, porque funcionan como depósitos de iones cuyo tiempo de permanencia dentro de ellos es mayor.

- c) *Electron capture dissociation* (ECD): funciona de manera análoga al método IRMPD excepto que en lugar de un haz de láser se utiliza un cátodo emisor de un haz de electrones de baja energía. Este método funciona con iones positivos con múltiples cargas que tienen su estado de carga reducido con la formación de iones radical positivo que puede fragmentarse. ECD es muy utilizado para la identificación de sitios de glicosilación y otras modificaciones postraduccionales de la secuencia de las proteínas. ECD se encuentra más en los analizadores de tipo ICR.
- d) *Electron transfer dissociation* (ETD): método alternativo al ECD, que no funciona en analizadores que utilizan un fuerte campo eléctrico (como es el caso del *ion trap*, por ejemplo). En el caso del ETD, la transferencia de electrones ocurre a partir de una reacción radical en el estado gaseoso en la cual un electrón del anión de antraceno monocargado es transferido a iones positivos con múltiples cargas.
- e) *In-source decay* (ISD): este método de fragmentación se observa en el ion precursor antes o durante el proceso de desorción por MALDI ya que la energía necesaria para este tipo de ionización es muy alta. Los iones precursores y sus respectivos fragmentos vuelan conjuntamente desde la fuente hasta el detector. Por lo tanto, no es posible saber de qué precursor se han generado los fragmentos. ISD es muy utilizado para la determinación de secuencia de aminoácidos de proteínas intactas (llamado de secuenciación *top-down*).
- f) *Post-source decay* (PSD): fragmentación análoga a la ISD, solo que en este caso, los iones precursores salen de la región de aceleración (o *source*) con un exceso de energía, volviéndose metaestables, condición que propicia su fragmentación antes de alcanzar el detector. En el caso del PSD, es posible correlacionar cuál precursor generó los fragmentos porque puede ser aislado a lo largo del recorrido. Este método de fragmentación puede tener varias aplicaciones, incluyendo determinación de secuencia de aminoácidos y determinación estructural de macromoléculas.

11.5. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE BIOMOLÉCULAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Dos de las tareas más importantes en el estudio de macromoléculas son la identificación de la secuencia de los monómeros que las forman y la determinación de cómo su estructura química se encuentra organizada espacialmente. En ambas tareas, la EM ha contribuido de forma significativa, principalmente a partir del desarrollo de nuevos instrumentos de altísima resolución y nuevas metodologías de análisis de mezclas muy complejas. En particular, actualmente, la identificación de secuencia de aminoácidos en péptidos y proteínas y de glúcidos en polisacáridos es hecha casi exclusivamente por EM en tándem (MS^2) con el uso de diferentes métodos de fragmentación. Veremos a continuación las estrategias más usadas en la secuencia de estas macromoléculas.

11.5.1. Determinación de la secuencia de péptidos y proteínas

La primera información química de péptidos y proteínas por EM es la determinación de la masa molecular de la molécula intacta. Incluso, es posible medirla con alta exactitud si la razón m/z de la molécula analizada es menor a 3 kDa. Sin embargo, solo es posible determinar la secuencia de aminoácidos de péptidos y proteínas a partir de los métodos de fragmentación, siendo CID el método de fragmentación más utilizado. Los fragmentos más comúnmente encontrados se derivan del clivaje de los enlaces de la cadena principal del péptido / proteína: $C\alpha-C$, $C-N$ o $N-C\alpha$, produciendo seis tipos de fragmentos, que se nombran respectivamente como a_n , b_n , c_n , cuando la carga positiva encuentra en el fragmento que contiene el N-terminal, y x_n , y_n , z_n , cuando la carga se encuentra en el fragmento que contiene el C-terminal (Biemann, 1988; Walsh, 1987). El subíndice n representa el número de aminoácidos presentes en dicho fragmento. Además, la unión entre las cadenas principal y lateral de los aminoácidos también puede ser clivada produciendo otras series de fragmentos, que también pueden ser usados en la identificación de la composición de aminoácidos del polipéptido.

La diferencia de masas entre fragmentos consecutivos dentro de una misma serie permite la identificación de la secuencia de aminoácidos de aquella serie y, consecuentemente, de la secuencia del polipéptido. Esto se ejemplifica en la Figura 11.3, donde se representa el espectro de fragmentación del ion $630,313 m/z$, correspondiente al péptido 169-HPYFYAPELLYYANK-183 triplemente cargado de la proteína albúmina sérica bovina. Excepto Ile y Leu, que son isómeros, todos los otros aminoácidos poseen una masa molecular distinta, que permite su identificación. Sin embargo, si la medida de masa es de baja resolución, puede que no sea posible diferenciar Gln y Lys, cuya

diferencia de masa es de solo 0.036 u.m.a. Como la fragmentación puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena polipeptídica, es posible determinar la secuencia de aminoácidos aunque las series de iones fragmentados sean incompletas porque hay una redundancia entre los fragmentos cuyas secuencias pueden solaparse. Los tipos de fragmentos de iones observados en los espectros de MS/MS dependen de varios factores entre ellos: composición de aminoácido, secuencia peptídica, cantidad de energía interna transferida, método de fragmentación. Como hay varios métodos de fragmentación, es importante evaluar cuál es el más adecuado para proporcionar la información estructural deseada. Por ejemplo, si se utiliza el CID de alta energía, se pueden obtener los seis tipos de fragmentos anteriormente mencionados, lo que puede ayudar, por una parte, a identificar la secuencia del polipéptido, pero, por otra parte, puede hacer más complejos los análisis de espectros. La fragmentación por CID de baja energía favorece la formación de los iones b_n e y_n , pudiendo ser una alternativa para disminuir la complejidad de los espectros de MS/MS.

La fragmentación de péptidos también puede ser obtenida por ISD durante la ionización por MALDI con la formación de los iones c_n y z_n que son los más abundantes. Los fragmentos observados en el MALDI-TOF-TOF usando el método reflectrón se asemejan a los obtenidos en el método de CID de alta energía (de Hoffmann & Stroobant, 2013). Sin embargo, tanto CID como ISD tienden a fragmentar de forma uniforme las conexiones químicas de la cadena polipeptídica, siendo las más lábiles, las más fácilmente quebradas.

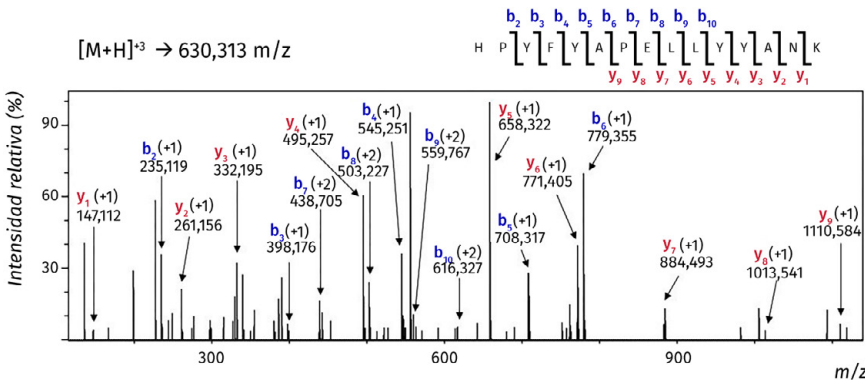


FIGURA 11.3. ESPECTRO DE FRAGMENTACIÓN DEL ION 630,313 M/Z CORRESPONDIENTE AL PÉPTIDO 169–HPYFYAPELLYYANK–183 TRIPLEMENTE CARGADO DE LA PROTEÍNA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.

LOS FRAGMENTOS B E Y IDENTIFICADOS ESTÁN SEÑALADOS CON SUS RESPECTIVAS CARGAS. LA PROTEÍNA FUE DIGERIDA CON TRIPSINA Y LOS PÉPTIDOS RESULTANTES FUERON ANALIZADOS POR LC-MS/MS EN UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS CON CONFIGURACIÓN QTOF, USANDO FRAGMENTACIÓN CID

Así durante esos métodos de fragmentación, las modificaciones postraduccionales tales como fosforilación y glicosilación, son más fácilmente rotas por ser formadas por conexiones relativamente más lábiles. Para estos casos, los métodos de fragmentación ECD y el ETD deben ser usados como alternativa para la identificación de aminoácidos modificados en forma postraducciona, porque ellos no dependen de la energía de disociación de las conexiones entre los átomos que componen la cadena polipeptídica, o sea, la fragmentación de la cadena polipeptídica principal es independiente de su secuencia de aminoácidos. Por formar iones radicales, la carga se concentra en una parte de la cadena, de modo que la energía extra recibida para su fragmentación no se distribuye uniformemente entre las conexiones químicas. Así, los métodos ECD y ETD promueven la separación del esqueleto polipeptídico más general que los otros métodos de fragmentación, proporcionando información de secuencia más amplia, con la producción de fragmentos c_n y z_n . Además, los enlaces más lábiles se preservan, permitiendo la identificación del aminoácido que se ha modificado.

Como los espectrómetros de masas actuales solo poseen poder de resolución monoisotópica por razones de m/z de hasta 3 kDa, las proteínas de alta masa molecular son generalmente digeridas con enzimas proteolíticas generando péptidos cuyas masas moleculares sean menores a 3 kDa. Este enfoque llamado de *bottom-up* es muy utilizado en la identificación de proteomas que están formados por miles de proteínas diferentes. Las proteínas no se identifican directamente, pero se lo hace a partir de sus péptidos generados por la digestión proteolítica, siendo la tripsinización (o proteólisis con la enzima tripsina) el método más utilizado. La tripsina cliva la unión peptídica en el lado C-terminal de los aminoácidos Lys y Arg, de forma que los fragmentos trípticos tienen siempre en su extremo uno de estos aminoácidos (excepto el péptido C-terminal puede tener cualquiera de los 20 aminoácidos). Con ello se hace relativamente más fácil la comparación de la secuencia de aminoácido obtenida por EM con la obtenida a partir de la digestión tríptica teórica realizada *in silico* de todas las proteínas de un determinado organismo.

La secuenciación *top-down* por espectrometría de masas MS/MS es otro enfoque experimental para la secuencia de proteínas intactas que ha crecido en los últimos años. Este enfoque se ha realizado más eficientemente en los espectrómetros ESI/FT por ofrecer una mayor resolución y exactitud de masas que los demás analizadores de masas, además de ser posible la fragmentación tanto por CID y por ECD. Una de las potencialidades del abordaje *top-down* es la secuenciación de proteínas *de novo*, es decir, de proteínas que no se han predicho *in silico* o cuyos genes aún no se han depositado en los bancos de datos genómicos. Permite, además, la secuenciación de los extremos de las proteínas que a veces no se identifican en el enfoque *bottom-up*.

11.5.2. Caracterización de los carbohidratos por EM

A diferencia de las proteínas, la caracterización completa de un oligosacárido o polisacárido es mucho más difícil porque exige la combinación de varios enfoques analíticos además de la EM. Esto se debe a que la unión glicosídica entre los monosacáridos puede ocurrir a partir de diferentes combinaciones entre sus diversos grupos químicos, pudiendo formar largas cadenas lineales o ramificadas. Además, los oligosacáridos pueden presentar diferentes isómeros de posición, formas cíclicas y configuración anomérica de cada una de sus conexiones glicosídicas. Hace décadas la EM se ha utilizado en la caracterización estructural de oligosacáridos a partir de su combinación con la cromatografía gaseosa (CG). Sin embargo, en este caso, deben ser hidrolizados en monosacáridos, que luego se derivatizan con compuestos orgánicos que los dejan más volátiles y pasibles de análisis por CG-EM. La identificación del monosacárido se basa entonces en la comparación del tiempo de retención y el patrón de fragmentación con los patrones de referencia (Hansson & Karlsson, 1993; Hellerqvist & Sweetman, 1990).

Con el desarrollo de las técnicas blandas de ionización fue posible analizar los oligosacáridos sin la necesidad de su hidrólisis completa y, en muchos casos, ni de reacción de derivatización. Los oligosacáridos neutros son más difíciles de ionizar en el ESI que en el MALDI, mientras que los que contienen carga negativa (fosforilados, sulfatados o sialilados) son fácilmente ionizados en el ESI en el modo negativo. Otro aspecto importante en relación a la ionización de oligosacáridos es la formación de especies moleculares resultantes de protonación $(M + H)^+$ o cationización por un ión metal alcalino $(M + \text{metal alcalino})^+$ en modo positivo o la desprotonización $(M - H)^-$ en modo negativo.

Así, si la cadena oligosacáridica es relativamente pequeña, es posible la determinación de su masa molecular, lo que permite la deducción de la composición de monosacáridos pero no permite la distinción entre monosacáridos isómeros, tal como se ejemplifica en la Figura 11.4 donde se muestra un péptido unido a un N-glicano y su espectro de fragmentación por CID.

CID y PSD son los métodos de fragmentación más utilizados para la caracterización química de oligosacáridos, cuya fragmentación depende de diversos factores tales como el método de ionización, el analizador, la naturaleza de la derivatización, y la naturaleza de las especies moleculares (de Hoffmann & Stroobant, 2013). En general, cinco series de fragmentos de iones pueden ser observados. Las dos series más intensas son debidas a la separación de la unión glicosídica, una de las cuales contiene el extremo reductor mientras que la otra la no reductora. Una tercera serie se deriva de la separación de una segunda unión glicosídica de cualquiera de los iones fragmentos observados en aquellas series más intensas. Las otras dos series menos intensas y en general menos abundantes provienen de un doble clivaje a través de la unión del anillo glicosídico y contiene el lado reductor o el lado no reductor. Para identificar los diferentes tipos de fragmentos obtenidos por EM, se

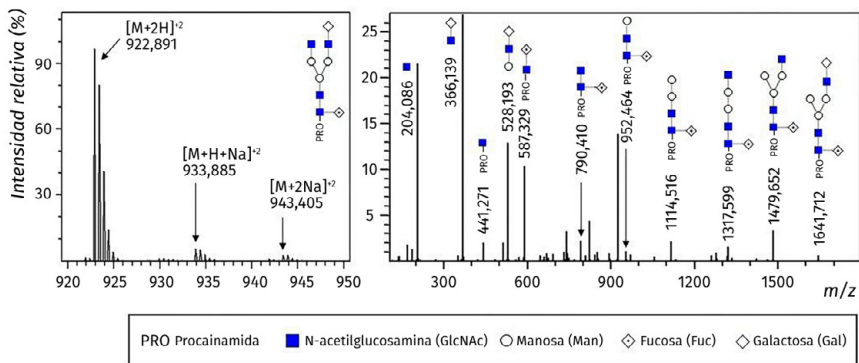


FIGURA 11.4. ANÁLISIS DE N-GLICANOS.

EL PANEL DE LA IZQUIERDA PRESENTA UNA REGIÓN DE UN ESPECTRO MS¹ EN EL QUE SE OBSERVAN LAS ESPECIES IÓNICAS DEL N-GLICANO G1F DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL. EL ANTICUERPO SE DIGIRIÓ CON PNGASA F Y LOS N-GLICANOS RESULTANTES FUERON PURIFICADOS Y DERIVATIZADOS CON PROCAINAMIDA. LUEGO SE LLEVÓ A CABO EL ANÁLISIS POR LC-MS/MS EN UN ESPECTRÓMETRO CON CONFIGURACIÓN QTOF. EL PANEL DE LA DERECHA PRESENTA UNA FRAGMENTACIÓN CID DE ESTE N-GLICANO. LOS FRAGMENTOS SEÑALADOS SE PRESENTAN EN LA FORMA [M+H]⁻¹

utiliza una nomenclatura sugerida por Domon y Costello. Los fragmentos que retiene la carga en el lado no reductor se llaman A, B, o C, mientras que los que retiene la carga en el lado reductor se llaman X, Y o Z, dependiendo de si cortan el anillo o la conexión glicosídica. El subíndice corresponde a la unión glicosídica interrumpida mientras que el superíndice a la izquierda de los fragmentos A y X corresponde a las conexiones que se rompen para obtener tales fragmentos. Las letras griegas α, β, etc., que pueden estar asociadas al subíndice, indican la ramificación, si existe, implicada en el clivaje.

11.5.3. Caracterización de glicoproteínas por EM

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más relevantes biológicamente de las proteínas. Se estima que casi la mitad de todas las proteínas son glicosiladas, siendo la porción glicosídica responsable de muchas de sus propiedades biofísicas (Dwek, 1996; Varki, 1993). Para la caracterización de glicoproteínas se necesita identificar el tipo de glicosilación (tipo de glicanos y sus sitios de conjugación), estructura de glicanos, sitio de glicosilación, porcentaje de ocupación de este sitio y cuantificación.

Debido a la alta variabilidad estructural en la parte glicosídica, la caracterización estructural de glicoproteínas es una tarea muy laboriosa, siendo que en estos casos la EM sigue siendo la herramienta analítica más adecuada. Hay diferentes estrategias experimentales para esta caracterización, pero las más comúnmente usadas separan la parte glicosídica de la proteica y las

caracterizan individualmente. En estos casos, se necesita después identificar el sitio de glicosilación en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La estrategia de análisis también depende de si la glicoproteína objetivo de estudio es conocida o si desea identificar una o más glicoproteínas aún no caracterizadas. En el primer caso, se pueden utilizar sistemas cromatográficos de afinidad para purificar o enriquecer la glicoproteína de interés, facilitando los análisis de los espectros de masa. En el segundo caso en el que se pretende estudiar un pool de glicoproteínas a gran escala (por ejemplo, el glicoma de una célula, tejido o incluso de un organismo), es fundamental su enriquecimiento usando métodos cromatográficos menos específicos pero que interactúen con la porción glicosídica. A partir de la glicoproteína o del pool de glicoproteínas de interés, se utiliza su digestión con enzimas proteolíticas (por ejemplo, tripsina) de modo de producir péptidos glicosilados y no glicosilados. Si la muestra digerida no es muy compleja, se puede analizar por nanoHPLC/EM-EM, que separa cromatográficamente los (glico) péptidos antes de su inyección en el EM. Este debe ser capaz de realizar al menos dos tipos diferentes de fragmentación: CID para identificar la secuencia de aminoácidos de los (glico) péptidos y la estructura química de la parte glicosídica y ECD/ETD para identificar el sitio de glicosilación en los glicopéptidos. Para los casos en que la muestra digerida resulta muy compleja debido a la digestión proteolítica, se recomienda la inclusión de una etapa cromatográfica adicional para separar los péptidos glicosilados de los no glicosilados antes de la etapa de nanoHPLC/EM-EM.

Como se puede observar en la estrategia anterior, el aislamiento de glicoproteínas/glicopéptidos es una etapa muy importante en su caracterización y, por eso, diferentes métodos han sido publicados en la literatura y se encuentran disponibles en el mercado distintos kits de purificación. A continuación, se describen los más métodos de aislamiento más usados.

11.5.4. Cromatografía de afinidad por lectinas

Las lectinas son proteínas que poseen afinidad por glicanos y, por esta propiedad, han sido muy utilizadas en el aislamiento y caracterización de glicoproteínas y glicopéptidos. En la actualidad, ya hay más de 160 descritas en la literatura, estando al menos 60 de ellas disponibles comercialmente (Fanayan, Hincapie, & Hancock, 2012; Kobayashi, Tato, Ogawa, Yamamoto, & Hirabayashi, 2014). Cada una presenta una especificidad para un determinado tipo de estructura de glicanos, siendo la Concanavalina A (ConA) la más conocida; que reconoce principalmente la manosa y la glucosa. Dependiendo del tipo de análisis, se combinan diversos tipos de lectinas para aislar una variedad mayor de glicanos. Actualmente, es posible encontrar comercialmente lectinas inmovilizadas en soportes sólidos basados en sílice, agarosa o partículas magnéticas, que facilitan el aislamiento de diferentes tipos de glicoproteínas.

11.5.5. Compuestos a base de borato

Los ácidos borónicos reaccionan con grupos *cis*-dioles, que se encuentran en casi todos los tipos de monosacáridos componentes de los glicanos, por lo que se utiliza para el aislamiento de una gran variedad de diferentes tipos de glicoproteínas y glicopéptidos. Los productos de esta reacción son lábiles de forma que los glicanos pueden ser recuperados por tratamiento en medio ácido. En la actualidad, ya se comercializan partículas magnéticas y resinas cromatográficas funcionalizadas con ácidos borónicos para facilitar el aislamiento de glicanos (Z. A. Lin *et al.*, 2011a, Z. Lin *et al.*, 2011b).

11.5.6. Enriquecimiento con hidrazida

El enriquecimiento de glicoproteínas y glicopéptidos con hidrazida se basa en la oxidación de dioles vecinales con peryodato formando dialdehídos que pueden reaccionar con grupos hidrazidos ligados a diferentes resinas o soportes sólidos. Dado que esta reacción es irreversible, se necesita digerir el material inmovilizado con glicosidasas para liberar la parte proteica de la parte glicosídica. Es un método muy robusto por ser capaz de aislar la mayor parte de glicoproteínas o glicopéptidos de una muestra, pero no es útil para caracterización estructural de glicanos por haber sido modificados químicamente.

11.5.7. Enriquecimiento en cromatografía de afinidad con óxido de titanio

Normalmente utilizada para el aislamiento de fosfoproteínas y fosfopéptidos, la cromatografía de afinidad con óxido de titanio puede interactuar con elevada afinidad con proteínas que contienen residuos de ácido siálico luego de llevar a cabo su desfosforilación con fosfatasa alcalina. Las interacciones no específicas de aminoácidos ácidos se pueden bloquear con la adición de TFA 5 % (v/v) y de ácido glicólico 1M. Las glicoproteínas pueden ser eluidas de la resina por tratamiento con hidróxido de amonio en pH 11.

11.5.8. HILIC

La cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) es una herramienta versátil de separación de glicanos nativos de acuerdo con su tamaño y la polaridad antes del análisis por EM (en forma de SPE o como columna cromatográfica acoplada de forma on line HPLC conectado directamente al mismo). Se utiliza para análisis del perfil glucídico, determinación de heterogeneidad de glicosilación en un sitio de glicosilación, enriquecimiento de glicopéptidos de una mezcla compleja de péptidos, así como de prefraccionamiento de

muestras complejas a nivel de proteínas o péptidos. HILIC tiene la ventaja de ser aplicable a todas las clases de glicanos, desde neutros a ácidos sin problemas de recuperación. Los tiempos de retención son previsible en base a la composición de monosacáridos de los glicanos, siendo las fases móviles usadas directamente compatibles con la EM.

11.5.9. Métodos de liberación de glicanos

Debido a la mayor dificultad en la caracterización estructural de los glicanos ligados a la proteína o a un péptido, en general, el análisis se realiza luego de su clivaje de la glicoproteína o glicopéptido. Este clivaje puede realizarse de forma química (usando hidrazina o β -eliminación reductiva) o enzimática por endoglicosidasas (por ejemplo, PNGasa F, EndoH y EndoS):

- Hidrazina: es un reactivo que cliva las conexiones amídicas, causando el completo clivaje de la cadena polipeptídica. Cliva tanto glicanos N- como O- ligados. Además de la ventaja de ser un método no selectivo, la reacción de glicoproteínas con hidrazina libera los azúcares con las regiones terminales reductoras intactas, que pueden ser marcadas posteriormente con varios tipos de reactivos fluorescentes. Estos, a su vez, pueden ser separados y detectados por HPLC. Sin embargo, la reacción con hidrazina tiene dos principales desventajas:
 - i. Cliva el grupo acetyl de los azúcares aminoacetilados, requiriendo una etapa de re-acetilación después de la reacción.
 - ii. La completa pérdida de información de la parte proteica y del sitio de glicosilación porque esta parte es completamente destruida.
- β -eliminación reductiva: es una reacción de aminación reductiva que cliva glicanos O- ligados en presencia de una base fuerte. Como es una reacción muy drástica que conduce a una degradación extensiva, se añade a la reacción un exceso del agente reductor cianoborohidruro de sodio. Algunos autores usan como base fuerte amoníaco para hacer esta reacción más suave. Una desventaja de este método es la producción de glicanos sin extremo reductor, impidiendo su posterior derivatización. Por otro lado, la parte proteica se mantiene intacta, excepto los residuos de Ser y Thr donde estaba ligado el glicano, que se convierten en sus formas dehidro. Sin embargo, hay informes en la literatura que la reacción de β -eliminación reductiva puede ser incompleta, dependiendo de los residuos de aminoácidos adyacentes al residuo de Ser o Thr glicosilado.
- Digestión enzimática: en el mercado existen muchas endoglicosidasas con diferentes especificidades, siendo la más popular la PNGasa F. PNGasa F es una amidasa que cliva el enlace entre el glicano y el residuo de Asn, convirtiendo este aminoácido en un residuo de Asp, marcando así el sitio de glicosilación con el aumento de 1 Da en la masa molecular de la proteína

(aumento que puede ser detectado por EM). Aunque es muy eficiente, la digestión enzimática es específica solo para un tipo de conexión y la actividad endoglicosidásica puede variar en función de la composición glicosídica y de los aminoácidos en torno a los sitios de glicosilación. Así, si el objetivo del análisis es la caracterización detallada de todas las potenciales estructuras de glicanos de una mezcla compleja de glicoproteínas se hace necesario el uso de varias endoglicosidasas específicas para los diversos tipos de unión glicosídica encontrada en glicoproteínas.

11.5.10. Caracterización del sitio de glicosilación

Como se dijo anteriormente, dos de las etapas muy importantes de la caracterización estructural de una glicoproteína son la identificación del sitio de glicosilación, que puede ser mucho más de uno y de varios tipos diferentes, y el grado o porcentaje de glicosilación de cada sitio, ya que es muy común que un mismo sitio no esté totalmente glicosilado. Esto se deriva del intrínseco proceso de regulación postraducional al que la glicoproteína está sometida.

Para la identificación del sitio de glicosilación generalmente la glicoproteína es digerida con tripsina (u otras proteasas específicas, tales como Lys-C, Glu-C o Arg-C), generando péptidos glicosilados y no glicosilados, que pueden ser separados por cromatografía e inyectados directamente en el EM. Para glicoproteínas de difícil digestión proteolítica, se puede añadir un detergente llamado RapiGest® (Waters) que facilita este proceso y que puede ser eliminado con la acidificación del medio luego de la proteólisis. Es importante tener en cuenta que puede haber casos en que un solo péptido tenga más de un sitio de glicosilación lo que dificulta el análisis. En estos casos, es necesario el uso de otras proteasas para minimizar esta posibilidad. La secuencia de aminoácidos y el sitio de glicosilación se pueden identificar utilizando la combinación de CID y ECD (o ETD), como ya se ha explicado anteriormente.

La tasa de ocupación de un sitio glicosilado puede evaluarse añadiendo $H_2^{18}O$ en la reacción de hidrólisis de forma que ^{18}O sea incorporado en el péptido glicosilado aumentando en 2 Da su masa con relación al mismo péptido glicosilado.

Referencias bibliográficas

- BIEMANN, K.** (1988). Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 16(1–12), 99–111. 10.1002/bms.1200160119
- CECH, N. B., & ENKE, C. G.** (2001a). Effect of affinity for droplet surfaces on the fraction of analyte molecules charged during electrospray droplet fission. *Analytical Chemistry*, 73(19), 4632–4639. 10.1021/ac001267j.
- CECH, N. B., & ENKE, C. G.** (2001b). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362–387. <http://doi.org/10.1002/mas.10008>
- DE HOFFMANN, E., & STROOBANT, V.** (2013). *Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons.
- DOUGLAS, D. J., FRANK, A. J., & MAO, D.** (2005). Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 1–29. <http://doi.org/10.1002/mas.20004>
- DREISEWERD, K.** (2003). The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews*, 103(2), 395–426. <http://doi.org/10.1021/cr010375i>
- DWEK, R. A.** (1996). Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews*, 96(2), 683–720. 10.1152/ajpregu.00322.2014.
- EL-ANEED, A., COHEN, A., & BANOUB, J.** (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230. <http://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- EMMETT, M. R., & CAPRIOLI, R. M.** (1994). Micro-electrospray mass spectrometry: Ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *Jam*, 5(7), 605–613. [http://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)85001-1](http://doi.org/10.1016/1044-0305(94)85001-1)
- FANAYAN, S., HINCAPIE, M., & HANCOCK, W. S.** (2012). Using lectins to harvest the plasma/serum glycoproteome. *Electrophoresis*, 33(12), 1746–1754. <http://doi.org/10.1002/elps.201100567>
- FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F., & WHITEHOUSE, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64–71.
- HANSSON, G. C., & KARLSSON, H.** (1993). Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of glycoprotein oligosaccharides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 14, 47–54. <http://doi.org/10.1385/0-89603-226-4:47>
- HARTMANN, H., & WANCZEK, K. P.** (2012). *Ion Cyclotron Resonance Spectrometry*. Springer Science & Business Media.
- HELLERQVIST, C. G., & SWEETMAN, B. J.** (1990). Mass spectrometry of carbohydrates. *Methods of Biochemical Analysis*, 34, 91–143.
- HU, Q., NOLL, R. J., LI, H., MAKAROV, A., HARDMAN, M., & GRAHAM COOKS, R.** (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4), 430–443. <http://doi.org/10.1002/jms.856>
- KARAS, M., & KRÜGER, R.** (2003). Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews*, 103(2), 427–440. <http://doi.org/10.1021/cr010376a>

- KOBAYASHI, Y., TATENO, H., OGAWA, H., YAMAMOTO, K., & HIRABAYASHI, J.** (2014). Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 1200, 555–577. (Clifton, N. J.). http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_45
- LIN, Z. A., PANG, J. L., LIN, Y., HUANG, H., CAI, Z. W., ZHANG, L., & CHEN, G. N.** (2011a). Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography. *The Analyst*, 136(16), 3281–3288. <http://doi.org/10.1039/c1an15180k>
- LIN, Z., PANG, J., YANG, H., CAI, Z., ZHANG, L., & CHEN, G.** (2011b). One-pot synthesis of an organic–inorganic hybrid affinity monolithic column for specific capture of glycoproteins. *Chemical Communications*, 47(34). (Cambridge, England). 9675–9677. <http://doi.org/10.1039/c1cc13082j>
- MAKAROV, A.** (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1156–1162. [10.1021/ac991131p](https://doi.org/10.1021/ac991131p)
- MARCH, R. E., & HUGHES, R. J.** (1989). *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*. Wiley–Interscience.
- MONIATTE, M., VAN DER GOOT, F. G., BUCKLEY, J. T., PATTUS, F., & VAN DORSSELAER, A.** (1996). Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI–TOF mass spectrometry. *FEBS Letters*, 384(3), 269–272. [10.1016/0014-5793\(96\)00328-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00328-6)
- STAFFORD, G.** (2002). Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *Jam*, 13(6), 589–596. [http://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00385-9](http://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00385-9)
- VARKI, A.** (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), 97–130. [10.1093/glycob/3.2.97](https://doi.org/10.1093/glycob/3.2.97)
- WALSH, K. A.** (1987). *Methods in Protein Sequence Analysis · 1986*. Springer Science & Business Media.
- WATSON, J. T., & SPARKMAN, O. D.** (2013). *Introduction to Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons.
- WILM, M., SHEVCHENKO, A., HOUTHAEVE, T., BREIT, S., SCHWEIGERER, L., FOTSIS, T., & MANN, M.** (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379(6564), 466–469. <http://doi.org/10.1038/379466a0>

12

Determinación de la actividad biológica de glicoproteínas: modelos celulares y animales

KAREN PERELMUTER, ANA PAULA ARÉVALO, MARTINA CRISPO, MARIELA BOLLATI-FOGOLÍN

12.1. INTRODUCCIÓN

En los Capítulos 9, 10 y 11 se realizó una descripción de las numerosas técnicas fisicoquímicas que existen para la caracterización de la glicosilación presente en las glicoproteínas (métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrometría de masa). Si bien en algunos casos con estas técnicas se puede inferir la actividad biológica de las glicoproteínas, sobre todo en aquellas simples, estos métodos no proporcionan directamente información sobre la potencia o actividad biológica de las mismas. Por ejemplo, Yanagihara *et al.* (2010) reportan que la medida del contenido de ácido siálico en la eritropoyetina humana (hEPO) no es suficiente para la predicción de la potencia biológica *in vivo*. La determinación de la actividad biológica en proteínas recombinantes se aplica con el objetivo de estimar la potencia de determinadas moléculas, testear la eficacia de fármacos e incluso vacunas.

12.2. GENERALIDADES DE LOS BIOENSAYOS

La determinación de la potencia biológica de una proteína es la medida cuantitativa de su actividad biológica. Para realizar esta medida se realiza un test funcional denominado bioensayo, el cual se puede definir como procedimiento cuantitativo que utiliza una respuesta funcional en un sistema vivo que puede ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*. En este procedimiento analítico se utiliza un sistema biológico que responde a la glicoproteína, y la respuesta a la glicoproteína a analizar se compara con la de un estándar de referencia, nacional o internacional, calibrado en Unidades Internacionales de actividad biológica (IU, del inglés *International Units*) (Mire-Sluis *et al.*, 1996).

Los bioensayos pueden ser ejecutados empleando modelos celulares (*in vitro*) o modelos animales (*in vivo*). Los modelos *in vivo* permiten estudiar las condiciones biológicas en las que ocurre un fenómeno y cuáles son sus consecuencias. Los ensayos basados en modelos animales presentan ciertas desventajas ya que existe una gran variabilidad entre animales, poseen un elevado costo y son técnicas laboriosas, además de los cuestionamientos éticos vinculados al uso de animales de experimentación. Debido a estos

inconvenientes, los modelos basados en cultivos celulares pueden ser una alternativa viable, ya que son menos laboriosos, se puede aumentar el número de réplicas a ensayar y no existen problemas éticos asociados. Una de las falencias de los métodos basados en células es la incapacidad de evaluar diferencias en la vida media de una glicoproteína, lo cual afecta su actividad. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* desarrollados para la estimación de la actividad de eritropoyetina humana recombinante (rHEPO) no son capaces de discriminar entre la rHEPO intacta y sus variantes asialo o aglicosilada, las cuales poseen tiempos de vida media más cortos y por lo tanto una actividad biológica reducida cuando son administrados en modelos animales (Ramos *et al.*, 2003). Los resultados hallados en un modelo no son fácilmente extrapolables a otro modelo y la compatibilización de resultados no es directa. Dentro de un mismo tipo de sistema, por ejemplo en el *in vivo*, el escalado es una herramienta importante pero requiere grandes esfuerzos y validaciones. Más compleja es aún la extrapolación de resultados hallados en modelos *in vitro* a modelos *in vivo*, pero su aplicación y conocimiento permiten evaluar de una forma integrada a la biomolécula de interés. En general, los modelos mencionados se complementan y a veces no son excluyentes. Los modelos *in vivo* permiten estudiar las condiciones biológicas en las que ocurre un fenómeno y cuáles son sus consecuencias. Los modelos *in vitro* nos aproximarán a los mecanismos subyacentes. Si bien es cierto que lo mismo podría hacerse con modelos *in vivo*, es indudable que la velocidad de obtención de la información y el menor gasto justifica enormemente su utilización (Fina *et al.*, 2013).

12.3. VALIDACIÓN DE BIOENSAYOS

El objetivo general de la validación de un bioensayo es determinar que el método seleccionado es apropiado para el uso que se le desea dar. Para que un ensayo sea válido, se debe cumplir la condición fundamental de que la muestra y el estándar tengan un comportamiento similar. Esto significa que los parámetros que definen la relación dosis–respuesta como la asíntota y pendiente deben ser idénticos. Por lo tanto, durante el desarrollo de un bioensayo se debe determinar el rango de dosis en los cuales la relación entre dosis y respuesta es lineal y además, en este rango, las curvas de respuesta del estándar y de la muestra deben ser paralelas. La calidad de un bioensayo, al igual que cualquier método analítico, está definida por la exactitud y precisión. Se entiende por exactitud, qué tan cercano está el valor medido del valor real o «verdadero». El término precisión, es usualmente definido como la medida del grado de repetibilidad del ensayo bajo su operación normal. Además, el ensayo debe ser reproducible, entendiendo como reproducibilidad a la capacidad de una prueba de ser reproducida o replicada por

otras personas. Para los bioensayos, el resultado puede ser expresado como porcentaje relativo del desvío estándar para un número estadísticamente significativo de potencias estimadas. La repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad son tres niveles operacionales abarcados dentro del concepto de la precisión. Para la repetibilidad, es necesario demostrar que el bioensayo puede ser repetido por un mismo operador, usando los mismos reactivos, condiciones, instrumentos de medición, etc., dentro de un período de tiempo definido. Para la precisión relativa, se debe demostrar que un ensayo puede ser repetido durante largos períodos de tiempo dentro del mismo laboratorio. Finalmente, el término reproducibilidad implica que el ensayo es repetible aún cambiando de operadores, equipos de medición e incluso en diferentes laboratorios. Este término es comúnmente asociado con el término de robustez de un bioensayo, definido como el grado de reproducibilidad de los resultados bajo una variedad de condiciones.

Otras definiciones útiles en el contexto de la validación de bioensayos son el límite de cuantificación, definido como la mínima concentración que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable. El límite de detección se define como la mínima concentración que puede ser detectada (sin llegar a ser cuantificada). La linealidad, es la habilidad de un bioensayo para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de proteína en un rango determinado. Finalmente, el rango se define como el intervalo entre niveles superiores e inferiores de una molécula dada que han sido determinados con precisión y exactitud utilizando un determinado bioensayo.

12.4. TIPOS DE MODELOS EMPLEADOS EN LOS BIOENSAYOS

12.4.1 Modelos celulares

En la actualidad existen varios modelos celulares en los cuales se evalúa la actividad biológica de diversas proteínas funcionales/terapéuticas, muchas de ellas glicoproteínas. Sin embargo, para alcanzar este punto, la tecnología que emplea a los cultivos celulares ha tenido que transcurrir un largo camino. Los primeros intentos por realizar cultivos de tejidos animales *ex vivo* se remontan a un siglo atrás y fueron necesarios cerca de 50 años para el establecimiento de los principios básicos y las rutinas fundamentales para el aislamiento y cultivo de las células, técnicas que aún son válidas y utilizadas de rutina en la actualidad. Otros desarrollos fundamentales para el establecimiento de los modelos celulares incluyen las técnicas de inmortalización de células, la obtención de líneas celulares a partir de tumores, la producción y la conservación de células en masa, las tecnologías de ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante y el desarrollo de formatos de

placas multipozos que permiten el desarrollo de este tipo de ensayos (por ejemplo, las placas de 96 pocillos). Fue entre 1980 y 1990 donde ocurrió un crecimiento exponencial de la ciencia relacionada a ensayos *in vitro* basados en el uso de células y hoy en día estas pruebas conforman aproximadamente la mitad de las actividades vinculadas a la detección de moléculas activas en investigación (Langer *et al.*, 2015).

Los ensayos basados en células pueden realizarse utilizando tanto cultivos primarios como líneas celulares establecidas. Los cultivos primarios poseen la ventaja que mantienen las características del tejido original del cual fueron extraídas. Sin embargo, no se pueden mantener en cultivo indefinidamente, son difíciles de cultivar en determinadas condiciones y en algunas situaciones pueden tener cierta variabilidad, principalmente relacionada con el animal del cual derivan. Las líneas celulares establecidas, por el contrario, pueden crecer indefinidamente y son clonales, por lo cual presentan elevada consistencia a lo largo del tiempo, características que las convierten en el modelo más simple y reproducible para la determinación de la actividad biológica de las glicoproteínas. Un ejemplo del uso de un cultivo primario para la determinación de la actividad biológica de una glicoproteína es el de la hormona folículo estimulante (FSH). Existen varios métodos para medir la actividad biológica de esta hormona, que van desde ensayos en animales hasta ensayos basados en genes reporteros. Uno de los métodos se basa en la utilización de un cultivo primario de células de Sertoli o células de la granulosa de rata. Las células de Sertoli responden específicamente y de manera dosis dependiente al agregado de FSH exógeno. Las posibles respuestas medidas frente a esta glicoproteína son la producción de estradiol, el aumento de la actividad de la enzima aromataasa o el aumento de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC).

Para un bioensayo, las células pueden obtenerse de dos maneras diferentes, a partir de cultivos en crecimiento o a partir de un stock de células criopreservadas. La utilización de células criopreservadas es un método altamente robusto y reproducible que libera al experimentador de los esfuerzos de mantener rutinariamente a las células en cultivo y evita los costos y problemas que pueden surgir al tenerlas en cultivo, como incidencia de una contaminación o alteración de la respuesta obtenida debido a un elevado número de pasajes en cultivo. Para la criopreservación de las células es importante tener optimizado el sistema de preservación, el medio de congelamiento a emplear y además tener suma precaución en el proceso de descongelado, evitando el estrés mecánico que podría generar daño en las células (Langer *et al.*, 2015).

Algunas de las respuestas a medir en este tipo de ensayos son inhibición o estimulación de la proliferación celular, regulación positiva de la expresión de marcadores secretados, intracelulares o de superficie de membrana, inducción de citotoxicidad o apoptosis, actividad antiviral o antimicrobiana, por mencionar algunos.

12.4.1.1. Factores que pueden afectar un bioensayo basado en células

En este tipo de ensayos, las células son consideradas el reactivo más importante, y de la calidad de las mismas dependerán los resultados que se obtengan. Es por esta razón que se debe garantizar y prestar suma atención a la calidad de los cultivos. En primer lugar, se recomienda obtener las líneas celulares de fuentes certificadas, como son las colecciones de la *American Type Culture Collection*, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y *RIKEN BRC Cell Bank* (ATCC, DSMZ y Riken, respectivamente) de manera de garantizar su origen y autenticidad. Además, se debe mantener un régimen estricto en cuanto al mantenimiento de las células, respetando los protocolos de subcultivo y alimentación de las mismas, el ambiente en el cual se deben incubar, en términos de estabilidad de temperatura, humedad y concentración de CO_2/O_2 . Para evitar las variaciones en estos parámetros que pueden ocurrir por aperturas de la estufa a repetición, se recomienda incubar en diferentes estufas las células que se encuentran en mantenimiento de las que están siendo utilizadas para un bioensayo (Mire-Sluis *et al.*, 1996). Por otro lado, la presencia de contaminación en los cultivos celulares (incluyendo contaminación por *Mycoplasma spp*) y el efecto de diferentes lotes de los componentes del medio de cultivo, fundamentalmente del suero, constituyen factores cruciales que pueden impactar en el resultado de un bioensayo. En el caso del ensayo para medir actividad de FSH en cultivos primarios de células de Sertoli o células de la granulosa, es necesario tratar el suero con polietilenglicol con el objetivo de remover factores presentes en el suero que interfieran con el bioensayo (Christin-Maitre *et al.*, 2000).

Además, se ha visto que los cultivos celulares cambian su respuesta cuando son mantenidos por largos períodos de tiempo en cultivo, por lo tanto, se recomienda reemplazarlos luego de 3 a 6 meses por cultivos con menor número de pasajes. Otro inconveniente surge de la posibilidad que los cultivos celulares sufran una contaminación cruzada (contaminación entre líneas celulares) o hayan sido mal identificados. Para evitar estos problemas, nuevamente se sugiere emplear cultivos celulares de origen certificado y además chequear periódicamente la autenticidad de los mismos. Además, es conveniente poseer bancos celulares maestros y de trabajo que hayan sido verificados para la ausencia de contaminación microbiana y/o cruzada.

La mayoría de los bioensayos se basan en el uso de placas multipozo de 96 pocillos. Es importante recalcar aquí la homogeneidad y uniformidad del inóculo de células dispensado por pocillo para este tipo de placas y además el correcto uso de las pipetas multicanal, factores que pueden arrojar resultados muy desiguales en diferentes pozos de la placa. Se debe tener especial cuidado en los pocillos de los bordes ya que en ellos se observan, generalmente, los resultados más desiguales (efecto conocido como «efecto borde»). Esto se debe tanto a diferencias entre los pozos debido al proceso de elaboración de las placas, como a un mayor proceso de evaporación que

ocurre en los pozos de los bordes (produciendo cambios en la concentración de nutrientes, modificaciones del pH) o debido a gradientes de temperatura. Para evitar este efecto se puede evitar el uso de los pozos de los bordes y adicionarle una solución salina para evitar la evaporación o un método más eficiente es realizar un diseño de siembra de las muestras en la placa al azar.

12.4.1.2. Ensayos basados en genes reporteros

El uso de ensayos basados en genes reporteros (EGR) para la determinación de la actividad de bioactivos, entre ellos las glicoproteínas, ha crecido en los últimos años debido a su simplicidad, fiabilidad, especificidad y sensibilidad (Lleonart *et al.*, 1990).

Estos ensayos se basan en la incorporación en un tipo celular determinado de un gen que codifica para una proteína reportera que se encuentra, por ejemplo, bajo el control de un promotor inducible por la glicoproteína que se quiere evaluar. El producto del gen reportero, el cual no se expresa naturalmente en la línea celular, es detectado de manera fácil y con alta sensibilidad en respuesta a la glicoproteína en estudio. Es un método muy elegido y de bajo costo; sin embargo, se debe considerar el tiempo que transcurre entre la adición de la glicoproteína hasta la aparición de una respuesta, debido a los procesos de transcripción y traducción involucrados. En algunos casos, también debe ser expresado el receptor de la glicoproteína en la línea celular.

El uso de la luciferasa de luciérnaga como proteína reportera predomina el campo (Langer *et al.*, 2015). Esta proteína genera luz con un pico de emisión a 562 nm mediante la conversión catalítica de luciferina en oxiluciferina y es dependiente de adenosina trifosfato (ATP). En la actualidad existen reactivos mejorados donde se prolonga la duración de la señal luminiscente lo que permite que varias microplacas puedan ser procesadas en paralelo sin la pérdida de señal. Además, gracias a la existencia de luciferasas de diferentes fuentes, es posible utilizar un sistema reportero dual mediante el empleo de los sustratos específicos. Así, se evalúa con un reportero la actividad de la glicoproteína y el segundo reportero se emplea para evaluar procesos celulares no relacionados o inespecíficos, lo que permite la normalización o corrección de la señal obtenida (Parson *et al.*, 2000). Una desventaja que presenta la familia de las luciferasas, al tratarse de reporteros basados en enzimas, es el posible efecto de la amplificación de la señal lo que puede generar una sobreestimación de la respuesta medida.. Otras dos enzimas utilizadas como proteínas reporteras son la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina secretada (SEAP, del inglés *secreted alkaline phosphatase*). La β -galactosidasa es detectada por la conversión de un sustrato agregado a las células en un producto que puede ser detectado fluorimétricamente o espectrofotométricamente. La proteína reportera SEAP tiene la desventaja que se acumula lentamente en el sobrenadante por lo tanto el ensayo debe incubarse entre 24 y 48 horas. El sustrato de la SEAP puede ser directamente

agregado a los pocillos, provocando la aparición de un producto amarillo en 15–30 min (para la reacción colorimétrica) o emisión de luz (para sustrato quimioluminiscente). La absorbancia puede ser medida a 405 nm en un lector de placas de microtitulación o en un luminómetro, respectivamente.

Otro ejemplo de proteína reportera utilizada en estos tipos de ensayos es la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) y sus variantes espectrales. La GFP es una proteína que tiene su máximo de emisión a 509 nm, luego de ser excitada a 395 nm. La excitación produce un cambio autocatalítico en la proteína que en presencia de oxígeno madura el cromóforo y emite luz. Posee la ventaja de ser una proteína estable frente a variaciones de temperatura, pH y no precisa de la adición de un sustrato.

Yang *et al.* 2014, reportaron el desarrollo y validación del primer EGR para la determinación de la actividad biológica de la rHEPO, el cual utiliza el gen reportero de la luciferasa bajo los promotores SIE (elemento inducible Sis) y GAS (secuencia activada por interferón). Con este sistema logran una buena especificidad, precisión, exactitud y robustez. También para la determinación de la FSH y la hormona luteinizante (LH) se han desarrollado varios ensayos en los cuales los receptores de FSH y LH fueron clonados y expresados en las líneas celulares, utilizando la luciferasa como gen reportero (Tilly *et al.*, 1992; Albanese *et al.*, 1994). Estos sistemas presentan además la ventaja de que son homólogos a humanos ya que utilizan receptores de humanos clonados en las líneas celulares, y tienen una sensibilidad cercana a los ensayos clásicos utilizados para medir estas hormonas.

Bürgi *et al.* (2012) desarrollaron un método para determinar la actividad del interferón de tipo I (IFN) basado en el uso de la GFP como proteína reportera y compararon este método con el método aceptado por la Farmacopea Europea (*European Pharmacopoeia*, 2009) demostrando que el EGR resultó simple, preciso, sensible, seguro y de bajo costo, características que lo convierte en un candidato para reemplazar los clásicos ensayos de actividad antiviral.

12.4.2. Modelos animales

Hasta el día de hoy no es posible reproducir desde el punto de vista fisiológico y del comportamiento, respuestas y patologías de sistemas vivos en modelos *in vitro* en forma absoluta y completa. Por este motivo, es imposible sustituir definitivamente el uso de animales en diferentes ensayos, especialmente aquellos que implican la evaluación de seguridad y eficacia para numerosos productos biotecnológicos de aplicación en investigación, estudios preclínicos o clínicos, los cuales han permitido ampliar los horizontes y posibilidades de nuevos productos biotecnológicos con más y mejores aplicaciones para la salud humana y animal. Basados en la evolución de una ética sólida aplicada a la utilización de animales en experimentación, un desarrollo exponencial se ha plasmado en la Ciencia de Animales de Laboratorio,

estableciéndose normativas internacionales estandarizadas que permitan realizar estos ensayos de forma segura y garantizar altos niveles de bienestar en los animales, tendiendo todas ellas a la aplicación de los principios de las 3 R's de Russell y Burch (Reemplazo, Refinamiento y Reducción). Las mismas implican: Reemplazar modelos *in vivo* cuando sea posible, Refinar las técnicas y metodologías de manera de obtener resultados más fiables y Reducir el número de animales utilizados en trabajos *in vivo*.

En este capítulo ya se han mencionado anteriormente algunos métodos *in vitro* para evaluar la actividad biológica de las glicoproteínas, pero existen además en la actualidad diversos tipos de modelos animales que pueden ser utilizados con estos fines, dependiendo de las metas de cada ensayo y teniendo en cuenta el modelo animal indicado. Algunos animales utilizados tradicionalmente son *Mus musculus* (ratón) o *Rattus norvegicus* (rata), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y otros considerados como de reemplazo relativo: *Caenorhabditis elegans* (gusanos), *Danio rerio* (pez cebra) o *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta). El desarrollo de ensayos *in vitro* necesarios para comprobar eficiencia y eficacia de nuevos compuestos biotecnológicos ha logrado reflejar en muchos casos los resultados de los análisis *in vivo* para lo cual, luego del proceso de validación internacional, han conseguido sustituir el uso de animales en los mismos. Pero aún es largo el camino a recorrer y lo más común es la complementariedad de ensayos *in vivo* e *in vitro*, con la clara tendencia a reemplazar el uso de animales al máximo posible.

Como ejemplo de ensayos *in vivo* para pruebas de eficacia, seguridad y/o actividad biológica para productos biotecnológicos podemos citar: rHEPO (Ramos *et al.*, 2003), factor estimulante de colonias de granulocitos, G-CSF (Vanz *et al.*, 2008), gonadotropina coriónica humana recombinante, rhCG (Seo *et al.* 2011), interferón- β (Hu *et al.*, 2011), entre otros.

12.4.2.1. Factores a considerar al realizar un bioensayo basado en animales

Se deben tomar en cuenta diversos aspectos para evaluar la necesidad de realizar un bioensayo empleando modelos animales:

- Objetivo del bioensayo bien declarado y justificado (validez científica).
- Considerar métodos alternativos (balance ético).
- Balance selectivo, precisión, relevancia para la actividad clínica, costo-beneficio.
- Disponibilidad de un ensayo apropiado (validez científica).
- Disponibilidad del modelo animal apropiado (validez del modelo animal).
- Opciones de evaluar actividad biológica (validez del modelo animal).
- Evaluar complejidad de la sustancia a testear (formulación, preparación, modo de aplicación).
- Optimizar al máximo la caracterización de las moléculas puede abolir ensayos innecesarios (puesta a punto y refinamiento de técnicas).

Las normativas internacionales generan los lineamientos estándares por los cuales se rigen los diseños y aplicaciones de numerosos ensayos que emplean animales para productos biofarmacéuticos, bajo la órbita de la Organización Mundial para la Salud (OMS). Las diversas guías internacionales como la farmacopea europea (*European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.) o la americana (*United States Pharmacopoeia*, USP) detallan en las especificaciones el modelo propicio para cada tipo de ensayo *in vivo*, diseño y condiciones en las que deben realizarse los mismos. Es interesante destacar que se están realizando enormes esfuerzos a nivel internacional para validar diversos métodos que reduzcan o sustituyan el uso de animales de experimentación (modelos con reducción filogenética, exigencias en estandarización genética, desarrollo de nuevos modelos *in vitro* e *in silico*).

La realización de un bioensayo en un modelo animal requiere el conocimiento profundo y detallado del modelo *in vivo* a utilizar. La pregunta que se debe plantear es: ¿Qué modelo es el más adecuado para responder al interrogante respecto del fenómeno natural que se está evaluando? Resulta fundamental conocer la calidad genética y microbiológica del modelo animal que se va a utilizar específicamente para el ensayo biológico. Se recomienda recurrir a un proveedor reconocido que pueda garantizar el *status* sanitario y genético, con el fin de obtener resultados fiables y reproducibles (por citar algunos ejemplos, el Jax® Mice & Services del Jackson Laboratory y el Charles River Lab). En el caso de los vertebrados es importante también utilizar la cantidad mínima de animales necesaria para obtener significancia estadística, respetando los principios de las 3R's. En las guías internacionales para realizar este tipo de ensayos se detalla cantidad de animales, sexo y en algunos casos la cepa o raza de la especie.

Para el diseño del experimento, hay que tener en cuenta además las instalaciones adecuadas para el alojamiento de la especie, la selección del inóculo (dosis, vía de administración y frecuencia de inoculación), la frecuencia de toma de muestras y la determinación del punto final humanitario. Un factor no menos importante es el entrenamiento específico del personal a cargo en las técnicas que se van a implementar, así como un conocimiento adecuado de la biología de la especie con la cual se va a trabajar para poder detectar a tiempo signos y síntomas asociados al tratamiento en evaluación.

Los ensayos en modelos animales son lentos y laboriosos, requieren instalaciones sofisticadas, complejas y costosas, además de personal entrenado y tanto el protocolo que se aplica como el personal deben estar debidamente acreditado por el organismo de contralor. No son menores las consideraciones éticas asociadas a la experimentación animal, aspecto que ha impulsado cambios radicales en la Ciencia de Animales de Laboratorio, desde antiguas concepciones intrínsecas sobre los seres vivos a nuevas visiones sobre la *sintiencia animal* y cómo manejarnos con los nuevos descubrimientos y conceptos, asumiendo la responsabilidad que conlleva a la utilización de otros seres vivos para los experimentos a fin de garantizar un nivel de bienestar aceptable éticamente.

Los ensayos con animales son menos precisos y exactos que los ensayos celulares por contar con una variabilidad individual intrínseca al modelo. La muestra a ser testada debe poseer una elevada pureza y debe cumplir determinadas características para ser administradas. Sin embargo, una gran ventaja es que estos ensayos son más predictivos para la evaluación de productos biotecnológicos en organismos completos ya que contemplan la absorción, distribución, metabolismo y excreción, que no son considerados en los ensayos celulares. Si bien los ensayos *in vivo* son buenos predictores, es importante tomar ciertos recaudos en la extrapolación de los datos obtenidos a la fase clínica ya que se deben contemplar las características propias de las poblaciones involucradas.

Según las normativas existentes a las cuales adhiere cada país, los lineamientos pueden diferir en algunos puntos, pero son internacionalmente aceptadas las siguientes guías: Ph. Eur., USP y la ICH (*International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*).

Definiciones y criterios de aceptación para productos biológicos y biotecnológicos:

- Actividad biológica: habilidad específica o capacidad de un producto para alcanzar un efecto biológico definido.
- Potencia: medición cuantitativa de la actividad biológica relacionada a una propiedad biológica relevante del mismo, la cual puede ser expresada en UI (unidades internacionales).
- Correlación entre la respuesta clínica esperada y la actividad del ensayo biológico establecido en estudios clínicos y farmacodinámicos.

Ejemplos de ensayos de Actividad biológica:

- Somatropina: se denomina así a la hormona del crecimiento humana producida por la tecnología de ADN recombinante. El test recomendado para la somatropina consiste en exponer ratas hipofisectomizadas al producto farmacológico que se está probando, el estándar de referencia de somatropina de la USP y un control negativo. Las ratas se pesan antes de la primera inyección y aproximadamente a las 18 horas posteriores a la última inyección subcutánea. Se registra el cambio en el peso corporal de cada animal en cada grupo y se calcula la potencia del producto farmacológico en relación con la potencia del estándar de referencia.
- rHPO: es una citoquina cuyo uso terapéutico está indicado para el tratamiento de la anemia resultante en pacientes con insuficiencia renal o anemia crónica debido a infecciones graves. La cuantificación precisa de la actividad biológica de la rHPO es una evaluación muy importante porque está relacionada con la efectividad del producto final y está recomendada por la Ph. Eur. Esta evaluación se puede realizar mediante dos métodos

diferentes: (a) utilizando ratones policitémicos o (b) utilizando ratones normocitémicos. Este último es el de elección ya que produce menor estrés y sufrimiento en los animales. El mismo consiste en la inyección de tres dosis de la muestra y del estándar de referencia y al cabo de 4 días se evalúa el porcentaje de reticulocitos en sangre debido a la actividad eritropoyética (Anexo, Protocolo 3).

Ejemplos de estándares de referencias para bioensayos según PhEur:

- Estándares Internacionales (IS) calibrados en UI: FSH (NIBSC, *National Institute for Biological Standards and Controls* code: 83/575), hIFN- β (NIBSC code: 00/572), G-CSF (NIBSC code: 09/136).
- Biological Reference Preparation (BRP) de rHEPO expresada en UI.
- Si no existen IS o BRP, los fabricantes deben establecer sus propios materiales de referencia, los cuales deben estar debidamente caracterizados.

A continuación, se describen a modo de ejemplo cuatro protocolos donde se emplean ensayos basados en células y en animales. Los dos primeros que se mencionan son utilizados para la determinación de la actividad biológica del IFN β -1a. Uno de los métodos se basa en la evaluación de la actividad antiviral del mismo según Ph. Eur. (2009) y el otro se basa en un EGR que fue descrito por Bürgi *et al.* (2012). Los protocolos que implican el empleo de animales siguen lineamientos de la Ph. Eur. 7.0 y 8.0.

12.5. ANEXO

Protocolo 1: Determinación de la actividad de IFN β -1a mediante ensayo antiviral

La potencia del IFN β -1a es estimada mediante la comparación de su habilidad para proteger a las células frente al efecto citopático causado por un virus con la de un estándar de referencia apropiado.

Materiales

- WISH cell line (ATCC CCL-25).
- Virus de la Stomatitis Vesicular, cepa Indiana (VSV, ATCC VR-158).
- Medio de cultivo: *Minimum Essential Medium* (MEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (v/v) y glutamina 2 mM (medio de crecimiento) y MEM suplementado con SFB 2 % (v/v) y glutamina 2 mM (medio de ensayo).

- Estándar: *WHO International Standard Interferon beta (human, rDNA, Glycosylated)*. NIBSC code: 00/572.
- Tripsina-EDTA.
- *Buffer* fosfato salino (PBS).
- Cristal violeta 0,75 % (P/V) en metanol 40 % (V/V).
- Placas multipozo de 96 cavidades.
- Incubadora a 37 °C con 5 % CO₂.
- Lector de placas de microtitulación.

Método

- En una placa de 96 pozos, sembrar $2,5 \times 10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µl de medio de crecimiento e incubar durante 24 h a 37 °C.
- Retirar el sobrenadante y colocar 100 µl por pozo de diluciones seriadas al medio de rhIFN-β (muestra a evaluar o el estándar internacional) e incubar durante 6 h a 37 °C en medio de ensayo. Cada condición se ensaya por triplicado.
- Retirar el sobrenadante de la placa y realizar 2 lavados con medio de cultivo MEM basal (sin suplementar con SFB). Colocar en cada uno de los pozos 100 µl de una dilución apropiada del vsv en medio de ensayo e incubar nuevamente durante 18–20 h a 37 °C.
- Realizar los siguientes controles:
 - Control de células: ausencia de virus e IFN, para evaluar máxima proliferación celular cuando no se produce infección viral. Para ello, incubar las células con 100 µl por pozo de medio de cultivo de ensayo.
 - Control de lisis: en ausencia de IFN, para evaluar el efecto citopático del virus sobre las células. En lugar de IFN sembrar 100 µl por pozo de medio de ensayo y luego infectar con vsv de la misma forma que se ejecutaron los pozos conteniendo muestras y estándar.
- Para revelar el ensayo, eliminar el sobrenadante y agregar 50 µl por pozo de una solución de cristal violeta 0,75 % (P/V) en metanol 40 % (V/V), incubar durante 15 min a 37 °C.
- Eliminar el colorante y realizar sucesivos lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. Disolver el colorante agregando 200 µl de ácido acético 20 % (V/V) en cada cavidad y homogeneizar.
- Realizar la lectura a 540 nm en un lector de placas de microtitulación.
- Con los valores de las lecturas realizadas, graficar las curvas dosis-respuesta de cada muestra ensayada y del estándar. Calcular la actividad correspondiente a la muestra en función del estándar.

Protocolo 2: Determinación de la actividad de IFN-β1a mediante EGR

La potencia del IFN-β1a es estimada mediante su habilidad para inducir el promotor Mx2 (inducible por IFN de tipo I), lo cual se pone en evidencia por la expresión de la GFP.

Materiales

- Línea reportera WISH-Mx/eGFP: esta línea celular deriva de células WISH transfectadas en forma estable con el plásmido pEGFP-C1 Clontech (USA). El mismo contiene la secuencia del promotor Mx2 que guía la expresión de la GFP (Bürgi *et al.* 2012).
- Medios de cultivo: MEM suplementado con SFB 10 % (V/V) y glutamina 2 mM (medio de crecimiento) y MEM suplementado con SFB 2 % (V/V) y glutamina 2 mM (medio de ensayo).
- Estándar: *WHO International Standard Interferon beta (human, rDNA, Glycosylated)*, NIBSC code: 00/572.
- Tripsina-EDTA.
- PBS.
- Placas multipozo de 96 cavidades.
- Incubadora a 37 °C con 5 % CO₂.
- Citómetro de Flujo equipado con láser 488 y filtro de detección en el rango del espectro de emisión de la EGFP.

Método

- En una placa de 96 cavidades, sembrar 3×10⁴ células por pozo en 100 µl de medio de crecimiento e incubar a 37 °C con 5 % CO₂ durante 24 h.
- Retirar el sobrenadante, lavar la monocapa celular con medio MEM basal y agregar por triplicado diluciones seriadas al medio de las muestras o del estándar de rIFN (diluciones realizadas en medio de ensayo).
- Realizar el siguiente control negativo: células en ausencia de IFN. Para ello, incubar las células con 100 µl por pozo de medio de ensayo.
- Incubar a 37 °C con 5 % CO₂ durante 24 h.
- Descartar el sobrenadante, lavar la monocapa con PBS y tratar las células con tripsina.
- Resuspender las células tripsinizadas en 0,2 ml de PBS.
- Evaluar el porcentaje de células EGFP positivas utilizando un citómetro de flujo, adquiriendo 5000 eventos colectados en una región de análisis realizada en un gráfico de *Forward Scatter (FSC)* versus *Side Scatter (SSC)*. Realizar un segundo gráfico de FSC versus EGFP. Calcular el porcentaje de células EGFP positivas, definiendo la región de corte con el control negativo.

- Construir curvas dosis respuesta graficando % de células EGFP positivas en función de la potencia conocida del estándar rH1FN o las diluciones de las muestras evaluadas. Verificar que se cumplan los criterios de paralelismo y linealidad. Si esto se cumple, calcular la potencia de las muestras.

Protocolo 3: Determinación de actividad biológica de rHEPO en ratones (Farmacopea Europea 7.0 Monografía 1316)

Se describe el ensayo *in vivo* para la estimación de la potencia biológica de rHEPO empleando ratones normocitémicos y se basa en el conteo de reticulocitos en sangre periférica.

Materiales

- Anticoagulante K3-EDTA.
- Solución diluyente.
- Estándar rHEPO BRP (*Biological Reference Preparation*).
- PBS/EDTA.
- Solución de naranja de Tiazol (1mg/ml): solución de trabajo.
- Citómetro de flujo equipado con un láser de 488 nm.
- Perlas para verificar alineación del láser en el citómetro de flujo.
- Balanza analítica.
- Tubos estériles.
- Jeringas 1 ml.
- Micropipetas automáticas.
- Placas multipozo de 96 cavidades.
- Tubos para citometría.
- Ratones hembra B6D2 F1 de ocho semanas de edad.
- Sala de experimentación de animales en condiciones controladas.
- Jaulas acondicionadas con biberones y comida *ad libitum*.

Método

- Animales de experimentación: se emplean ratones hembra de ocho semanas de edad, híbridos B6D2 F1. Los mismos deben ser aclimatados en el bioterio al menos una semana antes del inicio del ensayo. Se requieren 30 animales para ser tratados con el estándar (nunca menos de 24), e igual cantidad para ser tratados con cada una de las muestras a ensayar. Una cantidad no menor a 3 animales se emplean como testigos, los que serán tratados solo con el diluyente. Los mismos permanecerán en racks ventilados a razón de

- 6 animales por caja, en condiciones adecuadas de temperatura, humedad y regulando los ciclos de luz y oscuridad.
- Preparación de Muestras y Estándar: en tubos de 50 ml realizar tres diluciones seriadas tanto del estándar como de la muestra a analizar de modo que su concentración final sea de 80, 40 y 20 IU/ml, respectivamente.
 - Antes de la inyección, asignar a cada tratamiento una marca en la oreja que permita identificar inequívocamente el animal que recibe el tratamiento designado. De cada dosis a ensayar, inyectar 0,5 ml a 10 animales por vía subcutánea. La EuPh indica que se deben emplear un mínimo de ocho animales por dosis, pero sugerimos emplear 10 por si se debe excluir alguno del análisis. Distribuir los animales tratados en las cajas disponibles, de manera que por cada una se encuentren animales con tratamientos distintos de estándar y al menos una de las muestras. Tratar 3 animales con 0,5 ml del diluyente y ubicarlos en cajas con animales tratados con muestra y estándar.
 - A las 96 h posinyección, realizar el sangrado de los animales por punción de la vena submandibular. Recoger al menos 100 µl de sangre en anticoagulante K3-EDTA. Codificar cada muestra de sangre con números y letras indicando número de caja, número de animal y tratamiento recibido, lo cual permitirá la identificación inequívoca de cada animal.
 - Coloración de reticulocitos: manteniendo el orden del sangrado, realizar una dilución final 1/500 de las muestras de sangre en PBS/EDTA (para esto realizar una dilución intermedia 1/10). Para la coloración realizar dilución al medio de las muestras prediluidas en PBS/EDTA conteniendo naranja de tiazol (TMO) a la concentración 0,2 µg/ml. Preparar un pool de muestras que se incubarán con buffer sin colorante para control de autofluorescencia. Incubar la coloración en oscuridad por al menos 30 min a temperatura ambiente.
 - Determinación del porcentaje de reticulocitos por citometría de flujo: realizar el chequeo de linealidad del láser con las perlas para alineación apropiadas de acuerdo con el equipo. Adquirir una muestra sin colorear y verificar que la población de glóbulos rojos delimitada en el gráfico biparamétrico FSC vs. SSC sea mayor al 95 % de los eventos colectados. Determinar la autofluorescencia en el canal donde se colecta el TMO (530/30) de las células delimitadas en el gráfico anterior en un gráfico biparamétrico FSC vs. Fluorescencia de TMO. Adquirir 10.000 eventos para cada tubo con las muestras coloreadas. Guardar las adquisiciones para posterior análisis e impresión.
 - Criterio de aceptación del ensayo: la media de porcentaje de reticulocitos medido para los animales tratados con la dilución más baja del estándar debe ser mayor o igual a la media más un desvío estándar del porcentaje de reticulocitos obtenido para el grupo de ratones control. Para la curva estándar, debe existir una diferencia de al menos un 1 % en la media del porcentaje de reticulocitos medidos para los animales tratados con la dosis más elevada y la más diluida.

- Cálculos y expresión de resultados: podrán ser excluidos para el cálculo de potencia aquellos valores de reticulocitos fuera de tendencia identificados como tales, o que tengan alguna observación técnica informada durante la ejecución del método que justifique el valor fuera de tendencia. Calcular la potencia de las muestras analizadas. Expresar el resultado para cada muestra en uI/ml o por mg según corresponda, acompañado por los límites fiduciales relativos. La potencia estimada debe estar entre el 80 % y el 125 % de la potencia declarada. Los límites fiduciales del error de la potencia estimada ($P=0,95$) no deben ser menor que el 64 % ni mayor que el 156 % de la potencia declarada.

Protocolo 4: Determinación de potencia de la FSH en ratas (Farmacopea Europea 8.1)

La actividad folículo estimulante de la hormona es estimada comparando bajo ciertas condiciones su efecto en el crecimiento de ovarios de ratas inmaduras tratadas con gonadotrofina coriónica con el mismo efecto de la preparación del Estándar Internacional de hFSH o de una preparación de referencia calibrada en uI.

Materiales

- Solución de *buffer* diluyente.
- Estándar Internacional FSH (NIBSC code: 83/575).
- Material de cirugía.
- Balanza analítica.
- Tubos estériles.
- Jeringas 1 ml y agujas 25G.
- Micropipetas automáticas.
- Ratas hembras inmaduras de la cepa Sprague Dawley de 19–28 días de vida.
- Sala de experimentación de animales en condiciones controladas.
- Jaulas acondicionadas con biberones y comida *ad libitum*.

Método

- Se emplean ratas hembras inmaduras de la cepa Sprague Dawley de 19–28 días de vida, con una diferencia de edad entre ellas de no más de tres días y con una diferencia de peso de no más de 10 g. Se asignarán las ratas al azar en 6 grupos de 5 ratas cada uno.
- Se elegirán 3 dosis de la preparación de referencia y 3 dosis de la preparación a ser testeada, tal que la dosis menor produzca una respuesta

positiva en algunas ratas y que la dosis máxima no produzca una respuesta máxima en todas las ratas. Usar las dosis en progresión geométrica. Como aproximación inicial se pueden probar dosis totales de 1,5; 3 y 6 UI. Tener en cuenta que la dosis dependerá de la sensibilidad de la cepa de ratas utilizada, la cual puede variar ampliamente.

- Disolver separadamente las cantidades totales de la preparación a ser testada y del estándar correspondiente a las dosis diarias a ser utilizadas, en suficiente PBS pH 7,2 tal que la dosis diaria sea administrada en un volumen de 0,5 ml. La solución de *buffer* en la dosis diaria debe contener no menos de 14 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) para asegurar una luteinización completa. Agregar un conservante antimicrobiano apropiado tal como 4 g/l fenol o eventualmente 0,02 g/l timerosal. Almacenar las soluciones a 5 ± 3 °C.
- Inyectar cada grupo por vía subcutánea con una dosis de la preparación del estándar o una dosis de la preparación a evaluar. Las dosis serán: 1,5; 3 y 6 UI para ambas preparaciones. La FSH se diluirá en PBS conteniendo albúmina y hCG en un volumen final de 500 µl a administrarse cada vez, utilizando aguja 25G. Las inyecciones se repetirán a las 24 y 48 h de transcurrida la primera dosis, y a las 72 h las ratas serán pesadas y posteriormente sacrificadas por inhalación de CO₂ para diseccionar los ovarios y pesarlos. Remover todo fluido extraovárico y tejido de los ovarios. Pesar los dos ovarios combinados de cada rata inmediatamente. Según farmacopea, se realizarán los ensayos estadísticos sugeridos (análisis de covarianza), utilizando la masa de los dos ovarios combinados como respuesta. Se podrá realizar una corrección de la masa de los órganos tomando como referencia la masa de la rata de la cual fueron tomados. La potencia estimada estará entre 80 % y 125 % de la potencia establecida. Los intervalos de confianza (P=0.95) de la potencia estimada estarán entre 64 % y 156 % de la potencia establecida.

Referencias bibliográficas

- ALBANESE, C., CHRISTIN-MAITRE, S., SLUSS, P.M., CROWLEY, W. JR. & JAMESON, J.L.** (1994). Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol*, 101(1), 211–219. 10.1016/0303-7207(94)90237-2
- BÜRGI, M. DE L., PRIETO, C., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., OGGERO, M. & BOLLATI-FOGOLÍN, M.** (2012). wish cell line: from the antiviral system to a novel reporter gene assay to test the potency of human IFN- α and IFN- β . *J. Immunol. Methods*, 381(1–2), 70–74. 10.1016/j.jim.2012.04.010
- CHRISTIN-MAITRE, S., VASSEUR, C., FAUSER, B. & BOUCHARD, P.** (2000). Bioassays of gonadotropins. *Methods*, 21(1), 51–7. 10.1006/meth.2000.0974
- COUNCIL OF EUROPE.** (2009). *European pharmacopoeia*. 6.3. Strasbourg: Council of Europe. Strasbourg. 10.1007/978-3-211-89836-9_515
- ESCOBEDO-MORATILLA, A., BARBA DE LA ROSA, A. P. & PÉREZ-URIZAR, J. T.** (2015). Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de Biocomparabilidad. *Gac. Med. Mex.*, 151, 377–86.
- FINA, B. L., LOMBARTE, M. & RIGALLI, A.** (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual. Osteol*, 9, 239–240.
- GENNARO, A.** (2003). *Remington farmacia*. 20ma. edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.
- HU, Y., WANG, J., YANG, B., ZHENG, N., QIN, M., JI, Y., LIN, G., TIAN, L., WU, X., WU, L. & SUN, B.** (2011). Guanylate binding protein 4 negatively regulates virus-induced type I IFN and antiviral response by targeting IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.*, 187(12), 6456–6462. 10.4049/jimmunol.1003691
- LANGER, G.** (2015). Implementation and Use of State-of-the-Art, Cell-Based In Vitro Assays. En Nielsch, U., Fuhrmann, U., Jaroch, S. (Ed.). *New Approaches to Drug Discovery* (pp. 171–190). Switzerland: Langer Springer International Publishing. 10.1007/978-3-319-28914-4
- LLEONART, R., NÄF, D., BROWNING, H. & WEISSMANN, C.** (1990). A novel, quantitative bioassay for type I interferon using a recombinant indicator cell. *Nat. Biotechnol.*, 8(12), 1263–1267. 10.1038/nbt1290-1263
- MIRE-SLUIS, A. R., GERRARD, T., DAS, R. G., PADILLA, A. & THORPE, R.** (1996). Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. *Biologicals*, 24(4), 351–362. 10.1006/biol.1996.0050
- PARSONS, S. J., RHODES, S. A., CONNOR, H. E., REES, S., BROWN, J. & GILES, H.** (2000). Use of a dual firefly and Renilla luciferase reporter gene assay to simultaneously determine drug selectivity at human corticotrophin releasing hormone 1 and 2 receptors. *Anal Biochem.* 281(2), 187–192. 10.1006/abio.2000.4570

- RAMOS, A. S., SCHMIDT, C. A., ANDRADE, S. S., FRONZA, M., RAFFERTY, B. & DALMORA, S. L.** (2003). Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Brazilian Journal of medical Research*, 36(11), 1561–1569. doi; 10.1590/s0100-879x2003001100014
- SEO, K. S., YOON, J. W., NA, K. H., BAE, E. J., WOO, J. G., LEE, S. H., KANG, S. H. & YANG, J. M.** (2011). Evaluation of process efficiency and bioequivalence of biosimilar recombinant human chorionic gonadotropin (rhcg). *BioDrugs*, 25(2), 115–127. doi; 10.2165/11589430-000000000-00000
- TILLY, J. L., AIHARA, T., NISHIMORI, K., JIA, X. C., BILLIG, H., KOWALSKI, K. I., PERLAS, E. A. & HSUEH, A. J. W.** (1992). Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding, signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology*, 131(2), 799–806. 10.1210/endo.131.2.1322283
- VANZ, A.L., RENARD, G., PALMA, M.S., CHIES, J.M., DALMORA, S.L., BASSO, L.A. & SANTOS, D.S.** (2008). Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*, 4(7), 13–25. 10.1186/1475-2859-7-13
- YANAGIHARA, S., TANIGUCHI, Y., HOSONO, M., YOSHIOKA, E., ISHIKAWA, R., SHIMADA, Y., KADOYA, T. & KITSUKAKE, K.** (2010). Measurement of Sialic Acid Content Is Insufficient to Assess Bioactivity of Recombinant Human Erythropoietin. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(9), 1596–1599. 10.1248/bpb.33.1596
- YANG, Y., ZHOU, Y., YU, L., LI, X., SHI, X., QIN, X., RAO, C. & WANG, J.** (2014). A novel reporter gene assay for recombinant human erythropoietin (rHuEPO) pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 100, 316–321. 10.1016/j.jpba.2014.08.003

13

Inmunogenicidad de glicoproteínas terapéuticas

EDUARDO F. MUFARREGE

13.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas recombinantes de uso terapéutico han despertado el interés de múltiples compañías biotecnológicas debido a su impacto en el control de múltiples enfermedades humanas, desde infecciones microbianas hasta su uso para el tratamiento de diversos cánceres y artritis. Por este motivo no resultan sorprendentes los inagotables esfuerzos realizados con el fin de desarrollar bioterapéuticos capaces de generar una respuesta biológica eficaz y sostenida en el tiempo. En la mayoría de los casos se trata de proteínas prácticamente idénticas a las producidas por el organismo humano tales como citoquinas (Scagnolari *et al.*, 2002), factores de crecimiento (Basser *et al.*, 2002; Haznedaroglu *et al.*, 2002; Herzik *et al.*, 2003) y anticuerpos monoclonales (Kim *et al.*, 2003). Sin embargo, se han reportado numerosos casos de respuestas inmunológicas desarrolladas como consecuencia de la administración de dichas drogas (Koren *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Ryff *et al.*, 2002).

La prevalencia de los anticuerpos desarrollados varía desde menos de 1 % para drogas tales como el activador plasminógeno de tejidos, Activase® (Genentech, USA) (Nilsson *et al.*, 2002) hasta un 70 % para drogas tales como OKT3, un anticuerpo monoclonal IgG2a (Chatenoud, 1993; Jensen *et al.*, 1996). Esta respuesta indeseable puede producir diversos efectos de variada complejidad y gravedad según las circunstancias. Las consecuencias más comunes son las reacciones de hipersensibilidad, anafilaxias, enfermedades autoinmunes o una disminución de la eficacia del tratamiento debido al desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra la droga (ADA, por las siglas en inglés *anti-drug antibody*) (Barbosa *et al.*, 2006; De Groot y Scott, 2007; Koren *et al.*, 2007; Barbosa y Celis, 2007; Tatarewicz *et al.*, 2007).

Por estos motivos, las agencias encargadas de regular la calidad de estos productos en distintas partes del mundo han desarrollado minuciosas guías que permiten evaluar las distintas características de estos productos (Barbosa *et al.*, 2011). Entre ellas, el análisis de la inmunogenicidad de los bioterapéuticos ocupa un lugar de preponderancia.

Diversos factores que conducen a la generación de anticuerpos neutralizantes y al desarrollo de una respuesta celular proinflamatoria han sido descriptos. Estos se dividen principalmente en aquellos factores relacionados con el individuo (genotipo, enfermedades asociadas y medicación) y aquellos

vinculados específicamente con el producto. En particular, con relación a los últimos, se encuentran:

1. Factores extrínsecos (Díaz *et al.*, 1994): ruta de administración, dosis, formulación, agregados, glicosilación y contaminantes. La contaminación del producto con agentes proinflamatorios o compuestos inespecíficos mitogénicos tales como el LPS (lipopolisacárido bacteriano) y el desarrollo de agregados pueden generar una señal crítica y requerida para la inducción de anticuerpos. Más aún las proteínas que pierden su conformación nativa durante la formulación pueden ser más inmunogénicas que sus contrapartes intactas (Tovey y Lallemand, 2010), debido a que estos productos pueden presentar nuevos epitopes que podrían no estar presentes en la molécula original y ser reconocidos por linfocitos B, conduciendo a la estimulación de una respuesta inmune (Josik *et al.*, 1999). En contraste, la glicosilación que se produce durante la biosíntesis del producto podría reducir la inmunogenicidad del mismo debido a su capacidad de enmascarar potenciales epitopes y su consecuente reconocimiento (Carbone y Gleeson, 1997).
2. Factores intrínsecos: la presencia de epitopes inmunogénicos que conducen a la formación de anticuerpos. En este sentido y en contraste con lo antes expuesto, la presencia de azúcares producidos por la célula huésped, que luego del procesamiento antigénico acompañan a ciertos péptidos, puede también dar lugar a la generación de nuevos epitopes y a una respuesta inmunológica subsecuente.

Los primeros factores (extrínsecos) han sido sorteados satisfactoriamente en la mayoría de los casos por medio de un proceso productivo cuidadoso como así también mejoras en la etapa de purificación.

Asimismo, se han logrado buenos resultados mediante el uso de excipientes que estabilizan al bioterapéutico, como así también por medio de la introducción de residuos de polietilenglicol.

Sin embargo, los factores intrínsecos constituyen un verdadero desafío ya que la activación de linfocitos B contribuye al desarrollo de anticuerpos, incluso en aquellos casos donde el terapéutico es prácticamente idéntico a la proteína autóloga. La activación de linfocitos B puede ser de dos tipos, independiente de linfocitos T (T-independiente) o dependiente de linfocitos T (T-dependiente). En el primer caso, ciertas características estructurales en la molécula, tales como repeticiones poliméricas, constituyen las señales requeridas para estimular la activación de un determinado grupo de linfocitos B. Los anticuerpos desarrollados como consecuencia de la activación son fundamentalmente del isotipo IgM de baja afinidad.

En contraste, la activación dependiente de linfocitos T está relacionada fundamentalmente con la estructura primaria de la proteína. En este escenario, la

molécula es endocitada, procesada y los péptidos resultantes son presentados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA) tales como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II. Estas secuencias pueden en algunos casos ser reconocidas por los linfocitos T «colaboradores» (a través de su receptor en la superficie celular, conocido como TCR por sus siglas en inglés, *T Cell Receptor*) y desencadenar una respuesta inmune que conduce a la activación de linfocitos B y la consecuente producción de anticuerpos neutralizantes. La diferencia fundamental entre los dos tipos de respuestas (independiente y dependiente de linfocitos T) radica en que en la segunda los anticuerpos desarrollados son del isotipo IgG, presentan una mayor especificidad y afinidad y son generados de manera más prolongada y sostenida en el tiempo. La activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T comienza cuando un determinado grupo de linfocitos B interactúa con epitopes específicos de la proteína a través de receptores antigénicos (IgM/IgD) en la superficie celular. Esta interacción con el antígeno induce a los receptores a iniciar una señal de activación (señal 1). Esta señal promueve la internalización de la proteína completa que será luego procesada en pequeños epitopes peptídicos. Estos epitopes son luego «presentados» dentro del «bolsillo» del CMH de clase II sobre la superficie del linfocito B. Estas células coexpresan además la molécula CD40 en su superficie.

Cuando los linfocitos T colaboradores (o «helper», Th) previamente activados, interactúan a través de su TCR y el ligando de la molécula CD40 (CD154) con los complejos epitope-CMH de clase II y con CD40 (en la superficie del linfocito B), desencadenan la señal 2. Esta señal activa al linfocito B y los linfocitos T producen, entre otras, la citoquina IL-4 (interleuquina-4, en una respuesta de linfocitos Th de tipo 2) o IFN- γ (interferón gamma, en una respuesta de linfocitos Th de tipo 1) produciéndose la maduración de la respuesta inmune.

En el presente capítulo se describirá en detalle la respuesta inmunológica contra el terapéutico mediada por los linfocitos T, debido a que dicha respuesta es más intensa, específica y sostenida en el tiempo.

13.2. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

13.2.1. Reconocimiento de glicoproteínas por las células presentadoras de antígenos

En general, las glicosilaciones que se producen en forma natural generan glúcidos de tipo N y de tipo O. En los primeros, la N-acetilglucosamina se une a la cadena lateral amida de un residuo de asparagina, mientras que en la segunda, el azúcar es adicionado a un grupo oxidrilo de serina, treonina o tirosina (Buskas *et al.*, 2006).

En un comienzo la glicosilación fue considerada como una modificación postraduccional exclusiva de los organismos eucariotas. Sin embargo, con el advenimiento y mejoras de las técnicas analíticas, se pudo demostrar que las bacterias también son capaces de producir O y N-glicoproteínas (Calo *et al.*, 2010; Nothhaft *et al.*, 2010).

La glicosilación tiene un impacto muy importante en las distintas etapas del reconocimiento antigénico, procesamiento intracelular y en la presentación antigénica.

Con respecto a la primera etapa, las células presentadoras de antígenos profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) realizan un permanente monitoreo de las proteínas en el espacio que las circunda. Dichas células expresan receptores específicos que les permiten reconocer determinados azúcares. Entre ellos se destacan el grupo de receptores de lectinas de tipo C: DC-SIGN, DEC-205, dectina-1 y langerina. Estas proteínas presentan dominios estructurales altamente conservados, algunos de los cuales son capaces de unir azúcares microbianos mientras que otros se especializan en el reconocimiento de carbohidratos producidos naturalmente por las células humanas (endógenos) modificados. En particular, DC-SIGN es un receptor no solo capaz de reconocer glicanos presentes en proteínas virales y fúngicas, sino también en glicoproteínas humanas.

Luego del reconocimiento antigénico una cascada de eventos de señalización intracelular tiene lugar con el fin de activar la CPA. Estos receptores también actúan como mediadores de la endocitosis, promoviendo la internalización de la glicoproteína y su degradación, para su posterior presentación antigénica (Osorio y Reis e Sousa, 2011).

13.2.2. Procesamiento intracelular de glicoproteínas

Como se comentó previamente, la presencia de glicanos puede favorecer el reconocimiento e internalización de las glicoproteínas. De una manera análoga, los glicanos pueden ejercer un rol durante el procesamiento intracelular, influyendo en la degradación proteolítica de las glicoproteínas. En general, los glicanos cercanos a los sitios de clivaje pueden bloquear la proteólisis (Hanisch y Ninkovic, 2006). Esto reviste gran importancia en la etapa de diseño del terapéutico, ya que la correcta elección de los sitios de adición de los glicanos tendrá efectos directos en su procesamiento antigénico y por ende en evitar el desarrollo de una respuesta inmune no deseada.

La glicosilación puede afectar el reconocimiento por parte de las proteasas bloqueando o enmascarando su sitio de acción. En adición los N-glicanos pueden bloquear los anticuerpos neutralizantes y evitar así el acceso a los sitios activos de la glicoproteína terapéutica.

La O-glicosilación también puede influir sobre el procesamiento antigénico en el proteasoma.

Si bien, los glicopéptidos que contienen los motivos GalNAc o Gal-GalNAc pueden ser procesados proteolíticamente, su eficacia está íntimamente ligada con la abundancia, posición y longitud del glicopéptido (Ninkovic y Hanisch, 2007).

13.2.3. Presentación antigénica

Una vez que la glicoproteína es procesada en el interior de la CPA, los péptidos resultantes deben ser alojados en el «surco» o «bolsillo» de la molécula del CMH humano de manera tal de ser presentada en la superficie celular a los linfocitos T circulantes.

Existe evidencia que demuestra que los glúcidos pueden resistir la degradación lisosomal y por lo tanto permanecer unidos a los péptidos resultantes y luego asociarse a las moléculas del CMH de clase II. Una situación similar ocurre con los glicopéptidos provistos de glúcidos O-unidos y su interacción con las moléculas del CMH de clase I. Sin embargo, un escenario diferente tiene lugar para los glúcidos N-unidos, donde los N-glicanos deben ser removidos antes de alcanzar el inmunoproteasoma (Werdelin *et al.*, 2002; Purcell *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2009). Consecuentemente, la de-glicosilación puede conducir a la conversión de asparagina a ácido aspártico y de esta manera dar lugar a la generación de un nuevo epitope potencialmente inmunogénico (Altrich-VanLith *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que la vía de presentación antigénica que prevalece ante la administración de una glicoproteína terapéutica es la mediada por el CMH de clase II, la generación de nuevos epitopes en este contexto resulta un escenario poco probable. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que exista presentación antigénica cruzada, en especial si la CPA es una célula dendrítica.

En adición, la existencia de una población de linfocitos T capaces de reconocer específicamente los complejos glicopéptido-CMH de clase I y II, refuerza la idea de que los glúcidos pueden ser presentados en conjunto con péptidos derivados de la digestión proteolítica (Dengjel y Stevanovic, 2006).

Sin embargo, existen restricciones con respecto a las características y posición de los glúcidos unidos al péptido. La evidencia sugiere que los glúcidos unidos deben ser relativamente cortos y ubicados en posiciones que no comprometan el anclaje del péptido a la molécula del CMH (Hanisch y Ninkovic, 2006; Petersen *et al.*, 2009).

13.2.4. Activación de linfocitos T

Los linfocitos T son capaces de reconocer péptidos lineales presentados en el contexto de las moléculas del CMH. En particular, los linfocitos T colaboradores reconocen complejos péptidos-CMH de clase II, mientras que los linfocitos T citotóxicos unen péptidos presentados en el contexto de las moléculas del

CMH de clase I. Si bien en un comienzo se pensó que los linfocitos T eran solo capaces de reconocer péptidos asociados a azúcares simples, más tarde se demostró que existe una población de células T con la capacidad de unir polisacáridos. Debido a esta característica distintiva, a esta población particular de linfocitos T se la denominó *Tcarbs* (Avci *et al.*, 2011).

Más tarde se pudo demostrar que ciertos glicopéptidos pueden activar clones de linfocitos T específicos e inducir la producción de citoquinas tales como IL-2 e IL-4, claves para la activación y diferenciación de linfocitos B productores de anticuerpos.

En resumen, la degradación intracelular de las glicoproteínas de uso terapéutico humano da lugar a péptidos que luego pueden ser presentados en el contexto de las moléculas del CMH humano de clase II y en menor medida de clase I. En algunos casos estos péptidos contienen glicanos y dan lugar a glicopéptidos que potencialmente pueden ser reconocidos por ciertos clones de linfocitos T. Asimismo, los péptidos que no porten ningún glicano también podrán ser reconocidos por algunos linfocitos T circulantes. Consecuentemente, en uno o ambos escenarios una respuesta inmunológica indeseada se desencadenará, con resultados de variada complejidad y gravedad.

13.2.5. Respuesta inmunológica mediada por linfocitos Th1 y Th2

La activación inicial de los linfocitos T *vírgenes* se produce principalmente en los órganos linfoides secundarios a través del reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por células dendríticas maduras. El reconocimiento antigénico conduce a la activación linfocitaria con la consecuente generación de diversas respuestas que incluyen un aumento en el número de células, proceso conocido como expansión clonal y a la diferenciación o compromiso linfocitario en un determinado perfil efector (Abbas *et al.*, 2011). En el caso de los linfocitos T colaboradores dicha diferenciación posibilita el desarrollo de perfiles especializados en una determinada respuesta inmune específica.

En la actualidad, los perfiles efectores más frecuentemente evaluados en el curso del estudio de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas son los perfiles Th1 y Th2. Ambos se caracterizan por la producción de un set de citoquinas. El perfil Th1 incluye las citoquinas IFN- γ , IL-2 y TNF- α (factor de necrosis tumoral- α), mientras que los linfocitos T comprometidos en un perfil Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13.

Como se mencionó anteriormente el desarrollo de una respuesta humoral mediada por la colaboración de linfocitos T da lugar a la generación de anticuerpos del isotipo IgG. Asimismo, la polarización de linfocitos T hacia un dado perfil también se correlaciona con la inducción de una determinada subclase de anticuerpo. De esta manera, la subpoblación Th1 ha sido asociada con el desarrollo de anticuerpos IgG1 e IgG2, mientras que la respuesta Th2,

con la producción de anticuerpos IgG4. El desarrollo de una u otra respuesta puede acarrear un impacto directo en la eficacia de la terapia.

Un caso que ejemplifica lo expuesto es la terapia con FVIII recombinante humano en pacientes hemofílicos. El predominio de una respuesta Th2 condujo al desarrollo de anticuerpos IgG4 neutralizantes y altamente inhibidores y consecuentemente a una disminución severa de la eficacia del tratamiento (Reding *et al.*, 2002). Sin embargo, en pacientes previamente tratados con agentes inmunosupresores, la terapia con FVIII condujo al desarrollo de una respuesta Th1 y anticuerpos IgG1 e IgG2 que no produjeron un impacto marcado en la eficacia de la terapia (Reding, 2006).

13.3. HERRAMIENTAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE GLICOPROTEÍNAS DE USO TERAPÉUTICO

13.3.1. Predicción de la inmunogenicidad de glicoproteínas mediante análisis inmunoinformático y validación experimental

Actualmente, se disponen de modelos estructurales de las distintas moléculas del CMH.

En el caso de las glicoproteínas terapéuticas, por ser proteínas extracelulares, su presentación antigénica predominante es la mediada por las moléculas del CMH de clase II.

Debido a las características estructurales de las moléculas de clase II, los algoritmos disponibles para la determinación de la antigenicidad potencial presentan una precisión menor que los de clase I. Sin embargo, con el fin de economizar tiempo y costos, esta plataforma es ampliamente utilizada.

La estrategia consiste en la predicción de la inmunogenicidad global de la proteína por medio de algoritmos capaces de asignar un *score* de inmunogenicidad generado a partir del contenido de epitopes que son potencialmente capaces de unirse a las moléculas del CMH humano. Este *score* no solo permite tener una noción del riesgo inmunogénico potencial sino además comparar la inmunogenicidad de distintas proteínas. Existen diversos algoritmos informáticos capaces de realizar tal predicción y se diferencian fundamentalmente en su capacidad para predecir con certeza la inmunogenicidad global y los epitopes dentro de la proteína.

Estas pequeñas secuencias pueden ser reconocidas por más de un tipo de molécula del CMH de clase II (epitopes promiscuos) y por lo tanto dar lugar a una respuesta inmune en una mayor porción de la población mundial. En general, el resultado de esta búsqueda arroja una variedad de secuencias, donde determinados residuos llamados de «anclaje», contactan directamente con el «bolsillo» formado por las moléculas que conforman el CMH y los restantes están comprometidos en la unión al receptor del linfocito T

(TCR). Asimismo, los residuos que flanquean a esta secuencia núcleo resultan fundamentales para la estabilización de las interacciones CMH-péptido-TCR.

Una vez identificados los epitopes potencialmente inmunogénicos y promiscuos, el siguiente paso consiste en agruparlos formando péptidos de entre 15 y 25 aminoácidos, de manera tal de realizar los ensayos de validación experimental con un número menor de secuencias que incluyan a uno o más epitopes.

El ensayo de validación experimental más empleado consiste en evaluar la capacidad de interacción *in vitro* de los péptidos sintéticos a los distintos tipos de moléculas del CMH de clase II (alelos). En general, los alelos más frecuentemente analizados son DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301 y DRB1*1501, que representan más del 90 % de la diversidad alélica de la población humana. Este ensayo se basa en la capacidad de cada péptido analizado para competir por la unión al «bolsillo» del CMH contra un péptido de referencia, generalmente conjugado a una molécula de detección, por ejemplo Biotina. Luego, estos complejos se transfieren a una placa de múltiples pocillos donde previamente se ha preadsorbido un anticuerpo de unión al CMH humano. Finalmente, se realiza la detección mediante la incubación con estreptavidina conjugada a una molécula señal (por ejemplo, europio) y a partir de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia se puede estimar la afinidad relativa de unión del péptido de interés a la molécula del CMH. De esta manera, aquellos péptidos que presenten una alta afinidad de unión por las moléculas del CMH darán lugar a una señal menor que aquellos péptidos que se unen débilmente a dicha molécula.

13.3.2. Evaluación *in vitro* de la inmunogenicidad

Si bien los algoritmos inmunoinformáticos resultan de gran utilidad, no contemplan la presencia de glicanos unidos a los péptidos. Por este motivo resulta esencial complementar estos resultados con metodologías que incluyan la incubación de la proteína de interés con células del sistema inmune humano. En este sentido, el uso de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana constituye una alternativa muy atractiva. Este ensayo intenta imitar una situación similar a la que se desarrollaría cuando la proteína es administrada a un paciente, ya que intervienen algunos de los protagonistas celulares presentes en el sistema inmune humano.

Las alternativas disponibles en la actualidad incluyen la incubación directa de células mononucleares de sangre periférica humana con la proteína de interés (Wullner *et al.*, 2010) o ensayos más refinados que incluyen la purificación adicional de ciertas poblaciones celulares. Con respecto a la primera estrategia, la ventaja más distintiva es el ahorro de tiempo y esfuerzo, ya que luego de la obtención de las células mononucleares, el ensayo solo consiste en incubar estas muestras con la proteína de interés en forma reiterada de manera de tal de lograr

un enriquecimiento en aquellos clones de linfocitos T específicos para la proteína analizada. Para facilitar la activación *in vitro* de las células T se adicionan citoquinas tales IL-2 e IL-7 en bajas concentraciones. Luego, el ensayo de evaluación de la activación linfocitaria se realiza mediante ensayos de ELISA o ELISPOT. En general, las citoquinas evaluadas para determinar la activación linfocitaria son IFN- γ e IL-4, que representan los perfiles Th1 y Th2, respectivamente.

Si bien esta estrategia es utilizada ampliamente debido a la relativa sencillez en su concreción, presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, el número de células dendríticas presentes en la muestra es muy bajo y en general estas células son susceptibles a los procesos de congelamiento/descongelamiento. Esto último genera la necesidad de realizar los ensayos con muestras frescas. Por otra parte, su uso está restringido a aquellas proteínas que no presentan efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T. Por lo tanto, este sistema no resulta apropiado, por ejemplo, para evaluar la inmunogenicidad de los interferones de tipo I, debido a su actividad antiproliferativa (Jones *et al.*, 2004) e inmunomoguladora.

La segunda estrategia disponible resulta más laboriosa pero al mismo tiempo más confiable y no presenta las limitaciones antes mencionadas (Jaber y Baker, 2007; Mufarrege *et al.*, 2017). Luego de purificar las células mononucleares humanas, se aíslan los monocitos mediante adherencia al plástico o a través de micro *beads*. La segunda alternativa es más costosa pero permite obtener los monocitos con un alto grado de pureza. Los monocitos son luego diferenciados a células dendríticas inmaduras mediante un cóctel de citoquinas que incluye factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4. Luego de seis días de diferenciación, las células dendríticas son incubadas con la proteína de interés y posteriormente diferenciadas a un fenotipo maduro mediante el agregado de TNF al medio de cultivo. Finalmente, luego de dos a cuatro días de maduración, las células dendríticas son incubadas con los linfocitos T autólogos y se determina la activación linfocitaria por medio de la cuantificación de citoquinas o clones productores de tales citoquinas, mediante ELISA o ELISPOT, respectivamente.

13.3.3. Estudio *in vivo* de la inmunogenicidad

Si bien el ensayo de cuantificación de citoquinas (IFN- γ e IL-4) a partir de CMSP representa en buena medida el comportamiento de los protagonistas celulares del sistema inmune humano, es aún una técnica *ex vivo*. Por tal motivo, es conveniente en la medida de lo posible, confirmar estos resultados a través de estudios que involucran el trabajo con animales de experimentación, en este caso, ratones transgénicos. La ventaja adicional de este tipo de ensayos con respecto a los ensayos *ex vivo* con CMSP humanas, es la posibilidad de determinar una respuesta humoral contra el terapéutico.

Históricamente se han empleado los ratones como modelo animal en una amplia variedad de estudios para determinar la inmunogenicidad de proteínas humanas, debido a la gran similitud en los sistemas inmunológicos de dichos organismos. Sin embargo, existen aún diferencias relevantes entre ambos sistemas, principalmente entre aquellas proteínas que componen el CMH (en humanos denominado HLA y en ratón H-2). Esto trae aparejado que la presentación antigénica en ambos sistemas sea diferente y por lo tanto que la respuesta inmune consecuente, también lo sea. Para salvar esta dificultad se han desarrollado ratones transgénicos que no expresan ninguna proteína del CMH de ratón pero que por el contrario han sido modificados genéticamente para que expresen ciertas moléculas del CMH humano. De esta manera, en la actualidad se dispone comercialmente de ratones con diversos fenotipos HLA-DR, por ejemplo HLA-DR1 (DRB1*0101), HLA-DR3 (DRB1*0301) y HLA-DR4 (DRB1*0401). Estos ratones son capaces de «imitar» de manera más confiable una respuesta inmune humana que los ratones de tipo salvaje o *wild type*.

Los protocolos de inmunización generalmente incluyen dos o tres inyecciones con las proteínas de interés (en distintas concentraciones) y se realizan en forma intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal en función de la proteína y volumen administrado.

Una vez finalizado el protocolo de inmunizaciones (aproximadamente unos 45 días) se extraen muestras de sangre, bazo y ganglios linfáticos. Con estas muestras se realizan ensayos de titulación de anticuerpos totales y neutralizantes. Las células provenientes del bazo y ganglios linfáticos se incuban con la proteína de interés y se evalúa la activación linfocitaria mediante la cuantificación de citoquinas (IL-4 e IFN- γ murinas) mediante ensayos de ELISA.

En conjunto, los ensayos *ex vivo* e *in vivo* descritos representan una muy buena estrategia experimental para el estudio de la inmunogenicidad de glicoproteínas de uso terapéutico humano en etapas preclínicas de desarrollo.

13.3.4. Microorganoides linfáticos humanos

Las plataformas antes descriptas representan las estrategias más empleadas en la actualidad para la evaluación preclínica de la inmunogenicidad de glicoproteínas de uso terapéutico humano. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones. En primer lugar no representan la complejidad y especificidad del sistema inmune humano. Además, si bien los ratones humanizados han sido modificados de manera tal de expresar moléculas humanas en reemplazo de sus pares murinas, existen aún discrepancias en ciertas poblaciones celulares y componentes moleculares que restringen la posibilidad de correlacionar en forma directa el comportamiento en ambos sistemas. En adición, los aspectos éticos relacionados con el uso de animales de experimentación generan una motivación para el desarrollo de estrategias alternativas.

Con respecto a los ensayos *ex vivo* con CMSP humana, las suspensiones celulares carecen tanto de la funcionalidad del tejido como así también de la fisiología del órgano. Asimismo, presentan una limitación relacionada con su incapacidad de permanecer en cultivo por largos períodos de tiempo.

Hace unos años, en un intento por resolver estos inconvenientes, comenzó a gestarse la idea de desarrollar microorganoides linfáticos a partir de células estructurales y del sistema inmunológico humano (Lubitz y Giese, 2014).

Como se mencionó anteriormente, una fuente apropiada de células inmune es provista por las células mononucleares de sangre periférica, mientras que las células del estroma (estructurales) son obtenidas a partir de biopsias de nódulos linfáticos o médula ósea. Por razones de disponibilidad también se ha propuesto el uso de líneas celulares de fibroblastos. Las células del estroma resultan esenciales en este tipo de estrategia debido a que brindan el ambiente propicio para la inducción de la movilización (*homing*) y segregación linfocitaria. En adición, dirigen la formación del tejido y su organización estructural modulando en forma precisa el balance entre estado estacionario e inflamación (Giese *et al.*, 2010).

Las células del sistema inmune y del estroma son luego combinadas con matrices artificiales con el fin de establecer estructuras 3D que imitan el ambiente tisular.

Estos sistemas pueden ser mantenidos en cultivo durante varias semanas y permitir de esta manera no solo realizar repetidas dosis de la proteína terapéutica de interés, sino además evaluar la posible respuesta humoral contra la misma. La plataforma, además, se constituye en un sistema biorreactor perfundido por lo que, por un lado, se realiza la provisión de medio de cultivo fresco y, por el otro, la cosecha de sobrenadante para el monitoreo de citoquinas (respuesta inmune celular) y anticuerpos (respuesta humoral).

Si bien esta plataforma resulta sumamente promisoría, existen ciertas dificultades asociadas con la obtención de células primarias del estroma, como así también dificultades técnicas, como por ejemplo, evitar la citotoxicidad celular mediada por células NK (*natural killer*) y linfocitos T citotóxicos.

Por estos motivos, como se mencionó previamente, los ensayos *ex vivo* a partir de cultivos en suspensión de células humanas e *in vivo* con animales transgénicos, continúan siendo en la actualidad las plataformas más empleadas.

13.4. INMUNOGENICIDAD MEDIADA POR AZÚCARES EXÓGENOS

Las células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) presentan diversas características que las sitúan como la plataforma de elección en la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico. Entre ellas se destacan la vasta caracterización, la capacidad de crecer en suspensión, de adaptarse a medios de cultivo químicamente definidos y la resistencia a infecciones por virus

humanos. En conjunto, estas ventajas justifican el hecho de que actualmente más del 70 % de las proteínas terapéuticas se produzcan mediante el uso de esta línea celular (Kim *et al.*, 2012).

Sin embargo, un problema característico relacionado con la inmunogenicidad de las glicoproteínas es la presencia de azúcares provenientes de la célula huésped empleada para su producción y no propias del organismo humano. Dos casos que ejemplifican claramente lo antes expuesto son el ácido glicolilneuramínico (Neu5Gc) y la galactosa- α -1,3-galactosa (α Gal).

13.4.1. Ácido glicolilneuramínico

A diferencia de lo que ocurre en otros mamíferos, las células humanas no pueden sintetizar el Neu5Gc debido a una mutación irreversible en el gen *CMAH* que codifica para la enzima CMP-ácido N-acetilneuramínico hidroxilasa, encargada de producir CMP-Neu5Gc a partir de CMP-ácido N-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) (Varki, 2007).

Las células CHO sintetizan la enzima CMP-N-acetilneuramínico hidroxilasa biológicamente activa. Por lo tanto, son capaces de generar Neu5Gc y adiccionarlo a las proteínas glicosiladas que producen.

Por otra parte, el uso de células humanas no constituye una solución definitiva, ya que el Neu5Gc puede ser tomado desde el medio de cultivo y luego incorporado metabólicamente en las glicoproteínas que secretan (Bardor, 2005).

Los anticuerpos anti-Neu5Gc están presentes en todos los seres humanos. Más aún, en algunos casos los niveles son relativamente altos, alcanzando rangos de 0,1–0,2 % de las IgG en circulación (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). En consecuencia, dichos anticuerpos preformados podrían unirse y neutralizar la glicoproteína administrada, provocando una reducción de su eficacia.

Esto constituye una limitación al uso de las células CHO como plataforma de producción, motivo por el cual se realizaron numerosos esfuerzos con el fin de reducir el contenido de Neu5Gc en las glicoproteínas producidas en dichas células (Borys *et al.*, 2009).

Una de las primeras estrategias consistió en incrementar la presión de CO₂ durante el curso del cultivo celular. De esta manera, se logró reducir a la mitad el contenido de Neu5Gc en proteínas tales como el activador tisular del plasminógeno (tPA) sin alterar el contenido de ácido siálico total ni de otros monosacáridos en el mismo (Kimura y Miller, 1997).

Más tarde, mediante la manipulación del contenido de conjugados nucleótido-azúcar (involucrados en la regulación del procesamiento de los glicanos) se redujo la ocurrencia de glicanos murino-específicos en proteínas recombinantes producidas en células NSO (Baker *et al.*, 2001).

Con el advenimiento de las técnicas de ARN de interferencia, se lograron avances en la reducción de los niveles de la enzima CMP-N-acetilneuramínico hidroxilasa en células CHO. De esta manera, mediante una reducción del 80 % en los niveles de actividad hidroxilasa se logró disminuir el contenido de residuos de Neu5Gc desde 4 % a 1 % (Chenu *et al.*, 2003).

13.4.2. Galactosa- α -1,3-galactosa

Las células de origen murino producen una enzima conocida como α 1,3-galactosiltransferasa que cataliza la producción de glicanos que contienen residuos de α -Gal y es inactiva en humanos. Los productos generados a partir de estas líneas celulares contienen mayores niveles de α -Gal que aquellos provenientes de las líneas derivadas de hámster (ВНК, *Baby Hamster Kidney* y CHO). Por ende, las proteínas producidas con líneas celulares murinas son potencialmente más inmunogénicas (Muchmore *et al.*, 1989). Sin embargo, la enzima necesaria para producir este epítipo también está presente en las células CHO.

Existe evidencia que demuestra la presencia de anticuerpos anti- α -Gal preexistentes en humanos (Padler-Karavani y Varki, 2011). Más aún, en pacientes con elevado contenido de anticuerpos anti- α -Gal se reportaron reacciones anafilácticas severas, como consecuencia del reconocimiento de este epítipo en un anticuerpo monoclonal (Cetuximab) derivado de células Sp2/o (Chung *et al.*, 2008).

Distintas estrategias han sido abordadas con el fin de reducir la presencia de este epítipo en las glicoproteínas producidas en forma recombinante. Existe evidencia que demuestra que ciertas modificaciones en las condiciones del cultivo celular pueden producir cambios en la glicosilación. De esta manera, se ha logrado controlar la *galactosilación* modificando la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo (Liu *et al.*, 2014). En adición, algunas estrategias alternativas incluyen la disrupción a nivel genético de la producción de la enzima α 1,3-galactosiltransferasa (Dai *et al.*, 2002).

13.5. ESTRATEGIAS PARA REDUCIR LA INMUNOGENICIDAD DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

Por lo antes expuesto, el estudio de la inmunogenicidad de glicoproteínas de uso terapéutico humano merece un lugar destacado en el control de calidad de las mismas. Este análisis debe realizarse tanto en la etapa preclínica de desarrollo del terapéutico como así también durante las distintas fases de los ensayos clínicos.

Diversas estrategias han sido abordadas con el fin de reducir el impacto potencial de una respuesta inmune indeseada en el paciente. Entre ellas, la identificación y remoción de las regiones potencialmente inmunogénicas de la glicoproteína como así también la coadministración de inmunosupresores son dos de las estrategias propuestas para reducir el riesgo de un quiebre en la tolerancia inmunológica hacia la droga administrada.

13.5.1. Remoción de los epitopes T (deinmunización)

Con el advenimiento de la inmunoinformática, el estudio de la inmunogenicidad de proteínas alcanzó mejoras notables, que se tradujeron no solo en una mayor precisión del análisis sino además en una reducción de tiempo y costos.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se dispone de numerosos algoritmos informáticos capaces de predecir con distintos grados de certeza, las regiones más inmunogénicas de una proteína terapéutica. Estas predicciones están basadas en la capacidad de un dado epitope de unir determinadas moléculas del CMH humano y, por ende, de dar lugar al desarrollo de una respuesta inmune mediada por linfocitos T. Asimismo, estos algoritmos están dotados, en algunos casos, de herramientas iterativas que permiten evaluar el impacto de una modificación puntual en la inmunogenicidad del péptido que la contiene. El proceso de sustitución racional de aminoácidos directamente implicados en la inmunogenicidad de una proteína se lo conoce como deinmunización. Este proceso está basado en resultados obtenidos a través de un estudio inmunoinformático y confirmados mediante plataformas experimentales *in vitro* e *in vivo* que incluyen la comparación de la inmunogenicidad de las nuevas muteínas con la proteína original.

En la actualidad, la deinmunización de proteínas terapéuticas está dando lugar al desarrollo de nuevas drogas con características sumamente promisorias en la industria farmacéutica. Por medio de esta tecnología se han desarrollado versiones deinmunizadas de eritropoyetina (Tangri *et al.*, 2005), factor VIII (Moise *et al.*, 2011) e IFN- α 2b (Mufarrege *et al.*, 2017), entre otras glicoproteínas.

13.5.2. Tregitopes

Determinados linfocitos T son capaces de reconocer secuencias específicas de una proteína (epitopes) y desencadenar una respuesta inmunológica contra la misma. En contraste, existen péptidos capaces de ser reconocidos por linfocitos T específicos y generar una respuesta inmunosupresora. Estas secuencias fueron denominadas *Tregitopes* debido a su capacidad de activar linfocitos T reguladores (o *Treg cells*). Estos linfocitos, una vez activados,

secretan citoquinas tales como IL-10 y TGF- β (factor de crecimiento transformante- β) que dan lugar a una regulación negativa de la respuesta inmune inflamatoria y por lo tanto favorecen la tolerancia inmunológica.

Los *Tregitopes* fueron descubiertos a partir de una búsqueda de epitopes potencialmente activadores de linfocitos T efectoras en anticuerpos monoclonales (De Groot *et al.*, 2008). Presentan características distintivas entre las que se destacan la elevada conservación de secuencia en proteínas autólogas similares, la capacidad de unirse a numerosas moléculas del CMH (epitopes promiscuos) y los linfocitos T que los reconocen presentan un fenotipo regulador ya que una vez activados secretan IL-10, TGF- β y la proteína quimioatrayente de monocitos 1, MCP-1 (Schanen *et al.*, 2011).

El cocultivo linfocitario *in vitro* de péptidos inmunogénicos con *Tregitopes* inhibe la proliferación de linfocitos T y la consecuente producción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas. Debido a la capacidad de suprimir las respuestas inmunológicas T efectoras, estas secuencias han sido propuestas como posibles candidatas para reducir la inmunogenicidad de proteínas de uso terapéutico y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Elyaman *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2013).

13.6. CONCLUSIÓN

Las glicoproteínas recombinantes de uso terapéutico se presentan como una solución muy atractiva para el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Sin embargo, también se plantean interrogantes en cuanto a su eficacia y seguridad. Con relación a esto último, el estudio de su inmunogenicidad ocupa un lugar preponderante. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias que establezcan escenarios que se correlacionen de manera precisa con los resultados de los ensayos clínicos, constituye un verdadero desafío para numerosos centros tecnológicos y agencias regulatorias.

La inmunoinformática y la ingeniería genética han brindado soluciones en este sentido, imprimiendo un fuerte impulso en la generación de herramientas predictivas. Sin embargo, la brecha que aún existe entre los resultados provenientes de los sistemas *ex vivo* e *in vivo* y la información disponible de los ensayos clínicos, conlleva a la permanente búsqueda de nuevas plataformas que permitan predecir con certeza el potencial inmunogénico de las glicoproteínas terapéuticas.

Referencias bibliográficas

- ABBAS, A. K., LICHTMAN A. H., ANDREW H.** (2018). *Inmunología celular y molecular*. Madrid: Elsevier Saunders.
- ALTRICH-VANLITH, M. L. ET AL.** (2006). Processing of a class I-restricted epitope from tyrosinase requires peptide N-glycanase and the cooperative action of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and cytosolic proteases. *Journal of Immunology*, 177, 5440–5450.
- AVCI, F. Y., LI, X., TSUJI, M. & KASPER, D. L.** (2011). A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nature Medicine*, 17, 1602–1609.
- BAKER, K. N., RENDALL, M. H., HILLS, A. E., HOARE, M., FREEDMAN, R. B. & JAMES, D. C.** (2001). Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 188–202.
- BARBOSA, M. D., VIELMETTER, J., CHU S., SMITH D. D. & JACINTO J.** (2006). Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clinical Immunology*, 19(2), 226.
- BARBOSA, M. D. & CELIS, E.** (2007). Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses. *Drug Discovery Today*, 12(15–16), 674–681.
- BARBOSA, M. D.** (2011). Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. *Drug Discovery Today*, 16(7–8), 345–353.
- BARDOR, M., NGUYEN, D. H., DIAZ, S. & VARKI, A.** (2005). Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 4228–4237.
- BASSER, R. L. ET AL.** (2002). Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood*, 99(7), 2599–2602.
- BORYS, M.C. ET AL.** (2009). Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 105, 1048–1057.
- BUSKAS, T., INGALE, S. AND BOONS, G. J.** (2006). Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiology*, 16, 113–136.
- CALO, D., KAMINSKI, L. & EICHLER, J.** (2010). Protein glycosylation in Archaea: sweet and extreme. *Glycobiology*, 20, 1065–1076.
- CARBONE, F. R. & GLEESON, P. A.** (1997). Carbohydrates and antigen recognition by T cells. *Glycobiology*, 7(6), 725–730.
- CASADEVALL, N. ET AL.** (2002). Pure red-cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *The New England Journal of Medicine*, 346, 469–75.
- CHATENOUD, L.** (1993). Immunologic monitoring during OKT3 therapy. *Clinical Transplant*, 7, 422–430.

- CHENU, S. ET AL.** (2003). Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622, 133-144.
- CHUNG, C. H. ET AL.** (2008). Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *The New England Journal of Medicine*, 358, 1109-1117.
- DAI Y. ET AL.** (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 20(3), 251-255.
- DE GROOT, A. S. & SCOTT, D. W.** (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol*, 28(11), 482-490.
- DE GROOT, A. S., MOISE, L., MCMURRY, J. A. ET AL.** (2008). Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide «Tregitopes». *Blood*, 112(8), 3303-3311.
- DENGJEL, J. & STEVANOVIC, S.** (2006). Naturally presented MHC ligands carrying glycans. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 33, 38-44.
- DIAZ, M. O. ET AL.** (1994). Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics*, 22, 540-552.
- ELYAMAN W., KHOURY S. J., SCOTT D. W. & DE GROOT A. S.** (2011). Potential application of tregitopes as immunomodulating agents in multiple sclerosis. *Neurology Research International*, 256460. 10.1155/2011/256460.
- GIESE, C., LUBITZ, A., DEMMLER, C. D., REUSCHEL, J., BERGNER, K. & MARX, U.** (2010). Immunological substance testing on human lymphatic micro-organisms in vitro. *Journal of Biotechnology*, 148(1), 38-45.
- HANISCH, F. G. & NINKOVIC, T.** (2006). Immunology of O-glycosylated proteins: approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Current Protein and Peptide Science*, 7, 307-315.
- HAZNEVAROGLU, I. C., GOKER, H., TURGUT, M., BUYUKASIK, Y. & BENEKLI, M.** (2002). Thrombopoietin as a drug: biologic expectations, clinical realities, and future directions. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 8(3), 193-212.
- HERZIK, D. J.** (2003). The immunogenicity of therapeutic cytokines. *Current opinion in molecular therapeutics*, 5(2), 167-171.
- JABER, A. & BAKER, M.** (2007). Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1a formulations using ex vivo T-cell assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12, 43(4), 1256-61.
- JENSEN. P. B., BIRKELAND. S. A., ROHRP. N., ELBIRK. A. & JORGENSEN. K. A.** (1996). Development of anti-OKT3 antibodies after OKT3 treatment. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 30(3), 227-230.
- JONES. T. D. ET AL.** (2004). The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 24(9), 560-572.
- JOSIK, D. ET AL.** (1999). Degradation products of factor VIII which can lead to increased immunogenicity. *Vox Sanguinis*, 77(1), 90.

- KIM, J. A.** (2003). Targeted therapies for the treatment of cancer. *The American Journal of Surgery*, 186(3), 264–268.
- KIM, J. Y., KIM, Y. G. & LEE, G. M.** (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 917–930.
- KIMURA, R. & MILLER, W. M.** (1997). Glycosylation of CHO-derived recombinant tPA produced under elevated pCO₂. *Biotechnology Progress*, 13(3), 311–317.
- KOREN, E. ET AL.** (2007). Clinical validation of the «in silico» prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein. *Clinical Immunology*, 124(1), 26–32.
- KOREN, E., ZUCKERMAN, L. A. & MIRE-SUIS, A. R.** (2002). Immune responses to therapeutic proteins in humans, clinical significance, assessment and prediction. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3, 349–360.
- LIU, B., SPEARMAN, M., DOERING, J., LATTOVA, E., PERREAULT, H. & BUTLER, M.** (2014). The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology*, 170, 17–27.
- LUBITZ, A. & GIESE, C.** (2014). *Human Artificial Lymph Node Model (HUALN)*. *Encyclopedia of Immunotoxicology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi 10.1007/978-3-642-27786-3_1573-1.
- MOISE, L., SONG, C., MARTIN, W. D., TASSONE, R., DE GROOT, A. S. & SCOTT, D. W.** (2012). Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clinical Immunology*, 142(3), 320–331.
- MUCHMORE, E. A., MILEWSKI, M., VARKI, A. & DIAZ, S.** (1989). Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 20216–20223.
- NILSSON, J. B., NILSSON, T. K., JANSSON, J. H., BOMAN, K., SODERBERG, S. & NASLUND U.** (2002). The effect of streptokinase neutralizing antibodies on fibrinolytic activity and reperfusion following streptokinase treatment in acute myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine*, 252(5), 405–411.
- NINKOVIC, T. & HANISCH, F. G.** (2007). O-glycosylated human muc1 repeats are processed in vitro by immunoproteasomes. *Journal of Immunology*, 179, 2380–2388.
- NOTHAFT, H. & SZYMANSKI, C. M.** (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 765–778.
- OSORIO, F. & REIS E SOUSA, C.** (2011). Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, 34, 651–664.
- PADLER-KARAVANI, V. & VARKI, A.** (2011). Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk. *Xenotransplantation*, 18, 1–5.
- PETERSEN, J., PURCELL, A. W. & ROSSJOHN, J.** (2009). Post-translationally modified T cell epitopes: immune recognition and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*, 87, 1045–1051.

- PURCELL, A. W., VAN DRIEL, I. R. & GLEESON, P. A.** (2008). Impact of glycans on T-cell tolerance to glycosylated self-antigens. *Immunology & Cell Biology*, 86, 574–579.
- REDING, M. T., LEI, S., LEI, H., GREEN, D., GILL, J. & CONTI-FINE, B. M.** (2002). Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thrombosis and Haemostasis*, 88, 568–75.
- REDING, M. T.** (2006). Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia*, 12, 30–5.
- RYFF, J. C. & SCHELLEKEN, H.** (2002). Immunogenicity of rDNA-derived pharmaceuticals. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(6), 254–256.
- SCAGNOLARI, C. ET AL.** (2002). Neutralizing and binding antibodies to IFN-beta: relative frequency in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with different IFN-beta preparations. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22(2), 207–213.
- SCHANEN, B. C. ET AL.** (2011). Coupling sensitive in vitro and in silico techniques to assess cross-reactive CD4+ T cells against the swine-origin H1N1 influenza virus. *Vaccine*, 29(17), 3299–3309.
- STEIN, K. E.** (2002). Immunogenicity: concepts/issues/concerns. *Developmental Biology*, 109, 15–23.
- SU, Y., ROSSI, R., DE GROOT, A. S. & SCOTT, D. W.** (2013). Regulatory T cell epitopes (Tregitopes) in IgG induce tolerance in vivo and lack immunogenicity per se. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(2), 377–383.
- TANGRI, S. ET AL.** (2005). Rationally Engineered Therapeutic Proteins with Reduced Immunogenicity. *J. Immunol*, 174(6), 3187–3196.
- TANGVORANUNTAKUL, P. ET AL.** (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12045–12050.
- TATAREWICZ, S. M., WEI, X., GUPTA, S., MASTERMAN, D., SWANSON, S. J. & MOXNESS, M. S.** (2007). Development of a maturing T-cell-mediated immune response in patients with idiopathic Parkinson's disease receiving r-metHuGDNF via continuous intraputaminial infusion. *Journal of Clinical Immunology*, 27(6), 620–627.
- TOVEY, M. G. & LALLEMAND, C.** (2010). Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. *Pharmaceuticals*, 3, 1162–1186.
- VARKI, A.** (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446, 1023–1029.
- WERDELIN, O., MELDAL, M. & JENSEN, T.** (2002). Processing of glycans on glycoprotein and glycopeptide antigens in antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9611–9613.
- WULLNER, D., ZHOU, L., BRAMHALL, E., KUCK, A. GOLETZ, T. J., SWANSON, S., CHIRMULE, N. & JAWA, V.** (2010). *Clinical Immunology*, 137, 5–14.

14

Calidad de productos bioterapéuticos

GUILLERMINA FORNO Y MARINA ETCHEVERRIGARAY

14.1. INTRODUCCIÓN

Una característica propia de los productos bioterapéuticos es su complejidad y su variabilidad. El enfoque tradicional para asegurar la calidad de un producto incluye la verificación de que cumple con especificaciones predeterminadas. Sin embargo, en la actualidad se entiende que eso no es suficiente, y es preciso el conocimiento profundo del producto y del proceso para evitar el rechazo de lotes por no cumplir con las especificaciones (Guerra *et al.*, 2019).

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) define al Control de Calidad como la parte de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que concierne al muestreo, especificaciones y análisis, así como a los procedimientos de organización, documentación y autorización, que garantizan que todos los controles necesarios y adecuados han sido realmente efectuados, y que no se autorice el uso de materiales ni la expedición de productos para su venta o distribución, sin que su calidad haya sido juzgada como satisfactoria. El control de calidad no se limita a operaciones de laboratorio, debe estar involucrada en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto (Disposición ANMAT 3602/2018, 2018).

De acuerdo con la mencionada disposición, los requisitos fundamentales de control de calidad son los siguientes:

- Disponer de instalaciones y equipamiento adecuados, personal formado y procedimientos adecuados para el muestreo y análisis de materiales de partida, materiales de acondicionamiento, intermedios, graneles y producto terminado y, cuando corresponda, para el control de las condiciones ambientales en lo que a BPF se refiere;
- Disponer de personal y métodos aprobados para el muestreo de materiales de partida, material de acondicionamiento, producto intermedio, producto a granel y producto terminado;
- Validar los métodos analíticos no compendiados en farmacopea argentina o internacionales; o se determina el grado de adecuación de los métodos codificados.
- Registrar de forma manual y/o a través de otros medios de registro, que demuestran que realmente se han llevado a cabo los procedimientos requeridos de muestreo, inspección y análisis. Cualquier desviación debe quedar completamente registrada e investigada;

- Garantizar que los productos terminados contienen las materias primas establecidas en la composición cualitativa y cuantitativa de la autorización de comercialización o de la autorización de ensayos clínicos, que estos son de la pureza requerida, se encuentran en los envases adecuados y están correctamente etiquetados;
- Garantizar que los resultados de los controles y análisis de los materiales, intermedios, graneles y productos terminados, se registran y evalúan conforme a sus especificaciones. La evaluación incluye la revisión de la documentación de producción.
- Guardar suficientes muestras de referencia de materiales de partida y de productos, en caso de necesidad, controles futuros.

14.2. GUÍAS INTERNACIONALES DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS

El Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (o ICH, por sus siglas en inglés) fue creado en 1990 y reúne a las autoridades reguladoras de medicamentos y principales compañías farmacéuticas de Europa, Japón y Estados Unidos para discutir aspectos científicos y técnicos de registro de productos farmacéuticos. Este organismo desarrolló un conjunto de guías de décadas a temas de calidad, cuyo listado se encuentra en la Tabla 14.1.

En particular, las denominadas ICH8, ICH9 e ICH10 proporcionan lineamientos para alcanzar la excelencia en la fabricación eficiente de medicamentos. Desde un punto de vista conceptual, se postula que la calidad del producto es incorporada en cada una de las etapas de su ciclo de vida y esto se logra en base a la creación y divulgación de conocimiento. A modo de resumen, los aportes provistos por cada una de estas guías pueden describirse de la siguiente manera:

14.2.1. ICH Q8. Desarrollo de Productos Farmacéuticos

Su objetivo fundamental es controlar en tiempo real los riesgos derivados de la variabilidad en la fabricación desde las etapas de desarrollo. Provee un resumen de las características de calidad de un producto que deben alcanzarse idealmente para asegurar su calidad, teniendo en cuenta el impacto en su seguridad y eficacia. Determina que la verificación de calidad del medicamento a lo largo de todo el proceso será posible solamente si se logra un conocimiento profundo del producto y de los procesos aplicados (ICH, 2009). Las principales herramientas conceptuales derivadas de esta ICH son la Calidad por Diseño (QbD, *Quality by Design*), la definición de Espacios de Diseño y la implementación de las Tecnologías Analíticas de Procesos (PAT, Process Analytical Technologies) (Charoo y Ali, 2013; Rozet *et al.*, 2015).

TABLA 14.1 LISTADO DE GUÍAS ICH DE CALIDAD

Guía		Aplicación
Estabilidad:	Q1A – Q1F	Laboratorios de fabricación de medicamentos de uso humano. Algunas también pueden alcanzar a laboratorios que fabriquen fármacos para uso veterinario, empresas fabricantes de alimentos tanto de consumo humano como animal y empresas fabricantes de productos cosméticos o de higiene, tanto de uso humano como animal.
Fotoestabilidad:	Q1B	
Validación Analítica:	Q2	
Impurezas:	Q3A – Q3D	
Farmacopeas:	Q4 – Q4B	
Calidad de los productos biotecnológicos:	Q5A – Q5E	
Especificaciones:	Q6A – Q6B	
Buenas prácticas de manufactura:	Q7	
Desarrollo Farmacéutico	Q8	
Gestión de Riesgos de Calidad	Q9	
Sistemas de Calidad Farmacéutico	Q10	
Desarrollo y Producción de Sustancias Activas	Q11	
Gestión del Ciclo de Vida	Q12	

La Calidad por Diseño pretende el diseño de productos y procesos robustos. Para ello es indispensable definir adecuadamente el producto y los objetivos de calidad que se perseguirán en su diseño, lo que en conjunto se ha denominado el «perfil de calidad del producto objetivo» (QTPP, *Quality Target Product Profile*). También es importante un adecuado conocimiento de los conceptos teóricos y los aspectos prácticos asociados al tipo de producto y para ello la experiencia de quien desarrolla el producto es determinante. De esta manera, será posible identificar los atributos críticos de calidad del producto (CQA, *Critical Quality Attribute*), de los materiales de partida (CMA, *Critical Material Attribute*) y los parámetros críticos de control del proceso (CPP, *Critical Process Parameter*), para efectuar el análisis de los riesgos asociados al producto y al proceso y para planear el conjunto de actividades de desarrollo de productos que se consideren pertinentes (Yu *et al.*, 2014; Alt *et al.*, 2016). Como ejemplo, algunos CQA comunes para los anticuerpos monoclonales son agregados, formas clivadas, impurezas de bajo peso molecular, modificaciones postraduccionales (por ejemplo, oxidación, deamidación y glicación), variantes en la secuencia de aminoácidos, heterogeneidad de carga, N-glicosilación (galactosilación, fucosilación, sialidación, entre otros), potencia biológica y unión a los receptores de Fc (Wang *et al.*, 2018).

Por otra parte, el Espacio de Diseño es la combinación de las variables de entrada de cualquier operación unitaria que aseguran el mismo resultado. En otras palabras, puede definirse como la combinación e interacción multidimensional de variables de entrada y parámetros de proceso que hayan demostrado proporcionar un producto de calidad aceptable y predefinida. Trabajar dentro del Espacio de Diseño no se considera un cambio en las condiciones de operación. Sin embargo, una excursión fuera del Espacio de Diseño será considerado un cambio, y por lo tanto requerirá un proceso regulatorio para que la autoridad sanitaria apruebe dicho cambio (Hakemeyer *et al.*, 2016; Finkler y Krummen, 2016; Mishra *et al.*, 2018; Peraman *et al.*, 2015).

Diferentes herramientas estadísticas pueden facilitar la tarea de delinear un Espacio de Diseño ya que permiten evitar la estrategia tradicional de modificación de un parámetro por vez y utilizar en cambio estrategias que permiten estudiar el efecto en las respuestas de varios parámetros de entrada simultáneamente, e inclusive evaluar el efecto de las interacciones entre estos parámetros (Devebek *et al.*, 2018; Tabora y Domagalski, 2017; N Politis *et al.*, 2017).

Por ejemplo, en los diseños factoriales los parámetros del proceso son alterados intencional y simultáneamente, de acuerdo con una matriz predefinida de combinaciones. Los factores se representan habitualmente con letras mayúsculas (A, B, C...) mientras que los niveles se designan como (+) o (-) 1. Si existiera un nivel central, este se representa con el cero (0). Los diseños factoriales completos incluyen todas las combinaciones posibles de niveles y factores. El número de experimentos requerido sigue la siguiente expresión:

$$\text{Número de experimentos} = \text{Niveles}^{\text{Factores}}$$

De esta manera, un diseño factorial completo de dos niveles y tres factores requerirá 8 experimentos. Los diseños factoriales tienen como problema principal el gran tamaño que representa el diseño ya que es preciso estudiar todas las combinaciones posibles de tratamientos. Como una alternativa, los diseños factoriales fraccionados representan una parte del diseño factorial completo y se utilizan típicamente cuando el número de factores es mayor a 4-5, con fines de *screening* ya que desprecian las interacciones de algunos o todos los atributos. Su principal limitación radica que algunos efectos de factores y/o de interacciones aparecen confundidos, es decir que implican una pérdida de información estadística. Por eso, se los utiliza frecuentemente para determinar de una lista de factores cuáles son aquellos sobre los que se realizará un experimento posterior con un diseño experimental no fraccionado (experimentación secuencial). Existe una variedad de programas estadísticos para diseñar experimentos y analizar los resultados experimentales, algunos de ellos son *Design Expert* (Stat-Ease Inc.), *MODDE* (Umetrics), *DoE Fusion PRO* (S-Matrix Corp.), *STAVEX* (Aicos), *Minitab* (Minitab Inc.) y *JMP* (SAS). Para

ejemplos sobre aplicaciones de Calidad por Diseño al desarrollo de biofármacos y de métodos analíticos ver Zurdo *et al.*, 2017; Amadeo *et al.*, 2011, Amadeo *et al.*, 2014, Pathak *et al.*, 2014.

Se considera que un proceso ha sido comprendido y se conoce adecuadamente cuando se han identificado todas las fuentes críticas de variabilidad y los atributos de calidad del producto pueden ser predefinidos de forma confiable. La Tecnología Analítica de Procesos (PAT) se basa en dos componentes principales: (a) la comprensión de los principios científicos y de ingeniería involucrados en el proceso de fabricación; (b) Identificación de las variables que afectan la calidad del producto. De acuerdo con la guía de la FDA, (2004): «el estado deseado de la fabricación farmacéutica es que la calidad y el rendimiento del producto estén garantizados a través del diseño de procesos de fabricación efectivos y eficientes» en los que se recomendó un control de calidad continuo y en tiempo real. Una vez que se entienden las propiedades de los componentes del producto farmacéutico, se deben identificar las variables de procesamiento que controlan las propiedades relevantes. Una vez que se alcanza ese estado, se debe realizar la medición a tiempo real de aquellos parámetros que se correlacionan en forma directa con atributos de calidad críticos, proporcionando elementos para tomar decisiones sobre continuar o no con un proceso, evaluando si el proceso está funcionando dentro de un rango de operación predefinido (Yu *et al.*, 2014).

La ventaja de la Tecnología Analítica de Procesos sobre la estrategia de monitoreo clásica es su mayor eficiencia para detectar fallas o fuentes de variabilidad del proceso. Otra ventaja fundamental es el potencial para generar una plataforma de control activo, permitiendo el ajuste de parámetros de operación si se detecta una variación en una variable de entrada o en el entorno, que pudieran afectar en forma negativa al producto. Esto permite establecer un proceso productivo más robusto, que redundará en un menor costo de producción (Ferreira y Tobyn, 2015; Pais *et al.*, 2014; Mercier *et al.* 2014; Hintz *et al.*, 2013).

Es preciso notar que a pesar de los beneficios, algunos factores han retrasado la aplicación de la Tecnología Analítica de Procesos (Texeira *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2017). Entre estos factores pueden mencionarse:

- El sofisticado mecanismo de control de los sistemas biológicos, que puede ser extremadamente sensible a cambios en las condiciones ambientales.
- Las características estructurales de las proteínas, significativamente más complejas que las moléculas sintéticas, no solamente por su mayor tamaño sino también por la presencia de modificaciones postraduccionales.
- La dificultad para conocer y comprender el significado funcional y clínico de distintas variantes estructurales del producto.
- La variabilidad que presentan las materias primas complejas, principalmente las utilizadas durante la etapa de bioproceso.
- La presencia de impurezas, tanto relacionadas con el producto como con el proceso, que pueden interferir en las medidas analíticas.

- Restricciones tecnológicas, asociadas con la necesidad de contar con modelos matemáticos que permitan un eficiente control del proceso o disponibilidad de instrumental de bajo costo para el monitoreo *in situ* de variables del proceso.

Algunos ejemplos de aplicación de PAT, principalmente al nivel de prototipo o prueba de concepto pueden encontrarse en Sharma *et al.*, 2019; Tiwari *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Peters *et al.*, 2017; Repka *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2017; Karmann *et al.*, 2017; Buckley y Ryder, 2017; Esmonde–White *et al.*, 2017.

14.2.2. ICH Q9. Gestión de Riesgo en Calidad

El objetivo principal de la Guía de Gestión de Riesgo en Calidad es imponer una cultura de previsión y análisis que tiene como soporte el conocimiento adquirido por la empresa acerca de sus productos y procesos. La gestión del riesgo requiere la identificación de los riesgos, su análisis y el diseño de estrategias para evitarlos o mitigarlos. El conocimiento ganado durante la gestión del riesgo debe también administrarse, haciendo énfasis en la comunicación de los resultados. Además debe controlarse la eficacia de las estrategias implementadas para evitar o mitigar los riesgos y diseñar las acciones correctivas y preventivas que se consideren pertinentes. Propone incorporar herramientas y métodos para el análisis de riesgos, también describe cómo gestionar el riesgo a través de cuatro fases: valorar, controlar, comunicar y revisar el riesgo. Herramientas como FMEA (*Failure Mode and Effect Analysis*), FTA (*Fault Tree Analysis*); HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) y el RAMM (*Risk Analysis and Mitigation Matrix*) entre otras, se aplican en la actualidad en diversos entornos productivos. En última instancia, estas herramientas formalizan y estructuran la evaluación de los posibles riesgos asociados al proceso y se basan en los siguientes cuestionamientos:

- ¿Qué podría fallar?
- ¿Cuál es la probabilidad de que se produzca el fallo?
- ¿Cuáles serían las consecuencias?

Las respuestas a estos cuestionamientos deberán basarse en el conocimiento científico del proceso y del producto y deberán centrarse en la protección del paciente (ICH, 2005; Charoo y Ali, 2015).

14.2.3. ICH Q10. Sistema de Calidad Farmacéutico

Publicada en julio de 2008, esta guía define cómo implementar el sistema de calidad farmacéutica adaptándolo según las indicaciones descritas en la ISO 9001. El modelo de calidad previsto por la Q10 contempla todas las

fases por las que debe pasar el medicamento, incluyendo el desarrollo y la discontinuidad de este, integrando en el Sistema de gestión de la Calidad, la gestión de riesgos y la mejora continua durante todo el ciclo de vida del producto (ICH, 2008).

14.2.4. ICH Q11

Esta guía, centra su atención en el desarrollo y producción de principios activos, aunque la misma guía cita explícitamente que puede ser apropiada también para otros procesos, llevando a cabo las consultas apropiadas con las autoridades sanitarias competentes. Una lectura más profunda de esta guía la dota de la potencia necesaria para aplicar la Q8 y la Q9 sobre el propio sistema de calidad descrito por la Q10 (ICH, 2012).

14.3. ESPECIFICACIONES

De acuerdo con la Guía de Calidad ICH Q6B (*Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*), una especificación se define como «una lista de pruebas, referencias a procedimientos analíticos y criterios de aceptación que son límites numéricos, rangos u otros criterios para las pruebas descriptas».

Las especificaciones se eligen para confirmar la calidad de la sustancia farmacéutica y el producto farmacéutico en lugar de establecer una caracterización completa y debería centrarse en aquellos elementos moleculares y biológicos característicos que se consideran útiles para garantizar la seguridad y eficacia del producto. Son una parte de una estrategia de control total diseñada para garantizar la calidad del producto y consistencia. Otras partes de esta estrategia incluyen una caracterización completa del producto durante desarrollo, en el que se basan muchas de las especificaciones, el cumplimiento de las buenas prácticas de Fabricación, la utilización de un proceso de manufactura validado, el análisis de las materias primas del proceso y los controles realizados durante el proceso (ICH, 1999).

14.3.1. Identidad

Las pruebas de identificación se utilizan para establecer la identidad de un producto medicinal. Deben ser capaces de discriminar compuestos de estructura relacionada que podrían estar presentes en la muestra (ICH Q6B, 1999). Deben ser específicas para el producto. A modo de ejemplo, los métodos habitualmente empleados para determinar identidad incluyen *Western*

blot con anticuerpo específico, isoelectroenfoque (Figura 14.1) y el mapeo peptídico. En este último caso se realiza la comparación del mapeo peptídico de una muestra con el de una sustancia de referencia. Para ello, se cotejan visualmente el número, el tiempo de retención y la intensidad relativa de los diversos péptidos en un mapa de péptidos de la muestra y de la sustancia de referencia. Más aún, los mapas de péptidos de la muestra y la referencia pueden superponerse para evaluar la presencia de todos los picos. La aparición de un nuevo pico significativo en el mapeo no significa necesariamente una falla para demostrar identidad. Sin embargo, la aparición de los nuevos picos implicará iniciar una investigación para explicar la aparición del/de los nuevo/s pico/s.

14.3.2. Estructura

El análisis de la estructura proteica como parte de las especificaciones de un producto medicinal implica la incorporación de al menos un método para verificar su integridad estructural. Por ejemplo: secuencia de aminoácidos del producto: debe determinarse en comparación con la secuencia de los aminoácidos deducidos de la secuencia del gen. Para ello pueden utilizarse distintas estrategias, tales como:

- a) Composición de aminoácidos: la composición general de aminoácidos se determina utilizando diversos métodos hidrolíticos en combinación con otros procedimientos analíticos. El análisis cuantitativo de aminoácidos también se puede utilizar para determinar el contenido de proteína.
- b) Secuencia terminal de aminoácidos: se realiza para identificar la naturaleza y la homogeneidad de los aminoácidos amino y carboxi terminales. Si se encuentra que el producto deseado es heterogéneo con respecto a los aminoácidos terminales, se deberá determinar la cantidad relativa de las distintas variantes utilizando un procedimiento analítico apropiado. La secuencia de aminoácidos amino terminales debe compararse con los aminoácidos terminales de la secuencia deducida a partir de la secuencia génica del producto de interés.
- c) Mapa peptídico: se realiza la fragmentación selectiva del producto en péptidos discretos utilizando enzimas proteolíticas o digestión química. Los fragmentos de péptidos resultantes se analizan mediante HPLC u otro procedimiento analítico apropiado. Los fragmentos de péptidos se identifican, en la medida de lo posible, utilizando técnicas como la composición de aminoácidos o espectrometría de masas.
- c) Presencia de grupos sulfhidrilo e integridad de puentes disulfuro: si, en base a la secuencia del producto deseado, se esperan residuos de cisteína, puede determinarse el número y la posición de cualquier

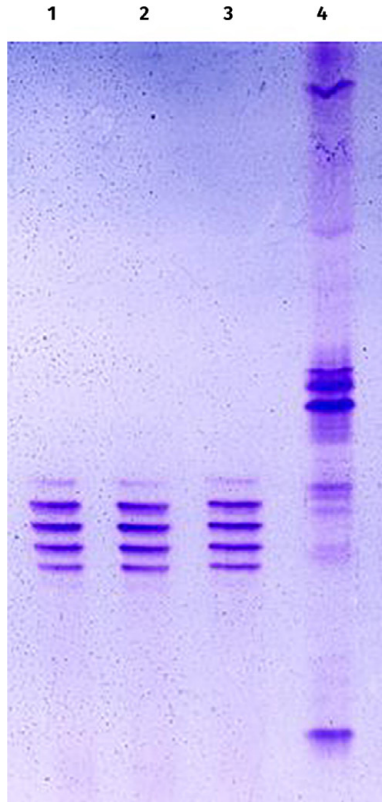


FIGURA 14.1. ISOELECTROENFOQUE DE MUESTRAS DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE. CALLES 1-3: MUESTRAS DE INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO DE ERITROPOYETINA. CALLE 4: MARCADOR DE PUNTO ISOELÉCTRICO

grupo sulfhidrido libre y/o puentes disulfuro. Para ello puede aplicarse el mapeo peptídico (en condiciones reductoras y no reductoras), espectrometría de masas u otras técnicas apropiadas.

- d) Estructura de carbohidratos: en el caso de las glicoproteínas, la descripción de la porción glucídica constituye un elemento fundamental ya que no solo permite identificarlas sino que es posible verificar la consistencia del proceso productivo, ya que es sabido que el perfil de glicosilación es sensible a cambios en el entorno celular. Dentro de las determinaciones analíticas que pueden aplicarse se pueden mencionar el contenido de carbohidratos cargados (que estará condicionado fundamentalmente por la sustitución de las cadenas de azúcares con residuos de ácido siálico) (Figura 14.2), el contenido de formas conteniendo fucosa proximal (fucosilación) o galactosa terminal (galactosilación). Además, podrá determinarse la antenaridad y el/los sitios de glicosilación.

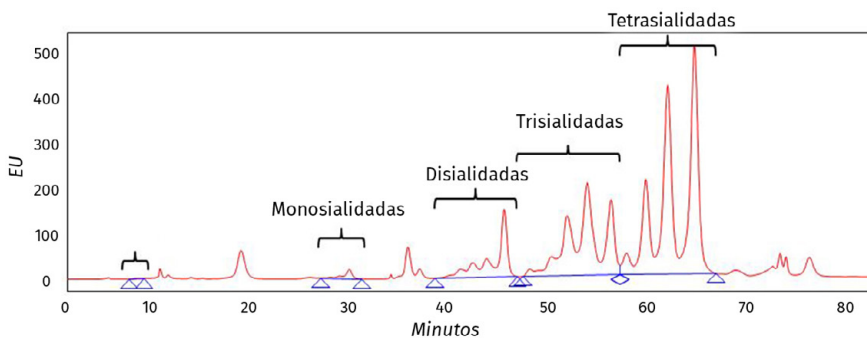


FIGURA 14.2. CROMATOGRAMA DE HPLC OBTENIDO PARA EL ANÁLISIS DE GLICANOS DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO. LOS GRUPOS DE PICOS CORRESPONDEN A ESTRUCTURAS NEUTRAS, MONOSIALIDADAS, BISIALIDADAS, TRISIALIDADAS Y TETRASIALIDADAS

14.3.3. Pureza

Conforme a la Guía Internacional de Calidad ICH Q6B, las variantes de un anticuerpo monoclonal (mAb) pueden clasificarse como «sustancias relacionadas con el producto» o «impurezas relacionadas con el producto». Las sustancias relacionadas con el producto se definen como «variantes moleculares del producto deseado formado durante la fabricación y/o el almacenamiento que están activas y no tienen ningún efecto perjudicial sobre la seguridad y eficacia del producto farmacéutico». Estas variantes poseen características comparables al producto deseado y no se consideran impurezas.

Las impurezas relacionadas con el producto se definen como variantes moleculares de los productos deseados (por ejemplo, precursores, ciertos productos de degradación que surgen durante la fabricación y/o almacenamiento) que no tienen características comparables con el producto en términos de actividad, seguridad o eficacia (Figura 14.3). Deberá fijarse un criterio de aceptación para determinar el nivel permitido de estas impurezas y también se deberá contar con métodos analíticos adecuados para evaluar el cambio en el nivel de estas sustancias a lo largo de la producción o almacenamiento del producto.

14.3.4. Potencia

La potencia se suele considerar como «la capacidad de un producto para producir una actividad biológica esperada». A mayor potencia de un determinado producto, menor será la cantidad necesaria para ejercer el efecto deseado. La determinación de la potencia biológica desempeña un papel clave

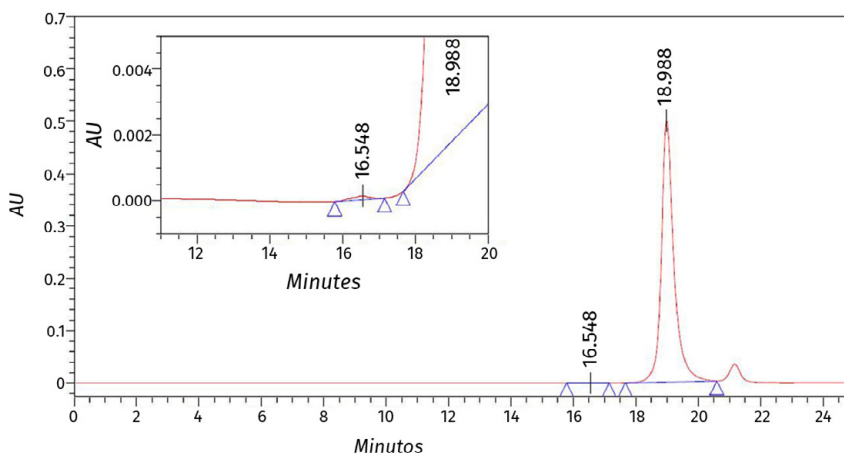


FIGURA 14.3. CROMATOGRAMA CORRESPONDIENTE A LA DETERMINACIÓN DE AGREGADOS DE FILGRASTIM. LOS AGREGADOS ELUYEN A LOS 16,548 MIN MIENTRAS QUE EL MONÓMERO DE FILGRASTIM ELUYE A LOS 18,988 MINUTOS

en el desarrollo, registro y control de los productos biológicos y derivados de la biotecnología. Los ensayos de potencia se utilizan para liberar lotes de productos medicinales y también para demostrar la consistencia del proceso productivo y la estabilidad del producto.

Durante el diseño de un ensayo de potencia se debe tener en cuenta que debe satisfacer algunos requerimientos:

- Medir una actividad biológica relevante del producto.
- Medir una propiedad específica del producto.
- Ser cuantitativo.
- Incluir el uso de un estándar de referencia para comparación.
- Debe ser lo suficientemente robusto como para poder ser validado.

El enfoque general de la mayoría de los bioensayos es realizar un ensayo de dilución, que mide las respuestas biológicas en varias dosis (Figura 14.4). Como supuesto se asume que el componente activo sigue el mismo principio de actividad que un patrón utilizado como el estándar. Este concepto de similitud puede controlarse utilizando el modelo de líneas paralelas u otros ensayos estadísticos.

La muestra se ensayó por quintuplicado para tres dosis y la respuesta obtenida se comparó con la del estándar, también ensayado por quintuplicado para las mismas dosis.

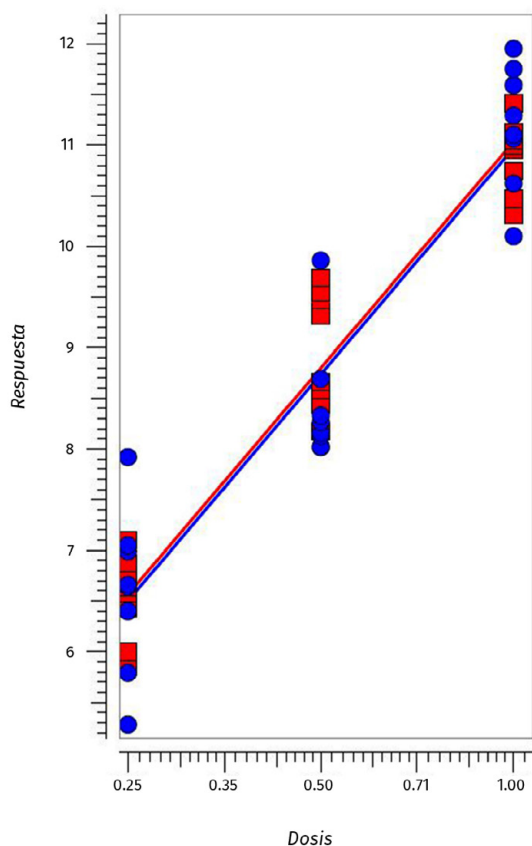


FIGURA 14.4. GRÁFICO DE DOSIS-RESPUESTA OBTENIDO EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR TF-1

14.4. ESTÁNDARES Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Un estándar de referencia o, material de referencia, es una sustancia preparada para su uso como el estándar en un ensayo de identificación, pureza o potencia. Debe tener una calidad adecuada a su uso. Los estándares de referencia desempeñan funciones esenciales durante el ciclo de vida de las terapias biológicas ya que permiten garantizar que los ensayos analíticos son consistentes.

Los estándares de referencia pueden obtenerse de la Farmacopea Europea (EP), Farmacopea de Estados Unidos (USP), Organización Mundial de la Salud (OMS) y otros organismos internacionales. Los materiales de referencia de otras fuentes deben caracterizarse por procedimientos descritos en la guía ICH Q6B. Se deberán emplear métodos ortogonales para medir su identidad, características estructurales, potencia, pureza e impurezas.

Conforme a la Disposición de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) 3602/2018, los estándares de referencia se clasifican de la siguiente manera:

Sustancia de Referencia de Farmacopea Internacional: Material de uniformidad comprobada, cuya monografía ha sido incluida en farmacopeas reconocidas internacionalmente, como USP, EP, BP entre otras, desarrollado total o parcialmente por esa institución y avalado por dicha Farmacopea. Su empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se comparan sus propiedades con las de un producto en análisis y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Estándar Secundario: material de uniformidad comprobada, cuya monografía ha sido incluida en la Farmacopea Argentina y/o en alguna de las Farmacopeas internacionalmente reconocidas, desarrollado en el país bajo responsabilidad del usuario, caracterizado frente a una Sustancia de Referencia de alguna de las mencionadas Farmacopeas, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se comparan sus propiedades con las de un producto en análisis y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Estándar de Trabajo: Material de uniformidad comprobada, cuya monografía no ha sido incluida en la Farmacopea Argentina ni en Farmacopeas internacionalmente reconocidas, desarrollado en el país bajo responsabilidad del usuario, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos, en los que se comparan sus propiedades con las de un producto en análisis y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Referencias bibliográficas

- AMADEO, I., MAURO, L.V., ORTÍ, E., FORNO, G.** (2011). Determination of robustness and optimal work conditions for a purification process of a therapeutic recombinant protein using response surface methodology. *Biotechnol Prog.* 27(3), 724–32. 10.1002/btpr.588
- AMADEO, I., MAURO, L., ORTÍ, E., FORNO, G.** (2014) Establishment of a design space for biopharmaceutical purification processes using DoE. *Methods Mol. Biol.*, 1129, 11–27. 10.1007/978-1-62703-977-2_2
- ALT, N., ZHANG, T.Y., MOTCHNIK, P., TATICEK, R., QUARMBY, V., SCHLOTHAUER, T., BECK, H., EMRICH, T., HARRIS, R.J.** (2016). Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals* 44(5), 291–305. 10.1016/j.biologicals.2016.06.005
- ANMAT** (2018, 13 de agosto). *Disposición 3602/2018 Guía de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos Humanos.*
- BUCKLEY, K., RYDER, A.G.** (2017). *Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing: A Short Review.* *Appl. Spectrosc.*, 71(6), 1085–1116. 10.1177/0003702817703270
- CHAROO, N. A., ALI, A. A.** (2013). Quality risk management in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm.* Jul., 39(7), 947–960. 10.3109/03639045.2012.699065
- DEBEVEC, V., SRČIČ, S., HORVAT, M.** (2018). Scientific, statistical, practical, and regulatory considerations in design space development. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44(3), 349–364. 10.1080/03639045.2017.1409755
- ESMONDE-WHITE, K. A., CUELLAR, M., UERPMANN, C., LENAIN, B., LEWIS, I. R.** (2017). Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing. *Anal Bioanal. Chem.*, 409(3), 637–649. 10.1007/s00216-016-9824-1
- FDA** (2004, September). *Guidance for Industry. PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance* us Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) Office of Regulatory Affairs (ORA) Pharmaceutical CGMPs.
- FERREIRA, A. P., TOBYN, M.** (2015). Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era. *Pharm Dev Technol*, 20(5), 513–527. 10.3109/10837450.2014.898656
- FINKLER, C., KRUMMEN, L.** (2016). Introduction to the application of QbD principles for the development of monoclonal antibodies. *Biologicals*, 44(5), 282–290. 10.1016/j.biologicals.2016.07.004
- GUERRA, A., VON STOSCH, M., GLASSEY, J.** (2019). Toward biotherapeutic product real-time quality monitoring. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39(3), 289–305. 10.1080/07388551.2018.1524362

- HAKEMEYER, C., MCKNIGHT, N., ST. JOHN, R., MEIER, S., TREXLER-SCHMIDT, M., KELLEY, B., ZETTL, F., PUSKEILER, R., KLEINJANS, A., LIM, F., WURTH, C.** (2016). Process characterization and Design Space definition. *Biologicals*, 44(5), 306–318. 10.1016/j.biologicals.2016.06.004
- HINZ, D. C.** (2013). Process analytical technologies in the pharmaceutical industry: the FDA's PAT initiative. *Anal Bioanal Chem*, 384(5), 1036–1042.
- ICH** (1999). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, Q6B: Step 5*, Geneva.
- ICH** (2009). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8 (R2)*, Geneva.
- ICH** (2005). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Quality Risk Management, Q9*, Geneva.
- ICH** (2008). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Quality System, Q10*, Geneva.
- ICH** (2012). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities), Q11*, Geneva.
- JIANG, M., SEVERSON, K.A., LOVE, J. C., MADDEN, H., SWANN, P., ZANG, L., BRAATZ, R. D.** (2017). Opportunities and challenges of real-time release testing in biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol. Bioeng*, 114(11), 2445–2456. 10.1002/bit.26383
- KARMANN, S., FOLLONIER, S., EGGER, D., HEBEL, D., PANKE, S., ZINN, M.** (2017). Tailor-made PAT platform for safe syngas fermentations in batch, fed-batch and chemostat mode with *Rhodospirillum rubrum*. *Microb Biotechnol*, 10(6), 1365–1375. 10.1111/1751-7915.12727
- MERCIER, S. M., DIEPENBROEK, B., WIJFFELS, R. H., STREEFLAND, M.** (2014). Multivariate PAT solutions for biopharmaceutical cultivation: current progress and limitations. *Trends Biotechnol*, 32(6), 329–336. 10.1016/j.tibtech.2014.03.008
- MISHRA, V., THAKUR, S., PATIL, A., SHUKLA, A.** (2018). Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opin. Drug Deliv*, 15(8), 737–758. 10.1080/17425247.2018.1504768
- PAIS, D. A., CARRONDO, M. J., ALVES, P. M., TEIXEIRA, A. P.** (2014). Towards real-time monitoring of therapeutic protein quality in mammalian cell processes. *Curr. Opin. Biotechnol*, 30, 161–7. 10.1016/j.copbio.2014.06.019
- PATEL, B. A., PINTO, N. D. S., GOSPODAREK, A., KILGORE, B., GOSWAMI, K., NAPOLI, W. N., DESAI, J., HEO, J. H., PANZERA, D., POLLARD, D., RICHARDSON, D., BROWER, M., RICHARDSON, D. D.** (2017). On-Line Ion Exchange Liquid Chromatography as a Process Analytical Technology for Monoclonal Antibody Characterization in Continuous Bioprocessing. *Anal Chem*, 89(21), 11357–11365. 10.1021/acs.analchem.7b02228

- PERAMAN, R., BHADRAYA, K., PADMANABHA REDDY, Y.** (2015). Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics. *Int. J. Anal Chem.*, 868727.
- PATHAK, M., DUTTA, D., RATHORE, A.** (2014). Analytical QbD: development of a native gel electrophoresis method for measurement of monoclonal antibody aggregates. *Electrophoresis*, 35(15), 2163–71. 10.1002/elps.201400055
- PETERS, J., TESKE, A., TAUTE, W., DÖSCHER, C., HÖFT, M., KNÖCHEL, R., BREITKREUTZ, J.** (2018). Real-time process monitoring in a semi-continuous fluid-bed dryer – microwave resonance technology versus near-infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 537(1–2), 193–201. 10.1016/j.ijpharm.2017.12.040
- POLITIS, S. N., COLOMBO, P., COLOMBO, G., REKKAS, D. M.** (2017). Drug Dev Ind Pharm. *Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. Jun.*, 43(6), 889–901. 10.1080/03639045.2017.1291672
- REPKA, M. A., BANDARI, S., KALLAKUNTA, V. R., VO, A. Q., MCFALL, H., PIMPARADE, M. B., BHAGURKAR, A. M.** (2018). Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review. *Int. J. Pharm.* 535(1–2), 68–85. 10.1016/j.ijpharm.2017.10.056
- ROZET, E., LEBRUN, P., MICHIELS, J. F., SONDAG, P., SCHERDER, T., BOULANGER, B.** (2015). Analytical procedure validation and the quality by design paradigm. *J. Biopharm Stat.*, 25(2), 260–268. 10.1080/10543406.2014.971176
- SHARMA, P., KESSLER, W. J., BOGNER, R., THAKUR, M., PIKAL, M. J.** (2019). Applications of the Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy: In-Process Estimation of Primary Drying Heterogeneity and Product Temperature During Lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 108(1), 416–430. 10.1016/j.xphs.2018.07.031
- TABORA, J. E., DOMAGALSKI, N.** (2017). Multivariate Analysis and Statistics in Pharmaceutical Process Research and Development. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 7;8, 403–426. 10.1146/annurev-chembioeng-060816-101418
- TEXEIRA, A. P., OLIVEIRA, R., ALVES, P. M., CARRONDO, M. J. T.** (2009). Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: supporting the PAT initiative. *Biotech. Adv.*, 27, 726–732. 10.1016/j.biotechadv.2009.05.003
- TIWARI, A., KATEJA, N., CHANANA, S., RATHORE, A. S.** (2018). Use of HPLC as an Enabler of Process Analytical Technology in Process Chromatography. *Anal Chem.*, 90(13), 7824–7829. 10.1021/acs.analchem.8b00897.
- YU, L. X., AMIDON, G., KHAN, M. A., HOAG, S. W., POLLI, J., RAJU, G. K., WOODCOCK, J.** (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.*, 16(4), 771–783. 10.1208/s12248-014-9598-3
- WANG, X., AN, Z., LUO, W., XIA, N., ZHAO, Q.** (2018). Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell.*, 9(1):74–85. 10.1007/s13238-017-0447-x
- WANG, X., ESQUERRE, C., DOWNEY, G., HENIHAN, L., O'CALLAGHAN, D., O'DONNELL, C.** (2018). Assessment of infant formula quality and composition using Vis-NIR, MIR and Raman process analytical technologies. *Talanta*, 183, 320–328. 10.1016/j.talanta.2018.02.080
- ZURDO, J., ARNELL, A., OBREZANOVA, O., SMITH, N., GÓMEZ DE LA CUESTA, R., GALLAGHER, T. R., MICHAEL, R., STALLWOOD, Y., EKBLAD, C., ABRAHMSÉN, L., HÖIDÉN-GUTHENBERG, I.** (2015). Early implementation of QbD in biopharmaceutical development: a practical example. *Biomed Res Int.*, 605427. 10.1155/2015/605427

15

Comparabilidad y similitud de glicoproteínas terapéuticas

Aspectos regulatorios

LAURA V. MAURO

15.1. GENÉRICOS Y BIOSIMILARES

Un medicamento genérico es aquel que tiene la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica que un medicamento previamente aprobado, cuya patente ha expirado, con el cual ha demostrado su bioequivalencia en términos de farmacocinética y farmacodinamia. Las drogas genéricas son moléculas pequeñas de estructura sencilla que pueden ser reproducidas de forma idéntica por síntesis química. Estos medicamentos, en la mayoría de los países, suelen ser autorizados mediante mecanismos legales abreviados al demostrar que tienen la misma calidad, contenido, pureza y un perfil farmacocinético comparable al de un producto ya autorizado, llamado de referencia o innovador. Esta aprobación abreviada se basa en la idea de que dos productos con el mismo principio activo y con igual biodisponibilidad son tan parecidos que sus efectos terapéuticos, además de su seguridad y eficacia, serán esencialmente los mismos, y por lo tanto, serán intercambiables (Wang; Chow, 2012:353). Así, la aprobación de un genérico no requiere de estudios toxicológicos o farmacológicos ni resultados de ensayos clínicos lo que redundará en un proceso de aprobación menos oneroso, con el consecuente menor costo de los genéricos culminando en grandes ahorros para el sistema de salud.

En 1982 se aprobó el uso terapéutico de la insulina recombinante, convirtiéndose en el primer bioterapéutico en ser aprobado y desde entonces el número de productos biológicos ha aumentado vertiginosamente. Los productos medicinales biológicos o bioterapéuticos son aquellas medicinas cuya sustancia activa es producida por organismos vivos naturalmente variables o derivada de organismos vivos mediante ADN recombinante y/o la expresión controlada de genes. Estos productos pueden ser polipéptidos, proteínas, glicoproteínas o ácidos nucleicos, con características moleculares más complejas que las drogas de síntesis química. Estas últimas suelen tener un peso molecular entre 100 y 1000 Da, mientras que el peso molecular de los productos biológicos puede estar entre 18 y 150 kDa. La Figura 15.1 muestra la diferencia en tamaño y complejidad existente entre una aspirina sintetizada químicamente cuya masa es de 180 Da y un anticuerpo monoclonal producido biológicamente de alrededor de 150 000 Da.

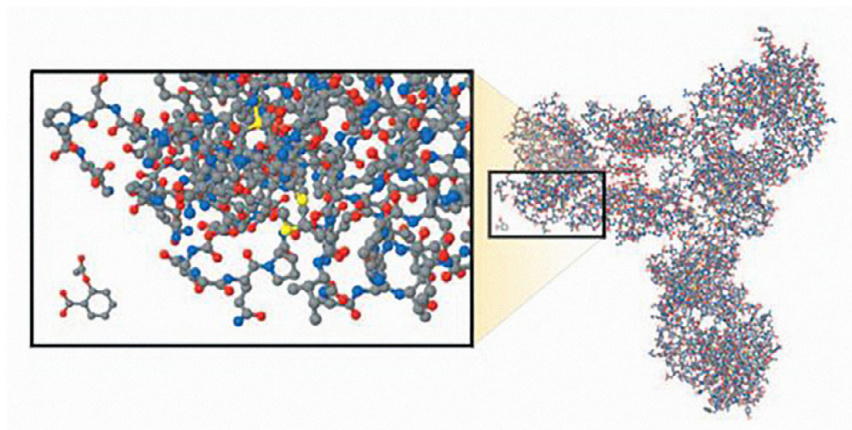


FIGURA 15.1. COMPARACIÓN ENTRE UN ANTICUERPO MONOCLONAL Y UNA MOLÉCULA DE ASPIRINA FUENTE: EXTRAÍDO DE KOZLOWSKI *ET AL.*, 2011:385–388

Los bioterapéuticos son moléculas altamente complejas con una estructura primaria (determinada por la secuencia de aminoácidos si el terapéutico es una proteína por ejemplo) y de orden superior (secundaria, terciaria y potencialmente hasta cuaternaria resultante de la asociación de dos o más subunidades proteicas). Las drogas de moléculas pequeñas tienen, por el contrario, una estructura tan simple que puede ser reproducida por síntesis química. Como consecuencia de sus diferencias en estructura y tamaño, las moléculas pequeñas y los biológicos difieren en su ruta de administración, siendo los primeros administrados generalmente en forma oral y los segundos de manera parenteral. Los sistemas vivos en los que se producen los bioterapéuticos son inherentemente variables provocando variaciones en las modificaciones postraduccionales, tal como la glicosilación, por ejemplo. Así, los productos biológicos son una mezcla de variantes de la misma proteína y no una entidad molecular única como es el caso de las drogas pequeñas. Por otro lado, debido en gran parte a su gran tamaño, los productos biológicos tienen el potencial de ser reconocidos por el cuerpo como un agente extraño, lo que les confiere mayor potencial inmunogénico, es decir que son capaces de provocar una respuesta inmune (Olech 2016:S1).

Entre los principales factores que influyen en la composición de un producto biológico recombinante se encuentran: el plásmido usado, la célula huésped (cada productor tendrá su propia línea celular productora de la proteína de interés), el proceso de cultivo (el medio de cultivo, características del biorreactor, entre otros factores), las modificaciones postraduccionales (glicosilación, oxidación, etc.) y los pasos de purificación (Jelkmann, 2010:771). Así, cuando una empresa elaboradora de bioterapéuticos busca producir su propia versión de un producto biológico de otra compañía, la variabilidad natural de la fuente biológica en la que se genera (cada

elaborador tiene su propia línea celular productora) y el uso inevitable de procesos y métodos de manufactura diferentes producirán un producto con algunas diferencias en sus características estructurales con respecto al original. Todo esto, sumado a su complejidad estructural, hace poco probable la demostración inequívoca de que un producto biológico es idéntico a otro. Surge así el concepto de biosimilar.

Si bien las agencias regulatorias como la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) tienen ciertas diferencias en lo que definen como un biosimilar, se pueden establecer algunos aspectos en común:

- Es un producto biológico (pueden ser proteínas obtenidas mediante tecnología de ADN recombinante o pueden ser sustancias biológicas obtenidas mediante la extracción de fuentes biológicas tales como las heparinas de bajo peso molecular, por ejemplo).
- Altamente similar a un producto de referencia aprobado previamente para su comercialización y cuya patente ha vencido.
- No debe tener diferencias clínicamente significativas con el producto de referencia, debiendo demostrar similitud en términos de calidad, potencia, pureza, seguridad y eficacia.

El objetivo del desarrollo de un biosimilar es demostrar su alta similitud en términos de estructura, actividad biológica, eficacia y seguridad con el producto innovador. Con esta demostración, el biosimilar puede apoyarse en la experiencia ganada sobre la seguridad y eficacia del producto de referencia, evitando la repetición innecesaria de ensayos clínicos que ya fueron llevados a cabo con el producto innovador y accediendo a un proceso de aprobación abreviado aunque no menos riguroso. Sumado a esto, si se ha demostrado con gran cantidad de evidencia científica que un biosimilar es altamente parecido al producto de referencia y que tiene una seguridad y eficacia comparable para cierta indicación terapéutica, su perfil de seguridad y efectividad puede extrapolarse a otras indicaciones para las que el producto de referencia ha sido aprobado.

Otras consideraciones a tener en cuenta para el desarrollo de un biosimilar es que debe presentarse en las mismas dosis que el producto de referencia y utilizar el mismo mecanismo de acción y vía de administración. Las autoridades regulatorias requieren además que el elaborador de un biosimilar compare su producto con el de referencia aprobado para la región en la que la mencionada autoridad regulatoria es competente. Es decir, cuando un biosimilar es presentado en Europa, la EMA requiere que el producto de referencia sea el aprobado para comercializar en Europa, mientras que un producto aprobado en Estados Unidos será necesario como referencia cuando el biosimilar se presente ante la FDA, incluso si el principio activo de los productos de referencia comercializados en Europa y Estados Unidos es el mismo. Se ha hecho evidente que este requerimiento duplica los estudios

clínicos elevando el costo del desarrollo de un biosimilar. Actualmente, con datos científicos que demuestren que los productos de referencia de Europa y Estados Unidos son indistinguibles uno del otro, el patrocinador de un biosimilar puede obviar la repetición de ciertos estudios críticos (McCamish; Woollett, 2011:212).

En forma parecida a lo que sucede con los productos genéricos, cuando una patente expira, una proteína terapéutica puede ser producida por otras compañías para competir en el mercado, lo que asegura al paciente el acceso a un bioterapéutico seguro y eficaz más económico. Sin embargo, la complejidad de los biosimilares, por ser proteínas de alto peso molecular con una heterogeneidad inherente por ser producidas en organismos vivos con complicados procesos de elaboración, hace que se requiera un marco regulatorio específico para su aprobación.

Actualmente es ampliamente reconocido que por diversas razones una droga producida biológicamente no puede ser aprobada con el mismo mecanismo regulatorio aplicado a un genérico. La agencia europea EMA fue la primera en aprobar un biosimilar de somatotropina (Omnitrope) en 2006, habiendo establecido previamente un mecanismo regulatorio específico que si bien se caracteriza por ser un proceso abreviado aún requiere de la presentación rigurosa de una cantidad extensa de datos con los mismos estándares de calidad, seguridad y eficacia que se aplican para la aprobación de un biológico innovador. En este sentido, EMA ha publicado desde 2005 guías científicas específicas a seguir por los desarrolladores de biosimilares de forma tal de cumplir con los requisitos para su aprobación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también ha publicado guías para la aprobación de biosimilares con el fin de facilitar una armonización global. Basados en las guías de EMA y OMS, otros países como Canadá, Japón y Corea han editado sus propias guías sobre biosimilares. Por su parte, la FDA autorizó la aprobación de biosimilares en 2010 y desde 2012 ha publicado guías que resumen el enfoque general que se espera un solicitante utilice para demostrar la similitud de este tipo de productos. En Argentina, en 2011, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), siguiendo los lineamientos de las guías de la OMS, pone en vigencia las disposiciones N° 7075-11 y N° 3397-12 donde se establecen los requisitos y exigencias científicas y técnicas para el registro de productos biológicos y/o producidos con ADN recombinante y la disposición N° 7729-11 destinada a específicamente a biosimilares. En octubre de 2012, se aprobó en Argentina (por disposición N° 7060-14) la comercialización de Novex (Laboratorios Elea), biosimilar de rituximab, convirtiéndose en el primero en ser aprobado en América Latina.

Si bien las guías de los diferentes países difieren en ciertos aspectos, los conceptos básicos y los principios más importantes, por ejemplo el uso de un mecanismo abreviado para la aprobación de un biosimilar, son semejantes. En este sentido el Comité Internacional de Armonización (ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals*

for Human Use) publica guías internacionales armonizadas entre diferentes países, con el fin de establecer estándares internacionales consistentes para las distintas agencias regulatorias del mundo y las industrias farmacéuticas con el fin de eliminar la necesidad de duplicar estudios para satisfacer requerimientos regulatorios distintos.

15.2. PASOS PARA EL DESARROLLO DE UN BIOTERAPÉUTICO

Como se mencionó, la elaboración de productos medicinales de origen biológico es más compleja que la de moléculas generadas químicamente. Un producto biológico es un agente terapéutico, generalmente una proteína, derivado de células u organismos vivos naturalmente variables, que consiste en una población de entidades moleculares complejas difíciles de caracterizar en forma completa. Esta variabilidad debe estar contenida en un rango aceptable haciendo necesarios controles estrictos durante la manufactura del producto para asegurar la consistencia entre lotes del mismo producto medicinal de forma tal de asegurar la seguridad y la eficacia del producto. En líneas generales, y como se explicará más adelante, en el caso de un biosimilar, se espera que esta variabilidad esté dentro de la del producto de referencia.

Todo el proceso de manufactura de un producto biológico, sea biosimilar o innovador, debe estar muy bien controlado debido a que pequeñas variaciones o cambios pueden tener gran impacto en la calidad del producto afectando características tales como la estructura primaria y/o de orden superior, las modificaciones postraduccionales o el contenido de impurezas. Debido a que estos cambios pueden afectar la seguridad y eficacia final del producto terapéutico es que el control de los procesos de manufactura está altamente regulado. En este sentido las guías internacionales, tales como ICH Q8 (*Pharmaceutical Development*), Q9 (*Quality Risk Management*), Q10 (*Pharmaceutical Quality System*) y Q11 (*Development and Manufacture of Drug Substances*), señalan la necesidad de identificar, valorar y controlar los riesgos derivados de la variabilidad en la fabricación desde las etapas de desarrollo y caracterizar el producto y el proceso, estableciendo especificaciones e identificando atributos y parámetros críticos. De estas guías se desprenden conceptos como la Calidad por Diseño (QbD, *Quality by Design*) consistente en un abordaje sistemático, con principios científicos y basados en el riesgo para el desarrollo de un terapéutico, promoviendo el conocimiento del producto y del proceso de manera tal que la calidad sea construida desde el desarrollo y a lo largo del proceso de manufactura en vez de ser solo evaluada después del desarrollo. Así, el producto es diseñado para cumplir con el desempeño clínico deseado y su proceso de manufactura es desarrollado para arrojar un producto que cumpla con los atributos de calidad necesarios de manera consistente.

El primer paso en el proceso de desarrollo de un terapéutico es el establecimiento de los atributos de calidad que este debe poseer. En la guía ICH Q8 se introduce el concepto de QTPP (*Quality Target Product Profile*) referido al perfil a alcanzar en la calidad del producto (innovador o biosimilar) como el primer paso del desarrollo. El QTPP es un resumen prospectivo de las características de calidad de un producto que será idealmente alcanzado para asegurar la seguridad y la eficacia deseada. Este resumen de características incluye aspectos como la vía de administración, la dosis, la biodisponibilidad, la calidad y la estabilidad. En el caso de un biosimilar el QTPP se establece manteniendo el producto innovador al que el producto debe asemejarse como referencia; esto hace que sea necesaria una caracterización detallada del producto de referencia que incluya la variabilidad entre lotes usando técnicas analíticas modernas como primer paso para el desarrollo del biosimilar. Así, la generación del QTPP es de naturaleza dinámica, se desarrolla a medida que se gana conocimiento del producto de referencia y cualquier variación detectada en el producto de referencia se verá reflejada en el QTPP. Conocer los atributos de calidad deseados al principio del desarrollo minimiza el riesgo de no alcanzar la similaridad al final del proceso.

El siguiente paso que debe incluir el desarrollo de un terapéutico es la identificación de los atributos de calidad críticos (CQA, *Critical Quality Attributes*), es decir, aquellas características o propiedades físicas, químicas, biológicas o microbiológicas que deberían mantenerse dentro de ciertos límites para asegurar la calidad del producto final. La lista de potenciales atributos de calidad críticos puede ir modificándose a medida que se obtiene mayor conocimiento del producto y del proceso productivo.

Quienes desarrollan un producto biosimilar no tienen acceso a los datos del proceso de manufactura del producto innovador o de referencia por estar protegidos por la compañía originadora, debiendo desarrollar entonces un proceso de elaboración propio capaz de obtener un producto lo más similar posible al de referencia (Al-Sabbagh, 2016:S11). El primer paso en la producción de un biológico es la obtención de una línea celular que contenga el gen que codifica la proteína de interés en cantidades suficientes y con las características postraduccionales deseadas. Ya en el proceso de manufactura hay tres etapas importantes: (1) la expansión celular y la expresión de la proteína, (2) la purificación de la proteína de interés y (3) la formulación y envasado del producto final.

El proceso de elaboración desarrollado debe ser estrictamente controlado, ya que pequeños cambios pueden tener un gran impacto en la eficacia y seguridad del producto. En este sentido, las guías internacionales alientan la identificación (en función del conocimiento previo, la experimentación o la evaluación sistemática de: 1) parámetros de proceso críticos (CPP, *Critical Process Parameter*), es decir, aquellos cuya variabilidad puede impactar en un atributo de calidad crítico y que, por ende, debería ser monitoreado o controlado para asegurar que el proceso produce la calidad deseada; y 2)

atributos materiales críticos (CMA, *Critical Material Attribute*) como aquellas propiedades físicas, químicas, biológicas o microbiológicas del material de entrada que deberían estar dentro de ciertos límites para asegurar la calidad deseada del material de salida.

La identificación de materiales y parámetros críticos que pueden afectar potencialmente los atributos de calidad críticos puede realizarse a través de la valoración del riesgo, herramienta de bases científicas descrita en la ICH Q9 (*Quality Risk Management*) que permite la identificación y clasificación de parámetros (del proceso, equipamiento, materiales de entrada) que tienen la capacidad de impactar en la calidad del producto. La valoración del riesgo se realiza en las primeras etapas del desarrollo del proceso con los primeros datos experimentales y es repetido a medida que se dispone de mayor información y conocimiento.

Una forma de definir y valorar el riesgo es respondiendo las siguientes preguntas: (1) ¿Qué puede salir mal? (2) ¿Cuál es la probabilidad de que salga mal? (3) ¿Cuál es la severidad de las consecuencias? El resultado de la valoración del riesgo es un estimador cuantitativo (expresado como una probabilidad numérica) o una descripción cualitativa de un rango de riesgo (por ejemplo, el riesgo puede ser expresado como «alto», «medio» o «bajo»). El objetivo final es definir una estrategia de control en base al creciente conocimiento del producto y de su proceso de elaboración que permita obtener un producto de calidad consistente, sea un biosimilar o un innovador.

15.3. MECANISMO DE APROBACIÓN DE UN BIOSIMILAR – DEMOSTRACIÓN DE BIOSIMILITUD

De lo mencionado anteriormente se desprende que el desarrollo de un biosimilar debería cubrir dos aspectos:

- Un proceso de manufactura consistente y diseñado para cumplir con el QTPP.
- Características moleculares y atributos de calidad incluidos en el QTPP que sean comparables con el producto de referencia.

Si bien tanto el desarrollo de un producto innovador como el de un biosimilar involucran ensayos analíticos, no clínicos y clínicos, es diferente el énfasis puesto en cada etapa (Figura 15.2).

Los productos originadores deben establecer y evaluar el beneficio para el paciente a través de ensayos clínicos que demuestren seguridad y eficacia. Luego de que el producto de referencia ha obtenido su permiso de comercialización y a medida que pasa años en el mercado se acumula un gran número de evidencia de su seguridad y eficacia. Ya que un biosimilar se utilizará para el tratamiento de la misma enfermedad, con la(s) misma(s) dosis y vía(s) de

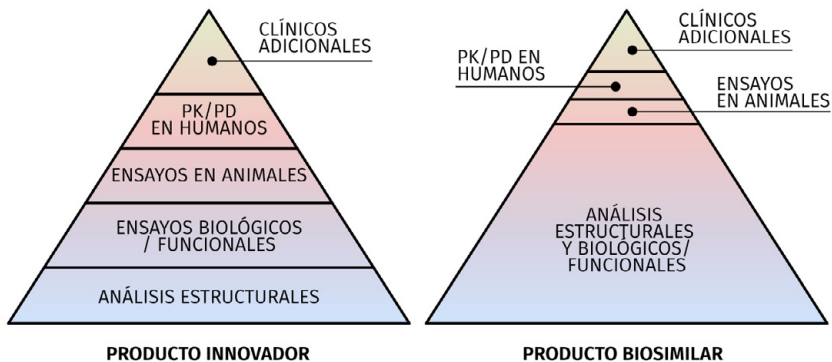


FIGURA 15.2. REQUERIMIENTOS DE ANÁLISIS ESTRUCTURALES, CLÍNICOS Y NO CLÍNICOS PARA UN PRODUCTO INNOVADOR Y UN BIOSIMILAR

administración, el esfuerzo estará puesto en demostrar suficiente similitud con el producto de referencia y no en demostrar el beneficio para el paciente. Así, en el caso de los biosimilares, si se minimizan las diferencias estructurales y funcionales con el producto de referencia se pueden disminuir las incertezas sobre los posibles impactos en la seguridad y eficacia del producto a través del conocimiento y la experiencia ganados con el producto de referencia y obtener finalmente la reducción de los requerimientos de los ensayos clínicos necesarios para su aprobación. Ya que el biosimilar se administrará por la misma vía y en la misma dosis que el producto de referencia no serán necesarios ensayos de evaluación de dosis y, generalmente, solo serán requeridos estudios de farmacocinética y farmacodinamia y de comparabilidad clínica en una población de pacientes para evaluar la similitud en seguridad y eficacia entre el biosimilar y el innovador.

Debido a que el proceso de manufactura de un biosimilar es diferente al del producto innovador (protegido por la propiedad intelectual de la empresa productora), y dada la complejidad de los productos biológicos, es necesario descartar a través del ejercicio de comparabilidad los posibles impactos de las diferencias en la seguridad y eficacia del producto. La caracterización fisicoquímica del producto no es suficiente para demostrar la similitud, será la totalidad de la evidencia, incluyendo datos analíticos y funcionales y estudios preclínicos y clínicos, lo que permita establecer la similitud entre productos. Las agencias regulatorias han establecido requerimientos estrictos para el establecimiento de la similitud entre productos. Tanto EMA como FDA han editado guías específicas donde se establecen criterios para demostrar la similitud entre productos. Ambas agencias recomiendan un enfoque «escalonado» o «paso a paso» (*stepwise approach*), en el que cada escalón se construye en función de la construcción de escalones anteriores. Así, en cada escalón, el elaborador de un biosimilar debe evaluar si hay incertezas

residuales sobre la similitud de su producto con el de referencia e identificar los próximos pasos a seguir para abordar y desestimar esas incertezas.

El primer paso en la demostración de similitud es una extensa caracterización físicoquímica y funcional mediante el uso de técnicas ortogonales e incluidas en el estado del arte del producto biosimilar y el de referencia. El término ortogonal hace referencia al análisis de un mismo atributo de calidad con técnicas que se rigen con distintos principios. Por ejemplo, la estructura secundaria de una proteína podría ser estudiada por espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier y difracción circular aprovechando las diferencias que presentan en resolución para detectar láminas beta o hélices alfa, respectivamente.

Las diferencias analíticas que se consideren que tendrán impacto en las funciones biológicas deberían ser eliminadas durante el desarrollo del biosimilar. Así, el estudio de comparabilidad impulsa las mejoras del proceso volviéndose una operación iterativa y repetida durante el desarrollo del biosimilar que permite ir aumentando la similitud entre productos.

EMA y FDA sugieren en sus guías para biosimilares, que una caracterización estructural exhaustiva debería incluir la comparación del biosimilar y del producto de referencia con metodología sensible y específica en cuanto a:

- Estructura primaria, el biosimilar debe tener la misma secuencia de aminoácidos que el producto de referencia excepto por posibles heterogeneidades en los extremos donde los aminoácidos N- y C-terminal pueden faltar si se demuestra que no se provocan cambios en la performance del producto.
- Estructuras de orden superior, abarcando estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria (incluyendo agregación).
- Modificaciones postraduccionales enzimáticas como glicosilación y fosforilación.
- Otras posibles variaciones como la desaminación y oxidación.
- Modificaciones químicas intencionales como el agregado de sitios de PEGilación.

La caracterización estructural de ambos productos (innovador y biosimilar) debe ser realizada con múltiples lotes representativos de forma tal de entender la variabilidad de ambos productos durante el proceso de elaboración. Es posible que el proceso de manufactura del producto de referencia haya sufrido cambios (por ejemplo por un aumento en la escala de producción o por transferencia a un nuevo sitio de producción), incluso mientras es comercializado, y haya debido mostrar a la agencia reguladora, mediante estudios de comparabilidad, que las muestras pre y poscambio son comparables para poder continuar con su comercialización. Las variaciones pre y poscambio en el producto innovador proveen un rango para aquellos atributos que se vieron modificados que pueden ser considerados aceptables durante la evaluación de un biosimilar, ya que el producto innovador poscambio se administró exitosamente a pacientes.

En forma complementaria a los ensayos físicoquímicos deben realizarse aquellos que permiten una medida cuantitativa de la funcionalidad del producto. Los ensayos funcionales deben reflejar, en lo posible, el(los) mecanismo(s) de acción clínicamente relevante(s) conocido(s) para el producto de referencia. Dependiendo de la complejidad estructural del producto, es posible que los análisis físicoquímicos no sean capaces de confirmar la integridad de las estructuras de orden superior, pudiendo ser estas inferidas a partir de la actividad biológica.

Los ensayos funcionales dependerán de las propiedades biológicas del producto y pueden incluir ensayos de actividad biológica, de unión a ligando, de cinética enzimática, entre otros. Estos ensayos funcionales deben proveer evidencia de que el mecanismo de acción del biosimilar es el mismo que el conocido para el producto de referencia y de que la potencia del biosimilar propuesto es semejante a la del producto de referencia, apoyando así la idea de que no existen diferencias clínicamente significativas entre ambos productos. Estos ensayos deben ser lo suficientemente sensibles como para proveer evidencia de que las posibles diferencias observadas en los atributos de calidad anteriormente estudiados no tienen relevancia clínica. Estos ensayos deben realizarse sobre una cantidad de lotes de biosimilar y producto de referencia que dependerá de la variabilidad del ensayo y entre muestras, las cuales deberán incluir lotes del biosimilar que sean representativos de la calidad del material que usará posteriormente en los ensayos clínicos y que será finalmente comercializado.

Otro aspecto a comparar entre el biosimilar y el producto de referencia y requerido por las agencias regulatorias es el contenido de impurezas, aquellas relacionadas al producto y las relacionadas al proceso. Entre las primeras se encuentran aquellas que se producen por mecanismos de degradación específicos tales como la oxidación, desaminación, agregación, entre otros. Si el análisis comparativo entre el biosimilar y el producto de referencia revela contenidos similares de estas impurezas la necesidad de estudios farmacológicos y toxicológicos que caractericen sus posibles efectos biológicos se verá disminuida. Entre las impurezas relacionadas al proceso se encuentran aquellas que derivan de la célula productora (proteínas y ADN de la célula huésped), del medio de cultivo (antibióticos, componentes del medio) y de los pasos de purificación que incluye el proceso de manufactura (solventes residuales, endotoxinas, carga microbiana, entre otros). No se espera que el perfil de impurezas relacionadas al proceso del producto biosimilar concuerde con el del producto de referencia ya que son producidos por dos procesos diferentes. Sin embargo, se espera que el contenido de estas impurezas sea el mínimo posible de forma tal de disminuir los riesgos asociados y que se documenten y justifiquen los posibles impactos de las diferencias en la seguridad del producto biosimilar.

Cuanto más extensa y robusta, es decir que pueda distinguir diferencias en atributos relevantes, sea la comparación estructural y funcional entre el producto biosimilar y el innovador, más útil será para determinar qué estudios adicionales deben realizarse. Por ejemplo, una comparación rigurosa que muestre diferencias mínimas entre los productos fortalecerá la justificación de un abordaje selectivo y acotado a los ensayos en animales y clínicos para la demostración final de biosimilitud.

La demostración de biosimilitud a presentar ante las agencias regulatorias deberá incluir estudios en animales que incluyan evaluación de toxicidad, farmacocinética (PK), farmacodinamia (PD) e inmunogenicidad. La extensión de estos estudios dependerá de la información disponible sobre el producto de referencia, sobre el biosimilar y de las similitudes y diferencias encontradas en los pasos anteriores. Los estudios de toxicidad en animales, por ejemplo, serán considerados útiles si existe alguna especie animal que pueda arrojar datos relevantes (en las que la actividad biológica imite la respuesta humana) y si luego de la caracterización estructural y funcional aún se tienen incertezas sobre la seguridad del producto que deban ser desestimadas antes de comenzar estudios clínicos en humanos.

En algunas circunstancias, entre la evidencia que apoye la similitud entre el biosimilar y el producto de referencia es necesario incluir un estudio de dosis única en animales para demostrar la similitud en la PK y PD entre los productos. Por otro lado, las diferencias en el contenido de impurezas debido a los procesos de manufactura distintos del biosimilar y del innovador pueden provocar diferencias en la capacidad inmunogénica del producto volviendo necesaria la medición comparativa de anticuerpos anti proteína terapéutica. Si bien estos resultados en animales no pueden predecir el comportamiento inmune contra la proteína terapéutica en humanos, pueden reflejar cambios estructurales o diferencias funcionales que no fueron detectadas durante las etapas previas de caracterización.

Ya en la etapa de estudios clínicos se incluye la evaluación de la inmunogenicidad y farmacocinética o farmacodinamia necesarios para demostrar la seguridad, pureza y eficacia del biosimilar en una o más condiciones de uso para las que el producto de referencia fue aprobado y para las que el biosimilar requiere aprobación. El objetivo de los ensayos clínicos es, en general, evaluar las pequeñas diferencias que se hayan observado en los pasos previos y no para justificar diferencias sustanciales entre biosimilar e innovador en los atributos de calidad. Incluso las guías de EMA sostienen que en ciertas circunstancias puede no necesitarse un ensayo clínico si la eficacia y la seguridad de un producto pueden deducirse de lo evaluado entre el biosimilar y el innovador para otras indicaciones terapéuticas.

15.4. ¿CUÁN PARECIDO DEBE SER UN BIOSIMILAR AL PRODUCTO DE REFERENCIA?

Como ya se mencionara, para demostrar biosimilitud las agencias regulatorias recomiendan un enfoque paso a paso (*stepwise approach*) que comienza con la caracterización estructural y funcional de atributos de calidad críticos (CQA) para el resultado clínico y continúa con los estudios de PK/PD, estudios en animales, estudios de inmunogenicidad y finalmente estudios clínicos de seguridad y eficacia. Para los estudios analíticos la FDA sugiere actualmente que los CQAs sean identificados y clasificados en 3 niveles (*tiers*) según su criticidad, es decir, su posible efecto sobre el mecanismo de acción, la seguridad y eficacia final del producto (Chow, 2016). Los atributos del nivel 1 (*Tier 1*) serán aquellos con mayor riesgo de influir en el resultado clínico. En los niveles 2 y 3 se incluyen atributos con moderado o bajo efecto, respectivamente, sobre el desempeño clínico del producto. Cada nivel tiene asociado un tipo de análisis y rigor estadístico en base al riesgo asociado que se explicarán brevemente por escapar del alcance de este capítulo.

Tier 1: Test de equivalencia

Para aquellos atributos de alta criticidad, FDA recomienda una evaluación mediante un test de equivalencia (similar al test de bioequivalencia utilizado para el análisis de genéricos) para establecer la similitud entre el producto de referencia y el biosimilar. La equivalencia de atributos medibles en una escala continua puede evaluarse mediante el análisis de diferencias de medias entre el biosimilar y el producto de referencia. Este análisis estadístico implica la evaluación de la siguiente hipótesis nula de no-equivalencia:

$$H_0: \mu_T - \mu_R \leq -\delta \text{ o } \mu_T - \mu_R \geq \delta,$$

donde δ es el límite de equivalencia (o margen de similitud) y μ_T y μ_R son el promedio de la respuesta de los productos biosimilar y de referencia, respectivamente. FDA señala que este límite de equivalencia δ es una función de la variabilidad del producto de referencia (σ_R), es decir, $\delta = 1,5 * \sigma_R$. Como cada lote de producto de referencia evaluado contribuye con un valor para el atributo analizado, σ_R , es la desviación estándar de todos los valores obtenidos para ese atributo en el producto de referencia. Así, la similitud analítica para el atributo de calidad analizado se acepta si la hipótesis nula es rechazada, es decir, si el intervalo de confianza de la diferencia de medias cae dentro del rango $-\delta : \delta$.

Tier 2: Rango de calidad

En este tipo de análisis para comparar ambos productos el rango de aceptación para determinado atributo se establece como $\mu_R \pm X \cdot \sigma_R$, donde μ_R y σ_R son la media y la desviación estándar, respectivamente, del producto de referencia para el atributo evaluado y X una constante cuyo valor debe ser justificado. La similitud analítica será aceptada si un número suficiente de lotes del biosimilar están incluidos en el rango de calidad. Suponiendo que los datos analíticos tienen una distribución normal, si $X = 1,645$ se espera que el 90 % de los valores del producto de referencia estén dentro del rango de calidad. Si $X = 1,96$ es esperable que cerca del 95 % de los lotes del producto de referencia estén incluidos en ese rango. Así, la selección del valor de X puede impactar en la amplitud del rango de calidad y en consecuencia en la proporción de lotes incluidos en dicho rango.

Tier 3: Demostración visual

Los atributos evaluados dentro de este nivel deben ser los de menor riesgo de impacto clínico o aquellos atributos importantes que no pueden someterse a una evaluación cuantitativa. En este nivel la comparación del biosimilar e innovador se realiza a nivel de datos crudos o mediante una comparación gráfica. Es recomendable que los lotes evaluados en este nivel sean los mismos o un subconjunto de los evaluados en *Tier 1* y *2*.

15.5. PARA FINALIZAR

El vencimiento de las patentes de los productos innovadores ha abierto un nuevo camino para el desarrollo de biosimilares. La aprobación de biosimilares mejora el acceso de los pacientes a alternativas eficaces y seguras del mismo medicamento con los potenciales ahorros que esto conlleva. Si bien el panorama regulatorio concerniente al desarrollo y aprobación de biosimilares es muy variado en diferentes regiones del mundo, muchos países están trabajando en la armonización de los criterios, dirigiendo sus esfuerzos hacia el control riguroso de la calidad durante el proceso de desarrollo y aprobación de un biosimilar. De esta forma, profesionales de la salud y pacientes podrán confiar igualmente en la eficacia y seguridad del innovador y del biosimilar.

Referencias bibliográficas

- AL-SABBAGH, A., OLECH, E., MCCLELLAN, J. E., KIRCHHOFF, C. F.** (2016). Development of biosimilars. *Seminars in Arthritis and rheumatism*, 45, S11–S18.
- ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA.** ANMAT Disposición N° 3397–12.
- ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA.** ANMAT Disposición N° 7729–11.
- CHOW, S. C., SONG, F., BAI, H.** (2016). Analytical Similarity Assessment in Biosimilar Studies. *The AAPS Journal*, 10.1208/s12248-016-9882-5
- EMA** (2014). *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues.*
- FDA** (2017). *Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity. Guidance for Industry.*
- FDA** (2015). *Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry.*
- FDA** (2015). *Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry.*
- ICH HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE** (2009). *Pharmaceutical development Q8(R2).*
- ICH HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE** (2008). *Pharmaceutical quality system Q10.*
- ICH HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE** (2005). *Quality risk management Q9.*
- JELKMANN W.** (2010). Biosimilar epoetins and other «follow-on» biologics: Update on the European experiences. *American Journal of Hematology*, 85, 771–780.
- KOZLOWSKI, S., WOODCOCK, J., MIDTHUN, K., BEHRMAN SHERMAN, R.** (2011). Developing the Nation's Biosimilars. *Program New Engl J Med*, 365(5), 385–388.
- MCCAMISH, M., WOOLLETT, G.** (2011). Worldwide experience with biosimilar development. *mAbs*, 3(2), 212–220.
- OLECH, E.** (2016). Biosimilar: rationale and current regulatory landscape. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45, S1–S10.
- WANG, J., CHOW, S. C.** (2012). On the Regulatory Approval Pathway of Biosimilar Products. *Pharmaceuticals*, 5, 353–368. ANMAT – Disposición N° 7075–11.

16

Glicoproteínas en el mercado biofarmacéutico

MARÍA DE LOS MILAGROS BÜRGI

16.1. INTRODUCCIÓN

Desde hace unas décadas, la industria biofarmacéutica está en una etapa de continuo crecimiento, debido al gran número de bioterapéuticos que están siendo desarrollados y aprobados para el tratamiento de numerosas enfermedades, gracias a la aplicación de nuevas tecnologías empleadas para su obtención (Sethuraman, *et al.*, 2006). Los medicamentos biotecnológicos así obtenidos, representan una de las principales alternativas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades graves y crónicas que afectan la calidad de vida del paciente y de patologías cuyos tratamientos son complejos. Se trata de proteínas, en su mayoría glicoproteínas, cuyas características permiten abordar las enfermedades de manera más específicas y con resultados promisorios. Dado que muchas enfermedades son producto de disfunciones proteicas, el desarrollo de proteínas terapéuticas que conserven la misma especificidad y afinidad de las proteínas naturales, las convierte en óptimos agentes terapéuticos. Actualmente, existen más de 500 moléculas terapéuticas en desarrollo para el tratamiento de más de 100 enfermedades incluyendo distintos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes y SIDA. Los bioterapéuticos representan un cuarto del total de fármacos aprobados.

16.2. DROGAS CONVENCIONALES VERSUS BIOTERAPÉUTICOS

Existen diferencias importantes entre las drogas convencionales y los bioterapéuticos (Bhupinder, 2010). Las primeras, son producidas de manera sintética, generalmente mediante reacciones químicas definidas, presentan menor tamaño y complejidad, pueden ser completamente caracterizadas y su acción farmacológica está vinculada con un efecto generalizado.

Contrariamente, los bioterapéuticos son proteínas producidas a partir de organismos vivos, lo que provoca una mayor heterogeneidad. Se caracterizan por tener mayor tamaño y complejidad. Como son proteínas, presentan estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, por lo que su síntesis es más compleja e involucra modificaciones postraduccionales

como glicosilación, procesamiento, acilación, entre otras (Carter, 2011). Es por esto que su caracterización es más compleja. Además, son más inestables, pudiendo sufrir desnaturalización, agregación, degradación, oxidación, frente a distintas condiciones como pH extremo y cambios de temperatura. No obstante, son más específicos para el objetivo terapéutico y presentan potencia biológica. Estas características propias de los bioterapéuticos, son las que los distinguen de las drogas convencionales y los postulan como potenciales candidatos para el tratamiento de numerosas patologías que no han podido ser controladas mediante el empleo de drogas convencionales.

Por su parte, algunos medicamentos biotecnológicos son capaces de generar una respuesta inmune, lo que no sucede con las drogas convencionales. El desarrollo de inmunogenicidad está generalmente asociada al patrón de glicosilación que presentan las glicoproteínas terapéuticas (Li *et al.*, 2009). Así, nuestro sistema inmune es capaz de reconocer mínimas alteraciones en los biofármacos y montar una respuesta inmune que puede comprometer la seguridad del paciente o neutralizar la actividad biológica del bioterapéutico. Más adelante, en este capítulo, se presentarán los carbohidratos capaces de generar una respuesta inmunogénica, y que estrategias se aplican hoy en día para poder independizarse de dicho efecto.

Otra característica importante de los bioterapéuticos es su rápida disposición, ya que en general, son degradados por proteasas y se excretan rápidamente vía renal, evitando su acumulación en el organismo, como puede ocurrir con algunas drogas convencionales (Franco Fraguas *et al.*, 2008).

16.3. MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS

Dentro de los bioterapéuticos podemos diferenciar los medicamentos biológicos de los biotecnológicos. Los medicamentos biológicos son aquellos cuyo principio activo es producido por un organismo vivo u obtenido a partir de él, mientras que los medicamentos biotecnológicos son aquellos medicamentos biológicos obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante o tecnología de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales (mAb).

Los bioterapéuticos pueden ser agrupados en las siguientes categorías: 1) citoquinas, 2) enzimas, 3) hormonas, 4) factores de coagulación, 5) vacunas, 6) mAbs, 7) terapia celular, 8) drogas antisentido y 9) péptidos terapéuticos (Bhupinder, 2010).

La mayoría de ellos presenta estructuras complejas y distintas modificaciones postraduccionales como la glicosilación. Las moléculas terapéuticas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos simples o complejos se denominan glicoproteínas terapéuticas.

A continuación, se hace una breve descripción y ejemplificación de cada uno de los grupos de bioterapéuticos anteriormente nombrados.

- **Citoquinas:** son moléculas responsables de la señalización celular y de la activación de células del sistema inmune (Vilcek *et al.*, 2004). Algunos ejemplos de estos terapéuticos en el mercado farmacéutico son los interferones (IFNs), cuya función principal es controlar las infecciones virales y la inmunomodulación. Dentro de la familia de los IFNs existen distintas clases y subclases. Solo algunos de ellos son empleados como bioterapéuticos. Los hIFNs- α son utilizados en el tratamiento de hepatitis crónica, leucemia mieloide crónica, carcinoma renal. Los hIFNs- β son empleados para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Finalmente, el hIFN- γ es empleado para el tratamiento de enfermedades granulomatosas crónicas (George *et al.*, 2012). Otros ejemplos de citoquinas son las interleuquinas (IL), que son mensajeros de procesos del sistema inmune; el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), responsable de estimular la médula ósea para la producción de neutrófilos y utilizados en tratamientos de cáncer que son inmunosupresores; el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), responsable de la estimulación de la médula ósea para la producción de macrófagos y neutrófilos, empleado en quimio y radioterapias que suprimen las funciones de la médula ósea.
- **Enzimas:** son proteínas complejas que provocan cambios químicos específicos en otras sustancias sin sufrir modificaciones. Un ejemplo de este grupo de bioterapéuticos es el Factor IX, que es una proteasa importante en la cascada de coagulación y su deficiencia causa Hemofilia B.
- **Hormonas:** son responsables de transferir información e instrucciones entre las células en animales y plantas. La insulina recombinante, la hormona de crecimiento, y hormonas de fertilización como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona gonadotrofina coriónica (GCH), son ejemplos de hormonas bioterapéuticas.
- **Factores de coagulación:** este grupo comprende a todos los factores que son esenciales para la coagulación sanguínea, por ejemplo, el Factor VIII (Refacto®).
- **Vacunas:** son microorganismos, subunidades de microorganismos, antígenos producidos de manera recombinante, proteínas de fusión, utilizados para estimular la respuesta inmune frente a una enfermedad específica. Existen muchos ejemplos, pero podemos mencionar a Cervarix®, que es una vacuna recombinante no infecciosa desarrollada para prevenir infecciones causadas por los tipos 16 y 18 del Virus del Papiloma Humano (VPH), responsable del desarrollo del 70 % de cáncer de cuello uterino.
- **Anticuerpos monoclonales:** los mAbs son producidos por células inmortalizadas producto de la fusión de células de estirpe tumoral como mielomas con esplenocitos productores de un anticuerpo específico para el antígeno de interés. Los mAbs representan un tercio del total de bioterapéuticos empleados hoy en día en los nuevos tratamientos para patologías de diferente índole. Su aplicación involucra el tratamiento de distintos tipos

de cáncer, enfermedades infecciosas e inflamatorias, artritis reumatoidea, psoriasis, rechazo de injertos, etc. (Reusch *et al.*, 2015). Esta área de bioterapéuticos está alcanzando un crecimiento muy importante con nuevas indicaciones y terapias que están emergiendo día a día.

- **Terapia celular:** describe los procesos por los cuales se introducen células dentro de un tejido para poder asistir ciertas enfermedades. Como ejemplo, podemos citar el trasplante de médula ósea para el tratamiento de leucemias y otros tipos de cáncer.
- **Drogas antisentido:** son medicamentos que contienen parte de una hebra no codificante de un RNA mensajero (mRNA). Estas drogas tienen su efecto a nivel genético, interrumpiendo los procesos por los cuales se producen enfermedades causadas por proteínas erróneas. Muchas de estas drogas son empleadas para corregir mutaciones que dan origen a distintos tipos de cáncer.
- **Péptidos terapéuticos:** representan una clase de agentes terapéuticos, muchos de ellos generados de manera sintética, para obtener moléculas más estables o activas. Un ejemplo es el péptido CTP (péptido de la porción C-terminal de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana-hGC), que confiere estabilidad a las proteínas terapéuticas, incrementando su vida media en plasma.

Las principales funciones que cumplen las proteínas terapéuticas son el reemplazo de proteínas naturales que sean anormales o se encuentren en concentraciones deficientes, el incremento en la función de vías celulares existentes, la interferencia con una molécula o microorganismo y la entrega específica de una carga útil de radionucleido, droga citotóxica o proteína efectora.

16.4. EVOLUCIÓN DE LOS BIOFARMACÉUTICOS

Inicialmente, las proteínas terapéuticas eran obtenidas a partir de distintas fuentes humanas. Así, los factores de coagulación sanguínea y la albúmina sérica eran obtenidos desde plasma humano, la insulina desde el páncreas, los glucocerebrósidos desde la placenta y las hormonas destinadas a incrementar la fertilidad desde la orina de mujeres menopáusicas, entre otras. No obstante, dada la pureza y consistencia del producto así obtenido, y que estos podían ser potenciales fuente de contaminación viral, con el surgimiento de múltiples herramientas de ingeniería genética, la producción de proteínas terapéuticas comenzó a desarrollarse en sistemas de expresión recombinantes. De esta forma, las células de mamíferos, las bacterias, las levaduras y las células de insecto se convirtieron en los principales sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, no todos los sistemas resultan útiles

para producir todo tipo de proteínas recombinantes. Estos sistemas muestran diferencias importantes en lo que respecta a la incorporación de modificaciones postraduccionales presentes en las proteínas humanas nativas.

En los años 1970–1980, con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, surgieron los denominados bioterapéuticos de primera generación. Estos fueron las primeras formas recombinantes de proteínas naturales. Los bioterapéuticos de primera generación presentan idéntica secuencia aminoacídica que las proteínas naturales, y se utilizan fundamentalmente, en terapias de reemplazo donde cumplen idéntica función que la proteína natural. Es decir, se utilizan para reemplazar la producción de una proteína anormal/deficiente o para incrementar sus niveles, y también, en terapias antagonistas, donde la función normal de una proteína es inhibida, principalmente mediante el uso de anticuerpos.

En 1982, en Estados Unidos, se aprobó la primera proteína recombinante, la insulina humana recombinante denominada comercialmente Humulin, producida por la empresa Genentech, utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus. En los años consecutivos, la industria farmacéutica creció rápidamente, alcanzando en el año 2003, un total de 140 biofármacos aprobados para el tratamiento de diferentes deficiencias.

Por su parte, en 1975, los investigadores Köhler y Milstein, desarrollaron la tecnología de producción de hibridomas, que permitió la generación de anticuerpos monoclonales, los cuales también constituyen los bioterapéuticos de primera generación. Inicialmente, los anticuerpos monoclonales así generados eran utilizados para el diagnóstico de muchas patologías, pero no transcurrió mucho tiempo hasta que los mismos comenzaron a emplearse como terapéuticos para activar respuestas de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Si bien los bioterapéuticos de primera generación presentaron beneficios substanciales al paciente al ser comparados con las proteínas naturales que eran purificadas desde secreciones humanas, los mismos mostraron algunas desventajas tales como una elevada depuración plasmática, lo que requería reiteradas dosis para alcanzar la ventana terapéutica; reacciones de inmunogenicidad, que muchas veces llevaba a suspender los tratamientos y otra serie de cuestiones relacionadas al perfil farmacocinético de las proteínas terapéutica. En respuesta a estas problemáticas, y con el propósito de desarrollar moléculas más efectivas, surgieron los bioterapéuticos de segunda generación. Estas nuevas moléculas fueron modificadas para obtener drogas más rápidas y efectivas, que presenten mayor vida media en plasma, sin desarrollar una respuesta de inmunogenicidad (Carter, 2011).

Las estrategias de modificación empleadas para el desarrollo de estos terapéuticos contemplan modificaciones en la secuencia de aminoácidos, fusión de proteínas, ingeniería de proteínas posproducción y nuevos sistemas de *delivery* de drogas (Ueda, 2014).

En cuanto a los anticuerpos, el desarrollo de la tecnología de producción de hibridomas facilitó la generación, en grandes escalas, de anticuerpos monoespecíficos para un antígeno dado. Cuando estos anticuerpos comenzaron a utilizarse con fines terapéuticos, muchos de ellos desarrollaron respuestas HAMA (del inglés, *Human Anti-Mouse Antibodies*) en los pacientes. Es decir, pacientes que eran tratados con mAb de origen murino, comenzaron a producir anticuerpos propios contra los anticuerpos murinos terapéuticos, neutralizando su efecto biológico, y en varios casos, montando una respuesta inmunológica. De esta forma, la respuesta terapéutica de los mAbs murinos se veía neutralizada. En respuesta a esta problemática, y mediante el empleo de ingeniería genética, se desarrollaron anticuerpos monoclonales de segunda generación (Walsch, 2004). Estos se dividen en anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Los primeros, fueron modificados mediante ingeniería genética de manera de obtener anticuerpos cuya región constante sea de origen humano, mientras que sus regiones variables eran conservadas desde los mAbs murinos. Esto permitió reducir las reacciones de inmunogenicidad en distintos tratamientos y aumentar su vida media plasmática. No obstante, en algunos tratamientos, se detectaron respuestas de tipo HACA (del inglés, *Human Anti-Chimeric Antibodies*). En este caso, el paciente producía anticuerpos propios contra los anticuerpos quiméricos. Consecuentemente, se desarrollaron los anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos son casi en su totalidad de origen humano y solo presentan las regiones hipervariables (CDRs) de origen murino. De esta manera, se logró reducir considerablemente las reacciones indeseadas de inmunogenicidad y neutralización de la respuesta terapéutica, favoreciendo también, su vida media en circulación.

Más adelante, se comenzaron a desarrollar una nueva generación de bioterapéuticos en respuesta a las desventajas presentadas por los bioterapéuticos de segunda generación: formas de administración, problemas de inmunogenicidad, macroheterogeneidad de glicoproteínas (Szlachcic *et al.*, 2011; Ueda, 2014; Higel *et al.*, 2016). Así, la nueva generación de bioterapéuticos consistió en el desarrollo de proteínas con mayor grado de ingeniería para mejorar su eficacia terapéutica y su seguridad, disminuyendo el grado de inmunogenicidad. Esta categoría también contempla nuevos sistemas desarrollados para el *delivery* de los terapéuticos, la modificación de sistemas huéspedes para producir proteínas terapéuticas no inmunogénicas y a menor costo de producción, y el empleo de nuevas tecnologías de glicoingeniería, todas ellas, con el propósito de crear bioterapéuticos «*novel*» o con atributos destacados.

En resumen, los bioterapéuticos han ido evolucionando a lo largo del tiempo, con el objetivo de desarrollar terapéuticos que presenten mejorada e incrementada sus funciones eectoras, sin generar respuestas adversas en el paciente.

En la Figura 16.1, se ejemplifica la evolución en el desarrollo de bioterapéuticos empleados para asistir problemas de infertilidad. Inicialmente, las proteínas responsables de favorecer la gestación eran obtenidas desde

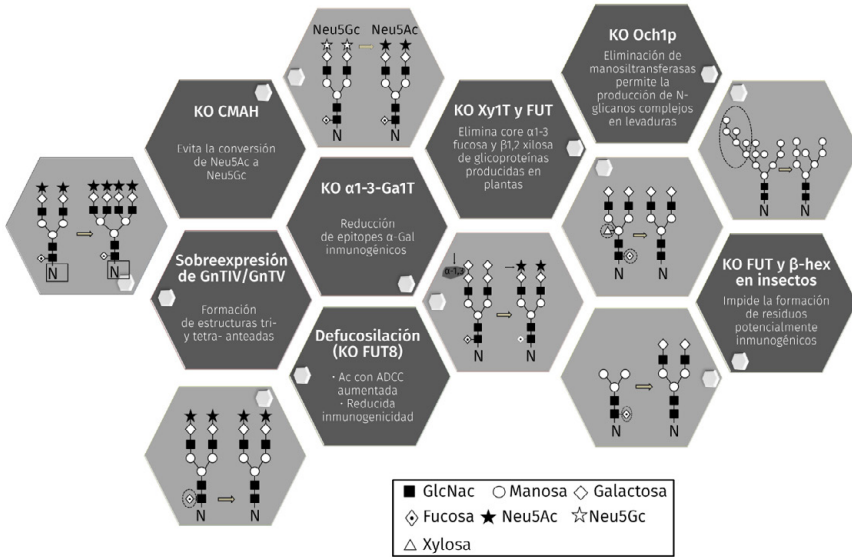


FIGURA 16.1. EVOLUCIÓN EN EL DESARROLLO DE BIOTERAPÉUTICOS UTILIZADOS PARA ASISTIR PROBLEMAS DE INFERTILIDAD

suero o plasma de animales o desde la orina de mujeres menopáusicas. Más tarde, con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante las mismas lograron producirse de forma recombinante. El desarrollo de estos bioterapéuticos comenzó avanzando en pos de mejoras: mayor pureza e incrementada actividad específica, así como mayor seguridad, calidad, consistencia y conveniencia para el paciente (Trousdale *et al.*, 2009).

La FSH se obtuvo originalmente de fuentes animales (suero de yegua preñada) o humanas (glándulas pituitarias post mortem), pero estas preparaciones fueron dejadas de lado debido a problemas de seguridad. Las gonadotropinas fueron extraídas por primera vez desde la orina en la década de 1940. Luego se obtuvo la gonadotropina menopáusica humana (hMG) en 1949. Más de una década después, las primeras formas urinarias de hCG y hMG se encontraban disponibles en el mercado. Las mejoras adicionales en los métodos de purificación produjeron productos de hormona foliculo-estimulante (FSH) en los años ochenta y el posterior desarrollo de FSH altamente purificada (u-hFSH AP), estuvo disponible 10 años más tarde, en 1993, permitiendo la inyección subcutánea. En los años setenta y ochenta, los avances en la tecnología de ADN recombinante, permitieron el desarrollo de la FSH recombinante humana (rec-hFSH), que se comercializó en 1995. Los desarrollos más recientes incluyen gonadotropina FSH de acción prolongada y una nueva familia de dispositivos de inyección de «pens» precargados.

16.5. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

A partir del desarrollo de técnicas de ingeniería genética, se comenzaron a expresar proteínas procedentes de diferentes seres vivos en otros organismos, transfiriendo el gen que la codifica de un huésped a otro, para producir en forma recombinante la proteína de interés.

Diferentes sistemas de expresión como bacterias, levaduras, células de insectos y células de animales son utilizados para la producción recombinante de proteínas. Cada uno de ellos presenta ciertas ventajas y desventajas. Por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli* es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales. Entre las ventajas que este microorganismo brinda como hospedero se encuentran: mayor velocidad específica de crecimiento respecto de levaduras y células de mamíferos; fácil manipulación genética; menores costos de producción; existencia de gran variedad de vectores de expresión estables, y, además, constituye un microorganismo aprobado por las entidades regulatorias para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos. Sin embargo, este microorganismo es incapaz de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales que son comunes en proteínas de origen eucariota. Asimismo, esta no es un eficiente secretor de proteínas al medio de cultivo. Contrariamente, las proteínas producidas en bacterias generalmente forman cuerpos de inclusión. Además, las bacterias pueden resultar una fuente potencial de pirógenos y son prácticamente incapaces de promover la formación correcta de numerosos puentes disulfuro. Por consiguiente, muchas de las proteínas terapéuticas que requieren modificaciones postraduccionales, que no pueden ser llevadas a cabo por cepas bacterianas de manera efectiva, como las N- y O-glicosilaciones; son preferentemente producidas en células eucariontes superiores, como las células de animales, debido a la capacidad de estas últimas de generar tales modificaciones de forma similar a las encontradas en glicoproteínas de origen humano. Por otro lado, las proteínas sintetizadas por células de mamífero son fácilmente secretadas al medio de cultivo, por lo que la proteólisis es limitada y el proceso de purificación es más simple.

Por todo lo mencionado, la mayoría de las proteínas recombinantes aprobadas para uso terapéutico son producidas a gran escala empleando células CHO, derivadas de ovario de hámster chino, células ВНК, derivadas de riñón de hámster bebé y células NSO, derivadas de mieloma murino. Todas ellas han demostrado ser seguras para la producción de diversas proteínas recombinantes de uso terapéutico.

La línea celular CHO-K1 constituye una plataforma de producción robusta y confiable (Kim *et al.*, 2012). Se caracteriza por su fácil adaptación al crecimiento en suspensión y en condiciones libre de suero fetal bovino (SFБ) lo que permite llevar a cabo su cultivo en altas densidades celulares. De este modo, el incremento de la concentración de la proteína recombinante de

interés en el sobrenadante de cultivo y la ausencia de proteínas contaminantes características del SFB (así como también virus y priones) permiten simplificar los procesos posteriores de recuperación, purificación y refinamiento del producto final (Solá *et al.*, 2010). Además, desde el punto de vista regulatorio, las células CHO son incapaces de replicar patógenos humanos como HIV, H. influenza, poliovirus y herpesvirus, entre otros.

No obstante, el empleo de líneas celulares CHO recombinantes presenta ciertas desventajas ya que requiere de la identificación de clones que evidencien las propiedades fenotípicas buscadas, incluyendo el tiempo de duplicación del cultivo y su viabilidad a largo plazo como así también la uniformidad y calidad del producto. De este modo, la elección del clon apropiado resulta un desafío ya que se ha descrito que puede sufrir cambios fenotípicos a lo largo del tiempo que afectan las características de la proteína producida. Particularmente, la variación en el grado de glicosilación constituye un factor que puede afectar tanto la función como la estabilidad de las proteínas, es por esto que representa un punto de control importante para productos generados en células CHO. Además, esta línea celular puede introducir epítopes inmunogénicos para humanos (ácido N-glicolilneuramínico, también conocido como Neu5Gc) y residuos α -Gal (Gal α 1-3) que también deben ser controlados a los fines de evitar reacciones inmunes en los pacientes. Si bien las células CHO constituyen la plataforma más utilizada para la producción de biofarmacéuticos, la necesidad de obtener proteínas recombinantes más eficaces y seguras ha impulsado el desarrollo de líneas celulares recombinantes de origen humano.

Casi dos décadas después del descubrimiento de las células CHO, la línea celular HEK293, derivada de células renales embrionarias de origen humano, fue establecida por Frank Graham y col. en 1977, mediante transfección con fragmentos de ADN del adenovirus 5. Las células HEK293 expresan la proteína 13 S E1a del adenovirus de manera estable, lo cual permite incrementar de manera significativa la transcripción de genes que se encuentran bajo la dirección del promotor de citomegalovirus (CMV). Esta línea celular puede crecer en adherencia, en presencia de SFB, o bien en suspensión, en condiciones libres de suero. Es muy empleada para la expresión de proteínas recombinantes de manera transitoria, debido a su facilidad de transfección.

A la hora de producir proteínas recombinantes de uso terapéutico, las líneas celulares humanas son ampliamente consideradas debido a su capacidad de introducir modificaciones postraduccionales similares a las que se encuentran en proteínas naturalmente secretadas por humanos (Ghaderi *et al.*, 2012). De este modo, se evitan reacciones inmunes contra epítopes no humanos, presentes en los bioterapéuticos producidos en células no humanas. Así, por ejemplo, las células HEK293 han sido empleadas con éxito para la expresión de interferón-alfa2b humano (IFN- α 2b), ya que esta molécula evidenció un perfil de glicosilación muy similar al observado para el IFN secretado naturalmente por leucocitos humanos.

Además, en los últimos años, 5 proteínas recombinantes producidas en células HEK293 han llegado a la etapa de comercialización luego de su aprobación por parte de la entidad estadounidense FDA y/o de la agencia europea de medicamentos (EMA).

16.6. SEGUNDA GENERACIÓN DE BIOTERAPÉUTICOS: ESTRATEGIAS DE MODIFICACIÓN

Aunque las proteínas cumplan perfectamente sus numerosas y complejas funciones en el medio celular o extracelular, existen distintas desventajas que deben ser tenidas en cuenta. Desde el punto de vista farmacéutico, las proteínas son moléculas muy complejas, y a su vez muy frágiles, en términos de su producción, conservación y administración. Los problemas más recurrentes son la alta tendencia a formar agregados proteicos, la inestabilidad química (incluyendo deaminación, oxidación, β -eliminación) y su susceptibilidad a proteasas. Por lo tanto, su estabilidad relativamente baja y su corta vida media en plasma son los principales obstáculos que deben sortear las proteínas para ser empleadas como exitosos bioterapéuticos. De esta manera, se han realizado modificaciones que permiten mejorar las propiedades de las proteínas como terapéuticos.

Las estrategias de modificación empleadas para el desarrollo de bioterapéuticos de segunda generación involucran modificaciones de la secuencia de aminoácidos, fusión de proteínas, ingeniería posproducción.

16.6.1 Modificación de la secuencia de aminoácidos

Los cambios pueden incluir la sustitución de un residuo aminoacídico, la inserción/delección de uno o varios residuos de aminoácidos consecutivos, así como la glicoingeniería para introducir sitios potenciales de glicosilación. La mutagénesis es empleada para aumentar la estabilidad de las proteínas, su vida media, su especificidad y su actividad (Vazquez-Lombardi *et al.*, 2013).

En este sentido podemos citar el reemplazo de cisteínas libres por serinas, para reducir la formación de puentes S-S indeseados que den lugar a la agregación de la proteína. Un ejemplo es la IL-2 recombinante humana, cuyo nombre comercial es Proleukin®, que fue aprobada para el tratamiento de melanomas metastásicos y carcinomas renales.

Otra sustitución para aumentar la estabilidad de las proteínas es el reemplazo de residuos aminoacídicos con baja propensión a formar α -hélices, como la prolina y glicina, por residuos de alta factibilidad de formar α -hélices como la alanina. De esta manera, se obtienen proteínas más resistentes a la desnaturalización.

16.6.2 Fusión de proteínas

La ingeniería de proteínas también facilitó la generación de biofármacos híbridos o de fusión. Los mismos resultan de la unión directa o mediante el empleo de un ligando, de dos polipéptidos; la unión entre una proteína y la porción Fc de un anticuerpo; la unión de una proteína a una molécula de albúmina o transferrina.

La fusión de proteínas se realiza con los siguientes propósitos: aumentar su vida media en plasma, mejorar su actividad biológica, incrementar la citotoxicidad en terapias específicas y permitir su distribución específica al sitio de acción.

La fusión de proteínas terapéuticas a la porción Fc de un anticuerpo IgG presenta numerosas ventajas. Entre ellas, la purificación efectiva y poco costosa de la proteína de fusión, mediante cromatografía de afinidad a proteína A (proteína que tiene afinidad por la porción Fc de los anticuerpos), así como el incremento en la vida media plasmática, como consecuencia de un aumento en el tamaño de la proteína de fusión, que permite reducir la filtración renal. En general, en estas proteínas de fusión, una sección cumple la función de reconocimiento molecular mientras que la otra es responsable de la función efectora. Ejemplos de estas proteínas que hoy se encuentran en el mercado biofarmacéutico son el Enbrel, Ontak y Amevive. El Enbrel (Immunex) es utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoidea. Es una proteína de fusión recombinante compuesta por la porción extracelular del dominio de unión del receptor del factor de necrosis tumoral humano ($\text{TNF-}\alpha$), unido a la porción Fc de un anticuerpo IgG humano. El Enbrel compite con el receptor natural de $\text{TNF-}\alpha$ para unir dicha molécula, inhibiendo su accionar, mientras que la porción Fc cumple la función de incrementar su vida media en plasma y proporcionar una respuesta ADCC en las células productoras de $\text{TNF-}\alpha$.

Por otro lado, la fusión de proteínas a albúmina sérica (SA), permite una larga vida media en circulación, incluso hasta 3 semanas en humanos. Un ejemplo de este terapéutico lo representa el Albinterferon- $\alpha 2b$ (nombre comercial Albuferon®), que es la fusión del IFN- $\alpha 2b$ a la SA. Este terapéutico está descrito para el tratamiento de la hepatitis C crónica. Su vida media en plasma es de aproximadamente 200 h, lo que permite una frecuencia de administración cada 2 o 4 semanas, dependiendo del tratamiento.

Otro ejemplo dentro de este grupo de terapéuticos lo representan una serie de proteínas terapéuticas que han sido fusionadas a toxinas bacterianas para promover de manera específica, la citotoxicidad de una población celular. Ontak® es el nombre comercial de la proteína de fusión compuesta por la IL-2 y la porción enzimáticamente activa de la toxina diftérica (DT). Este terapéutico fue aprobado para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (CTCL). Las células tumorales de este linfoma sobreexpresan los receptores de IL-2, y son sensibles a la toxina diftérica. De esta manera, la IL-2 se une a sus receptores presentes en estas células, dirigiendo la citotoxicidad.

16.6.3 Ingeniería postraduccional

Estas modificaciones involucran la unión covalente de la proteína ya sintetizada a moléculas como polietilenglicol (PEG). La unión covalente de una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) a un polipéptido se denomina PEGilación (Jevsevar *et al.*, 2010; Net *et al.*, 2012). El propósito de esta modificación es incrementar la vida media en circulación de la proteína mediante la disminución de la depuración sistémica (conocida en inglés como *clearance*). Además, el PEG enmascara sitios de clivaje de la proteína, prolongando su vida media plasmática. Muchas proteínas PEGiladas han sido aprobadas por las entidades regulatorias en los últimos años. Como ejemplo podemos citar al IFN. La vida media en plasma de los IFNs nativos oscila entre 3 y 5 h. Por lo tanto, las terapias basadas en IFNs de primera generación requieren de la administración de 3 dosis semanales. La PEGilación de estas moléculas incrementa su vida media en plasma a 24 h aproximadamente, disminuyendo la frecuencia de 3 a 1 dosis semanal.

16.6.4 Anticuerpos de segunda generación

En cuanto a los anticuerpos de segunda generación, como se describió, los mismos han sido modificados mediante ingeniería genética para disminuir su inmunogenicidad, desarrollando así, anticuerpos quiméricos y humanizados, y fracciones de anticuerpos que resultan efectivos terapéuticos (Beck *et al.*, 2008). Asimismo, se han desarrollado mediante ingeniería genética, anticuerpos completamente humanos producidos de forma recombinante (Hudak *et al.*, 2014). Es preciso destacar, que los anticuerpos son los bioterapéuticos cuyo desarrollo en todo el mundo va creciendo con mayor velocidad. A modo de ejemplo, en 2009, 5 de cada 10 proteínas terapéuticas eran anticuerpos. Su producción permite obtener grandes cantidades de proteínas para cubrir altas dosis en distintos tratamientos. Su combinación con tóxicos o radionucleidos los hace potentes drogas para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

Los anticuerpos son empleados formando complejos denominados inmunocitoquinas. Estos representan la fusión de citoquinas a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos destinados para un antígeno particular, presente por ejemplo en células tumorales (Vazquez-Lombardi *et al.*, 2013). Dado que la distribución física específica de las citoquinas no es factible en varias situaciones, las inmunocitoquinas representan una alternativa para alcanzar una acción localizada de la misma. De esta forma, el anticuerpo es responsable de transportar y localizar a las inmunocitoquinas dentro del microambiente patológico y/o dirigir las hacia una población celular específica, como son las células tumorales.

Por su parte, la unión de una proteína a un anticuerpo IgG completo (≈ 150 kDa) permite una unión bivalente del antígeno y por otra parte, prolonga su vida media en plasma mediante la reducción del *clearance* renal y la recirculación mediada por receptores-FcRn (receptores neonatales o de Brambell). Además, las funciones efectoras mediadas por el dominio Fc (ADCC y CDC) pueden ser mantenidas con el objetivo de potenciar la citotoxicidad celular dirigida. Sin embargo, muchas veces estas inmunocitoquinas no pueden penetrar los tumores sólidos. Este problema puede ser resuelto mediante el empleo de pequeños fragmentos scFv (≈ 30 kDa), compuestos por los dominios variables V_L y V_H , unidos mediante un polipéptido flexible de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos.

16.6.5 Glicoingeniería

La glicosilación en las proteínas cumple múltiples funciones, entre las que se destacan: la protección frente a proteólisis enzimática, el aumento en la estabilidad y solubilidad, la mejora en la farmacocinética y en su actividad biológica (Schwart *et al.*, 2011). Además, cada glicofoma proteica presenta una farmacodinamia y una función efectora particular. Todas estas propiedades hacen que el incremento en el grado de glicosilación de las proteínas tenga múltiples ventajas desde el punto de vista terapéutico (Elliot *et al.*, 2003; Sinclair *et al.*, 2004). Sin embargo, las proteínas inapropiadamente glicosiladas son removidas rápidamente de la circulación.

Algunas modificaciones en el contenido glicosídico de ciertas glicoproteínas terapéuticas, han producido cambios substanciales en la *performance* de la molécula. No obstante, es muy importante seleccionar correctamente el sistema de expresión de las glicoproteínas para no generar una decoración glicosídica que desarrolle una respuesta inmune desfavorable en el paciente.

Existen numerosas moléculas que han sido modificadas mediante glicoingeniería para mejorar sus propiedades terapéuticas.

La adición de sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-S/T, donde X no puede ser Pro) es una estrategia para incrementar el contenido de carbohidratos de la proteína, y en consecuencia, su masa molecular y su vida media en plasma, disminuyendo la frecuencia de administración (Ng *et al.*; 2014; Ceaglio *et al.*, 2016). Un ejemplo de estos terapéuticos lo representa la Nespo/ Aranesp® (Amgen, EEUU). Esta es una proteína recombinante utilizada para el tratamiento de la anemia renal crónica, cuyo contenido de carbohidratos es superior al de la molécula de EPO nativa. Mientras que la molécula nativa de EPO contiene 3 sitios de N-glicosilación, la Nespo ha sido modificada mediante la introducción de 2 sitios adicionales de N-glicosilación, conteniendo un total de 5 sitios de N-glicosilación. Esta molécula presenta una vida media en plasma superior, lo que favorece un incremento en su actividad biológica y reduce de 3 a 1 dosis semanal la frecuencia de administración.

Otras estrategias de glicoingeniería, todas ellas con el propósito de incrementar la farmacocinética, estabilidad y actividad biológica de las glicoproteínas, lo representan la adición de N- u O-glicanos en el extremo C- o N- de la proteína (Perlman *et al.*, 2003).

Una exhaustiva caracterización de los métodos de glicoingeniería aplicados a la generación de nuevas glicoproteínas ha sido desarrollada en el Capítulo 5 del presente libro.

La Tabla 16.1 cita una serie de ejemplos de glicoproteínas terapéuticas de segunda generación que hoy en día se encuentran disponibles en el mercado farmacéutico.

16.7. NUEVA GENERACIÓN DE BIOTERAPÉUTICOS

El desarrollo de esta clase de biofarmacéuticos, tiene como objetivo principal optimizar sus propiedades terapéuticas. En este sentido, los mismos presentan mayor grado de ingeniería para mejorar su eficacia terapéutica, su seguridad, y su distribución sitio-específico (Ueda *et al.*, 2014).

Esta clase de terapéuticos involucra no solo modificaciones sobre las proteínas, sino también, modificación de los sistemas huéspedes para obtener proteínas terapéuticas no inmunogénicas y a menor costo de producción (Pandhal *et al.*, 2010; Fidan *et al.*, 2015). Asimismo, involucra nuevas tecnologías de glicoingeniería para generar proteínas «novel» o con atributos destacados.

La complejidad y heterogeneidad de los oligosacáridos presenta un desafío importante para la industria biofarmacéutica en la producción de glicoproteínas terapéuticas con perfiles de glicoisofomas consistentes y reproducibles. Cada isoforma de una glicoproteína presenta diferentes características y puede tener distinta respuesta biológica, con diferencias en su farmacodinamia y farmacocinética. Por lo tanto, es necesario establecer modificaciones que permitan obtener y seleccionar isoformas homogéneas para desarrollar bioterapéuticos con actividad más consistente (Laukens *et al.*, 2015). Por otro lado, es preciso el control de los glicanos inmunogénicos mediante estrategias para modular la N-glicosilación y el procesamiento de los N-glicanos inmunogénicos. Todas estas modificaciones pueden efectuarse mediante la aplicación de herramientas de ingeniería genética sobre el sistema de expresión de dichas glicoproteínas, o bien, alterando los glicanos mediante el empleo de enzimas (Dicker *et al.*, 2015).

Como se mencionó previamente en este capítulo, el 70 % de las glicoproteínas terapéuticas son producidas en células CHO. Entre sus ventajas es posible mencionar que son fácilmente transfectables, pueden adaptarse a crecer en suspensión y en medios libres de suero, sus cultivos alcanzan altas densidades, presentan una gran robustez frente a pH, temperatura, oxígeno y presión y tienen, además, la capacidad para realizar

TABLA 16.1. BIOTERAPÉUTICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN DISPONIBLES EN EL MERCADO

Nombre comercial	Proteína	Modificación	Enfermedad	Compañía	Función mejorada
Aranesp®	EPO	Sitios adicionales de glicosilación	Anemia	Amgen	Incremento en su PK y actividad biológica.
Arcalyst®	Fragmento receptor de IL-1	Fusión a Fc	CAPS	Regeneron	Direccionamiento específico de la proteína.
Betaseron®	IFN-β	Sustitución Cys-Ser	Esclerosis múltiple	Bayer	Incremento en su estabilidad.
Enbrel®	Fragmento del receptor TNF	Fusión a Fc	Artritis reumatoidea	Amgen	Incremento en su PK y direccionamiento específico de la proteína de fusión.
Neulasta®	G-CSF	PEGilación	Leucopenia	Amgen	Incremento en su PK
NovoLog®	Insulina	Sustitución Pro28-Asp	Diabetes	NovoNordisk	Mayor estabilidad proteica.
Orencia®	CTLA4	Fusión a Fc	Artritis reumatoidea	Bristol-Myers Squibb	Incremento en su PK y direccionamiento específico de la proteína de fusión.
PEGasys®	IFN-α	PEGilación	Hepatitis C	Genentech	Incremento en su PK.
Proleukin®	IL-2	Sustitución Cys-Ser	Metástasis de melanomas y de cáncer renal	Prometheus	Incremento en su estabilidad.
Somavert®	hGH	PEGilación	Síndrome humano de dwarf	Pfizer	Incremento en su PK.
ZALBIN®	IFN-α-2b	Fusión a HSA	Cáncer, infecciones virales	HGS	Incremento en su PK.

modificaciones postraduccionales compatibles con las proteínas humanas. No obstante, existen algunas diferencias en el proceso de glicosilación, que representan una desventaja. La unión entre residuos de galactosa y residuos de ácido siálico solo se produce en enlaces de tipo α2-3, mientras que en humanos es una mezcla de enlaces de tipo α2-3 y α2-6. Además, es

factible la presencia de residuos de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Esta particularidad conlleva al desarrollo de una respuesta inmune en el paciente, con la generación de anticuerpos anti-Neu5Gc y a diferencias en las propiedades inherentes a la sialidación con respecto a las proteínas humanas. Para poder controlar todos estos aspectos, el desarrollo de nueva generación de bioterapéuticos implica la aplicación de diversas estrategias con el fin de alterar el patrón de glicosilación de las proteínas con función terapéutica (Wang *et al.*, 2015). Algunas de estas estrategias se resumen a continuación:

16.7.1 Optimización del medio de cultivo

Varios parámetros relacionados con los cultivos son manipulados para optimizar el crecimiento celular y la productividad. Esos parámetros también pueden modificar la glicosilación de las proteínas. Estos, pueden dividirse en medios de cultivo y condiciones de cultivo. En cuanto al medio de cultivo, la glucosa es la fuente de energía por excelencia para los cultivos de células animales, por lo tanto, la carencia de glucosa en los cultivos puede provocar la síntesis de proteínas aberrantes, así como una glicosilación incompleta, o incluso, ausencia de glicosilación. Por su parte, la incorporación de galactosa a los cultivos celulares puede favorecer un perfil de N-glicosilación con mayor proporción de residuos de galactosa en las glicoproteínas. Por ello, es importante monitorear y controlar dichos azúcares en los cultivos, para asegurar la correcta producción y calidad, de las glicoproteínas terapéuticas.

Con respecto a las condiciones de cultivo, el oxígeno disuelto, el pH, el CO₂ y la temperatura, pueden afectar la galactosilación, sialidación y síntesis completa de glicanos. Es también muy importante, llevar a cabo un monitoreo completo de las condiciones de cultivo a lo largo de toda la etapa de producción de las glicoproteínas, para sostener la calidad de las glicoproteínas como terapéuticos.

16.7.2 Sialidación

Los residuos de AS terminal pueden alterar las propiedades de las proteínas tales como su actividad biológica y su vida media en circulación, dado que el *clearance* proteico no solo depende del tamaño de la proteína sino también de la carga. Aquellas proteínas más cargadas negativamente permanecerán mayor tiempo en circulación sin ser eliminadas (Yin *et al.*, 2015). Por ello, es deseable maximizar el contenido de AS de las glicoproteínas terapéuticas para mejorar su calidad, consistencia y actividad biológica. Muchas enzimas, azúcares y sustratos están involucrados en el metabolismo del AS. Por lo

tanto, las estrategias para incrementar el contenido de AS implican la manipulación del contenido o expresión de distintas enzimas mediante ingeniería genética, así como la manipulación de las condiciones de cultivo. Algunos ejemplos son la sobreexpresión de sialiltransferasas (SiaT) y galactosiltransferasas (GalT) en las células huésped. Las SiaT son enzimas responsables de introducir un residuo de Neu5Ac = AS en el último residuo de galactosa sobre la cadena de oligosacáridos N-unidos, y por su parte, las GalT son responsables de la incorporación de residuos de galactosa sobre el cual la SiaT unirá el residuo de Neu5Ac. De esta manera, al sobreexpresar ambas enzimas, se favorece la incorporación de residuos de AS sobre las cadenas de azúcares en las glicoproteínas.

Otra estrategia es la manipulación de la vía CMP-AS con SiaT. Para que la sialidación ocurra, el CMP-AS debe ser generado en el núcleo, transportado hacia el aparato de Golgi por transportadores de CMP-AS y enzimáticamente transferido a un oligosacárido aceptor en Golgi. Al sobreexpresar el transportador de CMP-AS y las SiaT, permitirá obtener mayor cantidad de sustratos CMP-AS que puedan ser transferidos a oligosacáridos aceptores y sialilados.

16.7.3 Defucosilación

Otro objetivo importante para la glicoingeniería son los residuos de fucosa, especialmente en los anticuerpos terapéuticos utilizados en terapias contra el cáncer. La fucosa, es un residuo que puede promover respuesta inmune en el paciente. La eliminación de este residuo de fucosa de los anticuerpos favorece la interacción entre la porción Fc de los mismos y las células NK (del inglés, *natural killers*). Consecuentemente, los anticuerpos modificados mediante glicoingeniería presentan mayor potencia biológica, permitiendo reducir el número de dosis de acuerdo con el tratamiento terapéutico.

Las estrategias para eliminar los residuos de fucosa involucran:

- La inhibición de la actividad fucosiltransferasa silenciando los genes relevantes para la α -1,6 fucosilación mediante el empleo de siRNA (del inglés *small interfering RNA*) o mediante la edición del genoma, generando la disrupción del locus genómico responsable de la α -1-6 fucosilación.
- La inhibición de la generación de sustratos de azúcar para la fucosilación mediante el empleo de siRNA para bloquear o inhibir la formación de sustratos donantes de GDP-glucosa.
- La sobreexpresión de N-acetilglucosamiltransferasa (GnT-III) para inhibir la reacción de fucosilación. De esta manera se obtienen Ac con oligosacáridos bisectantes, que poseen mayor respuesta ADCC.

16.7.4 Sobreexpresión de N-acetilglucosamiltransferasas (GnT IV/GnT V)

Esta modificación permite incrementar el número de glicanos tri- y tetra-antenarios, es decir, N-glicanos con mayor ramificación y consecuentemente, con superior contenido de AS.

Algunas de las estrategias utilizadas para la ingeniería de N-glicanos se resumen en la Figura 16.2.

16.8. CONCLUSIONES

Las glicoproteínas terapéuticas representan la cuarta parte de los terapéuticos aprobados en la actualidad, dada su eficacia en el tratamiento de numerosas patologías. La generación y purificación de glicoproteínas terapéuticas, ha evolucionado gracias a la aplicación de nuevas tecnologías, con el objetivo de mejorar su calidad, seguridad, distribución y eficacia terapéutica. Estos avances han permitido mejoras en las características y *performance* de las

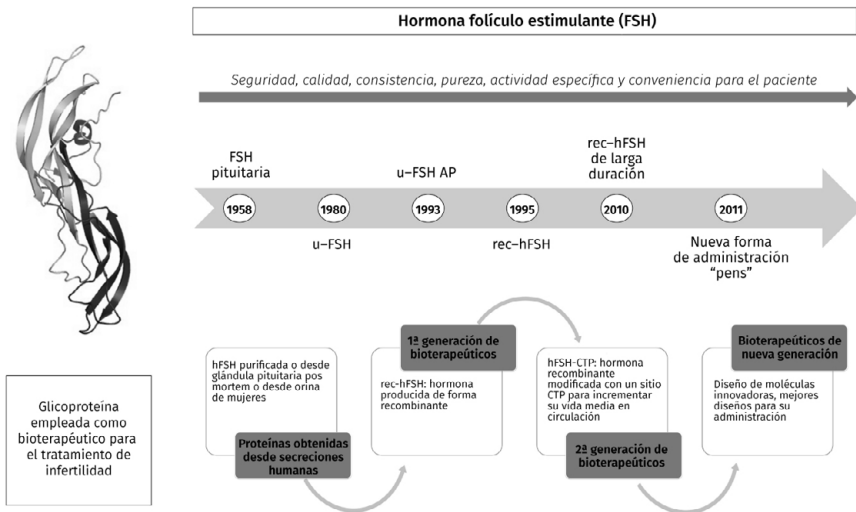


FIGURA 16.2. ESTRATEGIAS PARA INGENIERÍA DE N-GLICANOS.

KO: KNOCK OUT; **GnTIV**, **GnTV**: N-ACETYLGLUCOSAMILTRANSFERASAS IV Y V; **FUT 8**: α 1-6 FUCOSILTRANSFERASA; **CMAH**: CMP-Neu5Ac HIDROXILASA; **α 1-3-galT**: α 1-3 GALACTOSILTRANSFERASA; **Och1p**: α 1-6 MANOSILTRANSFERASA (EN LEVADURAS); **FUT**: α 1-3 FUCOSILTRANSFERASA; **β -HEX**: β -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA (EN CÉLULAS DE INSECTO); **XYLT**: β 1-2-XILOSILTRANSFERASA (EN PLANTAS)

proteínas terapéuticas. Con estos nuevos productos bioterapéuticos, muchas enfermedades desconocidas o que no podían ser curadas con los medicamentos disponibles, pueden ahora ser abordadas o al menos, establecer un tratamiento que mejore la calidad de vida del paciente.

El uso de herramientas de edición del genoma, la integración de un extensivo análisis de datos y un mejor entendimiento de los procesos celulares facilitará el desarrollo de una nueva generación de sistemas de expresión de glicoproteínas recombinantes terapéuticas. Los avances en glicoingeniería permitirán la producción de manera sencilla de biosimilares, así como la generación de mejores bioterapéuticos con glicosilación alterada y optimizada eficacia y seguridad.

Referencias bibliográficas

- BECK, A., WAGNER-ROUSSET, E., BUSSAT, M. C., LOKTEFF, M., KLINGER-HAMOUR, C., HAEUW, J. F. (...) Corvaia, N. (2008). Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (9), 482-501. 10.2174/138920108786786411
- BECK, A., WURCH, T., BAILLY, C., CORVAIA, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, (10), 345-352. 10.1038/nri2747
- BUPHINDER, S. S. (2010). Biopharmaceuticals: an overview. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, (34), 1-19.
- CARTER, P. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, (317), 1261-1269. 10.1016/j.yexcr.2011.02.013
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., CONRADT, H. S., OGGERO, M. (2012). Second-Generation Interferons: An Effective, Long-Lasting Hyperglycosylated IFN- α 2. *N. Jenkins et al. (eds.), Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT)*, Proceedings 5. 10.1007/978-94-007-0884-6_91
- CEAGLIO, N., GUGLIOTTA, A., TARDIVO, M. B., CRAVERO, D., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., OGGERO, M. (2016). Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit. *Journal of Biotechnology*, (221), 13-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.018>
- CREUS, S., CHAIA, Z., PELLIZZARI, EH., CIGORRAGA, SA., ULLOA-AGUIRRE, A., CAMPO, S. (2001). Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (174), 41-49. 10.1016/s0303-7207(00)00453-6
- DICKER, M., STRASSER, R. (2015). Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(10),1501-1516. 10.1517/14712598.2015.1069271
- ELLIOTT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., AOKI, K., BRANKOW, D., BUCK, L., (...) Egrie, J. (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology*, (21), 414-421. 10.1038/nbt799
- FIDAN, O., ZHAN, J. (2015). Recent advances in engineering yeast for pharmaceutical protein production. *RSC Advances*, (5), 86665-86674. 10.1039/c5ra13003d
- FRANCO FRAGUAS, M. L., SAVIO QUEVEDO, E. (2008). Medicamentos biotecnológicos: conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico. *Tendencias en medicina*, , art. 3.
- GEORGE, P. M., BADIGER, R., ALAZAWI, W., FOSTER, G. F., MITCHELL, J. A. (2012). Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacology & Therapeutics*, (135), 44-53. 10.1016/j.pharmthera.2012.03.006
- GHADERI, D., ZHANG, M., HURTADO-ZIOLA, N., VARKI, A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, (28), 147-176. 10.5661/bger-28-147

- HIGEL, F., SEIDL, A., SÖRCEL, F., FRIESS, W.** (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (100), 94–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>
- HUDAK, J. A., BERTOZZI, C. A.** (2014). Glycotherapy: New Advances Inspire a Reemergence of Glycans in Medicine. *Chemistry & Biology*, 21(1), 16–37. [10.1016/j.chembiol.2013.09.010](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.010). epub 2013 Nov 21
- JEONG, Y. T., CHOI, O., DOK SON, Y., YEOL PARK, S., HOE KIM, J.** (2009). Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in genetically engineered Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (52), 283–329. [10.1042/ba20080044](https://doi.org/10.1042/ba20080044)
- JEVŠEVAR, S., KUNSTELJ, M., GABERČ POREKAR, V.** (2010). PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, (5), 113–128. doi 10.1002/biot.200900218
- KIM, J. Y., KIM, Y. G., LEE, G. M.** (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3):917–930. [10.1007/s00253-011-3758-5](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5)
- KIM, H., YOO, S. J., KANG, H. A.** (2015). Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, (1), 1–16. [10.1111/1567-1364.12195](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195)
- LAUKENS, B., DE VISSCHER, C., CALLEWAERT, N.** (2015). Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now?. *Future Microbiology*, 10(1), 21–34. [10.2217/fmb.14.104](https://doi.org/10.2217/fmb.14.104)
- LI, H., D'ANJOU, M.** (2009). Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, (20), 678–684. [10.1016/j.copbio.2009.10.009](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.009)
- NETT, J. H., GOMATHINAYAGAM, S., HAMILTON, S. R., GONG, B., DAVIDSON, R., DU, M. (...), Sethuraman, N.** (2012). Optimization of erythropoietin production with controlled glycosylation–PEGylated erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, (157), 198–206. [10.1016/j.jbiotec.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.002)
- NG, T., MARX, G., LITTLEWOOD, T., MACDOUGALL, I.** (2003). Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgraduate Medical Journal*, 79(933), 367–376. [10.1136/pmj.79.933.367](https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.367)
- PANDAL, J., WRIGHT, P. C.** (2010). N-Linked glycoengineering for human therapeutic proteins in bacteria. *Biotechnology Letters*, (32), 1189–1198. [10.1007/s10529-010-0289-6](https://doi.org/10.1007/s10529-010-0289-6)
- PERLMAN, S., VAN DEN HAZEL, B., CHRISTIANSEN, J., GRAM-NIELSEN, S., JEPPESEN, C. B., ANDERSEN, K. V. (...), Schambye, H. T.** (2003). Glycosylation of an N-Terminal Extension Prolongs the Half-Life and Increases the in Vivo Activity of Follicle Stimulating Hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(7), 3227–3235. [10.1210/jc.2002-021201](https://doi.org/10.1210/jc.2002-021201)

- REUSCH, D., TEJADA, ML.** (2015). Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*, 25(12), 1325–34. 10.1093/glycob/cwv065.
- SCHWARZ, F., AEBI, M.** (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, (21), 576–582. 10.1016/j.sbi.2011.08.005
- SHRIVER, Z., RAGURAM, S., SASISEKHARAN, R.** (2004). Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(10), 863–73. 10.1038/nrd1521
- SINCLAIR, A., ELLIOT, S.** (2004). Glycoengineering: The Effect of Glycosylation on the Properties of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1626–1635. 10.1002/jps.20319
- SOLÁ, R., GRIEBENOW, K.** (2010). Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy. *BioDrugs*, 24(1), 9–21. 10.2165/11530550-000000000-00000
- SZLACHCIC, A., ZAKRZEWSKA, M., OTLEWSKI, J.** (2011). Longer action means better drug: Tuning up protein therapeutics. *Biotechnology Advances*, 29, 436–441. 10.1016/j.biotechadv.2011.03.005
- TROUSDALE, R. K., YU, B., POLLAK, S., HUSAMI, N., VIDALI, A., LUSTBADER, J. W.** (2009). Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertility and Sterility*, (91), 265–270. 10.1016/j.fertnstert.2007.11.013
- UEDA, T.** (2014). Next-generation optimized biotherapeutics — A review and preclinical study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844(11), 2053–2057. 10.1016/j.bbapap.2014.06.008
- VAZQUEZ-LOMBARDI, R., ROOME, B., CHRIST, D.** (2013). Molecular Engineering of Therapeutic Cytokine. *Antibodies*, (2), 426–451. 10.3390/antib2030426
- VILČEK, J., FELDMANN, M.** (2004). Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 25(4), 201–209. 10.1016/j.tips.2004.02.011
- WALSH, G.** (2004). Second-generation biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.012>
- WANG, Q., STUCZYNSKI, M., GAO, Y., BETENBAUGH, M. J.** (2015). Strategies for Engineering Protein N-Glycosylation Pathways in Mammalian Cells. *Methods in Molecular Biology*, (1321), 287–305. 10.1007/978-1-4939-2760-9_20
- WEENEN, C., PEÑA, J. E., POLLAK, S. V., KLEIN, J., LOBEL, L., TROUSDALE, R. K. (...), Lustbader, J. W.** (2004). Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with o-linked analogs in female rats. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(10), 5204–5212. 10.1210/jc.2004-0425.
- YIN, B., GAO, Y., CHUNG, C., YANG, S., BLAKE, E., STUCZYNSKI, M. C. (...), Betenbaugh, M. J.** (2015). Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(11), 2343–2351. 10.1002/bit.25650

17

Estudio de caso de producción de una nueva glicoproteína terapéutica: glicoingeniería, expresión, purificación y análisis de variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b

AGUSTINA GUGLIOTTA

17.1. INTERFERÓN

El Interferón (IFN) fue descubierto por los investigadores Isaacs y Lindenmann en el año 1957, al detectar la presencia de un material soluble, secretado por las células frente a la exposición con un virus. Su nombre fue establecido considerando su capacidad de «interferir» y proteger a las células frente a la infección viral (Isaacs y Lindenmann, 1957; Merigan, 1967; Vilçek y Feldmann, 2004).

17.1.1. Clasificación de la superfamilia IFN

Los IFNs constituyen una gran familia de proteínas clasificadas como citoquinas α -helicoidales, que presentan roles cruciales tanto en la respuesta inmune innata frente a la infección con virus, como así también en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa que confiere inmunidad antiviral a largo plazo (Tovey y col., 2008). En humanos, la superfamilia IFN está constituida por 3 subfamilias: IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III. La clasificación se realiza en función de su capacidad para unirse a receptores del mismo tipo. Cada IFN es designado con una letra griega (Borden y col., 2007; Tovey y Lallemand, 2010).

Los IFNs de tipo I (IFN-I) están principalmente representados por el IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ . Todos ellos se unen a un mismo receptor heterodimérico de alta afinidad, el cual está compuesto por dos cadenas polipeptídicas de transmembrana, IFNAR-1 e IFNAR-2 (Tovey y Lallemand, 2010).

17.1.2. Interferones de tipo I: IFN- α humano

Los IFNs-I exhiben actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. No son proteínas efectoras, es por ésto que para poder ejercer su acción necesitan interactuar con receptores específicos presentes en la superficie de diferentes tipos celulares. Los IFNs-I no son específicos de especie, es

decir que pueden interactuar con receptores presentes en la superficie celular de huéspedes diferentes. En humanos, los genes correspondientes a la familia IFN-I codifican para 12 subtipos de IFN- α funcionales y un solo tipo de IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ (Borden y col., 2007; Tovey y Lallemand, 2010).

El IFN- $\alpha 2$ es producido principalmente por leucocitos en respuesta a estímulos apropiados. Existen tres variantes alélicas del IFN- $\alpha 2$: IFN- $\alpha 2a$, IFN- $\alpha 2b$ e IFN- $\alpha 2c$ que difieren entre sí en los aminoácidos ubicados en las posiciones 23 y 34. El IFN- $\alpha 2b$ posee Arg en la posición 23 e His en la 34 (Bekisz y col., 2004).

La masa molecular teórica promedio de los diferentes subtipos de IFN- α es 18,5 kDa pero puede variar entre 19 y 26 kDa debido a la presencia de modificaciones postraduccionales (El-Baky y Redwan, 2015). Consecuentemente, los diferentes subtipos de IFN- α presentan diferentes puntos isoeléctricos (pI) que se distribuyen en el rango entre 4,5 y 7. La actividad biológica específica del IFN- α es del orden de 10^8 unidades internacionales (UI) por mg de proteína (Rubinstein y col., 1979). El IFN- $\alpha 2$ es el único subtipo que ha demostrado la presencia de O-glicosilación en la Thr106 (Adolf y col., 1991).

17.1.3. hIFN- $\alpha 2b$ recombinante

Los efectos antivirales del IFN- α junto con su potencial actividad antitumoral condujeron a la producción del hIFN- α a gran escala con el objetivo de proceder a ensayos clínicos que permitan llevar a cabo su evaluación en enfermedades virales y tumorales. Inicialmente, se llevó a cabo la producción de la citoquina mencionada a partir de leucocitos inducidos con virus Sendai, molécula que llegó a ser evaluada en ensayos clínicos en el año 1974. Tiempo después, el hIFN- $\alpha 2$ fue el primer subtipo en ser clonado y producido en *E. coli*, convirtiéndose en el primer IFN y la primera citoquina en ser aprobada para su comercialización por la industria farmacéutica (Paul y col., 2015).

En términos de investigación bioquímica básica y desarrollo de nuevos biofarmacéuticos, el sistema de expresión procariota aún constituye la opción más elegida para llevar a cabo la producción de IFN ya que presenta la ventaja de alcanzar rápidamente densidades celulares elevadas, dando como resultado la producción de gran cantidad de proteína. Sin embargo, esta se obtiene bajo la forma de cuerpos de inclusión donde generalmente se encuentra en una elevada proporción de estructura no nativa, requiriendo procedimientos de renaturalización para recuperar su conformación natural y, en consecuencia, su actividad biológica (El-Baky y Redwan, 2015).

Con el objetivo de sortear los obstáculos presentados en la producción de IFN- α humano recombinante (rhIFN- α) en bacterias, se han empleado otros sistemas tales como la expresión en células eucariotas que incluyen: levaduras, células de insectos, células de mamíferos y también sistemas de expresión libres de células. En general, estos sistemas presentan ventajas respecto del sistema

procariota ya que permiten lograr un apropiado plegamiento de la proteína, así como también la introducción de modificaciones postraduccionales necesarias para la actividad biológica *in vivo* del $\text{hIFN-}\alpha$ (El-Baky y Redwan, 2015).

17.1.4. $\text{rhIFN-}\alpha 2\text{b}$ como glicoproteína terapéutica

17.1.4.1. Usos clínicos del $\text{rhIFN-}\alpha 2\text{b}$

Las dos variantes alélicas de $\text{hIFN-}\alpha 2$ producidas en *E. coli* fueron aprobadas por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) en el año 1986 para el tratamiento de leucemia de células vellosas y comercializados bajo la denominación **ROFERON-A**[®] ($\text{rhIFN-}\alpha 2\text{a}$) por Hoffmann La Roche, Inc. e **INTRON A**[®] ($\text{rhIFN-}\alpha 2\text{b}$), por Schering-Plough. Actualmente, estos IFNs y sus variantes modificadas mediante la adición de polietilenglicol (PEG Intron[®], Schering-Plough, y PEGASYS[®], Hoffman La Roche, Inc.) se encuentran aprobados en un gran número de países para su uso clínico en el tratamiento de una amplia variedad de patologías virales y cancerígenas.

El $\text{IFN-}\alpha$ presenta un rol crucial en la inmunidad tumoral y terapias inmunes. Básicamente, el empleo de $\text{rhIFN-}\alpha 2$ como agente antitumoral se basa en su elevada capacidad para ejercer citotoxicidad directa sobre células tumorales y para estimular la acción de macrófagos y células NK (Rachmawati y col., 2004). Por otra parte, el $\text{IFN-}\alpha$ puede ser empleado como adyuvante en protocolos de radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia contra el cáncer, permitiendo prolongar la respuesta antitumoral (Zitvogel y col., 2015). En la actualidad, el $\text{rhIFN-}\alpha$ se encuentra aprobado para el tratamiento de linfoma folicular, leucemia de células vellosas, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi relacionada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y carcinoma de células renales metastásico. Además, el IFN ha sido empleado frente a cáncer renal y de vejiga (El-Baky y Redwan, 2015).

Por otra parte, la terapia con $\text{IFN-}\alpha$ ha logrado un notable éxito en el control de infecciones con el virus de la hepatitis B y C (HBV y HCV, respectivamente). Recientemente ha sido recomendado su empleo en el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple, quienes pierden la capacidad de respuesta al $\text{IFN-}\beta$ debido a la aparición de anticuerpos neutralizantes (El-Baky y Redwan, 2015).

17.1.4.2. Farmacocinética y efectos adversos del $\text{rhIFN-}\alpha 2$

La absorción de los IFN-I a través del tracto gastrointestinal es muy baja, motivo por el cual deben ser administrados por vía parenteral. Si bien el $\text{hIFN-}\alpha 2$ puede ser administrado por vía subcutánea, intravenosa e intramuscular, la primera es la más utilizada (George y col., 2012).

A pesar de que el perfil farmacocinético del IFN depende de la vía de administración, en todos los casos se produce una rápida inactivación y eliminación de la citoquina del organismo. El riñón es el principal órgano donde se produce el catabolismo del IFN mediante filtración glomerular y reabsorción tubular, en la que ocurre la degradación proteolítica (Bino y col., 1982; Sotoca Momblona, 1999). Por este motivo, se requieren dosis elevadas y frecuentes para alcanzar la ventana terapéutica durante el tratamiento con IFN. Esto puede conducir a la aparición de efectos tóxicos y síntomas adversos al tratamiento. Uno de los efectos adversos más comunes es la linfopenia. Asimismo, es muy común la aparición de efectos característicos de la gripe tales como: dolor de cabeza, malestar general, fiebre, escalofríos, fatiga, mialgia y dolores en las articulaciones y espalda. También se han reportado algunos efectos psicológicos como depresión, irritabilidad y cambios en la personalidad (Pestka y col., 2007).

17.2. GLICOINGENIERÍA DEL hIFN- α 2b: IFN4N

La glicoingeniería forma parte de la ingeniería de proteínas y puede ser definida como un procedimiento para incrementar el contenido de glicanos, específicamente de hidratos de carbono conteniendo ácido siálico (AS) con el fin de aumentar la actividad biológica y la duración de la acción de tales proteínas (Sinclair y Elliot 2005).

Una de las estrategias de glicoingeniería más empleada consiste en la introducción de mutaciones puntuales con el objetivo de generar sitios potenciales para N-glicosilación (Asn Xxx Ser/Thr) que posteriormente serán reconocidos y glicosilados por la maquinaria endógena celular (Sinclair y Elliot 2005).

La estrategia de glicoingeniería descrita anteriormente se empleó en nuestro laboratorio para el desarrollo de una variante hiperglicosilada del hIFN- α 2b denominada IFN4N (Ceaglio y col., 2008). La misma fue construida mediante la introducción de 4 mutaciones puntuales en la secuencia del hIFN- α 2b (P4, R23, K70, D77) que permitieron generar 4 sitios potenciales de N-glicosilación. La elección de los aminoácidos en los cuales se realizó la mutación puntual se llevó a cabo a partir de un análisis teórico basado en la estructura de la citoquina y en las regiones potencialmente involucradas en la interacción con su receptor. Inicialmente, se seleccionaron 14 posibles mutaciones que permitieran generar variantes portando un sitio consenso de N-glicosilación con una alta probabilidad de glicosilación, evitando distorsión conformacional y conservando la actividad biológica de la proteína. La comparación de la eficiencia de glicosilación y la actividad biológica específica (ABE) de las muteínas con un sitio de N-glicosilación expresadas en forma transitoria en células CHO-K1 condujeron a la selección de las posiciones más adecuadas para incorporar, de manera secuencial,

múltiples sitios de N-glicosilación hasta generar la variante IFN4N (Ceaglio y col. 2008). Esta última evidenció una masa molecular aparente aproximadamente 3 veces superior en comparación con la molécula no glicosilada. Además, conservó solo entre un 10 % y un 20 % de la ABE antiviral correspondiente a la proteína nativa. La introducción de mutaciones o la unión de los oligosacáridos afectaron en mayor grado la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de las citoquinas, observándose una notable reducción luego de la sustitución de la R23 por Asn. La molécula IFN4N conservó solo entre un 2 % y un 3 % de dicha ABE. Estudios farmacocinéticos demostraron un incremento de 25 veces en el tiempo de vida media y una disminución de 20 veces en el clearance sistémico, con respecto a la molécula no modificada (Ceaglio y col. 2008). Finalmente y a pesar del importante descenso de la ABE antiproliferativa evaluada *in vitro*, la notoria mejora de las propiedades farmacocinéticas debidas al agregado de los N-glicanos permitió incrementar la actividad biológica antitumoral *in vivo* del IFN4N (Ceaglio y col., 2010). La misma fue estudiada en ratones inmunodeficientes mediante la implantación de tumores sólidos de células de origen prostático (PC-3), en los cuales se observó una disminución de la velocidad de crecimiento de los tumores por acción de la citoquina hiperglicosilada, en comparación con el mismo esquema de tratamiento empleando rhIFN- α 2b no glicosilado. Los resultados obtenidos por Ceaglio y col. (2010) demostraron la utilidad de la glicoingeniería para generar variantes glicosiladas de rhIFN- α 2b que presenten actividad biológica *in vivo* incrementada.

17.3. PRODUCCIÓN DE IFN4N EN CÉLULAS CHO-K1 Y HEK293

Debido al grado de dificultad y el bajo rendimiento asociados a la producción de proteínas recombinantes en células animales, la exhaustiva caracterización de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b como potenciales medicamentos demanda la generación de líneas y clones celulares que presenten una elevada productividad de la citoquina. Es aquí donde adquiere relevancia la optimización del proceso productivo desde el *upstream*, incluyendo la evaluación de diferentes sistemas de alta expresión en células eucariotas, como es el caso de los vectores lentivirales de tercera generación y el uso de huéspedes celulares de diferente origen.

17.3.1. Elección de la línea celular

En la actualidad, los cultivos de células eucariotas dominan el campo de producción de proteínas recombinantes empleadas como agentes terapéuticos, para el diagnóstico y la prevención de enfermedades (Zhu, 2012). Si

bien la utilización de sistemas procariotas se caracteriza por ser más rápida y económica y las líneas celulares eucariotas ofrecen bajas productividades específicas de proteínas recombinantes, estas últimas constituyen el sistema de elección ya que permiten llevar a cabo el correcto procesamiento y plegamiento de la proteína de interés y además introducen modificaciones postraduccionales apropiadas. Por este motivo, para producir bioterapéuticos para humanos, la balanza costo-beneficio se inclina a favor del sistema eucariota (Almo y Love, 2014).

Tanto las células CHO-K1 derivadas de ovario de hámster chino (del inglés, *Chinese Hamster Ovary*) como HEK293, derivadas de células renales embrionarias de origen humano (del inglés, *Human Embryonic Kidney*), fueron elegidas como huésped de producción con el objetivo de mejorar la etapa de *upstream* del proceso.

Las células CHO constituyen una plataforma de producción robusta y confiable, muy utilizada en la industria farmacéutica para la generación de proteínas recombinantes de uso terapéutico a gran escala. Sin embargo, su empleo presenta ciertas desventajas principalmente relacionadas con la capacidad de esta línea celular para introducir epitopes inmunogénicos para humanos que deben ser controlados a los fines de evitar reacciones inmunes en los pacientes. Como se mencionó en capítulos anteriores, existen dos epitopes glicosídicos críticos que pueden despertar la respuesta inmune en humanos. Uno de ellos es el residuo α -Gal (Gal α 1,3Gal) y el otro es el ácido glicolilneuramínico (Neu5Gc), AS terminal característico de células animales no primates (Ghaderi y col., 2012;).

Si bien las células CHO constituyen la plataforma más utilizada para la producción de biofarmacéuticos, la necesidad de obtener proteínas recombinantes más eficaces y seguras ha impulsado el desarrollo de líneas celulares recombinantes de origen humano.

La línea celular HEK crece fácilmente y es muy fácil de transfectar y transducir. De este modo, permite generar líneas celulares recombinantes estables con elevados niveles de producción de la proteína estudiada. Con el objeto de producir proteínas recombinantes de uso terapéutico, las líneas celulares humanas son ampliamente consideradas debido a su capacidad de introducir modificaciones postraduccionales similares a las que se encuentran en proteínas naturalmente secretadas por humanos, evitando así reacciones inmunes contra epitopes no humanos. Particularmente, las células derivadas de hámster, carecen de enzimas tales como α 2-6 sialiltransferasa, α 1-3/4 fucosiltransferasa y transferasa de N-acetilglucosamina bisectante, necesarias para obtener un perfil de glicosilación similar al de proteínas humanas (Grabenhorst y col., 1999, Dumont y col., 2015).

17.3.2. Sistema empleado para la transferencia de genes. Generación de líneas y clones celulares. Producción y purificación

En la actualidad existen diversas metodologías que permiten llevar a cabo la introducción del material genético de interés en el genoma celular. Sin embargo, la mayoría de ellas se caracterizan por la integración del transgén al azar en sitios impredecibles del genoma, lo cual generalmente resulta en su baja o nula expresión. Tal es el caso de la transfección, metodología tradicionalmente usada para la generación de líneas celulares recombinantes estables. Solo unas pocas metodologías permiten obtener de manera eficiente líneas celulares con elevadas producciones específicas de la proteína en estudio. La efectividad de estas metodologías se debe a su naturaleza intrínseca que conduce a la integración del *cassette* de expresión en regiones del genoma transcripcionalmente activas.

Los vectores lentivirales de tercera generación han sido utilizados de manera exitosa para la generación de líneas celulares estables productoras de proteínas recombinantes, obteniéndose como resultado líneas celulares con elevadas productividades específicas de proteínas complejas (Oberbek y col., 2011).

En particular, en nuestro laboratorio (Laboratorio de Cultivos Celulares perteneciente al Centro Biotecnológico del Litoral de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL) el empleo de vectores lentivirales permitió obtener líneas celulares derivadas de células CHO y HEK con elevadas productividades específicas de IFN γ . Específicamente, la línea celular HEK duplicó la productividad de la línea celular CHO (1491 ± 332 vs. 817 ± 136 ng $\cdot 10^6$ cél $^{-1}$. día $^{-1}$). Estas líneas celulares fueron clonadas empleando el método de dilución límite. El análisis de los clones permitió seleccionar a los mejores productores que presentaron características marcadamente superiores respecto del clon obtenido previamente en nuestro laboratorio a través de la metodología clásica de transfección. Este último clon mostró una productividad específica de IFN γ de aproximadamente 2 ng $\cdot 10^6$ cél $^{-1}$. h $^{-1}$, lo que representa entre un 2 % y un 5 % de las producciones específicas promedio de los clones obtenidos mediante procedimiento de transducción de células HEK y CHO, respectivamente. Este resultado permitió definir a la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación como la herramienta más apropiada para la generación de líneas celulares que presenten elevadas producciones específicas de la proteína de interés.

Ambas variantes de IFN γ , IFN γ _{CHO} e IFN γ _{HEK}, fueron producidas en condiciones de adherencia y purificadas mediante cromatografía de inmovilizada afinidad. Se obtuvo una masa de entre 2 y 3 mg de cada una de las proteínas con purezas del 98 % para la variante de CHO y 92 % para la variante de HEK.

17.4. CARACTERIZACIÓN DEL IFN4N_{CHO} E IFN4N_{HEK}

17.4.1. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de las moléculas purificadas de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fue llevada a cabo mediante ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) e isoelectroenfoque (IEF) seguidos de tinción con el colorante azul brillante de Coomassie.

Mediante el ensayo de SDS-PAGE realizado en condiciones reductoras, se analizaron las muestras de IFNwt e IFN4N derivado de células CHO y HEK antes y luego de ser sometidos a digestión con PNGasa F, que escinde los glicanos unidos mediante enlaces de tipo N (Figura 17.1A). La ausencia de N-glicanos unidos al hIFN- α 2b *wild type* (wt) fue confirmada mediante la comparación entre las calles 2 y 3. La diferencia observada entre el IFNwt y la variante no glicosilada (IFN-NG) se atribuyó a la presencia de O-glicanos unidos a la Thr106 de la molécula nativa.

Por otro lado, se observó una notable diferencia entre la masa molecular aparente máxima alcanzada por las moléculas de IFN4N producidas en distintos huéspedes. Particularmente, el IFN4N_{CHO} presentó una masa molecular aparente máxima de aproximadamente 57 kDa mientras que para el IFN4N_{HEK} fue de aproximadamente 52 kDa. La variante producida en células CHO presentó una distribución de bandas heterogénea, mayormente concentrada hacia las zonas de masas moleculares superiores a 40 kDa. La variante producida en células HEK presentó una distribución de bandas más homogénea, las cuales se ubicaron uniformemente repartidas entre los 25 y 45 kDa.

Luego de la digestión con PNGasa F, tanto el IFN4N_{HEK} como el IFN4N_{CHO} (calles 5 y 7, respectivamente) se redujeron a una banda principal de aproximadamente 21–22 kDa, que se correspondió con la variante nativa del hIFN- α 2b. Notablemente, luego de la N-digestión de la variante producida en células HEK se visualizó la aparición de una banda correspondiente con el IFN-NG, la cual no fue observada en el producto de la digestión de la molécula derivada de células CHO. Este resultado sugiere la presencia de variantes de IFN4N_{HEK} que portan glicanos de tipo N pero no de tipo O.

Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo de IEF en el cual las diferentes isoformas de pI del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fueron sometidas a migración en un gel con un gradiente de pH entre 2,9 y 4,9 (Figura 17.1B). Se observó que las variantes hiperglicosiladas presentaron una cantidad de isoformas muy superior a la evidenciada por la variante no glicosilada (calle 1) y la nativa (calle 2) del hIFN- α 2b. Específicamente, el IFNwt presentó un mayor número de isoformas que el IFN-NG, lo cual es coherente ya que esta última no se encuentra glicosilada, mientras que la anterior presenta solo un sitio de O-glicosilación. Al comparar el IFN4N_{CHO} con el IFN4N_{HEK} se observó que ambas moléculas presentaron isoformas repartidas a lo largo de todo el gradiente

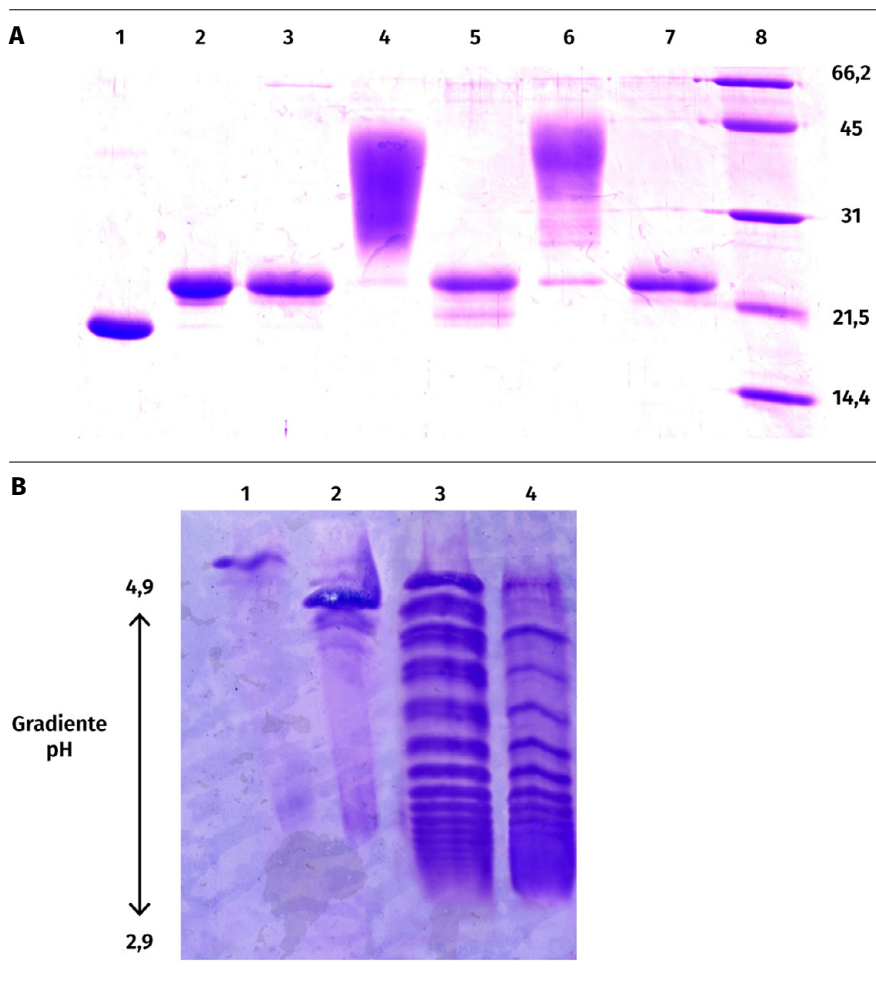


FIGURA 17.1. CARACTERIZACIÓN FISIQUÍMICA DEL IFN4N_{CHO} E IFN4N_{HEK}.
A. COMPARACIÓN DE LA MASA MOLECULAR APARENTE DEL IFN4N_{HEK} E IFN4N_{CHO} MEDIANTE SDS-PAGE EN CONDICIONES REDUCTORAS. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PRE Y POSDIGESTIÓN CON PNGASA F. 1: IFN-NG, 2: IFNWT, 3: IFNWT N-DEGLICOSILADO, 4: IFN4N_{HEK}, 5: IFN4N_{HEK} N-DEGLICOSILADO, 6: IFN4N_{CHO}, 7: IFN4N_{CHO} N-DEGLICOSILADO, 8: MARCADOR DE MASA MOLECULAR. **B.** ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ISOFORMAS DE DIFERENTE PI Y SU DISTRIBUCIÓN A LO LARGO DEL GRADIENTE DE PH ESTABLECIDO EN ENSAYOS DE IEF. 1: IFN-NG, 2: IFNWT, 3: IFN4N_{HEK}; 4: IFN4N_{CHO}

de punto isoléctrico. Mientras que la variante proveniente de células humanas presentó isoformas uniformemente repartidas a lo largo de todo el gradiente de pH, la variante derivada de células CHO se concentró principalmente hacia la zona ácida del gel. Además, esta última presentó isoformas más ácidas respecto del IFN4N_{HEK}, que no pudieron ser resueltas correctamente debido a limitaciones de la metodología.

17.4.2. Análisis glicosídico

La caracterización fisicoquímica del IFN4N producido en células CHO y HEK permitió concluir que las diferencias entre ellos están dadas principalmente por la presencia de glicanos que aportan distintas características de acuerdo con su composición. Teniendo en cuenta que la secuencia aminoacídica de ambas proteínas es la misma y, en consecuencia, los sitios potenciales de N- y O-glicosilación también, las principales diferencias podrían deberse a la diferente ocupación de sitios y/o a la estructura de los glicanos. Además, otros autores ya han descrito la existencia de marcadas diferencias en el grado de glicosilación de diferentes proteínas producidas en células derivadas de hámster y de humano.

17.4.2.1. Cuantificación de los monosacáridos que componen las estructuras glicosídicas derivadas del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Con el fin de analizar el contenido de las estructuras glicosídicas que conforman los oligosacáridos del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, se analizaron los monosacáridos neutros (Gal, Man y Fuc) y aminados (GlcNAc y GalNAc), así como también cargados, tal es el caso del ácido siálico (AS). Para este análisis las muestras fueron sometidas a diferentes hidrólisis ácidas y posteriormente fueron evaluadas mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado, empleando un detector electroquímico de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

Particularmente, el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas es una característica muy importante ya que contribuye a prolongar su tiempo de vida media plasmática y, en consecuencia, permite mejorar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas. Sin embargo, cuando el huésped de producción empleado no es de origen humano, como en el caso de las células CHO, deben controlarse las cantidades de la variante de ácido siálico denominada Neu5Gc, que resulta un epítope inmunogénico para humanos.

El análisis de las muestras demostró la misma proporción de Man y Fuc así como también de GlcNAc y GalNAc en relación molar al comparar las moléculas de IFN producidas en ambos huéspedes celulares. La principal diferencia entre ellas se visualizó en el contenido de Gal y AS. Por un lado, IFN4N_{CHO} evidenció un contenido de Gal aproximadamente 4 veces mayor respecto del IFN4N_{HEK}. Este resultado indicaría la presencia de estructuras más ramificadas en la molécula generada en células CHO. Asimismo, podría indicar la presencia de estructuras truncas entre los glicanos de la variante producida en células HEK, es decir, estructuras cuyo monosacárido terminal es una GlcNAc. Es importante aclarar que si bien el IFN4N se encuentra altamente N-glicosilado, la presencia de GalNAc se debe a la O glicosilación de la Thr106 en ambos IFNs (Tabla 17.1). Por otro lado, el resultado de la cuantificación de AS coincidió con las observaciones realizadas durante la caracterización fisicoquímica que

indicaban un mayor contenido de isoformas acídicas para la variante IFN4N_{CHO}, la cual en este caso evidenció un contenido de Neu5Ac significativamente superior respecto del valor obtenido para el IFN4N_{HEK}.

Teniendo en cuenta que el límite de detección de Neu5Gc establecido para esta metodología es 0,6 pmoles, es importante mencionar que no se detectó su presencia en la muestra proveniente de células HEK. Contrariamente, un 0,9 % de Neu5Gc fue observado para la variante producida en células CHO.

TABLA 17.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS EN LAS ESTRUCTURAS GLICOSÍDICAS DEL IFN4NCHO E IFN4NHEK

Monosacáridos (ms)	IFN4N _{HEK}		IFN4N _{CHO}	
	(mol MS.mol IFN ⁻¹)			
GalNAc	1,1	± 0,3	0,8	± 0,01
GlcNAc	13,2	± 1,9	12,9	± 2,5
Fuc	1,1	± 0,4	1,6	± 0,4
Gal	3,0	± 0,4	11,2	± 1,1
Man	5,1	± 0,6	5,7	± 0,1
Neu5Ac	3,1	± 0,5	7,9	± 1,1
Neu5Gc	n/d		0,07	± 0,02

N/D: NO DETECTABLE

17.4.2.2. Comparación de glicanos neutros y cargados presentes en el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}

Los N-glicanos del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} marcados con el fluoróforo 2 amino-benzamida (2-AB) fueron analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico débil, de manera de conocer la proporción de estructuras neutras, mono, bi, tri y tetrasiladas así como también estructuras de alta manosa fosforiladas (HMP). La identificación de estructuras se realizó en función de un estándar basado en el empleo de la proteína fetuina, cuyas estructuras se encuentran ampliamente descriptas.

El IFN4N_{HEK} exhibió una elevada proporción de glicanos neutros y monosialilados (68 %) mientras que el IFN4N_{CHO} evidenció una mayor proporción de especies bi- tri- y tetrasialiladas que en conjunto constituyeron un 79 % del total de los glicanos. La mayor diferencia entre los IFN4N se visualizó a nivel de los glicanos neutros que representaron casi el 50 % de los oligosacáridos del IFN_{HEK} contra un 6 % de glicanos neutros presentes en el IFN_{CHO} (~8 veces menor, Tabla 17.2). Además, para ambas muestras se observó la presencia de estructuras con un perfil de tiempo de elución similar a los estándares de glicanos de HMP.

TABLA 17.2. CONTENIDO DE ESTRUCTURAS GLICOSÍDICAS NEUTRAS Y CARGADAS PARA EL IFN4N_{HEK} E IFN4N_{CHO}

Glicanos (%)	IFN4N _{HEK}	IFN4N _{CHO}
Neutros	49	6
Monosialilados	19	11
Alta Manosa 5-,6-fosfato (HMP)	2	4
Bisialilados	14	23
Trisialilados	9	30
Tetrasialilados	7	26

17.4.2.3. Análisis de N-glicanos provenientes del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y espectrometría de masas. Análisis de las muestras luego de la digestión con enzimas exoglicosidasas

Los glicanos derivados de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} marcados con el fluoróforo 2-AB fueron analizados mediante HILIC-UPLC seguido de espectrometría de masas.

A partir del cromatograma obtenido, los picos principales fueron identificados con el tiempo de retención correspondiente. En la Tabla 17.3 se muestran las unidades de glucosa (UG) calculadas para cada uno de los picos predominantes empleando una curva de calibrado construida a partir de la cromatografía de estándares de moléculas de dextrano de diferente masa molecular (*dextran ladder*). Asimismo, se incluye el m/z observado y teórico, la estructura asignada y el porcentaje de abundancia correspondiente.

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de los N-glicanos con exoglicosidasas y su posterior análisis mediante HILIC-HPLC. El cálculo de UG para cada pico fue importante no solo para la confirmación de estructuras anteriormente asignadas mediante espectrometría de masas, sino también para la asignación de estructuras a aquellos picos para los cuales no se pudo obtener un valor de m/z. En la Figura 17.2 se observa el resultado de HILIC-HPLC para la muestra pre y postdigestión con enzimas exoglicosidasas.

En términos generales, se observó que para el IFN4N_{HEK} los picos de mayor tamaño eluyeron a valores de UG entre 5 y 8 mientras que para el IFN4N_{CHO} las principales estructuras detectadas eluyeron a valores de UG entre 8 y 14. Este resultado reveló que el IFN4N_{CHO} presenta una mayor cantidad de estructuras altamente ramificadas mientras que el IFN4N_{HEK} se compone mayoritariamente de estructuras glicosídicas más pequeñas. Es importante tener en cuenta que para la variante derivada de células HEK, también se observaron picos a UG mayores, demostrando la presencia de estructuras glicosídicas altamente ramificadas pero en menores cantidades.

TABLA 17.3 ANÁLISIS DE LOS N-GLICANOS DERIVADOS DEL IF4N_{HEK} E IFN4N_{CHO}

IFN4N _{HEK}						
Estructura	UG	m/z observado	m/z teórico	Error# (ppm)	Abundancia* (%)	TR
A2	5,41	n/d	1436,476	n/d	4	17,02
FA2	5,87	n/d	1582,534	n/d	6	20,63
FA2B/FA3	6,24	1785,657	1785,613	25	13	22,33
FA2G1	6,70	n/d	1744,587	n/d	14	25,75
FA2BG1	7,08	1947,709	1947,666	22	13	28,93
FA2G2S1	8,34	n/d	2197,735	n/d	4	38,80
FA4G4S2	11,65	3219,118	3219,095	7	4	62,92
FA4G4S3	12,18	3510,183	3510,190	-2	4	67,43
FA4G4S4	12,70	3801,310	3801,286	6	4	71,55

IFN4N _{CHO}						
Estructura	UG	m/z observado	m/z teórico	Error# (ppm)	Abundancia* (%)	TR
FA2G2S1	8,78	2197,792	2197,735	26	5	40,60
FA2G2S2	9,11	2488,910	2488,910	0	12	47,27
FA3G3S2	10,32	2853,993	2853,963	11	4	55,58
FA3G3S3	11,14	3145,100	3145,058	13	12	61,12
FA4G4S2	11,65	3219,104	3219,095	3	4	64,13
FA4G4S3	12,18	3510,230	3510,190	11	5	67,65
FA3G3Lac1S3	12,37	3510,230	3510,190	11	5	68,88
FA4G4S4	12,70	3801,355	3801,286	18	11	71,77
FA4G4Lac1S3	13,20	3875,413	3875,322	23	5	74,50
FA4G4Lac1S4	13,77	4166,466	4166,418	12	8	77,83
FA4G4Lac4S1	15,12	4411,507	4411,600	-21	4	82,97

N/D: ESTRUCTURAS QUE NO PUDIERON SER DETECTADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS. LA ESTRUCTURA PROPUESTA FUE ASIGNADA EN FUNCIÓN DE SU VALOR DE UG. **#ERROR (PPM):** SE CALCULÓ COMO EL PRODUCTO DE 106 Y EL COCIENTE CORRESPONDIENTE A LA DIFERENCIA ENTRE EL VALOR M/Z OBSERVADO Y EL TEÓRICO DIVIDIDO POR EL VALOR M/Z TEÓRICO. ***ABUNDANCIA (%):** INDICA LA PROPORCIÓN DE LA ESTRUCTURA DESCRITA RESPECTO DE LA TOTALIDAD DE LAS ESTRUCTURAS ANALIZADAS. SE CALCULÓ TENIENDO EN CUENTA EL ÁREA DE LOS PICOS DEL CROMATOGRAMA HILIC-UPLC

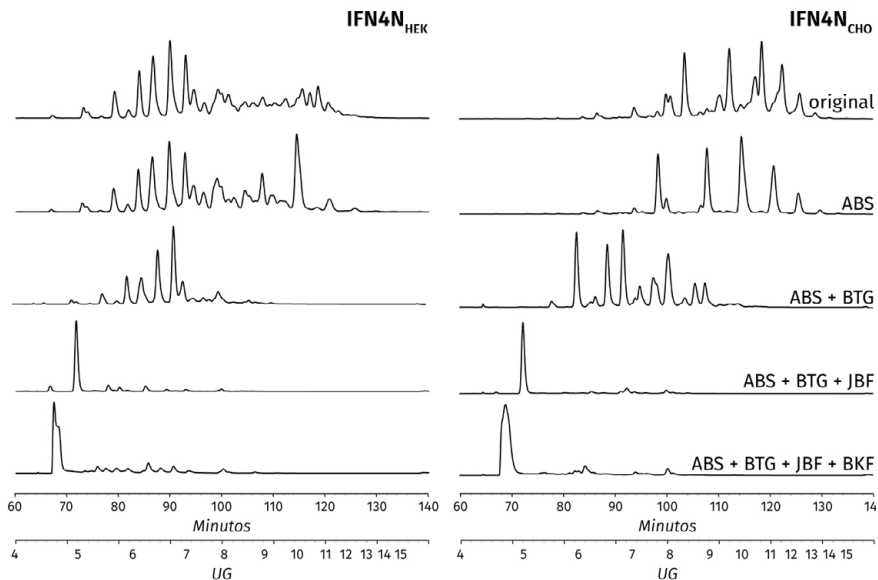


FIGURA 17.2. ANÁLISIS DE N-GLICANOS DERIVADOS DE IFN4N_{HEK} (IZQ.) E IFN4N_{CHO} (DER.) MEDIANTE HILIC-HPLC LUEGO DE LA DIGESTIÓN SECUENCIAL CON ENZIMAS EXOGLICOSIDASAS.

LOS N-GLICANOS OBTENIDOS A PARTIR DEL IFN4N DERIVADO DE CÉLULAS CHO Y HEK FUERON MARCADOS CON EL FLUORÓFORO 2-AB, DIGERIDOS CON ENZIMAS EXOGLICOSIDASAS Y LUEGO SOMETIDOS A HILIC-HPLC. SE MUESTRAN LOS CROMATOGRAMAS DE LOS N-GLICANOS SIN DIGERIR Y SOMETIDOS A DIFERENTES PROCESOS DE DIGESTIÓN SECUENCIAL CON LAS SIGUIENTES ENZIMAS PARA LAS CUALES SE INDICA ENTRE PARÉNTESIS SUS SIGLAS EN INGLÉS: (1) CON *ARTHROBACTER UREAFACIENS* SIALIDASA (ABS), (2) CON ABS Y B-GALACTOSIDASA DE TESTÍCULOS BOVINOS (BTG), (3) CON ABS, BTG Y B-N-ACETILHEXOSAMINIDASA DE POROTO DE SOJA (JBH) Y, POR ÚLTIMO, (4) CON ABS, BTG, JBH Y A-L-FUCOSIDASA DE RIÑÓN BOVINO (BKF)

El análisis de N-glicanos del IFN4N_{CHO} mediante espectrometría de masas permitió identificar estructuras completas principalmente constituidas por glicanos bi-, tri- y tetraantenarios con extensiones de N-acetilactosamina (LacNAc). Las abundancias relativas calculadas para cada pico evidenciaron que las estructuras FA2G2S2, FA3G3S3, FA4G4S4 y FA4G4Lac1S4 fueron las más abundantes (Tabla 17.3). En este caso, la digestión con exoglicosidasas y análisis mediante HILIC-HPLC fue empleada como herramienta complementaria y a su vez permitió afirmar que todas las estructuras glicosídicas tipo N derivadas del IFN4N producido en células CHO se encontraban completamente fucosiladas. La evaluación de los N-glicanos derivados de IFN4N_{HEK} demostró predominancia de estructuras glicosídicas incompletas o truncas. Si bien algunas estructuras no pudieron ser identificadas mediante espectrometría de masas, la asignación de UG y el análisis mediante digestión con exoglicosidasas

permitió realizar la asignación de estructuras. Las estructuras más abundantes fueron FA2B/FA3, FA2G1 y FA2BG1. La presencia de estructuras conteniendo GlcNAc bisectante fue observada para la muestra derivada de células humanas mientras que no se observó en la muestra proveniente de células CHO. A su vez, la digestión con exoglicosidas evidenció que un 4,5 % de las estructuras N-glicosídicas no se encontraban fucosiladas.

Para el análisis de las estructuras glicosídicas en base a las UG calculadas se tuvo en cuenta lo reportado en la GlycoBase (National Institute for Bioprocessing Research and Training, Dublin, Irlanda).

17.4.3. Caracterización biológica *in vitro* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Las variantes IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fueron evaluadas en relación con su capacidad *in vitro* para ejercer efectos antivirales sobre la línea celular MDBK frente a la presencia del virus vsv. Por otra parte, se evaluó la capacidad de estas citoquinas para ejercer su actividad antiproliferativa *in vitro* sobre la línea celular Daudi.

A partir de dichas determinaciones y de la concentración de cada una de las moléculas, se calculó la ABE.

En primer lugar, se observó que la ABE antiviral del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} (para ambas moléculas $165 \pm 15 \text{ UI}\cdot\text{ng}^{-1}$) fue superior respecto de su correspondiente valor de ABE antiproliferativa ($5,8 \pm 0,9 \text{ UI}\cdot\text{ng}^{-1}$ vs. $3,0 \pm 0,6$, respectivamente para ambas moléculas). Este comportamiento podría ser explicado teniendo en cuenta que la actividad antiproliferativa requiere de una interacción ligando-receptor más fuerte mientras que el estado antiviral puede ser inducido con una fuerza de interacción menor. En segundo lugar, si bien no se encontraron diferencias en la ABE antiviral de ambas moléculas, el IFN4N_{HEK} exhibió una ABE antiproliferativa significativamente superior respecto del IFN4N_{CHO} (**p = 0,001). El mayor grado de glicosilación exhibido por la molécula derivada de células CHO podría ser el principal responsable de su inferior valor de ABE antiproliferativa, más aún teniendo en cuenta que este tipo de actividad es más sensible a cambios en la afinidad de unión al receptor respecto de la actividad antiviral. Particularmente, se ha demostrado que, a menor contenido de ácido siálico, mayor es la ABE *in vitro* de la proteína, siendo la molécula eritropoyetina un caso emblemático de esta regla, por la cual se ha observado que preparaciones conteniendo una mayor proporción de isoformas altamente sialiladas demuestran menor ABE que contrapartes con menor proporción de tales isoformas (Goto y col., 1988; Egrie y col., 2003)

17.4.4. Evaluación farmacocinética del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Las propiedades farmacocinéticas de las glicoproteínas son altamente influenciadas por los oligosacáridos que las conforman y resultan críticas para la determinación de su eficacia terapéutica. La farmacocinética del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} fue llevada a cabo con el objetivo de evaluar la influencia de su perfil glicosídico sobre su velocidad de depuración o *clearance*, vida media plasmática, concentración máxima y tiempo necesario para alcanzarla.

Las diferencias observadas en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} no generaron grandes cambios en sus perfiles farmacocinéticos. Solo se visualizaron diferencias significativas durante la fase de absorción. Específicamente, el T_{máx} del IFN4N_{CHO} fue aproximadamente 3 veces superior respecto del correspondiente para la proteína producida en HEK, indicando que el mismo requiere de un tiempo significativamente más prolongado para alcanzar la máxima concentración plasmática ($p=0,03$). De todos modos, el C_{máx} de las dos proteínas no evidenció diferencias significativas (Tabla 17.4). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los parámetros $t_{1/2}$, AUC y Cl_{app} calculados para el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}.

Si bien muchos autores han descrito que el incremento del grado de glicosilación contribuye a un mejoramiento de las propiedades farmacocinéticas, la comprensión del comportamiento farmacocinético de cada molécula parecería ser más complejo.

Estudios previos han demostrado que las proteínas conteniendo Gal como glicano terminal (glicano desialilado) son removidas rápidamente de la circulación a través de endocitosis mediada por receptores de asialoglicoproteínas expresados en hepatocitos. Además, se ha postulado que las glicoproteínas conteniendo Man, Fuc o GlcNAc como glicanos terminales pueden ser removidas de la circulación mediante interacciones específicas con otros receptores tipo lectina expresados en diferentes tipos de células en mamíferos. Por otra parte, es importante tener en cuenta que las glicoproteínas pueden ser dirigidas hacia cierto tipo de tejidos y órganos dependiendo de las estructuras glicosídicas que contengan. Las evidencias postuladas permitirían explicar el comportamiento farmacocinético del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}. Las diferencias en el grado de glicosilación de ambas proteínas podrían ser las responsables de su direccionamiento hacia distintas vías de absorción y eliminación, promoviendo o interfiriendo en la interacción con los receptores partícipes de las mismas. Al involucrarse en diferentes vías farmacocinéticas no sería sorprendente que el comportamiento de ambas moléculas presente grandes similitudes, a pesar de las diferencias glicosídicas postuladas.

TABLA 17.4. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DEL IFN4N_{CHO} E IFN4N_{HEK} LUEGO DE SU INYECCIÓN SUBCUTÁNEA EN RATAS

Muestra	C _{máx} (UI.ml ⁻¹)	T _{máx} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (UI.h.ml ⁻¹)	CLapp (ml.h ⁻¹)
IFN4N _{CHO}	194 ± 17	7,2 ± 1,3	54 ± 6	11732 ± 1115	17 ± 2
IFN4N _{HEK}	149 ± 27	2,7 ± 0,3	57 ± 7	9679 ± 1206	21 ± 3

LOS PARÁMETROS FUERON CALCULADOS PARA CADA ANIMAL Y SE EXPRESAN COMO EL VALOR PROMEDIO ± SD (N=4). C_{MÁX}: CONCENTRACIÓN MÁXIMA. T_{MÁX}: TIEMPO NECESARIO PARA ALCANZAR LA CONCENTRACIÓN MÁXIMA. T_{1/2}: TIEMPO DE VIDA MEDIA TERMINAL. AUC: ÁREA BAJO LA CURVA DE AB ANTIVIRAL *VERSUS* TIEMPO. CLAPP: CLEARANCE APARENTE O VELOCIDAD DE ELIMINACIÓN

17.4.5. Análisis de la actividad biológica *in vivo* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

El IFN- α es capaz de ejercer su acción antitumoral no solo a través de la inhibición de la proliferación celular, sino que además es un potente inhibidor de la angiogénesis.

Las diferencias en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, así como también en la ABE antiproliferativa *in vitro*, estimularon el análisis y comparación de ambas citoquinas en ensayos de AB antitumoral *in vivo*. Este tipo de ensayos permite evaluar la capacidad del IFN para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos.

El experimento fue realizado empleando ratones nude atímicos de la cepa N:NIH nu/nu a los que se implantaron células tumorales de origen humano PC-3. En la Figura 17.3A se muestran las curvas que indican el volumen promedio de los tumores correspondientes al grupo de ratones tratados con IFN4N_{CHO}, IFN4N_{HEK} y control (solución salina de fosfatos, PBS) en función del tiempo desde el comienzo del tratamiento. Se observó claramente que ambas moléculas permitieron retardar el crecimiento de los tumores, en comparación con el control. A su vez, el IFN4N_{HEK} resultó ser el más efectivo, ya que su curva de crecimiento siempre se mantuvo por debajo de la curva correspondiente a los tumores derivados del tratamiento con IFN4N_{CHO}.

A partir de la Figura 17.3A se calcularon las velocidades de crecimiento de los tumores para cada uno de los tratamientos. Específicamente, en las muestras control e IFN4N_{CHO} se identificaron dos fases de crecimiento: una fase inicial lenta y una fase final más rápida. La primera se extendió desde el inicio del tratamiento hasta el día 26, mientras que la segunda etapa comprendió los días 26 a 34. Las velocidades de crecimiento calculadas para el grupo control fueron 42 ± 11 mm³.día⁻¹ y 147 ± 32 mm³.día⁻¹, para la primera y segunda etapa, respectivamente. Para el IFN4N_{CHO} la velocidad de crecimiento de la primera fase fue de 15 ± 5 mm³.día⁻¹ mientras que para la segunda fase se obtuvo un

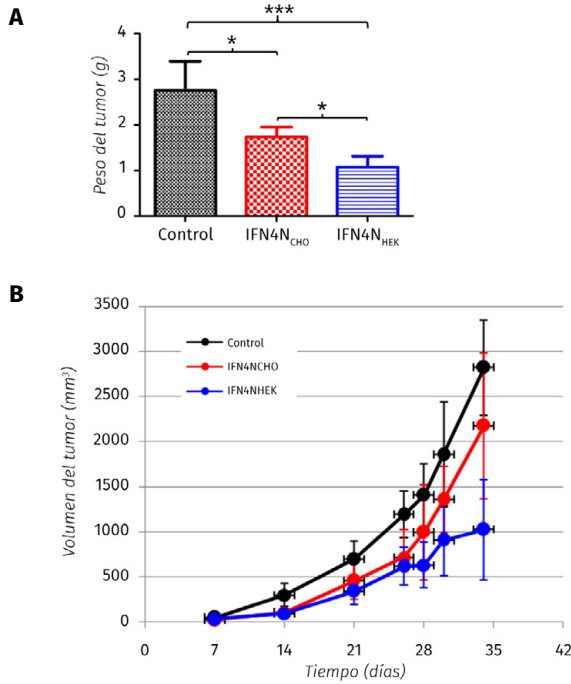


FIGURA 17.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL IN VIVO DEL IFN4N_{CHO} E IFN4N_{HEK}. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE TUMORES DE CÉLULAS PC-3 IMPLANTADAS SUBCUTÁNEAMENTE EN RATONES NUDE. **A.** DETERMINACIÓN DEL PESO DE LOS TUMORES. **B.** DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN SEMANAL DEL VOLUMEN TUMORAL. LOS RESULTADOS SE EXPRESARON COMO EL VALOR PROMEDIO \pm SD (N=6)

valor de $78 \pm 32 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$. Ambos valores demuestran la capacidad del IFN4N_{CHO} para reducir aproximadamente en un 50 % la velocidad de crecimiento de los tumores. En el caso del IFN4N_{HEK} se identificó una única fase de crecimiento lineal a partir del día 7 de iniciado el tratamiento hasta su finalización. En este caso, la velocidad de crecimiento durante todo el tratamiento fue de $22 \pm 5 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$, representando una disminución del 85 % y del 72 % con respecto a la velocidad de crecimiento del tumor a partir del día 26 de los grupos tratados con PBS o IFN4N_{CHO}, respectivamente. Este resultado demostró la mayor eficacia de la molécula derivada de células HEK como agente antitumoral.

El último día del experimento, 34 días posteriores al comienzo del tratamiento, se realizó el sacrificio de los ratones, la extracción de los tumores y la determinación de su peso. El peso promedio de los tumores derivados del tratamiento con IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fue significativamente inferior respecto del grupo control ($p=0,0184$ y $p=0,0009$, respectivamente; Figura 17.3B). Además, este resultado confirmó que el tratamiento con IFN4N derivado de células HEK fue significativamente más eficiente que el tratamiento realizado con la molécula proveniente de células CHO ($p=0,0106$).

Los estudios *in vivo* con ambas moléculas demostraron que la obtenida a partir de células HEK fue capaz de disminuir con mayor eficiencia la velocidad de crecimiento de los tumores generados luego de la inoculación de células neoplásicas de origen prostático a los ratones nude. En dicho contexto y en ausencia de diferencias significativas a nivel farmacocinético entre ambas glicoproteínas, la glicosilación desarrollada por las células humanas inclinó la balanza hacia una mejora en la actividad *in vitro* que probablemente fue responsable de una mayor potencia antitumoral *in vivo*.

En términos generales, el proceso de generación de un nuevo terapéutico hiperglicosilado es altamente complejo. Por lo tanto, para un biofármaco derivado de hIFN- α 2b con tales características, la búsqueda de un balance apropiado entre la actividad biológica evaluada *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas en el contexto del huésped de producción adecuado, constituyen las claves para la obtención de un producto innovador y efectivo.

Referencias bibliográficas

- ADOLF, G. R., KALSNER, I., AHORN, H., MAURER-FOGY, I. & CANTELL, K.** (1991). Natural human interferon- α 2 is O-glycosylated. *Biochemical Journal*, 276(2), 511–518. 10.1042/bj2760511
- ALMO, S. C. & LOVE, J. D.** (2014). Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Current Opinion in Structural Biology*, 26, 39–43. 10.1016/j.sbi.2014.03.006
- BEKISZ, J., SCHMEISSER, H., HERNANDEZ, J., GOLDMAN, N. D. & ZOON, K. C.** (2004). Human Interferons Alpha, Beta and Omega. *Growth Factors*, 22(4), 243–251. 0.1080/08977190400000833
- BINO, T., MADAR, Z., GERTLER, A. & ROSENBERG, H.** (1982). The kidney is the main site of interferon degradation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2(29), 301–308. 10.1089/jir.1982.2.301
- BORDEN, E. C., SEN, G. C., UZE, G., SILVERMAN, R. H., RANSOHOFF, R. M., FOSTER, G. R. & STARK, G. R.** (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(12), 975–990. 10.1038/nrd2422
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2008). Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, 90(3), 437–449. 10.1016/j.biochi.2007.10.013
- CEAGLIO, N., ETCHEVERRIGARAY, M., CONRADT, H.S., GRAMMEL, N., KRATJE, R. & OGGERO, M.** (2010). Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *Journal of Biotechnology*, 146(1–2), 74–83. 10.1016/j.jbiotec.2009.12.020
- DUMONT, J., EUWART, D., MEI, B., ESTES, S. & KSHIRSAGAR, R.** (2015). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. 10.3109/07388551.2015.1084266
- EGRIE, J. C., DWYER, E., BROWNE, J. K., HITZ, A. & LYKOS, M. A.** (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental hematology*, 31(4), 290–299. 10.1016/s0301-472x(03)00006-7
- EL-BAKY, N. A. & REDWAN, E. M.** (2015). Therapeutic Alpha-Interferons Protein: Structure, Production, and Biosimilar. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(2), 109–127. 10.1080/10826068.2014.907175
- GEORGE, P. M., BADIGER, R., ALAZAWI, W., FOSTER, G. R. & MITCHELL, J. A.** (2012). Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacology & Therapeutics*, 135(1), 44–53. 10.1016/j.pharmthera.2012.03.006
- GHADERI, D., ZHANG, M., HURTADO-ZIOLA, N. & VARKI, A.** (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 28, 147–175. 10.5661/bger-28-147

- GOTO, M., AKAI, K., MURAKAMI, A., HASHIMOTO, C., TSUDA, E., UEDA, M., KAWANISHI, G., TAKAHASHI, N., ISHIMOTO, A., CHIBA, H. & SASAKI, R.** (1988). Production of Recombinant Human Erythropoietin in Mammalian Cells: Host-Cell Dependency of the Biological Activity of the Cloned Glycoprotein. *Nature Biotechnology*, 6, 67–71. 10.1038/nbt0188-67
- GRABENHORST, E., SCHLENKE, P., POHL, S., NIMTZ, M. & CONRADT, H. S.** (1999). Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal*, 16(2), 81–97. 10.1023/a:1026466408042
- 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. 10.1098/rspb.1957.0048
- MERIGAN, T. C.** (1967). Interferons of Mice and Men. *The New England Journal of Medicine*, 276(16), 913–920. 10.1056/NEJM196704202761608
- OBERBEK, A., MATASCI, M., HACKER, D. L. & WURM, F. M.** (2011). Generation of stable, highproducing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(3), 600–610. 10.1002/bit.22968
- PAUL, F., PELLEGRINI, S. & UZÉ, G.** (2015). IFNA2: The prototypic human alpha interferon. *Gene*, 567(2), 132–137. 10.1016/j.gene.2015.04.087
- PESTKA, S.** (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(28), 20047–20051. 10.1074/jbc.R700004200
- RACHMAWATI, H., POELSTRA, K. & BELJAARS, L.** (2004). The use of cytokines and modified cytokines as therapeutic agents: present state and future perspectives. En: Pandalai, S. G. (Ed.), *Recent research development in immunology. Research Signpost*, 6(2), 191–214. Kerala, India.
- RUBINSTEIN, M., RUBINSTEIN, S., FAMILLETTI, P. C., MILLER, R. S., WALDMAN, A. A. & PESTKA, S.** (1979). Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity, and initial characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76(2), 640–644. 10.1073/pnas.76.2.640
- SINCLAIR, A. M. & ELLIOTT, S.** (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1626–1635. 10.1002/jps.20319
- SOTOCA MOMBLONA, J. M.** (1999). Cuarenta años de interferones. *Farmacia Hospitalaria*, 23(4), 205–213.
- TOVEY, M. G. & LALLEMAND, C.** (2010). Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1162–1186. 10.3390/ph3041162
- TOVEY, M. G., LALLEMAND, C. & THYPHRONITIS, G.** (2008). Adjuvant activity of type I interferons. *The Journal of Biological Chemistry*, 389(5), 541–545. 10.1515/jbc.2008.051
- VILCEK, J. & FELDMANN, M.** (2004). Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(4), 201–209. 10.1016/j.tips.2004.02.011

- ZHU, J.** (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158–1170. 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
- ZITVOGEL, L., GALLUZZI, L., KEPP, O., SMYTH, M. J. & KROEMER, G.** (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(7), 405–414. 10.1038/nri3845

Sobre las autoras y los autores

AMADEO, IGNACIO. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / AMEGA Biotech SA Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

ARÉVALO, ANA PAULA. Unidad de Animales Transgénicos y de experimentación. Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

ATTALLAH, CAROLINA. Unidad de Mejoramiento Vegetal. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas / Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Prov. Santa Fe, Argentina

BERTONCINI, CARLOS W. Centro de Investigación Biofarmacéutica DominguezLab / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Paraná, Prov. de Entre Ríos, Argentina.

BOLLATI-FOGOLÍN, MARIELA. Unidad de Biología Celular. Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal. Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

BÜRGI, MA. DE LOS MILAGROS. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

CEAGLIO, NATALIA. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina

COUTO, ALICIA. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Centro de Investigación en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR). Buenos Aires, Argentina.

- CRISPO, MARTINA.** Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación. Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal. Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.
- CUTINE, ANABELA M.** Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CABA, Argentina.
- ETCHEVERRIGARAY, MARINA.** Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina
- FONTANA, DIEGO.** Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.
- FORNO, GUILLERMINA.** Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / AMEGA Biotech SA Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.
- GUGLIOTTA, AGUSTINA.** Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.
- KRATJE, RICARDO.** Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.
- MARIÑO, KARINA V.** Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CABA, Argentina.

MASIN, MARIANELA. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina

MAURO, LAURA. AMEGA Biotech SA Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

MOHANA-BORGES, RONALDO. Laboratorio de Biotecnología e Bioingeniería Estructural. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

MONTESINO, RAQUEL. Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

MUFARREGE, EDUARDO. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

OGGERO, MARCOS. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

PERELMUTER, KAREN. Unidad de Biología Celular. Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

PRIETO, CLAUDIO. Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

RODRÍGUEZ, MA. CELESTE. Laboratorio de Cultivos Celulares. Centro Biotecnológico del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Santa Fe, Prov. de Santa Fe, Argentina.

Los bioterapéuticos innovadores y biosimilares basados en glicoproteínas terapéuticas constituyen una disciplina de interés en salud humana que este libro profundiza desde sus aspectos más elementales hasta los relacionados con su obtención y regulación para alcanzar el mercado de los biofarmacéuticos.

La obra se dirige a estudiantes de formación de grado en biotecnología aunque por la magnitud e importancia del área en sí misma, no solamente se circunscribe a ellos sino también a todos los interesados en adquirir conocimientos que no deben soslayarse al momento de introducirse en esta disciplina.

Es el deseo de los editores que el lector se motive en pensar, discutir, formular o rediseñar bioprocesos y/o productos de naturaleza glicoproteica durante la lectura de los capítulos de este libro.