

EL IMPACTO DEL BIOPROCESO SOBRE EL PERFIL DE N-GLICOSILACION DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE.

Jaime M. Uribe[#], Laura A. Palomares*, Adrián Delgado[#], Marisol Hernández[#], Paula Servín[#], Jessica Pérez[#], Lizbeth Lecea[#], Vanessa Hernández*, Norberto Cruz[#] y Octavio Tonatiuh Ramírez^{#*}

[#]Probiomed S.A. de C.V. San Esteban 88 México, D.F., C.P. 02020 Fax: (55)53527651. *Instituto de Biotecnología. UNAM. Correo electrónico: tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: Proteína recombinante, N-glicosilación, modo de cultivo, purificación.

Introducción. El perfil de N-glicosilación de proteínas con aplicaciones terapéuticas define en muchos casos sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. La glicosilación es un proceso complejo que requiere de varias actividades enzimáticas y de varios azúcares precursores, cuya disponibilidad depende del estado energético de la célula (1). Existen varios parámetros de cultivo que pueden influir el patrón de glicosilación. Asimismo, diferentes estrategias de purificación pueden seleccionar distintas glicofórmulas.

En este trabajo se evaluó el efecto de distintas condiciones de cultivo y purificación en el patrón de glicosilación de eritropoyetina (EPO) humana recombinante, una de las glicoproteínas terapéuticas de mayor importancia comercial.

Metodología. La EPO se produjo a partir del cultivo de células CHO recombinantes. Para la producción se utilizaron 2 medios de cultivo libres de suero fetal y un medio conteniendo suero fetal bovino. Se realizó el cultivo en suspensión o en cama empacada. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de cultivo. Para la purificación de EPO se utilizaron diferentes condiciones de cromatografía líquida de intercambio iónico y fase reversa. El análisis de N-glicosilación se realizó a partir de los azúcares obtenidos por digestión de la EPO con PNGasa F. Los azúcares obtenidos se marcaron con 2-aminobenzamida y fueron separados por HPLC en fase normal (2). Los glicanos fueron identificados de acuerdo a su migración en unidades de glucosa, a tablas de la literatura y a digestión con exoglicosidasas.

Resultados y discusión. No se observó diferencia en el contenido relativo de glicanos producidos en cultivos con o sin suero fetal bovino (fig. 1) o en la ocupación de sitios potenciales de N-glicosilación. Sin embargo, los cultivos en medio sin suero mostraron consistentemente un aumento en la cantidad de estructuras tetraantennarias a expensas de las estructuras triantennarias. Asimismo, los cultivos en medio sin suero mostraron un porcentaje mayor de estructuras tri y tetraantennarias en comparación con los cultivos con suero. Este aumento estuvo acompañado por una disminución de las estructuras bisialidadas, pero no monosialidadas. No hubo diferencias significativas entre el perfil de glicosilación obtenido de cultivos en suspensión o en camas empacadas. Un cultivo estático en el que se realizó una perfusión simulada mostró una disminución de estructuras tetrasialidadas. El uso de un reactor instrumentado y el

cultivo en perfusión incrementó el contenido de formas tri y tetra antenarias y tri y tetrasialidadas.

La purificación por intercambio iónico y fase reversa permitió separar las diferentes isoformas de EPO, y de esta forma fue posible obtener EPO con un patrón de glicosilación homogéneo independientemente de diferencias derivadas de la fase de cultivo celular.

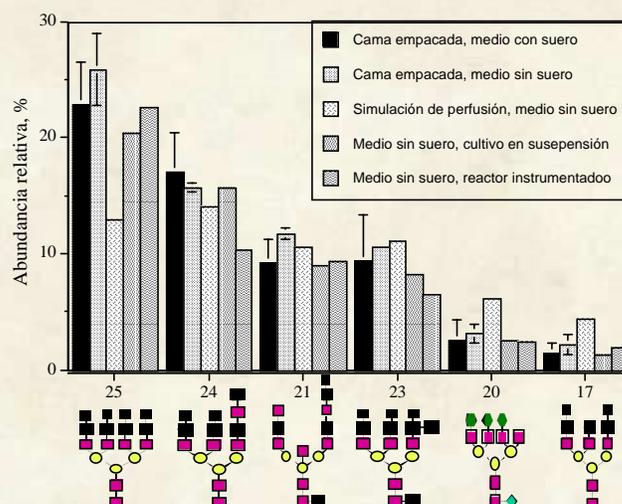


Fig. 1. Glicofórmulas mayoritarias presentes en la EPO producida en distintos medios y formas de cultivo. Cuadro. N-acetilglucosamina, círculo vacío, manosa, rombo, fucosa, círculo lleno, galactosa, triángulo, ácido siálico.

Conclusiones. El modo de cultivo impactó de forma importante el contenido de ácido siálico de EPO. El utilizar medio libre de suero incrementó la sialidación. No hubo diferencias en cultivos en camas empacadas o en suspensión. Sin embargo, el uso de frascos T disminuyó la presencia de ácido siálico, mientras que el cultivo en biorreactores instrumentados la incrementó. Es muy posible que estas diferencias se deban a mejores condiciones energéticas de la célula.

Bibliografía.

1. Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez, O.T. (2004) En: *Recombinant Gene Expression*. Balbás, P., Lorence, A. 2ª ed. Humana Press, E.U.A.. 15-51.
2. Serrato, J.A., Palomares, L.A., Meneses-Acosta, A., y Ramírez, O.T. (2004) Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2) 176-188.