



## ANÁLISIS DEL PATRÓN DE GLICOSILACION DE INTERFERON BETA-1A RECOMBINANTE

Laura A. Palomares<sup>1</sup>, Vanessa Hernández<sup>1</sup>, Norberto Cruz<sup>2</sup>, Rodolfo Salazar<sup>2</sup>, Jaime Uribe Wiechers<sup>1</sup>, Octavio Tonatiuh Ramírez<sup>1,2</sup>

1. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. C.P. 62250. Fax (777) 3138811, laura@ibt.unam.mx
2. PROBIOMED S.A. de C.V., Planta Tenancingo. Cruce de Carret. Acatzingo-Zumpahuacan SN, C.P. 52400, Tenancingo Edo. de México. Tel 0155-11662279.

*Palabras clave: N-glicosilación, citocinas, interferón beta, bigenéricos.*

**Introducción.** El interferon beta-1a (IFN $\beta$ -1a) es una glicoproteína de la familia de las citocinas compuesta de 166 aminoácidos y con un PM de 22.5KDa. Es producida en forma natural por fibroblastos en respuesta a una infección viral y se expresa de forma recombinante en células CHO transformadas con el gen de IFN $\beta$ -1a humano. Debido a sus propiedades antivirales, inmunomoduladoras y antiproliferativas, el IFN $\beta$ -1a es una molécula de interés terapéutico para la industria farmacéutica biotecnológica. El IFN $\beta$ -1a tiene un sitio de N-glicosilación en la posición Asp-80. Estudios recientes han encontrado que la ocupación de este sitio resulta en mayor actividad biológica, debido a una mayor estabilidad de la proteína. En el presente trabajo analizamos el patrón de glicosilación del IFN $\beta$ -1a producido comercialmente por Probiomed S.A. de C.V (Emaxem<sup>®</sup>), Abbott Laboratorios (Avonex<sup>®</sup>) y Serono (Rebif<sup>®</sup>).

**Metodología.** Se tomaron tres lotes de Emaxem<sup>®</sup> y uno de Avonex<sup>®</sup> y Rebif<sup>®</sup>. Los tres productos fueron tratados para eliminar la albúmina presente en la formulación utilizando cromatografía de fase reversa. El análisis de N-glicosilación se realizó a partir de la digestión del IFN $\beta$ -1a con PNGasa F. Los azúcares obtenidos se marcaron con 2-aminobenzamida (Prozyme) y fueron separados por HPLC en fase normal. Los glicanos fueron identificados de acuerdo a su migración en unidades de glucosa comparándolos con tablas de la literatura así como por digestiones con exoglicosidasas. Los detalles analíticos se describen en Serrato et al. (2).

**Resultados y discusión.** El perfil de N-glicosilación obtenido por HPLC consistió en un total de 22 picos. Las digestiones con exoglicosidasas permitieron la identificación de 26 estructuras de oligosacáridos, que incluyen una estructura alta en manosa (M7), estructuras complejas bi, tri y tetraantenarias, algunas de ellas sializadas. Se observó que las estructuras mayoritarias en todas las muestras fueron biantenarias galactosiladas de tipo complejo (A2NG2 y A2FG2). Formas trigalactosiladas fueron las que siguieron en abundancia, con 18 y 28 % de contenido relativo en todas las muestras. Entre 3 y 10% de todas las estructuras encontradas estuvieron sializadas. Este bajo contenido de ácidos siálicos, en comparación con la literatura (1), podría ser resultado del tratamiento llevado a cabo para eliminar la albúmina, ya que los ácidos siálicos son muy lábiles.

Agrupando las estructuras en oligosacáridos altos en manosa, biantenarios, triantenarios o tetraantenarios, se encontró que el mayor porcentaje (65 al 75 %) correspondió a estructuras biantenarias (Fig. 1). Formas tri y tetraantenarias fueron encontradas en menor abundancia. Las formas altas en manosa, típicas de glicanos no procesados en retículo endoplásmico, fueron encontradas en muy poca abundancia.

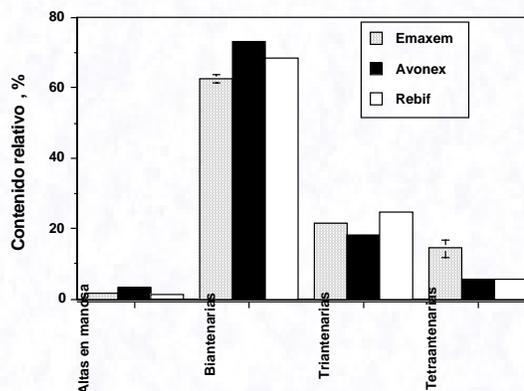


Figura 1. Tipo de estructuras de N-glicanos encontradas en IFN $\beta$ -1a.

**Conclusiones.** Las tres marcas comerciales de IFN $\beta$ -1a presentaron un patrón de N-glicosilación muy parecido, con predominancia por estructuras biantenarias bigalactosiladas. El patrón de N-glicosilación del IFN $\beta$ -1a fue similar al reportado en la literatura (4), a excepción del menor contenido de ácidos siálicos.

### Bibliografía.

1. Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, B., Karpusas, M., Whitty, A., Kimball, K., Brickelmaier, M., Muldowney, C., Jones, W. and Goelz, S. (1998) Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN- $\beta$ ). *Pharmaceutical Research*. 15, 641-649.
2. Serrato, J.A., Palomares, L.A., Meneses-Acosta, A. y Ramírez, OT. (2004). Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 88,177-188.
3. Palomares, L.A., Joosten, C.E., Hughes, P.R., Granados, R.R., Shuler, M.L. (2003). Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnol Prog* 19, 185-192.
4. Spearman, M., Rodríguez, J., Huzel, N., Butler, M. (2005). Production and glycosylation of recombinant  $\beta$ -interferon in suspension and Cytopen mlcrocarrier cultures of CHO cells. *Biotechnol. Prog.* 21, 31-39.