



COMPARACIÓN BIOQUÍMICA DE ERITROPOYETINA DE LOS MEDICAMENTOS BIOYETIN® Y EPREX®

Norma A. Valdez-Cruz¹, Vanessa Hernández¹, Octavio Tonatiuh Ramírez¹, Jaime Uribe²

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor. 62250, México. Fax: 777-3138811; adri@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: eritropoyetina, proteína recombinante, biogénicos

Introducción. La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína ácida, con un PM de 30,400 Da, de los cuales 21,174 Da corresponden a la proteína. La EPO se conforma por 165 aminoácidos estabilizados por 2 puentes disulfuro (1). Aproximadamente el 30% de los carbohidratos que conforman la molécula se componen de ácido siálico, los cuales son fundamentales para su actividad biológica. In vivo presenta tres N-glicosilaciones en las asparaginas 24, 38 y 83, y una O-glicosilación en la serina 126 (2). Las diferentes EPO en el mercado, exhiben cambios menores en la composición de carbohidratos, clasificándose en alfa cuando su contenido es de 31% y en beta cuando contienen 24%. La molécula nativa presenta cinco hélices alfa y dos pequeñas hojas beta (cada una conformada por alrededor de cuatro aminoácidos) por lo que su contenido es mínimo (3). El objetivo de este trabajo es determinar la similitud de estructura primaria y secundaria entre los biofármacos Bioyetin® (Probiomed S.A. de C.V.) y Eprex® (Janssen-Cilag Pharmaceutical NV), mediante espectrometría de masas (EM), dicroísmo circular (DC) y emisión de fluorescencia.

Metodología. Se utilizaron los medicamentos Eprex® (EPO alfa) 2000UI y dos muestras de Bioyetin®. Las muestras fueron desaladas por filtración en centricones Y-30 y posteriormente fueron deglicosiladas utilizando la enzima PNG-asa-F (Calbiochem). Cada muestra fue analizada en SDS-PAGE. La secuencia parcial de aminoácidos de los principios activos (PA) se determinó por EM, mediante la digestión en gel con tripsina (4). La estructura secundaria de las muestras glicosiladas, fue determinada mediante dicroísmo circular (DC), usando un espectro-polarímetro Jasco-710 en UV-lejano de 195 nm a 260 nm a 25 °C. Los ensayos de fluorescencia se realizaron usando un equipo Perkin Elmer, mediante la excitación de triptófanos, a 290 nm y registrando su emisión entre 310 hasta 410 nm.

Resultados y discusión. La secuencia de aminoácidos se determinó parcialmente, obteniendo el 40% de la secuencia primaria, siendo esta idéntica entre todas las muestras. La estructura secundaria analizada por DC se muestra en la figura 1. En los espectros obtenidos se observan pendientes similares dominadas por la fracción alfa helicoidal. Los espectros de fluorescencia obtenidos (fig. 2) muestran la emisión generada, presentando un máximo entre 344 y 346 nm, indicando alta similitud conformacional entre las muestras.

Conclusiones. Las muestras del medicamento Bioyetin®, sometidas a cromatografía en gel SDS-PAGE, son similares a la EPO contenida en el medicamento Eprex® (datos no

mostrados). Los geles de poliacrilamida realizados muestran bandas similares. La secuencia parcial de aminoácidos (40%) revela la identidad entre todas las muestras. Los espectros de DC y de fluorescencia muestran que la EPO de Bioyetin® es altamente similar a la EPO contenida en el medicamento Eprex®. El análisis dicroico reveló que todas las muestras presentan estructuras alfa helicoidales bien definidas. De igual forma, las muestras analizadas por fluorescencia muestran que todas presentan identidad conformacional presentando un mismo punto máximo de emisión.

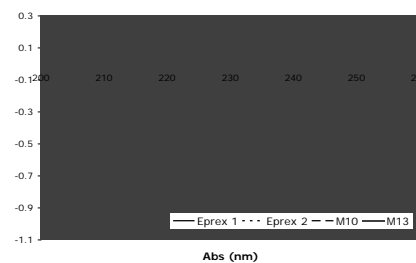


Figura 1. Espectro de dicroísmo circular UV-lejano de EPO Eprex® 1 y 2, y las muestras Bioyetin® (M10 y M13).

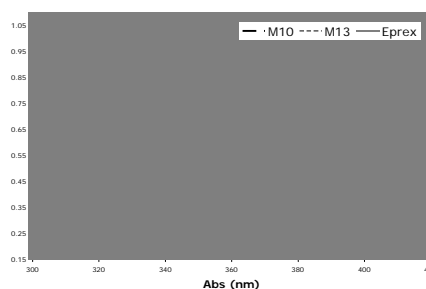


Figura 2. Espectro de emisión de triptófanos (290 nm excitación de las citocinas Bioyetin® (M10, M13) y Eprex®).

Bibliografía

- Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 261: 3116–3121
- Rush RS, Derby PL, Smith DM, Merry C, Rogers G, Rohde MF, Katta V (1995) Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal Chem.* 67: 1442–1452
- Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Egrie J, Harvey TS (1998) NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol.* 5: 861-866
- Aebersold R, Goodlett DR (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 101: 269-295