



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## EFECTO DE LA N-GLICOSILACIÓN EN LA ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA DE LA HEMAGLUTININA RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

Luis Angel Cueto Bravo, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A Palomares. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. CP 62210, Tel.: (777) 329-7617 Fax: (777) 329-1603 laura@ibt.unam.mx; lcueto@ibt.unam.mx

*Palabras clave: Hemaglutinina, virus de la influenza, dispersión dinámica de luz, diámetro hidrodinámico*

**Introducción.** La hemaglutinina (HA) es el principal factor antigénico del virus de la influenza. Por tal motivo se ha propuesto el uso de HA como una alternativa económicamente viable de vacuna estacional contra el virus de la influenza<sup>1</sup>. HA presenta glicosilaciones que disminuyen el reconocimiento del virus por el sistema inmune y que estabilizan la estructura cuaternaria de la proteína<sup>2</sup>. Para aumentar la capacidad antigénica de la HA se ha propuesto la reducción o eliminación de la glicosilación de la proteína, por lo que es importante determinar el efecto de la glicosilación en la estabilidad de HA a diferentes temperaturas. La estabilidad a la temperatura es de vital importancia para la producción y comercialización de las vacunas, siendo necesario que sea estable a temperaturas de transporte y almacenaje. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la glicosilación sobre la estabilidad de HA a la temperatura.

**Metodología.** Se utilizó HA recombinante de la cepa H1N1 California 2009 45-10017 producida en células de insecto por la compañía Protein Sciences Corporation. Se desglicosiló la HA con la enzima endoglicosidasa F1 de Sigma, usando la metodología descrita por Vite-Vallejo y colaboradores<sup>3</sup>. La HA nativa y desglicosilada (50  $\mu$ L a una concentración de 100  $\mu$ g/ml) fueron incubadas durante 10 min a 4°C, 20°C, 35°C, 45°C, 55°C y 65°C. Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz para determinar el diámetro hidrodinámico (DH) de la proteína sometida a diversos tratamientos. Se consideraron agregados las partículas con un DH mayor a 40nm. Se calculó la energía de Gibbs para la reacción de agregación en HA nativa y desglicosilada.

**Resultados.** El DH de la HA desglicosilada fue menor que el de la HA nativa a temperaturas menores a 45°C. A partir de los 45°C se observó un aumento en el DH de la HA desglicosilada, resultado de la agregación de la proteína (Fig 1). En contraste, el DH de la HA nativa permaneció constante hasta los 55°C. Ambas proteínas presentaron agregación a los 60°C. La energía de Gibbs del proceso de agregación mostró que la reacción de agregación de HA desglicosilada es más favorable que la agregación de HA nativa.

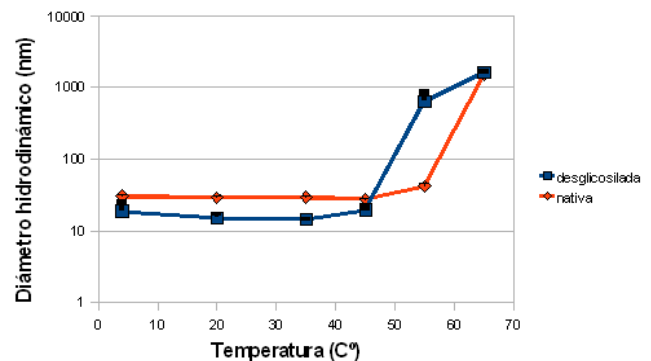


Fig. 1. Cambio del diámetro hidrodinámico de HA con respecto a la temperatura.

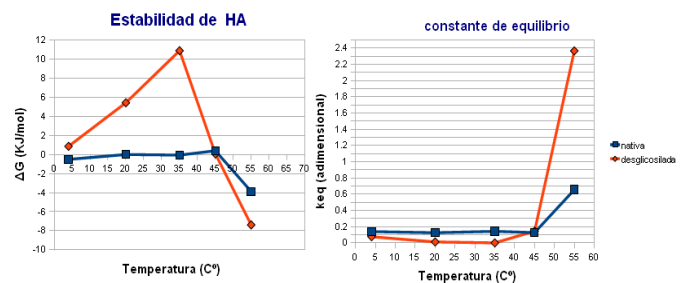


Figura 2. Cambio de energía de Gibbs y  $K_{eq}$  con respecto a la temperatura.

**Conclusiones.** Se observó que la HA es una proteína altamente estable a temperaturas menores a 45°C. La glicosilación de la proteína incrementa la estabilidad estructural a temperaturas mayores a 45°C

**Agradecimiento.** A Protein Sciences Corporation por el donativo de HA para los experimentos, CONACYT-salud 126663. Apoyo Técnico: R. Pastor y V. Hernandez.

### Bibliografía.

1. Cox M, Hollister J. (2009) Flublok, a next generation influenza vaccine manufactured in insects cells. *Biologicals* (37) 182-189
2. Wang C, Chen J, Tseng Y, Hsu C, Hung Y, Chen S, Kook K, Cheng T, Cheng Y, Jan J, Wu C, Ma C, Wong C. (2009) Glycans in influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *PNAS* (106) 18137- 18143.
3. Vite-Vallejo O, Palomares LA, Dantan-González E, Ayala-Castro H, Martínez-Anaya C, Valderrama B. (2009) The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial technology*. (45) 233-239