

**ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN: HACIA UN NUEVO PRODUCTO
RECOMBINANTE DE INTERÉS EN MEDICINA VETERINARIA**
Mussio, Pablo¹

¹Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico, Centro Biotecnológico del Litoral, FBCB-UNL

Directora: Rodríguez, María Celeste
Codirector: Prieto, Claudio

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Preformulación, Proteína recombinante, Medicina veterinaria.

INTRODUCCIÓN

La ganadería es una de las actividades económicas más importantes de nuestro país. En este contexto, el uso de la gonadotrofina coriónica equina (eCG) se ha convertido en una de las terapias hormonales claves para mejorar la actividad reproductiva en diferentes tipos de ganado (Quérat, 1994). Al igual que el resto de las hormonas glicoprotéicas, la eCG está compuesta por dos subunidades asociadas por enlaces no covalentes, denominadas α y β . Estas subunidades poseen un alto contenido de glicanos que le confieren a la hormona una prolongada vida media en circulación. La subunidad α está compuesta por 96 aminoácidos con 2 sitios de *N*-glicosilación y es estabilizada por 5 puentes disulfuro entre distintos residuos de cisteína. Por otro lado, la subunidad β presenta 149 aminoácidos con un solo sitio de *N*-glicosilación y 12 sitios potenciales de *O*-glicosilación en diferentes residuos de su C-Terminal (CTP) (De Medeiros y Norman, 2008; Ward, Moore, y Burleigh, 1982). Actualmente, la metodología para la obtención de dicha hormona, denominada PMSG (por las siglas en inglés de gonadotrofina sérica de yeguas preñadas), involucra un inadecuado uso de animales (yeguas preñadas), lo que ha despertado serios cuestionamientos bioéticos. Además, debido a su obtención a partir de animales, PMSG podría contener contaminantes con potenciales riesgos sanitarios como virus o priones y presenta una gran variabilidad en su perfil de glicosilación entre lotes, lo que repercute en su efectividad. Con el fin de resolver esta problemática, en el Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico (CBL) hemos desarrollado una tecnología basada en el cultivo de células de mamíferos para obtener un nuevo producto veterinario: la eCG recombinante (reCG). Durante las etapas de producción y almacenamiento, las proteínas recombinantes son sometidas a diferentes condiciones de estrés. Debido a esto, uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de un biofármaco es lograr una formulación que garantice su estabilidad. En este sentido, los estudios de preformulación del compuesto activo, tanto en su forma nativa como bajo condiciones de estrés, permiten desarrollar un producto seguro y eficaz que, además, mantiene su estabilidad en el tiempo (Volkin y col., 2002).

Título del proyecto: "Plataforma biotecnológica para la producción de hormonas recombinantes de interés en sanidad animal"

Instrumento: PROYECTOS CAI+D 2020

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Dr. Claudio César Prieto

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo diseñar estrategias de preformulación para la hormona Gonadotrofina Coriónica equina recombinante (reCG) a partir de diferentes técnicas analíticas simples y robustas.

METODOLOGIA

La hormona recombinante fue obtenida a partir del sobrenadante de cultivo de células CHO-K1, cultivadas en biorreactores de 1 L operados en modo perfusión. El sobrenadante de cultivo fue clarificado y se realizó un único paso de purificación que consistió en una cromatografía de pseudoafinidad a colorantes (reCG A). En todas las determinaciones se utilizó como estándar de referencia PMSG de dos marcas comerciales, denominadas PMSG (I) y PMSG (II), respectivamente, purificado mediante RP-HPLC.

Purificación

Para obtener una proteína con un mayor grado de pureza, se propuso purificar la muestra de partida, denominada reCG A, a partir de dos metodologías: I) RP-HPLC (cromatografía de alta resolución en fase reversa) y II) HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica). Las muestras obtenidas fueron denominadas reCG B y C, respectivamente. Para la purificación mediante HIC, se utilizó una columna XK 16/20 empaquetada con resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow* (GE, Healthcare). En la purificación por RP-HPLC, se empleó una columna C18 Jupiter Phenomenex (5 μ m, 300 Å, 250 mm x 4,6 mm).

Análisis de reCG en su conformación nativa

Se realizaron geles SDS-PAGE en condiciones no reductoras, seguido de tinción con *Coomassie brilliant blue* con el fin de evaluar la presencia de agregados, variantes *nickeadas/truncadas* y el grado de pureza de cada molécula purificada. Para confirmar la identidad de las diferentes muestras se realizó un ensayo de inmunodetección (*western blot*), utilizando anticuerpos policlonales específicos producidos en conejo, anti-reCG (previamente obtenidos en nuestro laboratorio).

Asimismo, se determinó el peso molecular y la pureza de las muestras mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC) (TSKgel G3000SW). Finalmente, para detectar diferencias de polaridad (hidrofobicidad/hidrofiliidad) o cambios estructurales, las muestras purificadas se analizaron mediante RP-HPLC.

Estudio de glicanos

El perfil de isoformas se analizó mediante isoelectroenfoco (IEF), el cual se llevó a cabo en geles de acrilamida/bisacrilamida al 8% (P/V) y el agregado de urea 7 M. Para obtener el rango de pH deseado, se utilizó una mezcla de anfolitos con un rango de pI 3,5-5,5 (Pharmalyte, GE Healthcare).

El contenido de ácido siálico (Neu5Ac) fue analizado mediante cromatografía de intercambio aniónico seguida de detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) empleando una columna CarboPac™ PA20 conectada a un equipo DIONEX ICS-5000 (Thermo Scientific).

Para el análisis de *N*-glicanos cargados presentes en las proteínas, las muestras purificadas se sometieron a una reacción de *N*-deglicosilación enzimática (en condiciones desnaturalizantes y nativas), utilizando el kit PNGasa F (Biolabs Inc.). Luego, los *N*-glicanos provenientes de la digestión, fueron marcados con fluoróforo 2-AB y analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX-HPLC).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Fue posible purificar reCG mediante RP-HPLC y HIC, permitiendo obtener la hormona con un mayor grado de pureza para su posterior caracterización fisicoquímica. En paralelo se purificó PMSG mediante RP-HPLC, para su utilización como estándar. En el análisis mediante SDS-PAGE/Coomassie, se observó que PMSG presenta un patrón complejo de bandas comprendidas en un rango de entre 50-90 KDa. En cambio, reCG presenta un patrón de bandas más homogéneo, a 45 KDa y 25 KDa, que se corresponden con el heterodímero $\alpha\beta$ y su subunidad α libre, respectivamente. Al comparar las muestras luego del segundo paso de purificación, se evidenció que en la variante purificada por RP-HPLC se logró obtener un mayor grado de pureza. Tras el análisis del SDS-PAGE/*western blot*, no se pudo detectar la proteína PMSG con los anticuerpos anti-reCG, lo que estaría indicando posibles diferencias conformacionales entre reCG y PMSG.

Se observó en los cromatogramas de RP-HPLC, que el tiempo de retención (*tr*) de PMSG (*tr* = 12,95 minutos) fue menor en comparación al de reCG B (*tr* = 13,58 minutos) y reCG C (*tr* = 13,74 minutos). Esto se relaciona con el contenido de glicanos, un mayor contenido de éstos aumenta la polaridad de la molécula y, por consiguiente, ocurre una disminución en el tiempo de retención en el caso de PMSG.

Mediante el análisis de proteínas estándar por SEC-HPLC, fue posible construir una curva de calibrado para determinar el peso molecular aparente de las proteínas estudiadas. La hormona recombinante de ambas muestras presentó un peso molecular aparente de 45 KDa, mientras que PMSG exhibió un peso molecular aparente de 66 KDa. Estos valores de peso molecular coinciden con los observados en los geles SDS-PAGE. Además, se determinó que reCG B y reCG C presen una pureza del 89% y 55% respectivamente, siendo la subunidad α la mayor impureza con un 43% en la muestra C. La proteína PMSG purificada por RP-HPLC presentó una pureza del 73%.

Estos valores de pureza obtenidos son similares a los determinados mediante densitometría en geles SDS-PAGE, pero difieren de los observados en el análisis mediante RP-HPLC. Esto evidencia la importancia de la ortogonalidad en el análisis de muestras. Utilizando distintas técnicas para separar moléculas basadas en diferentes principios, es posible detectar impurezas que comparten propiedades con la molécula de interés.

Mediante ensayos de IEF se determinó que tanto reCG como PMSG poseen un elevado número de isoformas con diferente punto isoeléctrico. Indicando que, pese a que reCG presenta un patrón de bandas más homogéneo en comparación con PMSG, ambas moléculas presentan un gran número de isoformas. Sin embargo, PMSG mostró una mayor proporción de glicofomas concentradas en la zona más ácida del gel en comparación con la proteína recombinante, indicando la presencia de diferencias en el contenido de glicanos entre las dos moléculas, en particular en el contenido de ácido siálico que disminuye el punto isoeléctrico de la hormona debido a su carga negativa. Esto fue confirmado mediante las determinaciones de HPAEC-PAD, donde se observó que PMSG (I) presenta más del doble de contenido de ácido siálico que la variante recombinante (18 ± 3 y 7 ± 2 moles de Neu5Ac/mol eCG, para PMSG (I) y reCG, respectivamente; $p < 0,05$). También, se analizó el contenido de Neu5Ac en PMSG (II), determinando que esta variante posee 9 moles de Neu5Ac por mol de proteína. El

contenido de ácido siálico de PMSG (II) se asemeja más al de la variante recombinante que al de PMSG (I). Estas diferencias entre las preparaciones comerciales están en concordancia con publicaciones previamente reportadas (Murphy, 2012) y demuestran la variabilidad estructural entre distintos lotes y preparaciones de PMSG, lo que como consecuencia podría dar lugar a diferencias en la potencia biológica de dichas preparaciones.

En el análisis de mediante WAX-HPLC de los *N*-glicanos obtenidos luego del tratamiento con PNGasa F de las proteínas desnaturalizadas, se encontró que las variantes recombinantes presentan un mayor contenido de *N*-glicanos neutros y tetra-sialilados que PMSG (I). También, se observó un mayor contenido de *N*-glicanos tri-sialilados en reCG B, en comparación a reCG C. Sin embargo, no fue posible determinar si la *N*-deglicosilación fue completa, ya que durante el protocolo de *N*-deglicosilación de las proteínas desnaturalizadas, las mismas se agregan irreversiblemente impidiendo su completo análisis por SDS-PAGE.

A partir de esto, se propuso realizar pruebas de *N*-deglicosilación de reCG B en su estado nativo con diferentes unidades de PNGasa F. En este ensayo no se observaron diferencias en el peso molecular aparente del heterodímero, lo que indicó que no se pudo lograr una completa *N*-deglicosilación de la proteína en condiciones nativas. Esto último, evidenciaría que los sitios de *N*-glicosilación de reCG no se encuentran lo suficientemente expuestos para que la PNGasa F pueda actuar, lo que podría estar dado por un impedimento estérico. En este sentido, se ha reportado que los glicanos unidos a la Asp78 de la cadena α de hCG (homólogo en humanos de eCG) no son susceptibles a la escisión por PNGasa F cuando esta subunidad se encuentra en su conformación nativa, pero si aquellos glicanos presentes en la Asp52 que se encuentran en la superficie de la proteína (Van Zuylen y col., 1995).

En este trabajo fue posible purificar reCG para la posterior caracterización fisicoquímica en su forma nativa, mediante el uso de diferentes técnicas analíticas simples y robustas. A su vez, se realizó un estudio comparativo con PMSG, demostrando diferencias en el perfil de glicosilación de ambas moléculas, lo cual podrá repercutir en la vida media en circulación, así como también en la interacción con su receptor.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

De Medeiros, S. F., & Norman, R. J. (2008). Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human Reproduction Update*, 15(1), 69–95.

Murphy B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9, 223-230.

Quérat, B. (1994). Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. *Perspect. Comp. Endocrinol.* 27-35.

Van Zuylen C. W. y col. (1995). Site-specific and complete enzymic deglycosylation of the native human chorionic gonadotropin alpha-subunit. *Eur J Biochem.* 231(3), 754-60.

Volkin, D. B., Sanyal, G., Burke, C. J., & Middaugh, C. R. (2002) *Preformulation Studies as an Essential Guide to Formulation Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals.* Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, 1–46.

Ward, D.N., Moore, W.T., y Burleigh, B.D. (1982). Structural studies on equine chorionic gonadotropin. *J. Protein Chem.* 1, 263-280.