

## DESARROLLO DE UNA VARIANTE DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA ALTAMENTE O-GLICOSILADA UTILIZANDO UN PÉPTIDO DERIVADO DEL GM-CSF HUMANO

**Faccio, Francesca**

*Centro Biotecnológico del Litoral (CBL – UNL)  
Director/a: Lic. Ma. Jesús Leopold  
Codirector/a: Doc. Natalia Ceaglio*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: glicosilación, tag, etiqueta

### INTRODUCCIÓN

La glicoingeniería es una de las estrategias utilizadas para mejorar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas terapéuticas, dado que permite incrementar su actividad *in vivo*, prolongando la duración de su acción mediante la incorporación de nuevos glicanos. En particular, la O-glicoingeniería ha sido llevada a cabo exitosamente mediante la fusión de péptidos susceptibles de incorporar O-glicanos a regiones N- y/o C- terminales de proteínas humanas de interés farmacológico. Esta técnica utiliza una serie de procedimientos de ingeniería molecular para modificar el contenido y/o estructura de los glicanos de las proteínas. El objetivo es lograr una nueva entidad proteica con mayor carga negativa y un mayor radio hidrodinámico, para incrementar su tiempo de vida media en circulación, sin afectar su conformación nativa.

En este sentido, en nuestro laboratorio se han diseñado dos etiquetas peptídicas derivadas de la secuencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF). La primera, denominada GMOP, porta 4 sitios potenciales de O-glicosilación que se hallan parcial o totalmente ocupados en la proteína de origen. La segunda etiqueta, denominada mGMOP, deriva de la anterior y ha sido modificada para incorporar 6 sitios potenciales de O-glicosilación. Asimismo, ambas etiquetas comparten un péptido lineal correspondiente a los 4 aminoácidos N-terminales (APAR) del hGM-CSF, el cual es reconocido por un mAb, denominado CC1H7, perteneciente a nuestro laboratorio.

Se propone estudiar ambos péptidos en paralelo fusionados a una proteína modelo, la eritropoyetina humana (hEPO), para evaluar la capacidad de los mismos de conferir mejoras en las propiedades farmacocinéticas y en la actividad biológica de la proteína.

Título del proyecto: Desarrollo de una variante de eritropoyetina recombinante humana altamente O-glicosilada utilizando un péptido derivado del GM-CSF-humano

Instrumento: Cientibeca

Año convocatoria: 2023

Organismo financiador: UNL

Director/a: Lic. Ma. Jesús Leopold



Cabe mencionar que la glicosilación es un proceso co/pos-traduccional que ocurre en las células eucariotas. Por esta razón, para que la incorporación de glicanos suceda, la producción de las proteínas de interés se realizará mediante el cultivo de células animales como sistema de expresión.

## OBJETIVOS

Evaluar y comparar la capacidad de dos nuevas etiquetas peptídicas, GMOP y mGMOP, susceptibles de O-glicosilación y derivadas de la secuencia N-terminal del hGM-CSF, para otorgar mejoras en la actividad biológica *in vivo* de la eritropoyetina humana, trabajando en condición de extensa O-glicosilación.

## METODOLOGÍA

### **Generación de variantes de rhEPO hiper-O-glicosiladas (GMOP3-EPO-GMOP y mGMOP3-EPO-mGMOP)**

Las variantes propuestas fueron diseñadas fusionando 3 copias secuenciales del péptido GMOP o mGMOP en la región N-terminal y una cuarta copia en el extremo C de la rhEPO. En consecuencia, se incorporaron 19 y 27 sitios susceptibles de adición de O-glicanos para GMOP o mGMOP, respectivamente. Como péptido señal se adicionó la secuencia de señalización del hGM-CSF, del cual derivan las etiquetas, para asegurar la correcta secreción de las variantes al sobrenadante de cultivo. La síntesis del ADN quimérico se solicitó a la empresa Gene Universal (Gene Universal Inc., Newark, EE.UU).

### **Obtención de líneas estables de células CHO-K1 productoras de las variantes GMOP3-EPO-GMOP y mGMOP3-EPO-mGMOP**

La línea celular CHO-K1 fue transducida utilizando partículas lentivirales. Posteriormente, se llevó a cabo una presión selectiva gradual empleando concentraciones crecientes del antibiótico puromicina (Gibco, EE.UU), con el fin de enriquecer la población con aquellas células que presentan mayor productividad. La productividad se evaluó mediante determinación de la concentración de las variantes por técnica de ELISA sándwich y recuento celular. Finalmente, las líneas obtenidas fueron adaptadas a su crecimiento en suspensión.

### **Producción de las variantes empleando las líneas generadas.**

Las líneas celulares obtenidas se utilizaron para llevar a cabo la producción de las quimeras. Para ello, cada línea fue cultivada en agitación en un volumen final de 200 ml. A partir de este cultivo, se realizaron recambios sucesivos del medio, recuperando las células por centrifugación y cosechando el sobrenadante. Este procedimiento se realizó cada 48-72 h hasta alcanzar un número de cosechas que permitió obtener una masa adecuada para los ensayos posteriores. Las cosechas recolectadas se evaluaron mediante ELISA sándwich para determinar la concentración de la proteína de interés.

### **Caracterización del perfil de glicoisofomas de diferente masa molecular y de distinta**

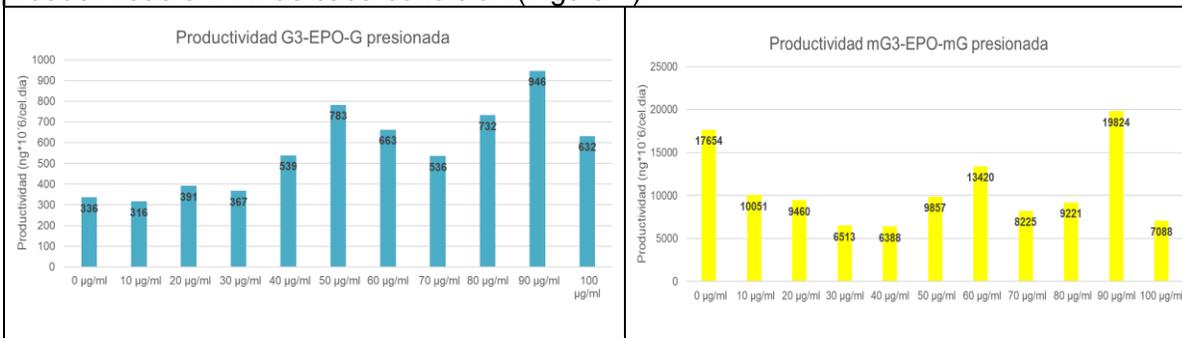


### carga de las nuevas moléculas

La caracterización de los perfiles de masa molecular y el patrón de isoformas de las variantes obtenidas se realizó mediante SDS-PAGE, seguido de la transferencia de las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) para llevar a cabo la detección inmunoquímica de las muestras, utilizando anticuerpos de conejo anti-rhEPO. Al mismo tiempo, se utilizó como método de detección el mAb anti-APAR (mAb CC1H7) para evaluar la identidad de las proteínas etiquetadas con los péptidos.

### CONCLUSIONES

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas y teniendo en cuenta consideraciones fisicoquímicas, se diseñaron dos variantes mediante fusión de la eritropoyetina humana (hEPO) con las etiquetas correspondientes a los péptidos GMOP y mGMOP. Estas secuencias, clonadas en los vectores de expresión correspondientes, fueron utilizadas para obtener líneas celulares mediante transducción. Para ello, las células CHO-K1 cultivadas en medio DMEM HAM's F12 suplementado con 5% SFB fueron transducidas cuatro veces de forma sucesiva para aumentar la eficiencia del proceso. A continuación, se realizó la presión selectiva empleando diferentes concentraciones del antibiótico puromicina y se evaluó la productividad a 24 h de cada condición (Figura 1).



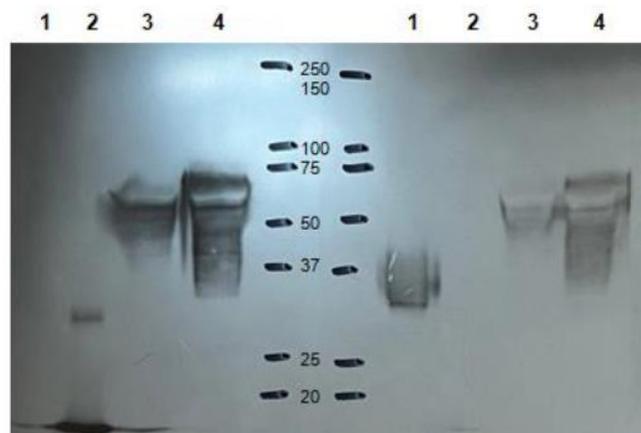
**Figura 1:** Productividad de las líneas celulares productoras de las variantes GMOP3-EPO-GMOP y mGMOP3-EPO-mGMOP sometidas a diferentes concentraciones del agente de selección (puromicina).

La máxima productividad de cada variante se obtuvo con diferentes concentraciones del antibiótico. Sobre la base de estos resultados, en el caso de la línea CHO GMOP3-EPO-GMOP se optó por continuar la presión de selección empleando una concentración máxima de puromicina de 280 µg/mL con el fin de alcanzar un mayor valor de productividad; mientras que para la línea CHO mGMOP3-EPO-mGMOP, la productividad luego de la presión de selección con 90 µg/mL de puromicina fue muy elevada, por lo cual no se continuó con el proceso de presión.

Finalizada la etapa de selección, las líneas con mayor productividad de ambas variantes de EPO fueron adaptadas al crecimiento en suspensión y agitación. Con este fin, en una primera instancia, las líneas cultivadas en adherencia en medio DMEM HAM'S F12 5% SFB fueron resuspendidas en un medio libre de suero para crecimiento en suspensión, Excell 302 SRF. Posteriormente, se continuó el proceso hasta su adaptación a otro medio libre de suero para

cultivo en suspensión más económico, CD BHK *Production Medium* (PM), con el fin de disminuir el costo de producción de las proteínas. Se realizó la adaptación gradual de un medio a otro, y una vez que ambas líneas celulares demostraron un óptimo crecimiento en medio de cultivo 100% PM, se evaluó su productividad a 24 h y 48 h. La productividad de ambas líneas celulares en los dos medios evaluados fue similar entre sí, por lo cual se continuó con la producción y purificación de cada variante en las condiciones establecidas.

La caracterización de los perfiles de masa molecular y el patrón de isoformas de las variantes mediante SDS-PAGE y posterior *western blot* empleando el pAb anti-EPO como anticuerpo de detección permitió identificar todas las variantes de EPO, incluyendo aquellas que contienen el péptido GMOP y mGMOP. Por otra parte, la incubación con el mAb CC1H7 sólo permitió detectar las proteínas que contienen la secuencia APAR, entre ellas las variantes fusionadas al péptido GMOP y mGMOP, y la citoquina rhGM-CSF, de la cual derivan ambas etiquetas peptídicas. Cabe aclarar que en el carril donde se sembró GM-CSF se observa una banda adicional a los 30 kDa, que podría corresponderse a agregados de la proteína. Además, se observó que la masa molecular de ambas variantes se incrementó en gran medida con respecto a la hEPO, alcanzando valores entre 50-75 kDa. Este incremento se atribuye no solo a la masa molecular aportada por la secuencia de aminoácidos de los péptidos incorporados, sino también a los glicanos unidos a los sitios de O-glicosilación de los mismos. A su vez, la variante mGMOP3-EPO-mGMOP presentó una masa molecular mayor con respecto a la variante GMOP3-EPO-GMOP, destacándose además un perfil ligeramente más heterogéneo evidenciado por la presencia de una banda más ancha que comprendería un mayor número de glicofomas (Fig. 2).



**Figura 2:** SDS-PAGE seguido de western blot e inmunodetección con mAb CC1H7 (izquierda) y con pAb anti-EPO (derecha). Calles: 1-rhEPO; 2-rhGM-CSF; 3-G4-EPO; 4-mG4-EPO.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- M. Sales, R. Kratje, M. Oggero, N. Ceaglio, Bifunctional, 2021.** GM-CSF-derived peptides as tools for O-glycoengineering and protein tagging. *Journal of Biotechnology* 327 18–27
- N. Ceaglio, A. Gugliotta, B. Tardivo, D. Cravero, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, M. Oggero, 2016.** Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG  $\alpha$ -subunit. *Journal of Biotechnology* 221 13–24
- F. Iturraspe Castellví, 2019.** Tesina para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología: Glicoingeniería de hIFN- $\alpha$ 2b: producción de variantes terapéuticas altamente o-glicosiladas empleando un nuevo péptido derivado del gm-csf humano
- M. Oggero, R. Frank, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, 2004.** Defining the antigenic structure of human GM-CSF and its implications for receptor interaction and therapeutic treatments. *Mol Divers* 8 257-269.
- N. Perotti, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, M. Oggero, 2013.** A versatile ionic strength sensitive tag from a human GM-CSF-derived linear epitope. *Protein Expr Purif* 91 10-19.