

GLICOINGENIERÍA DE IFN-ALFA2B HUMANO: PRODUCCIÓN DE VARIANTES TERAPÉUTICAS ALTAMENTE O-GLICOSILADAS EMPLEANDO UN NUEVO PÉPTIDO DERIVADO DEL GM-CSF HUMANO

Iturraspe Castellvi Francisco

UNL, CONICET, FBCB. Laboratorio de Cultivos Celulares.

Director: Oggero Eberhardt Marcos

Codirectora: Ceaglio Natalia

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La baja estabilidad y corta vida media en circulación que presentan las proteínas recombinantes terapéuticas desarrolladas como biofármacos de primera generación constituyen los mayores obstáculos para sus aplicaciones clínicas. Por tal motivo, se han implementado estrategias con el fin de prolongar el tiempo de permanencia en circulación en un contexto de dosis terapéuticas adecuadas. Por otro lado, la glicosilación es el evento co/postraduccional más importante que llevan a cabo las células eucariotas y, por este motivo, se ha propuesto a la glicoingeniería como un área de gran interés tecnológico cuyo objetivo es conferir a las proteínas mejoras en sus propiedades: solubilidad, bioactividad, secreción, velocidad de depuración plasmática y antigenicidad, entre otras. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de una estrategia de O-glicoingeniería para la generación de variantes recombinantes de IFN- α 2b humano (hIFN- α 2b) con potencial uso terapéutico. Dicha estrategia consistió en la adición de una nueva etiqueta peptídica (GMOPm), derivada del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF), la cual consta de los primeros 7 aminoácidos de la región N-terminal del hGM-CSF con 8 residuos adicionales que confieren 6 sitios potenciales de O-glicosilación. Las proteínas quiméricas resultantes de la fusión entre una proteína de interés farmacéutico como hIFN- α 2b y el péptido GMOPm (utilizado en diferentes proporciones con respecto a la citoquina) fueron producidas en células CHO-K1, purificadas y caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico y biológico.

OBJETIVO

Evaluación de una estrategia de O-glicoingeniería para la generación de variantes recombinantes de IFN- α 2b humano (hIFN- α 2b) para uso terapéutico que incorporen una nueva etiqueta peptídica (GMOPm), derivada del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF) y que tiene la propiedad de ser extensamente modificada por la adición de O-glicanos.

Título del proyecto: Glicoingeniería de eritropoyetina humana: generación de muteínas con superior actividad neuroprotectora y reducida acción eritropoyética
Instrumento: Proyectos PICT – PICT 2015-2150

Año convocatoria: 2015
Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT)
Director/a: Marcos Oggero Eberhardt

RESULTADOS

Producción de las quimeras hIFN- α 2b/GMOPm

Se generaron líneas estables de células CHO-K1 productoras de quimeras de hIFN- α 2b resultantes de la fusión del péptido GMOPm al extremo N-ter y/o C-ter de la proteína de interés. De este modo se obtuvieron 6 variantes que presentan entre 7 y 29 sitios potenciales de O-glicosilación, de acuerdo a su evaluación *in silico*, que se denominaron: GMOPm-IFN, (GMOPm)2-IFN, (GMOPm)3-IFN, (GMOPm)2-IFN-GMOPm y (GMOPm)3-IFN-GMOPm.

La producción fue llevada a cabo en condiciones de adherencia utilizando frascos T-175 cm². Durante la etapa de producción se evaluó la concentración de la proteína de interés mediante un ensayo de inmunoensayo en fase sólida (ELISA) de tipo sándwich basado en la captura de las variantes de hIFN- α 2b por parte de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-hIFN- α 2b inmovilizados sobre placas de poliestireno, alcanzando concentraciones entre 0,7 y 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 1).

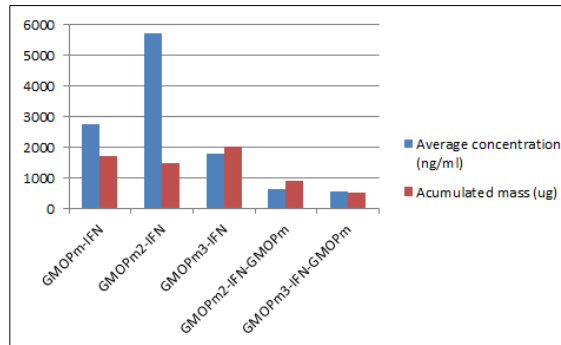


Figura 1. Concentración promedio y masa acumulada durante la producción de las variantes de hIFN- α 2b

Purificación de las variantes de hIFN- α 2b mediante cromatografía de inmunoafinidad

La purificación de las variantes de hIFN se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad empleando una matriz preparada previamente mediante acoplamiento del mAb anti-hIFN α 2b a una resina de Sepharose[®] (GE Healthcare) activada con CNBr. La desorción de las moléculas de interés se llevó a cabo mediante el empleo de una solución ácida (pH 2) seguido de la inmediata neutralización de las fracciones obtenidas. Se obtuvieron recuperaciones promedios entre 46 y 100%, calculadas a partir del ELISA sándwich previamente mencionado (Tabla 1).

Tabla 1. Recuperación de las purificaciones de las quimeras

Variante	Recuperación promedio (%)

GMOPm-IFN	46 (n=3)
GMOPm2-IFN	65 (n=3)
GMOPm3-IFN	87 (n=4)
GMOPm2-IFN-GMOPm	100 (n=3)
GMOPm3-IFN-GMOPm	88 (n=3)

Caracterización del perfil de glicoisformas de diferente masa molecular y de distinta carga de las nuevas moléculas

Los perfiles de masa molecular y de carga de las glicoisformas fueron analizados por SDS-PAGE e IEF respectivamente (**Figura 2**).

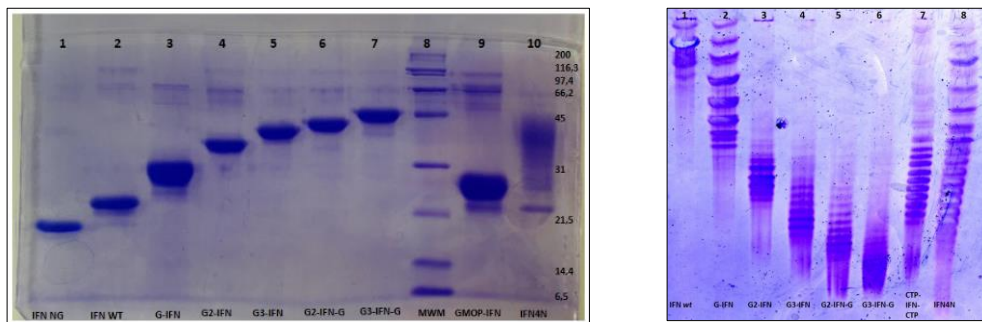


Figura 2. SDS-PAGE de las variantes de hIFN- α 2b. Calle 1, IFN no glicosilado; calle 2, IFN *wild-type*; calle 3, GMOPm-IFN; calle 4, GMOPm2-IFN; calle 5, GMOPm3-IFN; calle 6, GMOPm2-IFN-GMOPm; calle 7, GMOPm3-IFN-GMOPm; calle 8, marcadores de masa molecular; calle 9, GMOP-IFN; calle 10, una variante de IFN altamente N-glicosilada (IFN4N). Isoelectroenfoque de las variantes de IFN. Calle 1, IFN *wild-type*; calle 2, GMOPm-IFN; calle 3, GMOPm2-IFN; calle 4, GMOPm3-IFN; calle 5, GMOPm2-IFN-GMOPm; calle 6, GMOPm3-IFN-GMOPm; calle 7, una variante altamente O-glicosilada de IFN (CTP-IFN-CTP); calle 8, una variante de IFN altamente N-glicosilada (IFN4N).

El análisis fisicoquímico de las muestras reveló que al aumentar el número de etiquetas peptídicas GMOPm se produce un incremento de la masa molecular aparente en una proporción superior a lo esperable sólo por la contribución de la porción peptídica. Este resultado fue confirmado mediante O-deglicosilación enzimática de todas las quimeras, ya que se observó una disminución de la masa molecular de las mismas, lo que indicó la presencia de glicanos de tipo O- unidos a todas las proteínas de fusión. Además, se observó una disminución del punto isoeléctrico de las nuevas variantes de rhIFN- α 2b conforme al incremento en el número de sitios potenciales de O-glicosilación. Este resultado indica la presencia de un mayor contenido de ácido siálico. Particularmente, las variantes O-glicosiladas evidenciaron mayor homogeneidad en el perfil de isoformas en comparación con una molécula de IFN- α 2b altamente N-glicosilada por portar 4 sitios de comprobada N-glicosilación (IFN4N).

Actividad Biológica *in vitro*

La actividad biológica *in vitro* de IFN- α 2b y de sus derivados fue evaluada midiendo:

A- el efecto antiviral citoprotector en células MDBK infectadas por el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

B- el efecto antiproliferativo sobre el crecimiento de la línea celular Daudi.

Tabla 2. Actividad Biológica específica *in vitro* de las variantes de hIFN- α 2b

Actividad biológica específica <i>in vitro</i> (UI/ng)						
Variante	hIFN- α 2b*	G-IFN	G2-IFN	G3-IFN	G2-IFN-G	G3-IFN-G
Antiviral	200 \pm 20	240 \pm 40	170 \pm 70	71 \pm 15	70 \pm 20	50 \pm 20
Antiproliferativa	150 \pm 20	100 \pm 20	30 \pm 20	12 \pm 6	3 \pm 1	8 \pm 4

*Valor reportado para rhIFN- α 2b producido en células CHO-K1 [Ceaglio *et al.*, 2008].

Todas las variantes de IFN retuvieron en mayor grado la actividad antiviral con respecto a la antiproliferativa, ambas evaluadas *in vitro*. En términos generales se observó disminución de la actividad en forma concomitante con el número de etiquetas fusionadas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo la generación de 6 variantes O-glicosiladas de rhIFN- α 2b mediante la aplicación de una estrategia de O-glicoingeniería que consistió en la fusión de una o más unidades del péptido GMOPm al extremo N- y/o C-terminal de la citoquina mencionada. La caracterización fisicoquímica de las nuevas variantes reveló el incremento de la masa molecular aparente y del contenido de isoformas ácidas conforme al aumento en la proporción péptido/IFN. La observación de una disminución de la actividad biológica *in vitro* de las nuevas variantes de rhIFN- α 2b no resulta desalentador, ya que es ampliamente conocido que la actividad *in vitro* generalmente no refleja la eficacia *in vivo* de un agente bioterapéutico. Así, el incremento en el grado de glicosilación podría conducir a mejoras en las propiedades farmacocinéticas y estabilidad de tales variantes, aspectos que resultarán muy apropiados para potenciar la actividad biológica *in vivo* de la citoquina.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- N. Ceaglio, M. Etcheverrigaray, H. S. Conradt, N. Grammel, R. Kratje, M. Oggero.** 2007. Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *J. Biotechnol* 146 (2010) 74-83.
- N. Ceaglio, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, M. Oggero.** 2008 Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie* 90 437-449.
- A. Gugliotta, N. Ceaglio, B. Raud, G. Forno, L. Mauro, R. Kratje, M. Oggero.** 2017 Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- α 2 potentiate HEK293 cells as biofactories. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 112 119-131.
- N. Ceaglio, A. Gugliotta, M. B. Tardivo, D. Cravero, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, M. Oggero.** 2016. Improvement of *in vitro* stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit. *J Biotechnol* 221 13-24.