

PEGILACION DE ALFA-GALACTOSIDASA RECOMBINANTE HUMANA (RH α -GAL) EMPLEANDO MPEG-BUTIRATO DE NHS

Menegon, Malen^{1,2}

¹Instituto Nacional de Desarrollo
para la Industria Química (INTEC,
UNL-CONICET) ²Centro
Biotecnológico del Litoral (CBL,
UNL)

Director/a: Vaillard,
Santiago
Codirector/a:
Ceaglio, Natalia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Pegilación, Bioconjugación, Galactosidasa-A.

INTRODUCCIÓN

La bioconjugación con metoxi-polietilenglicol (mPEG), o pegilación, puede corregir varios inconvenientes asociados al uso terapéutico de proteínas recombinantes y de otros biofármacos (González et al, 2013). Las drogas conjugadas a mPEG exhiben mejoras en sus propiedades químicas, bioquímicas y farmacológicas y un comportamiento *in vivo* mucho más favorable (Goswami et al, 2013).

En la actualidad se encuentra en estudio clínico de fase III una versión pegilada de rha-Gal producida en células de tabaco (PRX-102, PEGunigalsidasa alfa®), donde se emplea PEG homo-bifuncional de 2 kDa en exceso (Kizhner et al, 2015), conduciendo a un bioconjugado muy heterogéneo en el que las subunidades de la enzima se encuentran entrecruzadas de forma covalente.

OBJETIVOS

Estudiar la conjugación de rha-Gal producida en células CHO-K1 empleando mPEG mono-funcional de elevado peso molecular, que no conduce al entrecruzamiento de las subunidades enzimáticas.

Mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de dicha proteína, empleada en Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) para tratamiento de la enfermedad de Fabry, por medio de la pegilación.

Título del proyecto: Desarrollo de Nuevas Tecnologías para la Preparación de mPEGs Activados Útiles en la Modificación de las Propiedades Fisicoquímicas.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Vaillard, Santiago.

METODOLOGÍA

En primer lugar, se determinó por espectrofluorimetría la actividad enzimática (AE) de la enzima pura, la que se empleó como producto de partida, obteniendo un valor de $1,01E+06 \text{ U.mg}^{-1}$ (Tabla 1, entrada 1). Luego se llevaron a cabo las reacciones de PEGilación con mPEG-NHS butirato de 30 kDa (mPEG-SBA), en PBS pH 8,0 a 25 °C, en una relación molar $\text{r}\alpha\text{-Gal:mPEG}$ 1:10. Tanto la enzima como las reacciones de conjugación se evaluaron por SEC-HPLC con detección a 280 nm y por SDS-PAGE. Con el objetivo de optimizar la reacción de conjugación se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 1). Además, se midió la AE remanente en el crudo de reacción, sin observar cambios en su valor (Tabla 1, entrada 2).

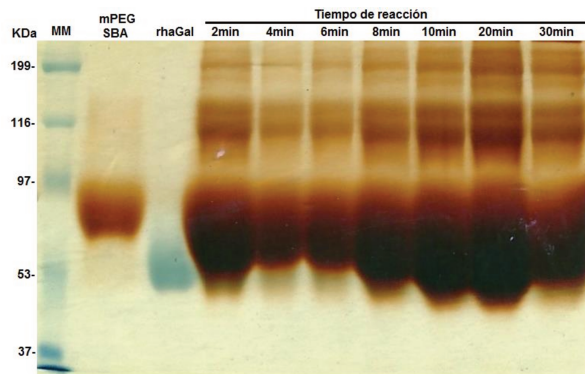


Figura 2. SDS-PAGE con gel de acrilamida/bisacrilamida al 7,5 % (m/v) de los diferentes tiempos de pegilación de $\text{r}\alpha\text{-Gal}$ evaluados.

Tabla 1. Actividad enzimática de las muestras de $\text{r}\alpha\text{-Gal}$ antes y después de las reacciones de conjugación con mPEG.

Muestra	Proteína Total (mg/mL)	Actividad (U.mL^{-1})	AE (U.mg^{-1})
$\text{r}\alpha\text{-Gal}$ pura	1,25	$1,26E+06$	$1,01E+06$
$\text{r}\alpha\text{-Gal}$ conjugada [#]	1	$6,32E+05$	$1,01E+06$

[#]Tiempo de conjugación: 20 min

En estas condiciones, se alcanzó conversión completa de $\text{r}\alpha\text{-Gal}$ luego de 6 h de reacción a expensas de la formación de un 60% de productos di-pegilados (figura 2 a). La formación de productos mono-pegilados, que otorgan homogeneidad al producto, alcanzó un máximo del 40% luego de 20 min (figura 2 b). A partir de ese momento, sólo se observó el incremento de productos de sobre-pegilación, por lo que se estableció como tiempo óptimo un período de 20 min. Luego de la conjugación, se comenzó la puesta a punto de la purificación del conjugado. La optimización se basó en el uso de la metodología empleada para purificar $\text{r}\alpha\text{-Gal}$ a partir de sobrenadantes de cultivo (Rodríguez et al, 2017) teniendo en cuenta los cambios esperados en las propiedades de la proteína, principalmente carga e hidrofobicidad.

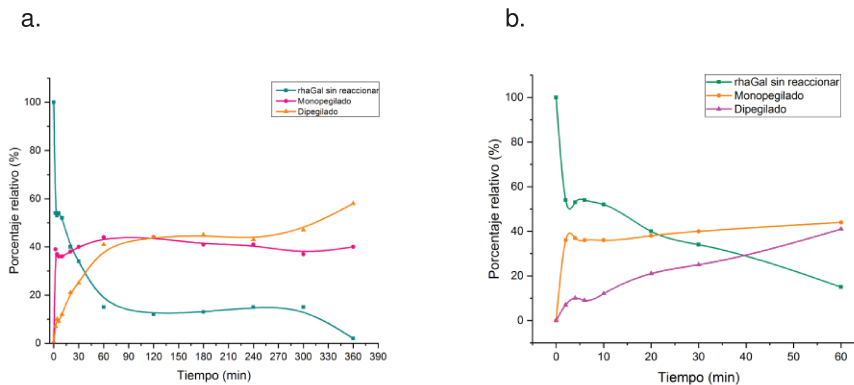


Figura 2. Conjugación de rha-Gal con mPEG-SBA de 30 KDa realizada a 25 °C en buffer PBS pH 8,0 durante 6 horas.

En primer lugar, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico (IEX), en la que se logró separar la proteína libre y la fracción conjugada del exceso de mPEG-SBA remanente en el crudo de reacción, que podría interferir en la siguiente etapa (Ramos de la Peña et al, 2020). Como segundo paso de purificación, se empleó una resina de interacción hidrofóbica (HIC), observándose un enriquecimiento de la proteína pegilada en relación a la proteína no pegilada en las primeras fracciones de elución.

CONCLUSIONES

En las condiciones estudiadas, la conjugación de rha-Gal con mPEG-SBA de 30 KDa proporcionó un rendimiento del producto mono-conjugado dentro del rango esperado de acuerdo a la experiencia del grupo de trabajo y a la bibliografía. Si bien hasta el momento aún no se han podido separar completamente ambas especies, estudios preliminares indican que la AE de la proteína conjugada no diferiría con respecto al producto de referencia ni a la versión pegilada en evaluación clínica, aunque exhibiría un carácter más homogéneo, lo que resulta una propiedad altamente deseable en un desarrollo de tecnología de pegilación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

González, M., Vaillard, S. 2013. Evolution of reactive mPEG polymers for the conjugation of peptides and proteins. *Current Organic Chemistry*, 17, (9), 975-998.

Goswami, L., Houston, Z., Sarma, S., Jalisatgi, S., Hawthorne, M. 2013. Efficient synthesis of diverse heterobifunctionalized clickable oligo (ethylene glycol) linkers: potential applications in bioconjugation and targeted drug delivery. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11, 1116-1126.

Kizhner T., Azulay Y., Hainrichson M., Tekoah Y., Arvatz G., Shulman A., et al. 2015.

Código de campo cambiado



Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human α -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114, 259–267.

Rodríguez C., Ceaglio N., Antuña S., Tardivo M. B., Etcheverrigaray M., Prieto C. 2017. High yield process for the production of active human α -galactosidase a in CHO-K1 cells through lentivirus transgenesis. *Biotechnology Progress*, 33, 1334-1345.

Ramos de la Peña A.M., Aguilar O. 2020. Progress and challenges in PEGylated proteins. Downstream processing: a review of the last 8 years. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 333– 348.

