

CHO.K1 VERSUS HEK-293 EN LA PRODUCCIÓN DE VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE EPO HUMANA COMO CANDIDATOS NEUROTERAPÉUTICOS

Francisco Iturraspe

Laboratorio de Cultivos Celulares, Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), FBCB-UNL

Director: Oggero Eberhardt, Marcos
Codirector: Bürgi, María de los Milagros

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: EPO, HEK-293, CHO.K1

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un conjunto de patologías que afectan el sistema nervioso central (SNC) y provocan desórdenes cognitivos, alteraciones de conducta y cambios en la regulación del organismo. Estas se caracterizan por su cronicidad y evolución progresiva. Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para estas patologías y el mercado farmacéutico solo ofrece medicamentos destinados al tratamiento de su sintomatología.

La EPO humana (hEPO) es una proteína encargada de la producción y mantenimiento de la masa de glóbulos rojos en sangre. Es considerada una droga segura y bien tolerada por el organismo para el tratamiento de la anemia. La hEPO es producida principalmente por los riñones. Estructuralmente consiste en una única cadena polipeptídica altamente glicosilada, portando tres sitios consenso de N-glicosilación y uno de O-glicosilación, responsables del 40% de su masa molecular, la que oscila entre 30-39 kDa (Lacombe & Mayeux, 1999).

Además de su accionar hematopoyético, se ha demostrado que la hEPO participa en procesos de neuroprotección y neuroregeneración (Alnaeeli y col., 2012). Esta citoquina es producida en cerebro, principalmente por astrocitos, y en menor medida por neuronas, y a diferencia de la hEPO producida en riñón, exhibe una menor masa molecular aparente, debido a una menor complejidad en sus estructuras glicosídicas.

Con el objetivo de potenciar su capacidad neuroprotectora, sin los efectos asociados a su actividad eritropoyética, en nuestro laboratorio se generaron variantes hiperglicosiladas de hEPO mediante glicoingeniería por hiperglicosilación. De este modo, se modificó la región molecular de la citoquina responsable de su actividad eritropoyética mediante la generación de nuevos sitios consenso de N-glicosilación. Esta estrategia permitió generar variantes que poseen nula actividad eritropoyética y conservan al mismo tiempo la actividad neuroprotectora, utilizando la línea celular CHO.K1 como plataforma de producción (Bürgi y col., 2021).

Los resultados exitosos obtenidos a partir de la producción de las variantes de hEPO en células CHO.K1, despertaron el interés de su generación en células HEK-293, con el propósito de obtener moléculas con mayor grado de similitud a la citoquina producida en cerebro, dado que la glicosilación de proteínas en la línea celular HEK-293 se presenta con estructuras más simples: menor antenaricidad y contenido de ácido siálico. El objetivo general de este trabajo

Título del proyecto: NEUROPLASTICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN SIN HEMATOPOYESIS: PROPIEDADES CLAVE DE UNA NUEVA ERITROPOYETINA HIPERGLICOSILADA

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2019

Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MinCyT)

Director/a: Oggero Eberhardt, Marcos Rafael

consiste en la generación de líneas celulares HEK-293 productoras de las variantes Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153, cuyas propiedades fisicoquímicas y biológicas serán comparadas con respecto a las de sus análogas expresadas en células CHO.K1.

OBJETIVOS

- Generación de líneas celulares HEK-293 productoras de las variantes de hEPO Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153.
- Evaluación de la productividad de las líneas recombinantes.
- Comparación de las variantes producidas en células HEK-293 y en células CHO.K1 en base a su masa molecular aparente y su actividad eritropoyética *in vitro*.

METODOLOGÍA

Generación de líneas celulares estables HEK-293 productoras de las variantes de hEPO y evaluación de su productividad

Se generaron líneas celulares estables HEK-293 mediante transducción con partículas lentivirales para producir las variantes de hEPO denominadas Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153. Para ello, se procedió a la cotransfección (lipofección), de células HEK-293 con tres plásmidos que codifican para proteínas estructurales de las partículas lentivirales (PLV) junto con un plásmido adicional, portando la secuencia codificante para cada muteína de hEPO y el gen de resistencia a puomicina. Los sobrenadantes conteniendo las PLV fueron cosechados 48 h posteriores a la transfección y utilizados para realizar la transducción de células HEK-293. Se realizaron tres transducciones sucesivas con el propósito de incrementar los niveles de expresión de las proteínas de interés. Las células transducidas fueron sometidas a un proceso de presión selectiva con concentraciones crecientes de puomicina, con el objetivo de enriquecer la población celular que presenta una mayor expresión de la proteína recombinante.

Para evaluar la productividad celular, las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 24 pozos a razón de 200.000 cél.ml⁻¹. Luego de 24 y 48 h, se tomaron los sobrenadantes de cultivo para analizar la concentración de cada variante de hEPO mediante ELISA sándwich y se realizaron los recuentos celulares en cada uno de los pozos. El cálculo de la productividad celular fue realizado utilizando la siguiente ecuación:

$$Productividad\ celular\ (pg.\cél^{-1}.\text{día}^{-1}) = \frac{(Concentración_{48\ h} (\frac{pg}{ml}) - Concentración_{24\ h} (\frac{pg}{ml}))}{(Células\ viables_{48\ h} (\frac{cél}{ml}) - Células\ viables_{24\ h} (\frac{cél}{ml}))}$$

Comparación de las variantes de hEPO producidas en los distintos huéspedes celulares con relación a su masa molecular y su actividad biológica eritropoyética *in vitro*

Las masas moleculares aparentes de las variantes de hEPO producidas en células CHO.K1 y HEK-293, fueron evaluadas mediante SDS-PAGE seguido de *Western Blot*. Para ello, se realizó una corrida electroforética durante 1 h a 200 V, sembrando 80 ng de cada variante. Posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF durante 1 h a 180 mA. El bloqueo de los sitios libres se realizó empleando leche descremada 5% (P/V) en solución salina de Tris (TBS). Como primer anticuerpo se empleó un suero de conejo anti-rhEPO (dilución 1/2000) y como anticuerpo de detección del inmunocomplejo se emplearon anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (dilución

1/2000). Entre etapas de incubación se realizaron lavados con TBS con el agregado de Tween-20. Finalmente, se realizó el revelado mediante quimioluminiscencia.

La actividad eritropoyética de las variantes de hEPO fue evaluada empleando la línea celular UT-7, que requiere de hEPO para su crecimiento. Las células fueron lavadas con medio de cultivo basal para remover el excedente de hEPO y resuspendidas en medio de ensayo, carente de hEPO, en placas de 96 pozos a razón de 2×10^5 cél.ml⁻¹. Seguidamente, se incubaron en presencia de 8 diluciones seriadas 1:2 del estándar de hEPO y de las variantes de hEPO desde una concentración inicial de 8,4 ng.ml⁻¹ durante 72 h a 37°C en estufa gaseada. El revelado del bioensayo fue realizado mediante la adición de la mezcla de reactivos MTS/PMS y posterior lectura espectrofotométrica a $\lambda=492$ nm y $\lambda=690$ nm.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Hasta el momento, se generaron tres líneas celulares recombinantes HEK-293, productoras de cada variante de hEPO. Estas exhibieron productividades crecientes con el aumento de la concentración de puromicina (Figura 1). Aún se continúa con la presión selectiva de estas líneas hasta alcanzar la condición que permita obtener la mayor productividad.

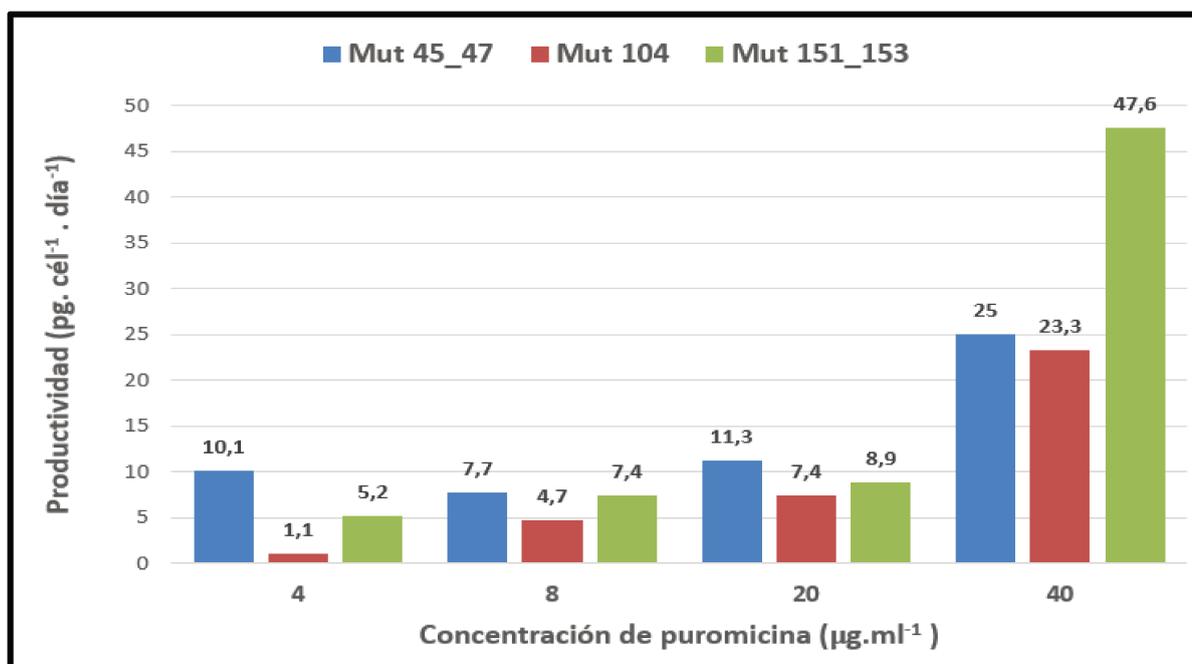


Figura 1. Productividad de las líneas celulares HEK-293 productoras de las Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153.

Las masas moleculares aparentes de las variantes producidas en células CHO.K1 y HEK-293 fueron comparadas mediante SDS-PAGE seguido de *Western Blot*.

Las variantes de hEPO producidas en células HEK-293 demostraron una menor masa molecular aparente con respecto a sus análogas expresadas en células CHO.K1. Si bien resta analizar el patrón de glicosilación de cada variante, la menor masa molecular obtenida para las variantes producidas en células HEK-293, en conjunto con los datos reportados sobre la glicosilación producida por células CHO.K1 vs. HEK-293 (Croset y col., 2012), permiten suponer que las muteínas expresadas en estas últimas, presentan una menor complejidad de sus estructuras glicosídicas. Como consecuencia, los glicanos que poseen las variantes expresadas en células HEK-293 podrían contener un menor grado de antenaridad y un menor contenido de ácido siálico y, por lo tanto, una menor carga neta. Tales aspectos asemejarían

estas variantes a la hEPO producida en cerebro.

Por otra parte, la evaluación de la actividad eritropoyética *in vitro* permitió confirmar que las muteínas expresadas en células HEK-293 conservaron la nulidad de dicha actividad, de la misma manera que las variantes producidas en CHO.K1. Ninguna de las variantes de hEPO estimuló la proliferación de las células UT-7 (Figura 2).

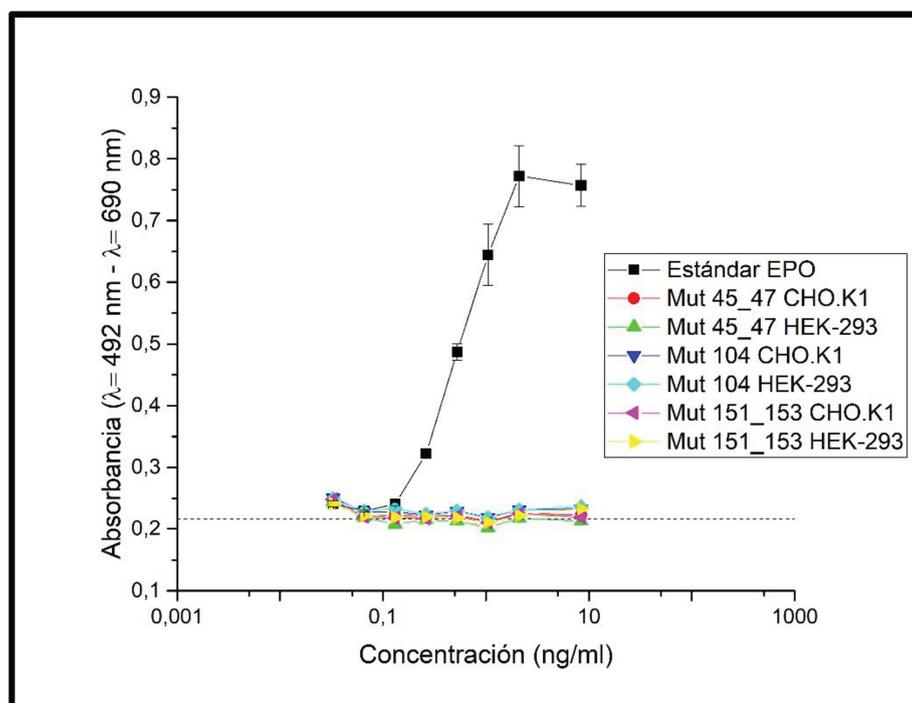


Figura 2. Evaluación de la actividad eritropoyética *in vitro* de las variantes.

Como perspectivas, se prevé la producción a mayor escala de las variantes expresadas en células HEK-293, su purificación por cromatografía de inmunoafinidad, su caracterización glicosídica y determinación de sus actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, comparando tales características con las variantes de hEPO ya producidas en células CHO.K1.

BIBLIOGRAFÍA

- C. Lacombe, P. Mayeux.** 1999. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 2 22-28.
- Alnaeli, M., Wang, L., Pikhova, B., Rogers, H. Li, X., Noguchi, C.** 2012. Erythropoietin in brain development and beyond. *Anat Res Int* 2012 953264
- Bürgi, M., Aparicio, G. I., Dorella, A., Kratje, R., Scorticati, C., Oggero, M.** 2021. Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra N-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *J Biotechnol*, 16(5):e2000455. doi: 10.1002/biot.202000455.
- Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., Begue, D., Krstanovic, A., Robert, F., Vilbois, F., Chevalet, L., Antonsson, B.** 2012. Differences in the glycosylation of recombinant protein expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol* 31; 161(3):336-48.