

# **Desarrollo de un sistema combinado de perfil cromatográfico y espectrometría de masas fluoróforo asistido para la caracterización de la N-glicosilación de glicoproteínas**

✉ José A Cremata, Raquel Montesino, Gleysin Cabrera, Marlene Mata, Rossana García

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)  
Departamento de Química de Carbohidratos  
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de la Habana, Cuba  
Fax: (53-7) 271 4764

## **RESUMEN**

La N-glicosilación como modificación post-traduccional es uno de los eventos que ocupa más atención hoy en día, en la caracterización de la estructura de glicoproteínas naturales o recombinantes de uso farmacéutico. La caracterización de esta modificación se realiza por métodos físico-químicos o de perfil cromatográfico, generalmente asistido por agentes fluorescentes que garanticen una alta sensibilidad en la detección, o combinación de ellos. En este trabajo se evalúa la introducción de un nuevo fluoróforo, el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA), el cual es empleado en el marcaje fluorescente de N-oligosacáridos posibilitando además la adecuada caracterización de los N-glicanos marcados en Espectrometría de Masas principalmente MALDI. Este fluoróforo permite la caracterización de la N-glicosilación en sistemas HPLC con cantidades mínimas de la glicoproteína de interés (hasta 20 microgramos en términos de glicoproteína, o de centenas de femtomoles en términos de N-glicano marcado). En el caso de la espectrometría de masas el análisis es posible con cantidades tan pequeñas como 5 a 10 picomoles (10-20 nanogramos) del N-glicano marcado. El sistema ha sido aplicado para la caracterización de proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales obtenidos en ascitis de ratón o cultivados *in vitro* en diferentes sistemas productivos así como en la determinación de variaciones del perfil de N-glicosilación de IgG sérica en enfermedades autoinmunes.

## **Introducción**

Aparte de la influencia en el correcto plegamiento de la proteína, la resistencia a proteasas y la estabilidad térmica, en la actualidad está bien establecido que la glicosilación interviene también en la interacción proteína-receptor, célula-célula y en la modulación de la actividad biológica o inmunogenicidad, entre otros [1-3]. Por otra parte se conoce que la glicosilación de proteínas recombinantes puede variar según la línea celular y las condiciones de cultivo empleadas dando lugar a una gran variedad de "glicofomas". Por tanto, la determinación de la glicosilación, particularmente la enlazada a residuos de Asparagina específicos en una secuencia consenso determinada por el tripéptido Asn-X-Ser/Thr (siempre que X no sea Pro), en términos de ocupación de sitios potenciales y los perfiles y estructuras de los N-glicanos enlazados es un requerimiento para garantizar una mayor uniformidad de la calidad de proteínas naturales o recombinantes de uso terapéutico.

Hasta el presente se han descrito varias metodologías para la caracterización de perfiles de N-glicosilación basadas, por lo general, en métodos cromatográficos o combinaciones de métodos cromatográficos con espectrometría de masas. Además, han sido publicados recientemente artículos de revisión acerca de la metodología de caracterización de la N-glicosilación basados en espectrometría de masas [4, 5]. El uso de agentes fluorescentes que permitan incrementar sustancialmente la sensibilidad de la detección ha sido un principio importante a la hora de seleccionar un agente derivatizante ideal para la separación de los N-glicanos en HPLC. Entre ellos la 2-aminopiridina (2-AP) [6, 7] y

la 2-aminoben-zamida (2-AB) [8-10] y el ácido 8-amino-1, 3, 6-naftalen trisulfónico (ANTS) [11].

## **Descripción del resultado**

En nuestro laboratorio se había desarrollado un método de perfil cromatográfico basado en la derivatización de los N-glicanos liberados enzimáticamente por aminación reductiva con el fluoróforo ácido 8-amino-1, 3, 6-naftalen trisulfónico (ANTS). Este derivado se analiza en sistema de HPLC (columna amino) y electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE), dando como resultado un mapa bidimensional con alto carácter de predicción [12]. El reactivo utilizado tiene como dificultad que es poco adecuado para la espectrometría de masas tanto por ionización por electronebulización (ESI) como por láser asistido por matriz (MALDI).

El trabajo que se describe a continuación es la introducción de un nuevo fluoróforo, el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA) que por aminación reductiva se emplea en el marcaje fluorescente de N-oligosacáridos [13]. Este fluoróforo, además de la alta sensibilidad en sistemas cromatográficos HPLC, tiene la virtud de ser adecuado para la caracterización de los N-glicanos marcados en espectrometría de masas, principalmente MALDI.

El 4-ABA permite la caracterización de la N-glicosilación con cantidades mínimas de la glicoproteína de interés (hasta 20 microgramos o menos en términos de glicoproteína, o de centenas de femtomoles en términos de N-glicano marcado) dada su alta sensibilidad usando detectores de fluorescencia. En el caso de la espectrometría de masas el

1. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. Ann. Rev. Biochem. (1988); 57:785-838.

2. Varki A. Biological Roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology 1993;3:97-130.

3. Ritchie GE, Moffatt BE, Sim RB, B Morgan P, Dwek RA, Rudd PM. Glycosylation and the Complement System. Chem. Rev. 2002;102:305-19.

4. Harvey DJ. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. Proteomics 2001;1:311-28.

5. Mechref Y, Novotny MV. Structural Investigations of Glycoconjugates at High Sensitivity. Chem. Rev. 2002;102:321-69.

6. Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Endo S, Arata Y, Takahashi N. Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique. Anal. Biochem. 1988;171:73-90.

7. Takahashi N, Nakagawa H, Fujikawa K, Kawamura Y, Tomiya N. Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides. Anal. Biochem 1995;226:139-46.

8. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method of separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. Anal. Biochem. 1996;240:210-26.

análisis es posible partiendo de 5 a 10 picomoles de N-glicano marcado.

En adición a la alta sensibilidad de la detección este derivado permite hacer análisis en HPLC en tiempos relativamente cortos si se comparan con los reportados para los derivados 2-AB y ANTS. Su mayor eficiencia se ha comprobado en la separación de mezclas de N-glicanos neutros y sialilados en combinación con separaciones en intercambio iónico.

**Algunos resultados obtenidos por la introducción de esta nueva metodología**

**Variación del perfil de N-glicosilación de IgG sérica en enfermedades autoinmunes [14]**

Se estudiaron diferentes poblaciones de individuos que presentan enfermedades autoinmunes, como por ejemplo Artritis Reumatoide, Psoriasis Artrítica y Enfermedad Celiaca utilizando tres grupos controles, niños menores de 12 años, adultos jóvenes y adultos mayores de 40 años.

Por reacción de desglicosilación enzimática se liberan los N-glicanos covalentemente enlazados a la Asn 297 de la cadena pesada de la IgG. El conjunto total de oligosacáridos se derivatiza por aminación reductiva con 4-ABA y los oligosacáridos marcados se separan en HPLC, columna NH<sub>2</sub> (NH<sub>2</sub>-HPLC). Los perfiles cromatográficos son representativos de las poblaciones de N-glicanos mayoritarios según se muestra en la Figura 1.

En la Figura 2 se presenta una separación tipo en columna de amino adsorción (NH<sub>2</sub>-HPLC) de la mezcla de oligosacáridos de IgG sérica una vez liberados enzimáticamente de la proteína.

Utilizando este sistema para la cuantificación de las poblaciones de las glicofomas G0F, G1F y G2F

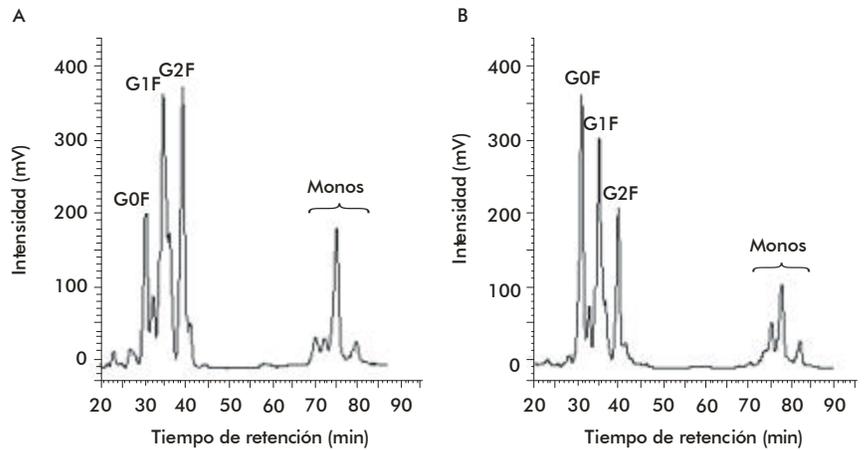


Figura 2. Perfiles cromatográficos obtenidos en NH<sub>2</sub>-HPLC a partir de N-glicanos aislados de IgG sérica. A) Control negativo (muestra 8C); B) pacientes celíacos (muestra 58P); MonoS, corresponde a estructuras monosialiladas.

se obtuvieron los resultados que se muestran en las Tablas 1-4.

Posteriormente se incluyó el estudio de pacientes de Enfermedad Celiaca adicionando un grupo control de niños menores de 12 años. Los datos obtenidos con el sistema de perfil 4-ABA se presentan en la Tabla 5.

El análisis estadístico de los resultados se da en la representación de la expresión matemática ln (G0F/G1F) para los tres grupos de control negativo utilizados en el estudio y para los grupos de pacientes con Enfermedad Celiaca, Artritis Reumatoide y Psoriasis Artrítica. La representatividad de la población agalactosilada (G0F) cambia en pacientes con enfermedades autoinmunes respecto a individuos sanos, hacia un marcado incremento de G0F respecto

9. Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* 2001; 1:285-94.

10. Harvey DJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *International Journal of Mass Spectrometry* 2003;226:1-35.

11. Jackson P. in *Guide to Techniques in Glycobiology, Methods Enzymol.* (Lennarz WJ and Hart GW eds) 1994;230:50-265. Academic Press, San Diego.

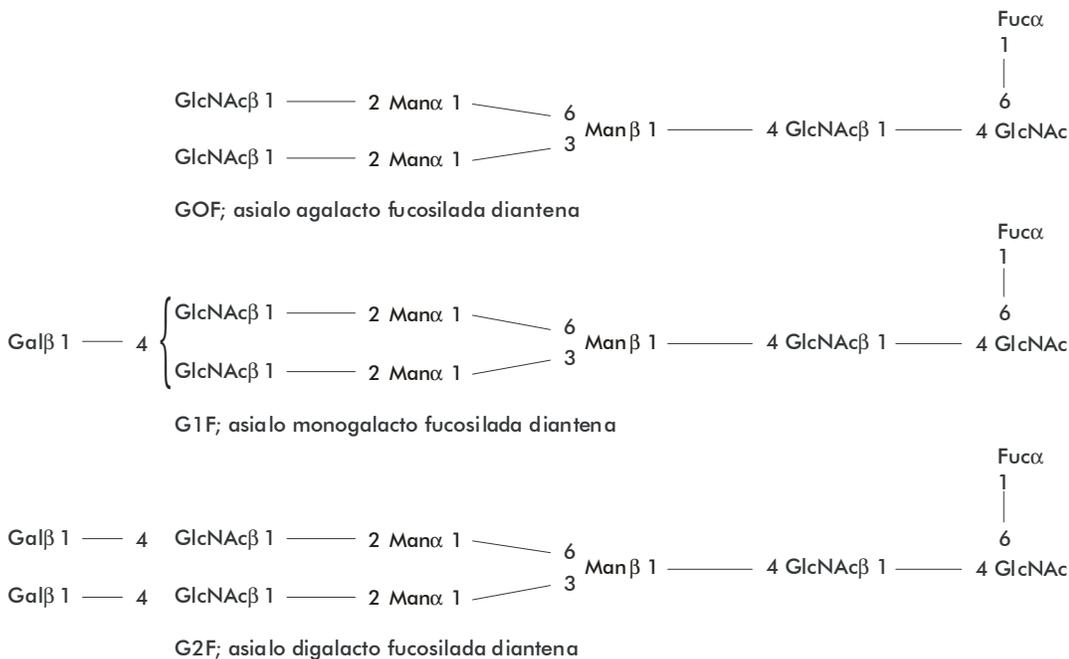


Figura 1. Estructuras oligosacarídicas mayoritarias aisladas de las moléculas de IgG sérica.

Tabla 1. Porcentaje de los oligosacáridos neutros G0F, G1F, G2F analizadas en columna de HPLC de amino adsorción de las muestras de IgG de los individuos sanos mayores de 45 años.

Glicoformas %	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13
G0F	36	30	30	30	29	31	32	37	46	49	38
G1F	45	44	46	45	46	43	45	43	40	37	41
G2F	19	26	24	25	25	26	23	20	14	14	21

Tabla 2. Porcentaje de los oligosacáridos neutros G0F, G1F, G2F analizadas en columna de HPLC de amino adsorción de las muestras de IgG de los individuos sanos menores de 45 años.

Glicoformas %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G0F	22	22	30	32	19	29	23	26	24	29
G1F	52	47	51	50	47	39	41	41	44	47
G2F	26	31	19	18	34	32	36	33	32	24

Table 3. Porcentaje de los oligosacáridos neutros G0F, G1F, G2F analizadas en columna de HPLC de amino adsorción de las muestras de IgG de los pacientes de Psoriasis Artrítica.

Glicoformas %	1	2	3	4	5	6	7	8
G0F	46	29	43	42	36	52	45	35
G1F	41	47	44	38	36	37	36	47
G2F	13	24	13	20	28	11	19	18

Tabla 4. Porcentaje de los oligosacáridos neutros G0F, G1F, G2F analizadas en columna de HPLC de amino adsorción de las muestras de IgG de los pacientes de Artritis Reumatoide

Glicoformas %	S1	S2	S3	S4	S5	1	11	14	54	50	20	24	19	36	18	23
G0F	19	30	35	39	47	41	39	40	38	69	35	30	38	35	31	54
G1F	38	40	40	36	38	40	43	42	41	25	41	45	43	43	52	33
G2F	43	30	25	25	15	19	18	18	21	6	24	25	19	22	17	13

a G1F, que es la estructura predominante en individuos sanos (Figura 3).

Mediante esta técnica de perfil fueron identificadas las poblaciones de N-glicanos de cada una de las muestras analizadas como las glicoformas G0F, G1F y G2F. En dos de los perfiles de pacientes se encontraron glicoformas G2 afucosiladas, atípicas en el perfil de N-glicosilación de IgG sérica. La asignación de estas estructuras fue confirmada mediante análisis en EM-MALDI. En la Figura 4 se presenta el espectro de la asialo, afucosilada digalacto diantena.

#### Variación del perfil de N-glicosilación de anticuerpos monoclonales producidos *in vitro* y su comparación con el producido en ascitis de ratón (manuscrito en preparación [15])

Basándonos en el mismo sistema se procedió a realizar un estudio comparativo del perfil de N-glicosilación de un anticuerpo monoclonal (Mab) empleado en la inmunopurificación del antígeno de superficie de Hepatitis B producido por vía recombinante (rHBsAg). Se compararon los perfiles de los anticuerpos que fueron producidos *in vitro* en diferentes reactores y medios de cultivo (Tabla 6) y el que se produce *in vivo* en ascitis de ratón. Aunque el Mab empleado no es de uso *in vivo*, los resultados de este estudio sirven de base para la consideración de los sistemas de producción de anticuerpos monoclonales de uso en inmunoterapia, teniendo en cuenta que si bien el reconocimiento por el antígeno

Tabla 5. Porcentaje de los oligosacáridos neutros G0F, G1F, G2F analizadas en columna de HPLC de amino adsorción de las muestras de IgG de niños sanos menores de 12 años como control negativo (A) y los pacientes de Enfermedad Celíaca, también niños menores de 12 años (B)

(A)												
Glicoformas %	1C	2C	3C	5C	6C	8C	9C	10C	11C			
G0F	33	27	44	29	29	24	33	26	28			
G1F	41	47	41	51	49	42	48	48	50			
G2F	26	26	15	20	21	34	19	26	22			
(B)												
Glicoformas %	2P	5P	9P	11P	14P	21P	58P	70P	83P	103P	104P	106P
G0F	54	30	42	37	37	38	44	34	54	41	48	42
G1F	36	38	41	35	36	35	36	42	34	41	35	42
G2F	10	32	17	28	27	27	20	24	12	18	17	17

Tabla 6. Producción del Mab CB.Hep-1 en diferentes reactores y medios de cultivo

Medio/ Reactor	Medio libre de proteínas	Medio de bajo contenido de suero	Medio de alto contenido de suero
Reactor de Fibra Hueca	1A	1B	1C
Frascos T-25	2A	2B	2C
Stirrer spinner flasks	3A	3B	3C
Biorreactor MiniPERM®	4A	4B	4C

no es afectado por la N-glicosilación sin embargo, las funciones efectoras dadas por interacciones con el fragmento Fc sí son significativamente alteradas por variaciones de los oligosacáridos enlazados a la Asn 297 de las dos cadenas pesadas de la IgG [16].

Los perfiles de N-glicosilación obtenidos empleando el sistema 4-ABA son similares a los representados en la Figura 2. La cuantificación de las estructuras neutras mayoritarias G0F, G1F y G2F se presentan en los diagramas de barras que aparecen en la Figura 5. El sistema 1C (fibra hueca en presencia de alto contenido de suero en el medio de cultivo) no fue analizado debido a que los rendimientos de Mabs, en esta condición experimental, resultaron muy bajos.

Las estructuras de las fracciones identificadas fueron corroboradas por espectrometría de masas (MALDI y ESI). En la Figura 6 se presenta el espectro MALDI-MS de la glicofoma más abundante, diantena asialo mongalacto afucosilada (G1F).

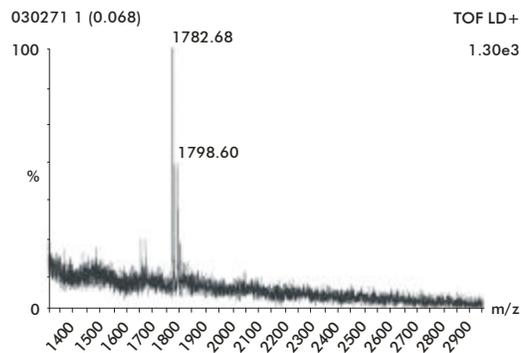


Figura 4. Espectro MALDI-MS de la estructura aislada del pico correspondiente a la glicofoma G2 afucosilada, atípica en los perfiles de N-glicosilación de IgG sérica.

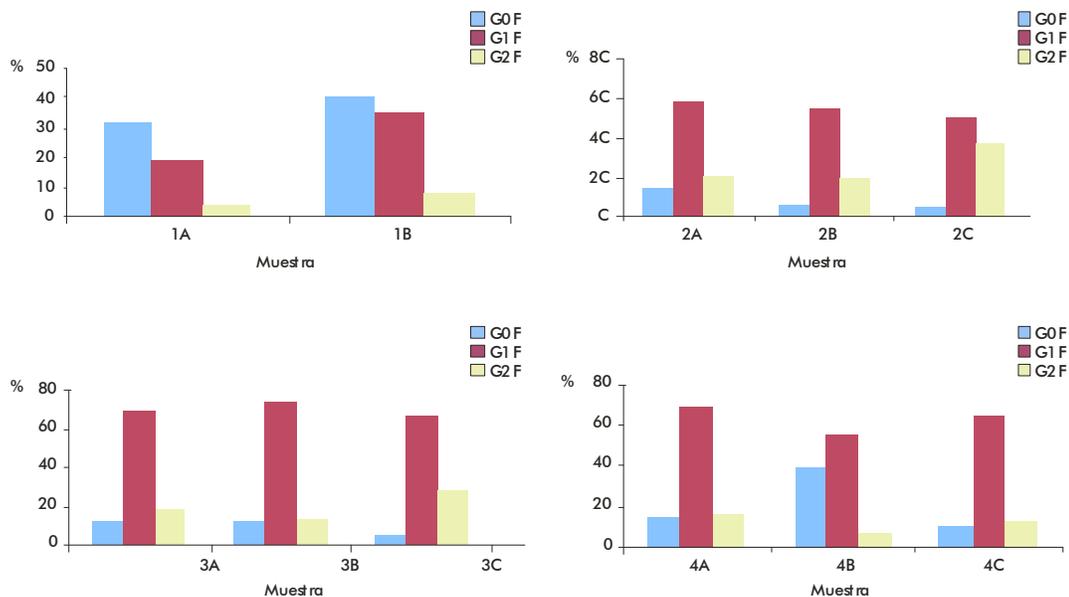


Figura 5. Representación gráfica del contenido de oligosacáridos derivados como 4-ABA del Anticuerpo Monoclonal (AcM) Hep-1 producido *in vitro* usando la combinación de cuatro sistemas y tres medios de cultivo.

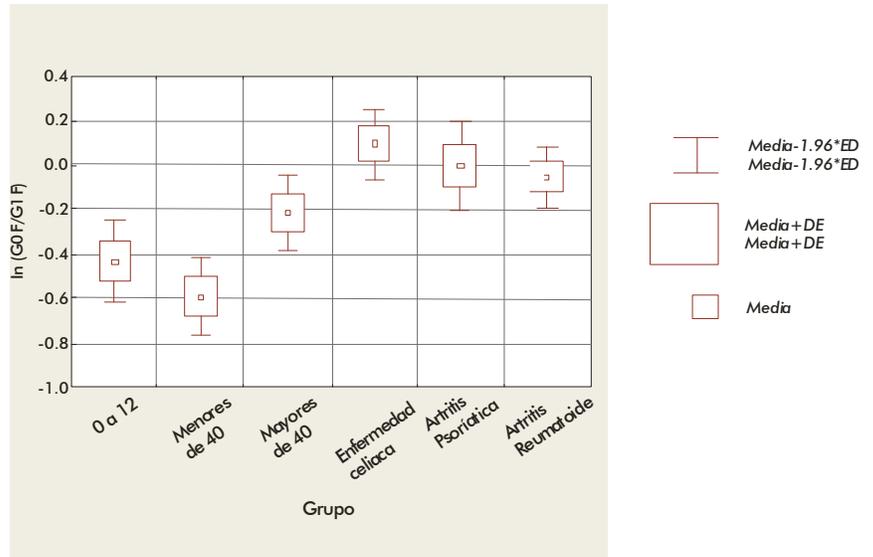


Figura 3. Representación gráfica de la expresión matemática  $\ln(G0F/G1F)$  para tres controles negativos y pacientes de Enfermedad Celiaca, Artritis Reumatoide y Psoriasis Artrítica para evidenciar incrementos de G0F en enfermedades autoinmunes.

Teniendo en cuenta los resultados de los perfiles antes mostrados se concluye que en los sistemas de frascos T y Spinner no se modifican los perfiles de N-glicosilación por cambios en el medio de cultivo empleado, y la glicofoma G1F es la estructura mayoritaria. Sin embargo, los sistemas de alta densidad celular sí son más susceptibles a los cambios de medio de cultivo. En particular el sistema de fibra hueca semeja grandemente el perfil obtenido cuando el Mab se produce en ascitis de ratón, donde la estructura mayoritaria es G0F, característica de procesos inflamatorios como el que se estudió en el caso de

12. Quintero O, Montesino R, Cremata JA. Two-dimensional mapping of 8-amine-1, 3, 6-Naphthalene trisulfonic acid derivatives of N-linked neutral and sialyloligosaccharides. Anal. Biochem. 1998; 256:23-32.

13. Yuen CT, Gee CK, Jones C. High Performance Liquid Chromatographic Profiling of Fluorescent labeled N-Glycans on Glycoproteins. Biomed. Chromatogr. 2002; 16:247-54.

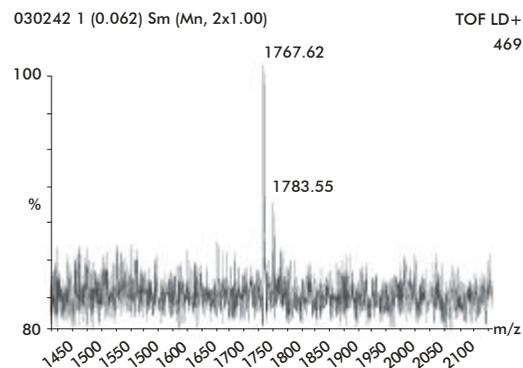


Figura 6. Espectro MALDI-MS de la estructura oligosacáridica más abundante aislada de los picos correspondientes a las glicofomas identificadas mediante las técnicas de perfil, G1F, asialo monogalacto afucosilada diantena, como aductos de Na y K.

enfermedades autoinmunes. Por tanto, si el Mab que se quisiera producir fuese para uso en la inmunoterapia habría que tener en cuenta que esta glicofoma pudiera provocar procesos de autoinmunidad.

### Caracterización de perfiles de N-glicosilación de Eritropietina humana recombinante (rhEPO) [17]

Se realizó la caracterización de la N-glicosilación de ocho muestras de rhEPO expresada en células de ovario de hamster chino (CHO) con el fin de buscar relaciones de estructurales de N-glicanos con la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*. Para la caracterización de la población de N-glicanos se empleó la combinación del perfil cromatográfico con espectrometría de masas-MALDI. Se escogió la muestra que presentaba la población más heterogénea de N-glicanos con mayor actividad *in vitro* pero muy baja actividad *in vivo*, lo que nos permitía tener un perfil representativo de una muestra de rechazo dada su baja actividad *in vitro*. Por este método se pudo identificar un gran número de estructuras incluyendo oligomanósidos con grupos fosfato/sulfato no comúnmente descritas para rhEPO recombinante expresada en CHO.

### Sumario

El uso del 4-ABA como fluoróforo en reacciones de aminación reductiva de N-glicanos liberados química o

14. Cremata JA, Sorell L, Montesino R, García R, Mata M, Cabrera G, Galván JA, García G, Valdés R, Garrote JA. Hypogalactosylation of serum IgG in patients with coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology* 2003;133:422-9.

15. Cabrera G, Cremata JA, Valdés R, García R, González Y, Montesino R, Gómez H, González M. Influence of the culture conditions on the N-

glycosylation of a monoclonal antibody specific for the recombinant hepatitis B surface antigen. *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Aceptado Julio 2003).

16. Jefferis R, Lund J, Pound J. IgG-Fc mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunological Reviews* 1998;163:59-76.

17. Yuen CT, Storring PL, Tiplady RJ, Izquierdo M, Wait R, Gee CK, Gerson P, Lloyd P, Cremata JA. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *British Journal of Haematology* 2003;121:511-26.

Tabla 7. Análisis por EM-MALDI y estructuras propuestas de los derivados 4-ABA de los N-glicanos de rhEPO liberados por desglucosilación enzimática separados en columna de intercambio iónico y Amida 80 HPLC

Fracción DEAE	Sub-fracción Amida-80	Estructura propuesta como 4-ABA derivado	Masas moleculares promedios	
			Experimental	Calculada
DE-0	1	NA2F	1908.6	1908.8
	2	NA3	2128.3	2128.0
	3	NA3F	2274.4	2274.1
	4	NA4F + LN	3003.9	3004.7
	5	NA4+2LN	3222.1	3223.9
	6	NA4F + LN + 3GN	3613.1	3614.4
DE-1	6	NA4 + 2LN + 2GN	3633.4	3630.4
	1	Mono(N-acetil)Sa diantenario+F	2199.0	2200.0
	2	Mono(N-acetil)Sa triantenario+F	2565.0	2565.4
	3	Mono(N-acetil)Sa tetraantenario+F	2930.3	2930.7
	4	Mono(N-acetil)Sa tetraantenario+F+LN	3295.5	3296.0
DE-2/3-a	5	Mono(N-glicolil)sialilado A4F+2LN+GN	3874.6	3876.5
	5	Mono(N-acetil)Sa tetraantenario+F+LN+3GN	3903.4	3905.6
	1	Man5+80 (sulfato o fosfato)	1435.7	1436.2
	2	Man5+80 (sulfato o fosfato)+F	1581.7	1582.3
	2	Man6+80 (sulfato o fosfato)	1596.6	1598.3
DE-2/3-b	3	Di(N-acetil)Sa tetraantenario+F	3222.1	3222.0
	4	Di(N-glicolil)Sa tetraantenario+F	3251.3	3254.0
	4	Di(N-acetil)Sa tetraantenario+F+LN	3610.0	3610.3
	1	Man5+80 (sulfato o fosfato)	1435.5	1436.2
DE-2/3-c	2	Man5+80 (sulfato o fosfato)	1435.7	1436.2
	2	Man6+80 (sulfato o fosfato)	1597.8	1598.3
	3	Man6+80 (sulfato o fosfato)	1598.1	1598.3
DE-4	1	Tri(N-acetil)Sa tetraantenario+F	3513.6	3513.3
	1	Tetra(N-acetil)Sa tetraantenario +F	3803.0	3804.5
DE-4	1	Tetra(N-acetil)Sa tetraantenario+F+O-acetil	3846.0	3847.5
	2	Tetra(di-N-acetil y di-N-glicolil)Sa tetraantenario+F	3831.5	3836.5

Abreviaturas: F/Fucosa en el núcleo; GN/N-acetilglucosamina; LN/N-acetilglucosamina; Man5+80/oligomanósido Man5+80 unidades de masa; Man6+80/oligomanósido Man6+80 unidades de masa; NA2/asialo-diantenario; NA3/asialo-triantenario; NA4/asialo-tetraantenario; Sa/sialilado

enzimáticamente de glicoproteínas ya había sido descrito con anterioridad como buen agente derivatizante debido a lo sencillo de su reacción y la alta sensibilidad en sistemas de detección de fluorescencia. La aplicación de esta metodología combinada con la espectrometría de masas MALDI o ESI para la caracterización de rhEPO expresada en células CHO y de IgG sérica o anticuerpos monoclonales sirvió para comprobar su efectividad como sistema de evaluación de potenciales biofármacos para uso en humanos y como metodología complementaria en estudios básicos de Glicobiología.