

CARACTERITZACIÓ DE LA GLICOSILACIÓ DE DIFERENTS ERITROPOETINES EMPRANT TÈCNiques DE SEPARACIÓ I ESPECTROMETRIA DE MASSES.



Marina Saball, Estela Giménez, José Barbosa, Victòria Sanz-Nebot

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona.

Grup de Bioanàlisi

*marinasaball95@gmail.com

Telf: (+34) 934039123

INTRODUCCIÓ

L'eritropoetina amb baix contingut d'àcids siàlics (EBCS) és una variant de l'eritropoetina humana recombinant (rhEPO) que s'està estudiant donat el seu potencial com a biofàrmac pel tractament dels ictus cerebrals i altres malalties neurodegeneratives. La EBCS presenta efectes neuroprotectors, igual que la rhEPO, però al no estimular l'eritropoesi, disminueix el risc de provocar infarts de miocardi o vessaments cerebrals quan es subministra de manera sistemàtica [1]. La principal diferència amb la rhEPO és el baix contingut amb àcids siàlics. No obstant, és necessari una caracterització fiable i exhaustiva de la seva glicosilació per conèixer el seu paper biològic al sistema nerviós.

L'anàlisi dels glicopèptids s'ha realitzat emprant l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses un cop la glicoproteïna ha estat digerida amb tripsina [2]. Els glicans, alliberats de la cadena peptídica amb PNGasaF, han estat caracteritzats mitjançant cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica zwitteriònica acoblada a l'espectrometria de masses [3]. Finalment, per l'avaluació de la glicoproteïna intacta, s'ha optimitzat la metodologia proposada per la Farmacopea Europea (Ph.Eur) per a l'anàlisi de la rhEPO, utilitzant l'electroforesi capil·lar amb detecció ultraviolada [4]. La combinació de les tres aproximacions ens proporciona informació complementària d'utilitat per a la caracterització completa de l'EBCS.

OBJECTIUS

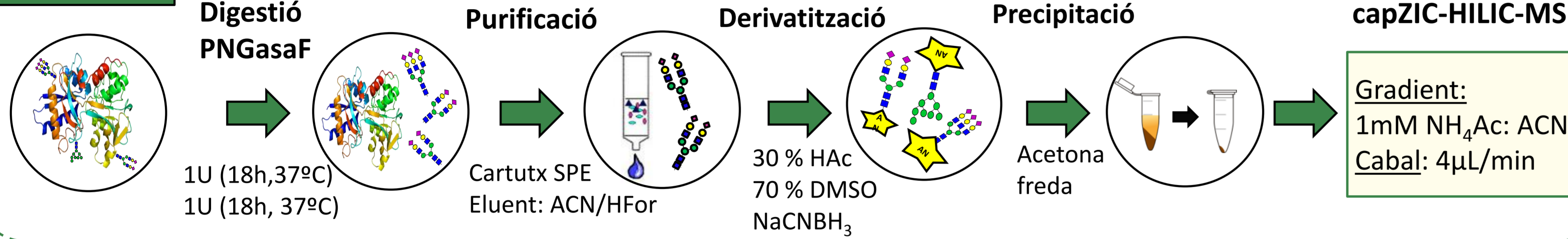
En aquest projecte, s'ha dut a terme la caracterització de la glicosilació de l'EBCS a tres nivells:

- l'anàlisi de la glicoproteïna intacta.
- Els glicans.
- Els glicopèptids.

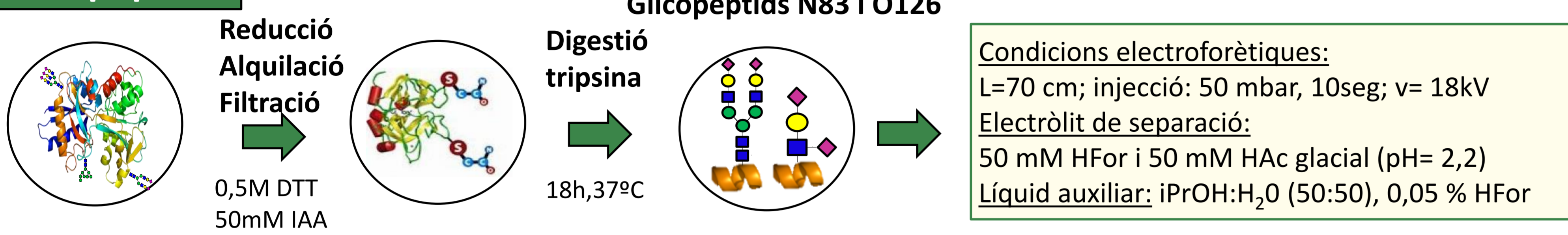
Finalment, s'ha comparat el seu perfil de glicosilació amb el de la rhEPO.

PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

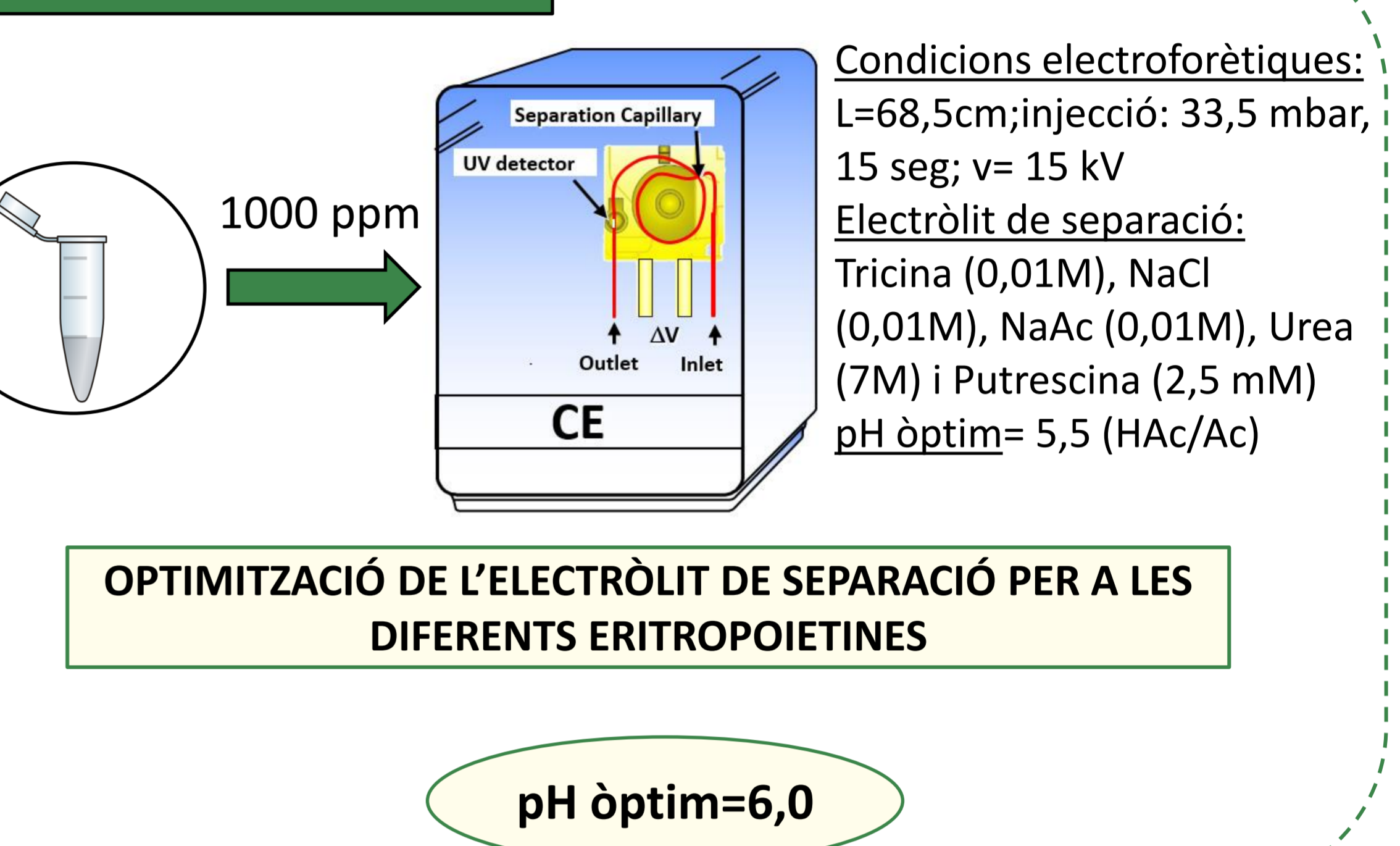
Glicans



Glicopèptids

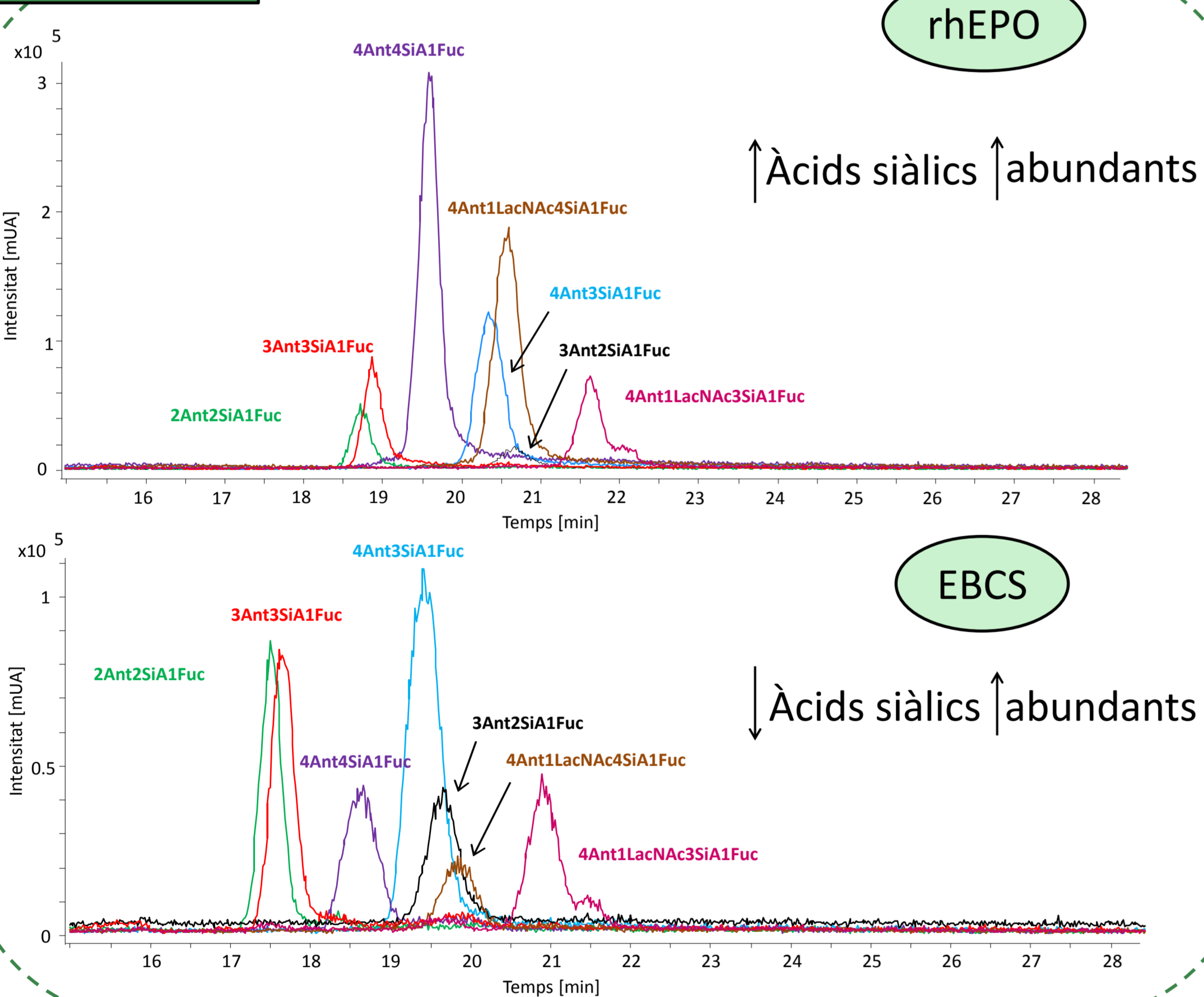


Proteïna intacta



RESULTATS I DISCUSSIÓ

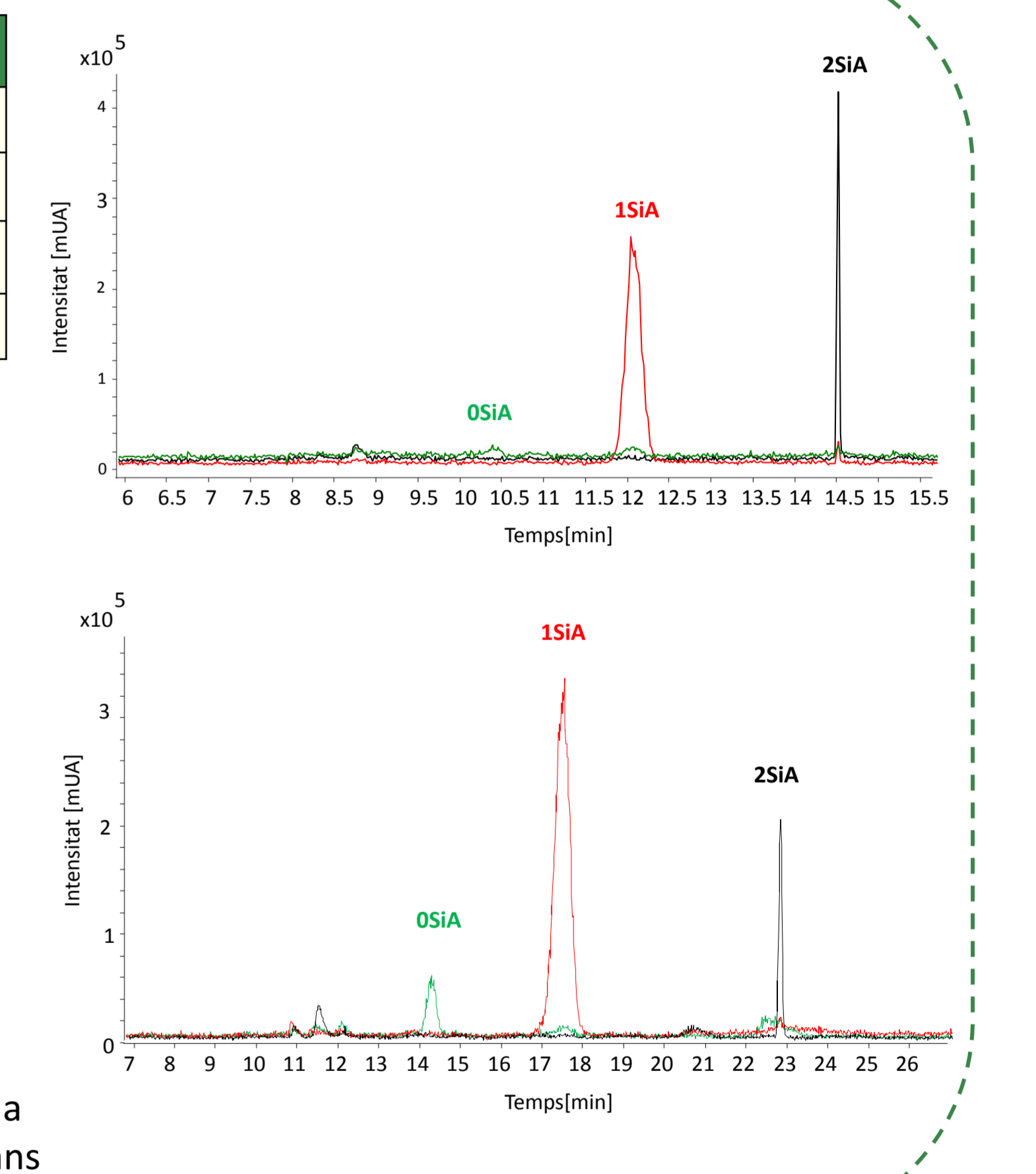
Glicans



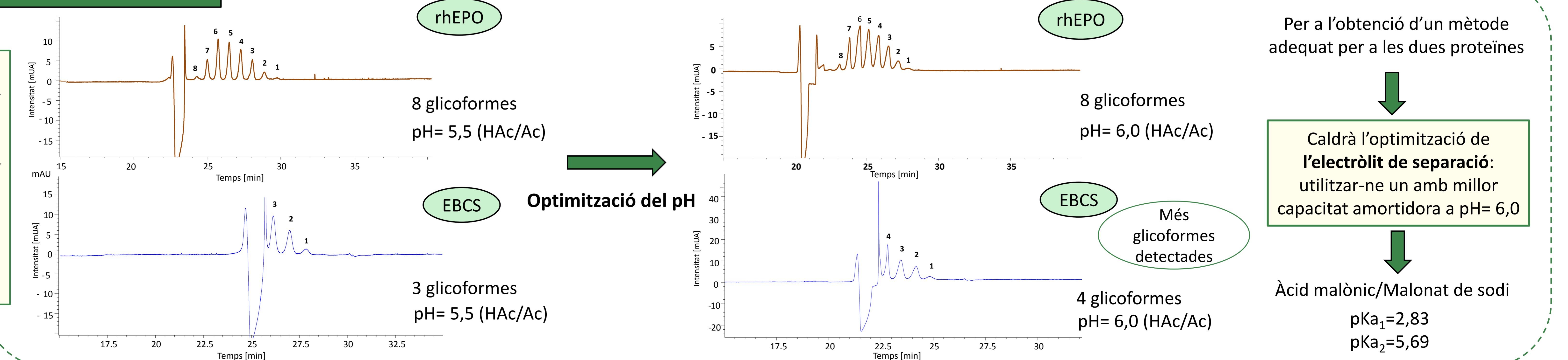
Glicopèptids

rhEPO		N83		O126	
Glicà	Àrea N*	Glicopèptids	Àrea N*	Glicà	Àrea N*
3Ant2SiA1Fuc	3,79	4Ant1LacNac4SiA1Fuc	15,7	2SiA	44,4
3Ant3SiA1Fuc	14,1	4Ant1LacNac3SiA1Fuc	5,95	1SiA	54,5
4Ant2SiA1Fuc	5,41	4Ant1LacNac2SiA1Fuc	9,84	OSiA	1,11
4Ant3SiA1Fuc	9,73	4Ant2LacNac4SiA1Fuc	11,98		
4Ant4SiA1Fuc	21,9	4Ant2LacNac3SiA1Fuc	7,95		
		4Ant3LacNac4SiA1Fuc	7,75		
EBCS		N83		O126	
Glicà	Àrea N*	Glicopèptids	Àrea N*	Glicà	Àrea N*
2Ant2SiA1Fuc	5,93	4Ant4SiA1Fuc	5,55	2SiA	10,9
3Ant1SiA1Fuc	16,3	4Ant1LacNac4SiA1Fuc	5,26	1SiA	80,7
3Ant2SiA1Fuc	7,98	4Ant1LacNac3SiA1Fuc	6,65	OSiA	8,32
4Ant1SiA1Fuc	5,68	4Ant1LacNac2SiA1Fuc	7,43		
4Ant2SiA1Fuc	12,0	4Ant1LacNac1SiA1Fuc	5,78		
4Ant3SiA1Fuc	10,6	4Ant2LacNac3SiA1Fuc	4,13		
		4Ant2LacNac2SiA1Fuc	6,72		

*Àrea N= àrea del pic cromatogràfic del glicà/suma de les àrees de tots els glicans



Proteïna intacta



CONCLUSIONS

- ❖ L'estratègia "GRIL" serà necessària per a dur a terme la quantificació relativa i poder confirmar que l'EBCS conté glicans amb menor contingut d'àcids siàlics.
- ❖ En les dues proteïnes, les tres glicofomes del glicopèptid O126 són les més abundants respecte al N83. S'ha pogut comprovar que en l'EBCS la glicofoma amb OSiA és més intensa que en la rhEPO i la glicofoma amb 2 SiA és menys intensa. Tot i així, caldrà seguir amb l'anàlisi dels glicopèptids.
- ❖ Referent a la proteïna intacta, caldrà continuar amb l'optimització del mètode de la Farmacopeia Europea, tot i canviant la composició de l'electròlit de separació (pH, composició...). També seria de gran interès completar aquest anàlisi amb la tècnica CE-MS per tal d'obtenir la massa exacta i finalitzar la caracterització amb els glicopèptids i els glicans.

REFERÈNCIES

- [1] I. S. Teste *et al.*, *Scientific World Journal*, vol. 2012, pp. 1–12, 2012.
- [2] E. Giménez, R. Ramos-Hernan, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Analytica Chimica Acta* (2012) 81-90.
- [3] M. Mancera-Arteu, E. Giménez, J. Barbosa, and V. Sanz-Nebot, *Analytica Chimica Acta*, vol. 940, pp. 92–103, 2016.
- [4] V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Giménez, and J. Barbosa, *Electrophoresis*, vol. 26, no. 7–8, pp. 1451–1456, 2005.