

10

Métodos espectroscópicos para el análisis de glicoproteínas

MARIANELA MASIN Y CARLOS W. BERTONCINI

10.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de glicoproteínas demanda el conocimiento de una variedad de aspectos estructurales que, en su conjunto, contribuyen a la descripción de su relación estructura–función. A partir de la búsqueda de propiedades estructurales de la cadena polipeptídica y sus glicanos conjugados, es posible inferir, por ejemplo, el impacto de la pérdida de grupos glicosídicos en la estabilidad de una glicoproteína, el cambio en su funcionalidad debido a mutaciones o incluso el efecto funcional de la unión de un ligando. Debido a esto, los estudios estructurales de glicoproteínas son un punto de partida habitual en el descubrimiento y desarrollo de fármacos contra virus, bacterias y otros agentes patógenos, así como en el diseño de nuevas proteínas terapéuticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes.

Los estudios estructurales toman una especial relevancia en la demostración de biosimilitud y el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas producidas por biotecnología. En la demostración de biosimilitud es necesario realizar un ejercicio de comparabilidad exhaustivo que permita asegurar la similitud en la estructura de una glicoproteína biosimilar respecto de la glicoproteína de referencia. Este ejercicio de comparabilidad también debe realizarse luego de implementarse todo tipo de cambios en los procesos de manufactura de la glicoproteína. Es por esto que las herramientas que brindan información sobre la estructura de proteínas son fundamentales en el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas, permiten detectar posibles alteraciones en la estabilidad y agregación del producto farmacéutico, ya sea por adición de excipientes o durante el tiempo de duración del producto.

El objetivo de este capítulo es brindar al lector una introducción a las distintas metodologías biofísicas basadas en el uso de espectroscopia molecular que comúnmente se emplean en la caracterización de la relación estructura–función en glicoproteínas. El capítulo hace especial énfasis en aquellas herramientas espectroscópicas que proveen información crítica para la caracterización de glicoproteínas terapéuticas, como el dicroísmo circular, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la espectroscopia de fluorescencia.

10.2. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS Y EL PROCESO DE PLEGAMIENTO

La estructura de una proteína está codificada en su cadena polipeptídica (secuencia de aminoácidos), que adopta su estado energéticamente más estable por medio de un mecanismo denominado plegamiento. Este proceso de plegamiento comienza ya desde el mismo momento en que la cadena naciente asoma de los ribosomas. Generalmente asistido por otras proteínas llamadas chaperonas, el proceso de plegamiento permite a la cadena polipeptídica explorar un espacio conformacional reducido hasta alcanzar el estado plegado. El estado plegado es aquella conformación de la cadena polipeptídica que posee mayor estabilidad (menor energía libre) gracias a una suma de fuerzas electrostáticas, exclusión del solvente, enlaces puente de hidrógeno, puentes disulfuro y contactos de largo alcance.

El estado plegado que adopta una proteína no es siempre el mismo. Si bien es la conformación energéticamente más estable que puede adoptar la cadena polipeptídica, el hecho de que esta se pliegue al instante inmediato posterior a ser sintetizada hace que el proceso sea fuertemente influenciado por el entorno celular particular que experimenta una proteína al momento de la síntesis. La influencia del entorno en el mecanismo de plegamiento es tan importante que se postula que el entorno «empuja» y «acompaña» a la cadena polipeptídica en el camino hacia alcanzar la estructura más estable, haciendo que ciertas conformaciones «permitidas» sean pobladas y evitando que se pueblen otras conformaciones «prohibidas» (Fersht y Daggett, 2002). Sin embargo, en el transcurso de la búsqueda del estado plegado es frecuente que la cadena polipeptídica adopte conformaciones parcialmente plegadas que puedan direccionar el proceso no hacia el estado plegado, sino hacia intermediarios plegados de forma aberrante y con cierta estabilidad marginal. Tales intermediarios parcialmente plegados son idénticos en secuencia y peso molecular a las proteínas plegadas, pero difieren en su nivel de actividad, unión a ligandos, estabilidad en solución y sensibilidad a proteasas, entre otras características. Además, estos intermediarios parcialmente plegados suelen facilitar la formación de oligómeros y otras estructuras agregadas, que habitualmente son tóxicas para la célula y despiertan respuestas de estrés, como un incremento en la actividad de chaperonas y en la degradación de proteínas (Figura 10.1).

Es pertinente mencionar que, de hecho, la secuencia de una proteína y la maquinaria de protección celular han coevolucionado para evitar que al plegarse la cadena polipeptídica se adopten estos intermediarios parcialmente plegados y causen la muerte celular. Cuando por ingeniería genética se altera la secuencia de una proteína por mutación sitio-dirigida a fin de modificar su actividad biológica, o se crea artificialmente una quimera por combinación de dos cadenas polipeptídicas, se considera solamente el estado plegado de las proteínas, sin tomar en consideración el posible impacto de los cambios

introducidos en el proceso de plegamiento. Debido a esto, es habitual que diseños de proteínas *in silico* fracasen al momento de ser transferidos a la producción de una proteína exógena en un hospedero celular, ya que no encuentran las condiciones adecuadas para alcanzar el estado plegado.

En el contexto de la producción heteróloga de glicoproteínas, en donde se fuerza a un sistema celular eucariota a producir grandes cantidades de una proteína exógena, es habitual que los mecanismos de protección celular frente a proteínas parcialmente plegadas o desplegadas se vean sobrepasados (Hartl *et. al.*, 2011). Esto produce la acumulación de intermediarios de plegamiento que con frecuencia se degradan parcialmente, oligomerizan y agregan como cuerpos de inclusión. La población de intermediarios parcialmente plegados trae como consecuencia una pérdida significativa del rendimiento del proceso productivo y serias dificultades en el *downstream* durante la purificación del producto. Más aún, en relación con la producción de glicoproteínas terapéuticas, los agregados pueden producir reacciones inmunológicas graves en aquellos pacientes tratados con el producto, si los agregados no son removidos durante el proceso de purificación.

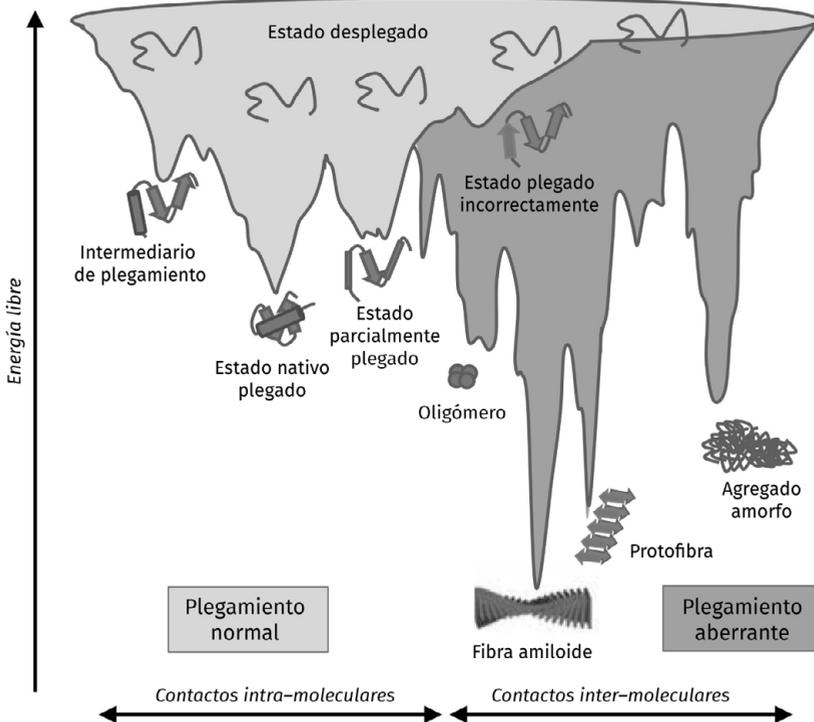


FIGURA 10.1. PLEGAMIENTO Y ESTRUCTURA DE GLICOPROTEÍNAS. DESCRIPCIÓN PICTÓRICA DE LOS POSIBLES CAMINOS DE PLEGAMIENTO QUE PUEDE SEGUIR UNA CADENA POLIPEPTÍDICA PARA ALCANZAR EL ESTADO NATIVO PLEGADO

Resulta entonces de primordial relevancia en la optimización de todo proceso de producción de glicoproteínas la caracterización estructural no solo de los productos principales sino también de los secundarios, incluyendo especies parcialmente plegadas, agregadas y productos de degradación. Afortunadamente existe una gran variedad de métodos biofísicos para el análisis y caracterización de las propiedades estructurales de glicoproteínas.

El estado nativo plegado es el estado energéticamente más favorable (menor energía libre) en las condiciones del medioambiente celular. Sin embargo, a lo largo del proceso de plegamiento, los polipéptidos pueden estabilizarse de forma transiente alcanzando estados parcialmente plegados. En ausencia de mecanismos adecuados para plegar nuevamente o degradar estos intermediarios parcialmente plegados es que pueden poblarse y estabilizarse estructuras oligoméricas o agregados que son más estables que el estado nativo plegado. Estas estructuras plegadas incorrectamente son frecuentemente tóxicas para las células productoras de glicoproteínas y, si no se remueven durante la purificación de un producto bioterapéutico, pueden causar reacciones inmunológicas en pacientes.

10.3. MÉTODOS BIOFÍSICOS EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS

Existen cuatro niveles de estructura posibles de alcanzar para una proteína. La *estructura primaria* es la secuencia lineal de aminoácidos que da origen a la cadena polipeptídica. La *estructura secundaria* se forma durante el proceso de plegamiento por interacción entre regiones contiguas que se estabilizan como hélices α o láminas β , mediante la formación de enlaces puente de hidrógeno. La *estructura terciaria* se adopta concomitantemente con la secundaria durante el mismo proceso de plegamiento, empacando las diferentes unidades de estructura secundaria y orientando las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos hacia el interior del núcleo plegado. En este proceso se acercan regiones distantes en la cadena polipeptídica y, en algunos casos, se estabiliza la topología tridimensional de la proteína a través de la formación de enlaces disulfuro. Finalmente, la *estructura cuaternaria* involucra la interacción entre dos o más cadenas polipeptídicas plegadas para dar origen a proteínas multiméricas, como es el caso de anticuerpos, complejos enzimáticos y receptores multiméricos de membrana, entre otros (Dill *et al.*, 2008).

Debido a la elevada complejidad que presentan las glicoproteínas, la caracterización de su estructura demanda de una combinación de metodologías analíticas. Estas metodologías se complementan a fin de determinar los diferentes niveles de estructura, primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Tabla 10.1).

La *estructura primaria* de glicoproteínas puede ser estudiada por metodologías químicas, como la degradación de Edman, o métodos de degradación enzimáticos acoplados a espectrometría de masas de alta resolución. La composición de glicanos se determina a través de metodologías de degradación enzimática o derivatización química, acoplados a métodos cromatográficos con detectores de fluorescencia o de espectrometría de masas.

Los métodos de caracterización de la *estructura secundaria y terciaria* de proteínas se clasifican en métodos de baja y alta resolución. Los métodos de baja resolución proveen una huella de la estructura de la proteína y permiten inferir rápidamente su estado plegado o desplegado, así como estimar la cantidad de estructura secundaria o si la estructura terciaria está perturbada. Entre estos métodos puede mencionarse la espectroscopia de dicroísmo circular, la espectroscopia de fluorescencia, la espectroscopia infrarroja y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear en 1 y 2 dimensiones.

Los métodos de alta resolución proveen información a nivel atómico acerca del estado de plegamiento y estructura de una proteína, posibilitando la descripción de un modelo estructural tridimensional. Existen tres métodos con la capacidad de proveer este tipo de información de alta resolución, la difracción de rayos X, la espectroscopia por resonancia magnética nuclear heteronuclear (NMR) y la criomicroscopía electrónica (Cryo-EM). Puede considerarse además a la espectroscopia por resonancia electrónica paramagnética (EPR) como un cuarto método, aunque altamente específico, que provee información espacial de distancia en el caso de proteínas con centros activos compuestos por átomos metálicos.

En lo que respecta a las metodologías disponibles para el estudio de la *estructura cuaternaria* de glicoproteínas, se utilizan principalmente electroforesis, cromatografía líquida de exclusión molecular, ultracentrifugación analítica, espectrometría de masas y microscopía de fuerza atómica. Existen también metodologías espectroscópicas para evaluar la estructura cuaternaria de glicoproteínas, basados en la dispersión de radiaciones, tales como la dispersión dinámica o estática de luz y la dispersión de rayos X de ángulo pequeño. Se ha desarrollado también una metodología de espectroscopia de resonancia magnética nuclear capaz de inferir el estado oligomérico de una proteína a partir de la medición de su coeficiente de difusión, llamada NMR con gradiente de campo pulsado.

10.4. METODOLOGÍAS ESPECTROSCÓPICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

De todas las metodologías descriptas en el punto anterior, el foco de este capítulo serán aquellas metodologías analíticas que habitualmente se utilizan para indagar la estructura de glicoproteínas mediante el uso de radiaciones

TABLA 10.1. MÉTODOS BIOFÍSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

Estructura	Métodos biofísicos
Primaria	<p><i>Químicos</i> Degradación de Edman acoplada a cromatografía líquida</p> <p><i>Enzimáticos</i> Degradación acoplada a cromatografía líquida y Espectrometría de Masas de Alta Resolución</p>
Secundaria / terciaria	<p><i>Baja Resolución</i> Dicroísmo Circular Fluorescencia Infrarroja Resonancia Magnética Nuclear Homonuclear.</p> <p><i>Alta Resolución</i> Difracción de Rayos X Crio-Microscopía Electrónica Resonancia Magnética Nuclear Heteronuclear</p>
Cuaternaria	<p><i>Metodologías de separación física</i> Electroforesis Cromatografía Líquida de Exclusión Molecular Ultracentrifugación Analítica Espectrometría de Masas Microscopía de Fuerza Atómica.</p> <p><i>Metodologías espectroscópicas</i> Dispersión Dinámica o Estática de Luz Dispersión de Rayos X de ángulo pequeño</p>

electromagnéticas, lo que comúnmente se conoce con el nombre de espectroscopia. La versatilidad del uso de las espectroscopias radica fundamentalmente en tres factores. Por un lado, la variedad de fuentes de radiaciones electromagnéticas disponibles para interactuar con la materia, capaces de obtener haces de muy alta energía, en algunos casos pulsados y con alta precisión en la longitud de onda y frecuencia. Por otro lado, existe una variedad de transiciones nucleares, electrónicas y moleculares que pueden manifestarse en proteínas por interacción de estas radiaciones con los átomos, con los enlaces entre estos átomos, con las moléculas de aminoácidos o incluso con la cadena polipeptídica (Figura 10.2). Por último, los avances en electrónica y digitalización de señales han permitido detectar, con muy alta sensibilidad, las señales emitidas a partir de la interacción de las fuentes de radiación con la materia.

En función de la naturaleza de las transiciones causadas por las radiaciones, las espectroscopias pueden clasificarse en:

- *Espectroscopias de absorción*: son aquellas en las que el átomo, enlace o molécula absorbe radiación a una determinada longitud de onda característica. Esta absorción de energía promueve electrones o espines nucleares

de un estado basal a un estado excitado. Este fenómeno de absorción perturba la radiación incidente sobre la muestra de forma tal que la radiación resultante pierde los componentes absorbidos y permite la identificación de la frecuencia absorbida. Estas espectroscopias incluyen la UV-Visible, Infra-Roja (IR), Dicroísmo Circular (CD) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR). La cantidad de energía absorbida es función de la abundancia de los grupos que absorben, con lo cual las espectroscopias de absorción son, en general, cuantitativas. En espectroscopías de absorción los detectores de radiación se sitúan, generalmente, en la misma dirección del haz incidente (Figura 10.2).

- *Espectroscopias de emisión:* son aquellas en las que un grupo de átomos o moléculas (fluoróforos) absorben radiación electromagnética de una determinada frecuencia, promoviendo electrones de un estado basal a un excitado (longitud de onda de excitación). Los electrones promovidos regresan al estado basal (relajación) a través de la emisión de una radiación electromagnética con una frecuencia diferente a la de excitación (longitud de onda de emisión). Entre estas espectroscopias se incluyen la Fluorescencia y la Fosforescencia. Este estado excitado tiene una larga vida media (10^{-9} a 10^7 s para fluorescencia y 10^{-3} a 10^{-2} s para fosforescencia). La emisión de esta radiación electromagnética en forma de fluorescencia es altamente sensible al entorno de los fluoróforos, y a la presencia de otros grupos fluorescentes en la cercanía, con lo cual el rendimiento cuántico de un fluoróforo no es constante. Esta sensibilidad hace que en general la fluorescencia no sea una espectroscopia cuantitativa. En la espectroscopia de emisión los detectores de radiación se sitúan perpendicularmente a la dirección del haz incidente (Figura 10.2).
- *Espectroscopías de dispersión:* son aquellas en las que la radiación electromagnética incide sobre los átomos, moléculas o macromoléculas y se miden las características de la radiación que se dispersa o difracta. Mediante este fenómeno es posible evaluar las características macroscópicas de oligómeros o agregados de las proteínas que, por su tamaño de 10^{-9} a 10^{-6} m, dispersan luz incidente de similar longitud de onda (10^{-7} m para dispersión de luz visible). La dispersión de luz puede ser dinámica (DLS, un solo detector) cuando determina el coeficiente de difusión de una macromolécula, o estática cuando evalúa el peso molecular y tamaño de la misma (SLS, arreglo de varios detectores). Utilizando radiaciones de mayor energía y menor longitud de onda (10^{-9} a 10^{-11} m para dispersión de rayos X en ángulo pequeño, SAXS), es posible determinar densidades electrónicas que permiten evaluar las características microscópicas de la morfología de estos oligómeros o agregados. Mientras que las dos técnicas anteriores se llevan a cabo en solución, en la difracción de rayos X, en cambio, se necesita la presencia de una proteína en estado sólido ordenada en un cristal. Cuando los rayos X inciden sobre una proteína cristalizada, la radiación electromagnética es difractada por los electrones de los átomos por ser

su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico (10^{-10} m). El haz de rayos X difractado contiene entonces información sobre la posición y tipo de átomos sobre el cual ha incidido. Por esta razón la difracción de rayos X es capaz de proveer información atómica tridimensional que permite reconstruir la estructura de una proteína con resolución atómica. En la espectroscopía de dispersión la detección del haz resultante de la interacción se realiza en múltiples direcciones (Figura 10.2).

A continuación, trataremos en mayor detalle los aspectos fundamentales de tres de estas metodologías que habitualmente se utilizan para monitorear la preservación de la estructura en la producción y el control de calidad de glicoproteínas de uso industrial o farmacéutico.

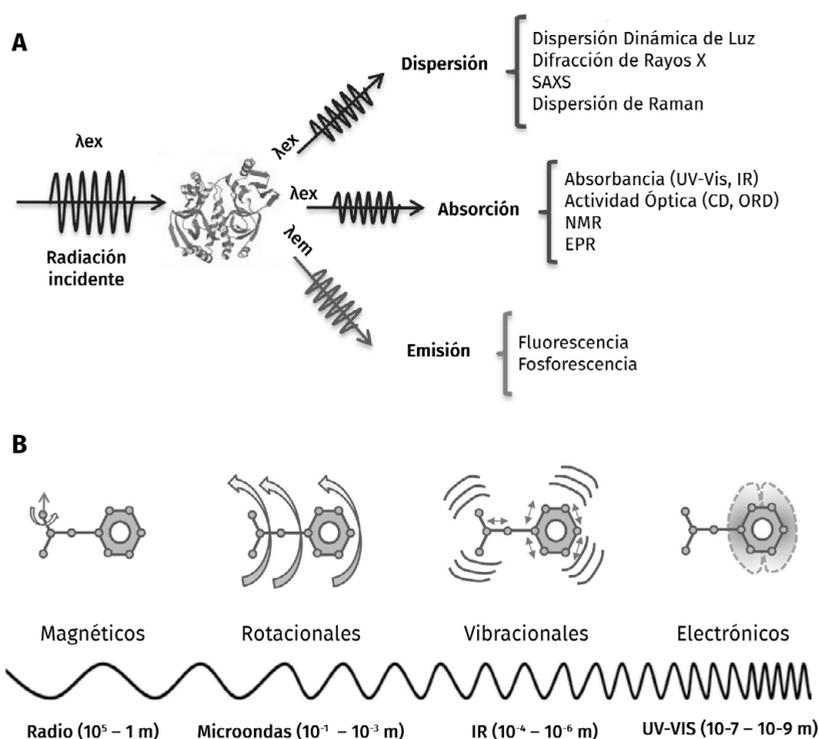


FIGURA 10.2. USO DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS. **A.** EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DE LAS TRANSICIONES CAUSADAS POR LAS RADIACIONES, LAS ESPECTROSCOPIAS PUEDEN CLASIFICARSE EN ESPECTROSCOPIAS DE ABSORCIÓN, ESPECTROSCOPIAS DE EMISIÓN, O ESPECTROSCOPIAS DE DISPERSIÓN. **B.** ES POSIBLE CARACTERIZAR DIFERENTES TIPOS DE TRANSICIONES NUCLEARES, ELECTRÓNICAS Y MOLECULARES QUE PUEDEN MANIFESTARSE EN PROTEÍNAS POR INTERACCIÓN DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS CON LOS ÁTOMOS, CON LOS ENLACES ENTRE ESTOS ÁTOMOS, CON LAS MOLÉCULAS DE AMINOÁCIDOS O INCLUSO CON LA CADENA POLIPEPTÍDICA

10.4.1. Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) mide la diferencia de absorción de una muestra entre una radiación electromagnética incidente que es circularmente polarizada en dos sentidos. En biomoléculas, la espectroscopía de CD permite estudiar arreglos atómicos y moleculares que tengan quiralidad, es decir que sean ópticamente activos, como el enlace peptídico, los anillos aromáticos presentes en los aminoácidos Tyr, Phe y Trp y los puentes disulfuro. Las propiedades quirales confieren diferentes características de absorción en función del sentido de polarización de la radiación incidente. Esta herramienta espectroscópica es de suma utilidad para caracterizar rápidamente el contenido de estructura secundaria de una glicoproteína y verificar su estado de estructura terciaria o plegamiento correcto (Kelly *et al.*, 2005). El enlace peptídico absorbe diferencialmente la luz circularmente polarizada en función del arreglo tridimensional que adopta el sistema electrónico conjugado de los orbitales π que lo componen. De acuerdo con la estructura secundaria en la que esté inmerso el enlace peptídico, ya sea hélice α , lámina β o de *random coil*, los electrones en los orbitales π pueblan diferentes estados energéticos que absorben radiación electromagnética a diferentes longitudes de onda. Estas transiciones posibles ocurren entre 190 a 250 nm, con lo cual pueden ser observadas observables utilizando radiaciones electromagnéticas del espectro ultravioleta lejano.

Cuando el enlace peptídico adopta un arreglo tridimensional de lámina β se observa una banda de absorción positiva alrededor de 195 nm y una banda de absorción negativa a 215 nm. Por el contrario, el enlace peptídico en un arreglo tridimensional de hélice α dará una banda de absorción positiva a 190 nm y una banda de absorción negativa con dos picos a 208 y 222 nm (Figura 10.3A). La presencia de la conformación de *random coil* estará dada por una fuerte banda de absorción negativa a 195 nm. El espectro de CD para evaluar la estructura secundaria de una proteína se colecta entre 190 y 250 nm, y el resultado es un espectro de absorción que representa la mezcla de los diferentes picos de absorción, ponderado por la abundancia relativa de cada una de las conformaciones estructurales en la cadena polipeptídica. Con el conocimiento de la composición de la estructura de una proteína es posible deconvolucionar el espectro de CD en los componentes individuales de estructura secundaria. Esto permite emplear a un espectro de CD como valioso indicador del contenido de estructura secundaria de proteínas y detectar rápidamente el impacto de mutaciones, ligandos o solventes en la conformación de la misma (Greenfield, 2006).

El sistema orbital conjugado de los anillos aromáticos presentes en los aminoácidos Tyr, Phe y Trp también posee quiralidad. Esta característica es aprovechada en la espectroscopía de CD para evaluar el entorno estructural en el cual se encuentran estos aminoácidos. Debido a su hidrofobicidad, los aminoácidos aromáticos suelen estar excluidos del solvente, conformando

el núcleo central de la proteína, lo que los convierte en excelentes reporteros del estado plegado. Phe y Tyr se caracterizan por bandas de absorción negativas alrededor de 265 a 275 nm, mientras que Trp muestra una banda de absorción positiva entorno a los 280–290 nm, todas transiciones que ocurren en el ultravioleta cercano (Figura 10.3B). Debido a esta característica, para evaluar el arreglo estructural de los aminoácidos aromáticos es necesario coleccionar un espectro de absorción entre 250 y 300 nm, en el llamado uv-cercano, en contraposición con las bandas de absorción del enlace peptídico, que se consideran uv-lejano.

En su conjunto, las características de las bandas de absorción de CD son una huella dactilar del estado plegado de una glicoproteína, y cualquier perturbación de esta conformación puede ser detectada por cambios sutiles en el mismo, aún en ausencia de cambios significativos de estructura secundaria.

Por medio de espectroscopia de CD también es posible la determinación de la temperatura de *melting* (T_m) de una cadena polipeptídica, lo que es particularmente útil para caracterizar el estado plegado de una glicoproteína. En un experimento de titulación por temperatura, la T_m es la temperatura que caracteriza la transición desde el estado plegado al estado desplegado (50 % plegado y 50 % desplegado). Empleando un equipo de CD con control de temperatura es posible tomar espectros de CD a varias temperaturas y caracterizar la evolución de la glicoproteína desde el estado plegado al estado desplegado, monitorizando la transformación de los elementos de estructura secundaria en *random coil*. Un ajuste global a las curvas de titulación por temperatura permite calcular la T_m , que es una característica que se asocia con el estado plegado, con su energía libre y su estabilidad. Si dos proteínas con la misma secuencia primaria tienen T_m diferentes, entonces se puede inferir que su estabilidad es diferente, así como la energía libre de su estado plegado, y por ende su estructura también lo será (Figura 10.3C) (Martin y Bayley, 2002). En el caso de proteínas termosensibles, en las que el experimento de incrementar la temperatura causa agregación, es posible llevar a cabo los estudios de transición del estado plegado al estado desplegado por medio de la adición de agentes caotrópicos como urea o cloruro de guanidinio.

Un ejemplo de la aplicación de dicroísmo circular para la caracterización de glicoproteínas terapéuticas es el estudio realizado en eritropoyetina por Kerwin y colegas para el laboratorio Amgen (Estados Unidos) (Deechongkit, 2006). El objetivo del trabajo ha sido detectar las posibles diferencias estructurales entre la eritropoyetina Epogen de Amgen y Eprex de Ortho Biotech Products (Estados Unidos), aplicando una variedad de técnicas biofísicas para el análisis comparativo de las mismas. Los investigadores realizaron estudios comparativos de CD en el uv lejano y cercano, pudiendo observar pequeñas modificaciones en el comportamiento espectroscópico, sugiriendo en Eprex un menor contenido helicoidal (5 % conforme a las bandas de absorción en el uv lejano) y cambios en la exposición al solvente del Trp64 (cambios en las bandas de absorción de CD en el uv cercano) respecto de Epogen. Estos

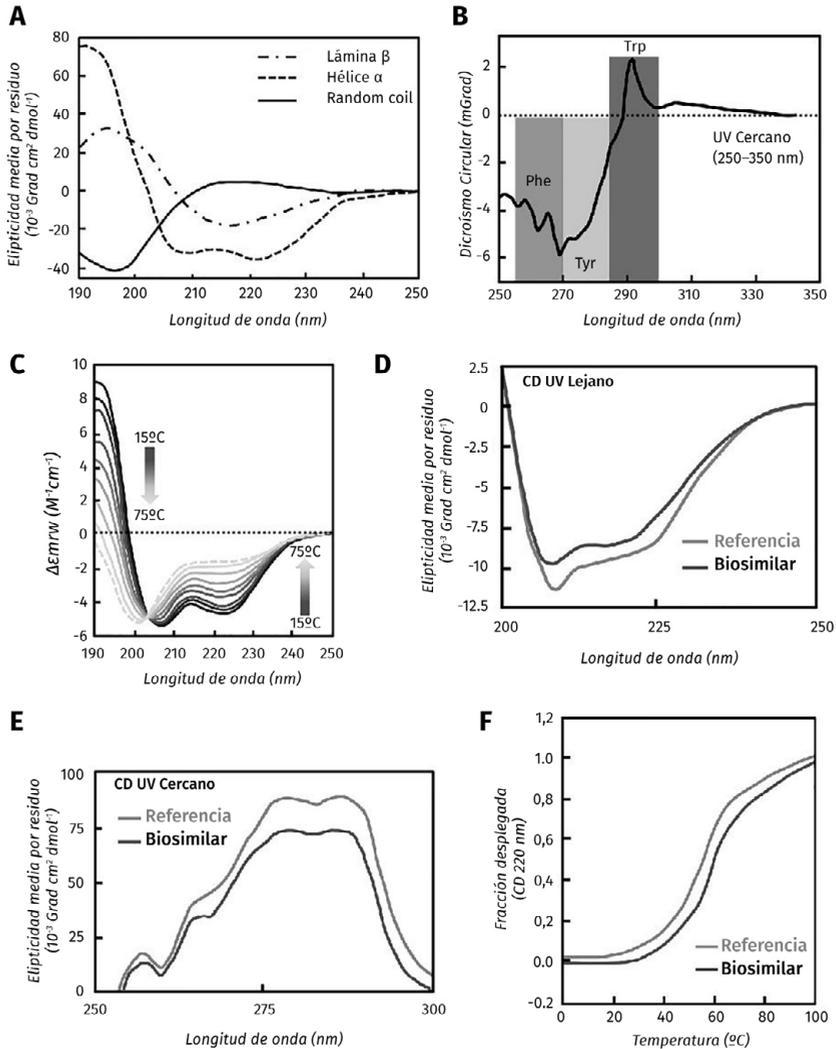


FIGURA 10.3. DICROÍSMO CIRCULAR EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS A. ESPECTRO DE CD EN EL UV LEJANO DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS PURAS QUE PUEDEN ADOP-TAR LOS POLIPÉPTIDOS (HÉLICE- α , LÁMINA- β Y RANDOM COIL). B. ESPECTRO DE CD EN EL UV CERCAÑO DONDE SE MUESTRAN LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DISTINTIVAS DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS TRIPTÓFANO (TRP), FENILALANINA (PHE) Y TIROSINA (TYR). C. TITULACIÓN POR TEMPERATURA DE UNA PROTEÍNA MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE SU T_M UTILIZANDO CD. NÓTESE LA TRANSICIÓN DEL ESTADO PLEGADO AL DESPLEGADO. D. EJEMPLO DEL USO DE CD EN EL UV LEJANO PARA DETECTAR CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD ENTRE DOS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS (REFERENCIA Y BIOSIMILAR). E. EJEMPLO DEL USO DE CD EN EL UV CERCAÑO PARA DETECTAR CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD ENTRE DOS GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS (REFERENCIA Y BIOSIMILAR). F. TITULACIÓN POR TEMPERATURA DE GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS DEMOSTRANDO QUE CAMBIOS CONFORMACIONALES PUEDEN SER EVIDENCIADOS A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE LA T_M POR MEDIO DE CD

cambios sugieren que Eprex posee una conformación estructural levemente diferente que Epogen. Esto se confirma al evaluar el comportamiento de ambas proteínas en experimentos de desplegamiento causado por temperatura, en donde Eprex demuestra tener una similar T_m pero no demuestra ser igualmente reversible, probablemente debido a una mayor tendencia a la formación de agregados a altas temperaturas (Figuras 10.3D, 3E y 3F).

10.4.2. Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) es una metodología de absorción de radiación electromagnética que permite obtener información acerca de las conformaciones estructurales de glicoproteínas con alta resolución (Marion, 2013). A diferencia de las espectroscopias ópticas, en las cuales las transiciones energéticas se manifiestan a nivel de los electrones, en NMR son los espines nucleares los que absorben y liberan energía. Para que puedan ocurrir estas transiciones nucleares es necesario que los espines estén polarizados (alineados) bajo un campo magnético de muy alto campo (10^8 a 10^9 Hz). Cuanto mayor sea el campo magnético mayor es la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado basal, con lo cual se incrementa significativamente la resolución del espectrómetro de NMR (Figura 10.4A). Tales campos magnéticos, de aproximadamente 10^5 a 10^6 veces el campo magnético de la tierra, son creados a través del uso de imanes especialmente contruidos con materiales superconductores que trabajan sumergidos en Helio líquido. Debido a esto los equipos de resonancia magnética nuclear son altamente costosos de adquirir y mantener.

No todos los núcleos atómicos son susceptibles de magnetizarse ya que, para hacerlo, deben contener un número impar de protones o neutrones. En proteínas, el átomo más comúnmente utilizado para NMR es el hidrógeno (^1H , también llamado protón) y luego le siguen el carbono (^{13}C) y el nitrógeno (^{15}N). Debido a su baja abundancia isotópica, para poder detectar carbono y nitrógeno en NMR de proteínas es necesario recurrir al enriquecimiento isotópico suplementando los medios de cultivo con precursores químicos enriquecidos como el cloruro de amonio ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$), sulfato de amonio ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), glucosa ($^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) o metanol ($^{13}\text{CH}_3\text{OH}$). Esto hace que la obtención de muestras para NMR también sea costosa, por lo que habitualmente se recurre a experimentos homonucleares en donde el único núcleo que se detecta es el hidrógeno (^1H), conocidos como espectros de NMR de protones.

El experimento de NMR consta de tres partes, una primera parte en donde se excita el sistema a través de un pulso de radiación electromagnética. En general, la mayoría de los experimentos de NMR de protones comienza con la excitación del sistema a través de los protones, que son los espines más abundantes. La segunda parte involucra a las transiciones de los espines en el estado excitado. A diferencia de las espectroscopias ópticas, el estado

excitado de un núcleo tiene una vida media con una duración de 10^9 veces más larga (orden de segundos), debido a que la energía se pierde (relaja) muy lentamente. Esta larga vida media permite, de similar modo a la espectroscopia de fluorescencia, que el estado excitado sea reportero no solo de la estructura de una proteína sino de la dinámica de las transiciones conformacionales que ocurren en ese tiempo, como por ejemplo el plegamiento de la cadena polipeptídica, aspectos funcionales como catálisis enzimática o unión a receptores.

Además, en NMR es posible transferir la energía del estado excitado (magnetización) de un núcleo vecino a otro, de forma altamente específica por medio de pulsos cortos de radiofrecuencia. Esto hace que la magnetización del estado excitado «salte» de un núcleo a otro y que se «cargue» de las características del entorno electrónico que experimenta no solo el núcleo que excitamos sino también varios núcleos en el entorno. De este modo es posible lograr experimentos de NMR multidimensionales tanto homonucleares (si la magnetización se transfiere entre átomos de la misma naturaleza) como heteronucleares (si la transferencia es entre átomos de diferente naturaleza). Es habitual que en el estudio de biomoléculas se realicen experimentos homonucleares de 2 y 3 dimensiones, y experimentos heteronucleares de 2, 3 y 4 dimensiones. Cada dimensión contiene información de un núcleo en particular que se correlaciona con otro núcleo gracias a la transferencia de magnetización que ocurrió en el estado excitado. Esta correlación entre dos núcleos se visualiza en un espectro bidimensional de NMR como un cruce de las frecuencias de absorción de ambos núcleos (*crosspeak*). La transferencia de magnetización se logra de un modo altamente específico que posibilita, por ejemplo, identificar los picos de absorción que pertenecen a cada átomo de cada aminoácido de la proteína o grupo funcional del glicano, si se trata de una glicoproteína. Esto posibilita obtener el mapeo preciso y con alta resolución de la estructura de una proteína o un glicano (Marion, 2013).

El último paso en la espectroscopia de NMR es la detección de la energía que libera el estado excitado. Al excitarse todos los átomos de la misma naturaleza simultáneamente, y dada la complejidad de las frecuencias que se correlacionan entre sí durante el transcurso del estado excitado, en NMR se detecta una multitud de frecuencias al mismo tiempo. Debido a que el ^1H es el átomo más abundante, previo a la detección se transfiere toda la magnetización nuevamente hasta los protones, que son los núcleos que se detectan con mayor sensibilidad. El detector detecta todas las frecuencias que decaen libremente (*Free Induction Decay*, o FID) que son convertidas a un espectro de NMR por medio de una transformada de Fourier. La transformada de Fourier extrae la información individual de frecuencias de cada uno de los núcleos resonantes que han participado del experimento de transferencia de magnetización.

En NMR, las frecuencias de absorción (o resonancia) de cada espín nuclear bajo la acción de un determinado campo magnético externo son influenciadas

por el entorno electrónico único que experimenta cada átomo. Estas frecuencias de absorción son altamente sensibles a cambios en los enlaces de cada átomo, en su conformación estructural y en las características de los átomos cercanos. Con el fin de independizar las frecuencias de absorción (picos) del campo magnético externo, en los espectros de NMR se convierten las frecuencias de absorción (Hz) a una escala universal llamada desplazamiento químico (δ). El desplazamiento químico de cada núcleo se referencia al Tetrametilsilano (TMS) que por convención tiene un desplazamiento químico $\delta=0$. En una proteína, el desplazamiento químico de ^1H puede tomar valores entre 0 y 10 ppm en función del enlace en el cual esté participando el protón (H–N, H–C) y dependiendo de si tiene otros protones cerca, si forma parte de un sistema conjugado aromático o participa de un enlace puente de hidrógeno, siendo un indicador de estructura secundaria (Figura 10.4B). El desplazamiento de ^{15}N para las amidas toma habitualmente valores entre 100 y 135 ppm, y está influenciado principalmente por la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido y, en menor medida, por la estructura secundaria que adopta la cadena polipeptídica. Para ^{13}C es posible observar desplazamientos químicos de 20 a 200 ppm en una proteína, dependiendo el átomo al cual esté unido el carbono (C–O, C–N, C–C, C–H, C–H₂ o C–H₃). Los desplazamientos químicos de los carbonos C α y C β son excelentes reporteros del tipo de aminoácido al cual pertenecen y de la estructura secundaria que adopta el mismo en la cadena polipeptídica plegada.

En glicoproteínas, el mismo fenómeno de absorción de radiación electromagnética que permite la caracterización de la estructura de la fracción proteica por NMR posibilita también el estudio estructural de los glicanos conjugados (Battistel *et al.*, 2014). La NMR de glicoproteínas permite identificar la naturaleza de los glicanos presentes directamente en la proteína glicosilada, habitualmente mediante los desplazamientos químicos de ^1H , que son característicos para cada glúcido. Generalmente los experimentos de identificación de glicanos por NMR demandan la comparación con patrones de glúcidos conocidos y se complementan con experimentos de deglicosilación enzimática y separación de glicanos por HPLC (Figura 10.4C). En la web hay disponibles bases de datos con desplazamientos químicos de carbohidratos que permiten la rápida asignación de un espectro de ^1H NMR de glicanos y así lograr su identificación, como CASPER (<http://www.casper.organ.su.se/casper/>) y SWEETDB (<http://www.glycosciences.de/sweetdb/>). CASPER realiza una predicción de los desplazamientos químicos de ^1H para un glúcido a partir de su secuencia y estructura, SWEETDB, por el contrario, identifica un glúcido a partir de los picos del espectro de NMR de ^1H o ^{13}C .

Es así que, mediante el monitoreo de los desplazamientos químicos de ^1H , ^{15}N o ^{13}C , es posible detectar sutiles cambios en la estructura de una proteína, la unión de un ligando, la modificación en la estructura de un glicano o el efecto de un excipiente en la formulación de una glicoproteína terapéutica. En la mayoría de los casos estas perturbaciones detectadas en los

desplazamientos químicos pueden ser localizadas con muy alta resolución, a nivel de aminoácidos o glúcidos individuales. Esto convierte a la NMR en una herramienta espectroscópica que brinda información única para caracterizar la estructura de glicoproteínas. En el análisis de glicoproteínas terapéuticas, la NMR de ^1H es habitualmente empleada para comparar rápidamente la estructura en solución de diferentes lotes de un producto, siendo una valiosa herramienta en las etapas de formulación y durante el control de calidad (Visser, 2013; Ghasriani, 2016). Mediante el uso de NMR de ^1H es posible también comprobar que el patrón de glicosilación del producto bioterapéutico es constante lote a lote, o frente a cambios en medios de cultivos o clones productores, detectándose diferencias muy sutiles en los patrones de glicosilación (Figura 10.4D). La NMR también resulta fundamental durante el ejercicio de biosimilitud, en el cual se busca la comparación de un biosimilar con su referencia, para posibilitar el registro abreviado de proteínas terapéuticas. En muchos casos se ha utilizado no solo NMR homonuclear de ^1H sino también heteronuclear, recurriendo a experimentos complejos de correlación ^1H - ^{15}N y ^1H - ^{13}C . Con este fin se han enriquecido isotópicamente diversas glicoproteínas terapéuticas, como eritropoyetina y anticuerpos monoclonales (Poppe, 2014).

Existen, sin embargo, ciertas limitaciones en el uso de NMR para el estudio de glicoproteínas. La principal limitación es el tamaño molecular, donde se hace evidente un fenómeno de rápida relajación de los estados excitados, lo que afecta severamente el ancho de línea de los picos del espectro de NMR. Esto es notorio en proteínas de tamaños mayores a los 30 kDa. Además, con el incremento de tamaño aumenta la complejidad del espectro, y ya no es posible resolver los picos de resonancias individuales. Para contrarrestar estos inconvenientes se han desarrollado metodologías específicas de supresión de señales por deutерación (cambio de ^1H por ^2D), metodologías de marcación isotópica selectiva de ciertos aminoácidos y pulsos especiales de RMN que permiten su aplicación a sistemas de 100 a 150 kDa.

10.4.3. Fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es la herramienta espectroscópica más antigua y versátil que existe para el estudio de proteínas y, al mismo tiempo, una de las que más ha evolucionado en la última década. Empleando espectroscopia de fluorescencia, a partir de las perturbaciones espectrales en aminoácidos aromáticos se han estudiado hace más de 50 años las primeras transiciones estructurales en proteínas. En los años 90, gracias a la ingeniería de proteínas, las mutaciones sitio dirigidas y los equipos de *stopped flow*, mediante espectroscopia de fluorescencia fue posible comprobar experimentalmente las teorías que permiten explicar actualmente el plegamiento de proteínas. Ya en la última década, la síntesis química de fluoróforos altamente fluorescentes y su conjugación química sitio específica sobre aminoácidos

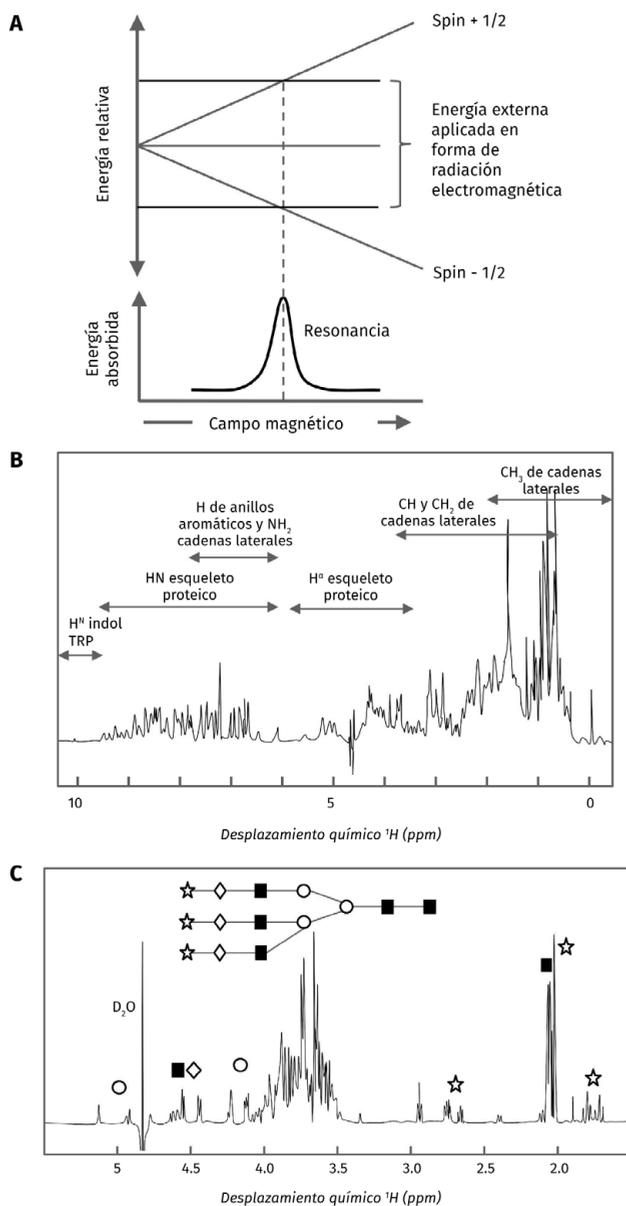


FIGURA 10.4. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN EL ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS. **A.** DESDOBLAMIENTO DE LOS ESPINES NUCLEARES (SPIN +1/2 Y -1/2) DE UN ÁTOMO SUSCEPTIBLE A UN CAMPO MAGNÉTICO. EN NMR, EL PICO DE ABSORCIÓN SE MANIFIESTA CUANDO SE ALCANZA LA ENERGÍA QUE PERMITE LA TRANSICIÓN DE UN SPIN DE UN ESTADO BASAL A UN ESTADO EXCITADO (ENERGÍA DE RESONANCIA). PARA QUE PUEDAN OCURRIR ESTAS TRANSICIONES NUCLEARES ES NECESARIO QUE LOS ESPINES ESTÉN POLARIZADOS (ALINEADOS) BAJO UN CAMPO MAGNÉTICO DE MUY ALTO CAMPO (108 A 109 HZ). **B.** DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS CARACTERÍSTICOS PARA LOS PROTONES (¹H) DEL ESQUELETO PROTEICO EN UN EXPERIMENTO MONODIMENSIONAL DE NMR. **C.** EJEMPLO DE DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS CARACTERÍSTICOS DE LOS GLÚCIDOS EN UN EXPERIMENTO MONODIMENSIONAL DE NMR DE GLICOPROTEÍNAS

permitió el estudio del mecanismo de plegamiento de proteínas a nivel de moléculas individuales, tanto *in vitro* como *in vivo* empleando microscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos (Royer, 2006).

La fluorescencia es el resultado de un proceso en tres etapas de absorción y emisión de energía que ocurre en moléculas con características fisicoquímicas especiales llamadas fluoróforos. En la primera etapa, denominada *excitación*, el fluoróforo absorbe un fotón a la longitud de onda λ_{ex} , que promueve un electrón a un estado excitado. En la segunda etapa, durante el *estado excitado*, que dura típicamente entre 1 a 10×10^{-9} seg, el fluoróforo disipa energía de forma no radiante, por interacción con el medio que lo rodea (solvente, aminoácidos, ligandos, etc.), por cambios conformacionales (dinámica), o por transferencia de energía en resonancia (FRET). Esta disipación de energía lleva al fluoróforo hasta un estado excitado de menor energía que el estado excitado original (proceso de relajación). En la tercera y última etapa, llamada *emisión*, el fluoróforo se libera de la energía restante emitiendo un fotón con una longitud de onda λ_{em} . El fotón que se emite es de menor energía que el que se absorbe, debido a la energía disipada en el estado excitado, y por lo tanto la longitud de onda de emisión será siempre mayor a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$). Esta diferencia de longitud de onda entre los fotones de emisión y excitación se conoce como «*Stokes shift*» y es una propiedad característica de cada fluoróforo (Lakowicz, 2006).

Debido a su larga vida media, el estado excitado de un fluoróforo es muy sensible a una gran variedad de procesos inherentes al plegamiento de proteínas, como las alteraciones conformacionales, cambios en la estabilidad del estado plegado, unión a ligandos, procesos catalíticos, y hasta cambios en el estado de oligomerización de una proteína. Estas perturbaciones son sensadas por los fluoróforos excitados durante el proceso de relajación, disipando menor o mayor cantidad de energía de forma no radiante, y, en algunos casos, modificando el tiempo de vida media del estado excitado. Tales perturbaciones se manifiestan en una variación de la cantidad de energía que es emitida, alterándose tanto la posición de λ_{em} como la intensidad del pico de emisión.

De modo similar a la espectroscopia por CD, el sistema orbital conjugado de los anillos aromáticos que poseen los aminoácidos Tyr, Phe y Trp es susceptible a ser utilizado en espectroscopia de fluorescencia. Los aminoácidos aromáticos pueden ser excitados a través de la absorción de longitudes de onda entre 265 a 290 nm, y emiten fluorescencia a 275 nm (Phe), 300 nm (Tyr) y 350 nm (Trp) (Figura 10.5A y 10.5B). Estas características fluorescentes son particularmente útiles para evaluar el entorno en el cual se encuentran inmersos estos aminoácidos, transformándose en pruebas intrínsecas de la estructura de una proteína. Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos aromáticos son excelentes reporteros del estado plegado ya que por su hidrofobicidad suelen estar excluidos del solvente, empaquetados en el núcleo central de la proteína. Cuando una proteína sufre alteraciones en su estructura debido a la pérdida de su estabilidad, oxidaciones o degradación,

se producen cambios conformacionales que impactan en el empaquetamiento de las cadenas aromáticas de una proteína (Figura 10.5C y 10.5D). Tales cambios modifican los mecanismos de relajación de los fluoróforos y la vida media del estado excitado, que se detecta como cambios en la emisión de la fluorescencia. Estos cambios pueden ser a nivel de la intensidad de fluorescencia (número de fotones emitidos) o en la posición del máximo de absorción (cambios en la frecuencia del pico de emisión).

Por medio de la espectroscopia de fluorescencia es posible caracterizar el estado plegado de una glicoproteína mediante la determinación de la temperatura de melting (T_m), también de forma análoga a la espectroscopia de CD. La conducción de un experimento de titulación por temperatura permite la medición de su T_m , parámetro que caracteriza la transición desde el estado plegado al estado desplegado (50 % plegado y 50 % desplegado). Mediante el uso de un espectrofluorímetro con control de temperatura se toman espectros a varias temperaturas monitorizando la exposición de los aminoácidos aromáticos, generalmente Trp, desde un entorno hidrofóbico (proteína plegada) a un entorno hidrofílico (proteína desplegada) (Figura 10.5E y 10.5F). Un ajuste global de los espectros de fluorescencia a diferente temperatura permite calcular la T_m , que es una característica que se asocia con el estado plegado de una proteína. Para proteínas con dos o más Trp en su secuencia es posible deconvolucionar las contribuciones de cada uno de los aminoácidos, permitiendo estudiar características en el mecanismo de plegamiento (Deechongkit, 2006; Garidel *et. al.*, 2008).

Para el estudio de la T_m por fluorescencia es posible recurrir al uso de sondas fluorescentes extrínsecas. Las sondas fluorescentes son pequeñas moléculas orgánicas hidrofóbicas con sistemas conjugados de electrones que poseen un mayor rendimiento cuántico, absorbiendo mayor energía y emitiendo un mayor número de fotones. Las sondas extrínsecas se adicionan a la solución que contiene la proteína y al interaccionar regiones de aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente, se modifican las características fotofísicas de la sonda, lo que se manifiesta en un incremento del número de fotones emitidos o cambios en las características del espectro de fluorescencia. En general, las sondas extrínsecas son útiles en experimentos de determinación de T_m , ya que al desplegarse una cadena polipeptídica se exponen al solvente aquellos aminoácidos hidrofóbicos, incrementándose el número de regiones sobre las cuales las sondas pueden interaccionar (Hawe, 2008). También es posible convertir fluoróforos extrínsecos en fluoróforos intrínsecos, conjugándolos a proteínas de modo sitio específico, por acoplamiento mediante reacción química *in vitro* con los residuos Lisina, Arginina o Cisteína. Este tipo de conjugaciones permite, entre otros usos, el marcado fluorescente de anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección específica de otras proteínas en preparados de tejidos o células en cultivo.

Los fluoróforos extrínsecos son de suma utilidad en el análisis de los glicanos conjugados a glicoproteínas. Mediante reacciones químicas es posible

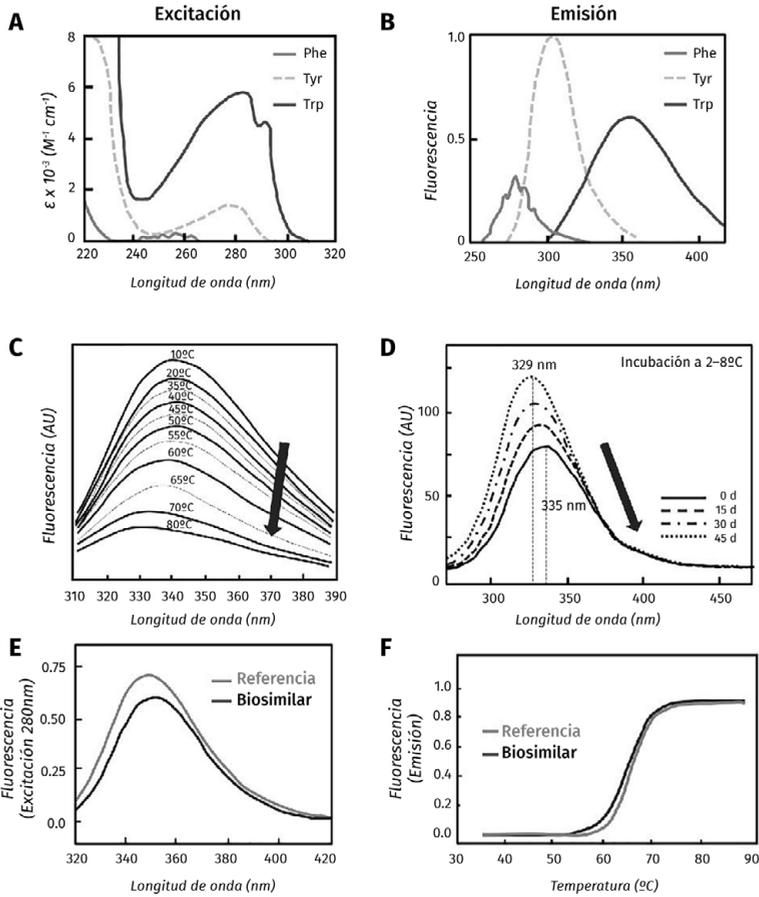


FIGURA 10.5. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS. **A.** CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE EXCITACIÓN DE LOS SISTEMAS ORBITALES CONJUGADOS PRESENTES EN LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS NATURALMENTE PRESENTES EN PROTEÍNAS. LOS MISMOS PUEDEN SER EXCITADOS A TRAVÉS DE LA ABSORCIÓN DE LONGITUDES DE ONDA ENTRE 265 A 290 NM. **B.** CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE EMISIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS PRESENTES EN PROTEÍNAS. UNA VEZ EXCITADOS, LOS MISMOS SE RELAJAN EMITIENDO FLUORESCENCIA A 275 NM (PHE), 300 NM (TYR) Y 350 NM (TRP). **C.** EJEMPLO DEL USO DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS COMO REPORTEROS DEL ESTADO DE PLEGAMIENTO DE UNA PROTEÍNA MODELO. A MEDIDA QUE SE INCREMENTA LA TEMPERATURA SE DESNATURALIZA LA PROTEÍNA Y LOS RESIDUOS AROMÁTICOS SE EXPONEN AL SOLVENTE, LO QUE DISMINUYE SU INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA. **D.** USO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS COMO REPORTEROS DE LA PÉRDIDA DE ESTABILIDAD DE UNA GLICOPROTEÍNA TERAPÉUTICA CON EL TIEMPO (SHELF LIFE). CON EL PASO DEL TIEMPO LA PROTEÍNA PIERDE ESTABILIDAD Y COMIENZA A DESNATURALIZARSE O DEGRADARSE, LO QUE SE VISUALIZA POR MEDIO DE UNA DISMINUCIÓN EN LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA. **E Y F.** USO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN EL EJERCICIO DE COMPARABILIDAD DE BIOSIMILARES. ES POSIBLE LA COMPARACIÓN DIRECTA DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (**E**) O LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE MELTING (T_M) EN UN EXPERIMENTO DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA. [CONTINÚA EN PÁG. SGTE.]

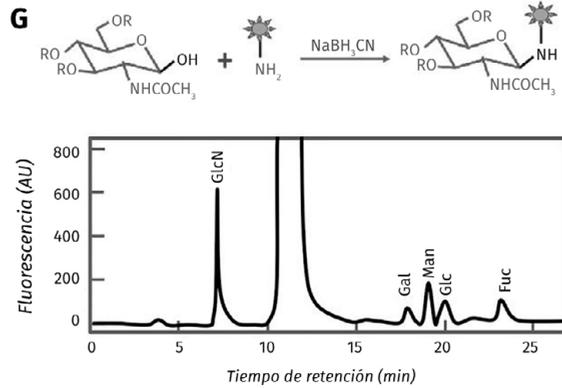


FIGURA 10.5. [CONTINUACIÓN] G. DERIVATIZACIÓN ESPECÍFICA DE GLÚCIDOS CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS DEL TIPO ABA (2-AMINO BENZÓICO (ABA). LA CONJUGACIÓN CON FLUORÓFOROS EXTRÍNSECOS Y SU POSTERIOR DETECCIÓN POR MEDIO DE HPLC ACOPLADO A DETECTOR DE FLUORESCENCIA PERMITE LA CUANTIFICACIÓN PRECISA DE LOS GRUPOS GLICANOS PRESENTES EN GLICOPROTEÍNAS CON MUY ALTA SENSIBILIDAD

derivatizar carbohidratos específicamente con fluoróforos extrínsecos. En particular, se puede mencionar la derivatización con ácido 2-aminobenzóico (ABA), Diamino-metilendioxibenceno (DMB) y Fenilendiamina (OPD) (Anumula, 2006). La conjugación con fluoróforos extrínsecos permite la cuantificación precisa de los grupos glicanos presentes en glicoproteínas. Luego de su reacción con el fluoróforo, los glicanos se escinden de la proteína por medio de reacciones de deglicosilación, y la mezcla de glicanos se separa por medio de cromatografía líquida de alta performance acoplada a un detector de fluorescencia (Figura 10.5G). La identificación y cuantificación de los componentes de mezclas complejas de glicanos se realiza por comparación del perfil cromatográfico con cromatogramas de sustancias patrones de glúcidos derivatizados del mismo modo. Debido a la simpleza en su implementación y alta reproducibilidad del método, esta técnica se emplea rutinariamente en el control de calidad de glicoproteínas terapéuticas para corroborar la composición relativa de glicanos del producto, así como su estabilidad a lo largo de las operaciones de purificación y formulación.

10.5. PERSPECTIVAS A FUTURO DE LAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

Los avances tecnológicos ocurridos durante la última década en áreas como la nanotecnología, superconductores, fuentes láser y capacidad computacional de cálculo, entre otros, han posibilitado el avance de las metodologías biofísicas para el estudio de proteínas, permitiendo avizorar su pronta aplicación al

análisis estructural de glicoproteínas. Posiblemente, tales adelantos permitirán trasladar el uso de las espectroscopias desde el tubo de ensayo a un entorno celular o incluso hasta un organismo vivo. En lo que respecta a las nuevas metodologías de espectroscopia de fluorescencia, el uso de proteínas fluorescentes como fluoróforos intrínsecos ha permitido expandir la aplicación de la espectroscopia de fluorescencia al estudio de glicoproteínas en un contexto celular complejo. Metodologías basadas en microscopía láser confocal permiten el estudio de la expresión, localización y dinámica celular de glicoproteínas fusionadas a proteínas fluorescentes en células vivas e, incluso, dentro de organismos complejos como *C. elegans* o pez cebra (Zhang, 2002). En el contexto celular, también es posible acoplar fluoróforos extrínsecos de forma específica a proteínas de fusión que portan una secuencia determinada, como el sistema FLASH/ReASH, que se acopla específicamente a motivos tetracisteína del tipo CysCysProGlyCysCys (Roberti, 2007). Más recientemente, se logró la incorporación directa de aminoácidos artificialmente fluorescentes en proteínas gracias a la expansión del código genético por técnicas de ingeniería genética. Empleando tRNAs mutados, que modifican la interpretación de los codones del mRNA, es posible incorporar un aminoácido no natural, químicamente modificado para ser fluorescente, en una determinada posición de la cadena polipeptídica (Xie y Schultz, 2006). Debido a que estos fluoróforos conjugados tienen un muy alto rendimiento cuántico, se facilita el estudio del plegamiento y estabilidad de proteínas en un contexto celular, incluso a nivel de moléculas individuales, mediante el uso de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia con resolución temporal de picosegundos (FLIM) o resolución de distancias del orden de 20 nm (STED, STORM, PALM) (Sahl *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista del desarrollo a futuro de la espectroscopia por NMR, el uso de criosondas, que permiten incrementar significativamente la sensibilidad de los experimentos, ha posibilitado la caracterización de la estructura de proteínas en el contexto celular (NMR *in vivo*). Por medio de la microinyección o la electroporación, es posible estudiar el comportamiento de proteínas marcadas isotópicamente dentro de células eucariotas vivas y estructuras más complejas como oocitos de *X. laevis* (Selenko *et al.*, 2006). Por medio de estas metodologías se ha podido demostrar a nivel celular como ocurren modificaciones postraduccionales en proteínas, como por ejemplo la fosforilación (Smith *et al.*, 2015). Es previsible entonces, que muy pronto sea posible estudiar mecanismos de glicosilación de proteínas directamente en el contexto celular por NMR *in vivo* (Valverde *et al.*, 2019). Otro adelanto muy importante, con aplicación directa al estudio de glicoproteínas, es la espectroscopia de NMR de estado sólido en proteínas de membrana. Empleando NMR de estado sólido se ha reportado la estructura intacta de proteínas de membrana de origen bacteriano en bicapas lipídicas, como por ejemplo el complejo translocador de proteínas de mitocondrias (TSPO) o la proteína Proteorodopsina, una proteína transmembrana con 7 segmentos helicoidales embebidos en la bicapa lipídica (Jaipuria *et al.*, 2017; Lalli *et al.*, 2017). La ventaja del NMR de estado

TABLA 10.2. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE ESTRUCTURA Y CONFORMACIÓN EN GLICOPROTEÍNAS

Técnica	Detección	Ventajas	Desventajas
Dicroísmo Circular	Estructura secundaria/ terciaria	Cuantitativo/ Detecta hélices α , lámina β y random coil	Sensible a interfe- rencias por compo- sición del <i>buffer</i>
Espectroscopia Infra-Roja	Estructura secundaria	Cuantitativo/ Detecta estructuras de lámina β	Sufre de interferencias
Fluorescencia	Estructura terciaria/ hidrofobicidad	Altamente sensible	Cualitativo
Calorimetría de Barrido Diferencial	Estabilidad térmica	Sensible	Cualitativo
Espectroscopia de Masas con Intercambio de Deuterio	Conformaciones dinámicas/ Interacciones moleculares	Específico	Costoso/ Equipamiento sofisticado
Resonancia Magnética Nuclear	Estructura tridimensional	Cuantitativo/ Elevada resolución	Muy Costoso/ Equipamiento sofisticados
Ultracentrifugación Analítica	Oligómeros/ Agregados	Cuantitativo	Lento
Dispersión Dinámica de Luz	Agregados de alto peso molecular	Sensible	Cualitativo/ Baja resolución
Cromatografía de Exclusión Molecular con Dispersión Estática de Luz	Oligómeros/ Agregados	Rápida/ Determinación directa del peso molecular	Poco sensi- ble a cambios conformacionales
Electroforesis de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	Agregados	Bajo costo	Baja resolución

sólido respecto del estado líquido es que en sólidos no existen impedimentos por el tamaño de las proteínas que se puedan caracterizar. Es posible avizorar entonces que próximamente se conocerán estructuras de glicoproteínas eucariotas intactas en membranas lipídicas.

10.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se han tratado los aspectos más básicos y relevantes de tres de las metodologías espectroscópicas que se emplean habitualmente para el análisis de la estructura y control de calidad de glicoproteínas, principalmente

enfocados en el uso industrial o farmacéutico. Existen en la bibliografía compendios de cada una de estas técnicas que amplían la descripción de sus fundamentos físicos o aplicaciones, y en particular para el caso de proteínas terapéuticas (Houde y Berkowitz, 2014). En la práctica es necesario el uso de una variedad de técnicas complementarias para la caracterización de la estructura de glicoproteínas. A modo de resumen, en la Tabla 10.2 se comparan las principales características de los métodos que se utilizan para la caracterización de glicoproteínas.

Un tópicos de activo debate entre los laboratorios productores de glicoproteínas terapéuticas y las agencias regulatorias de los países de alta vigilancia sanitaria es el margen de aceptabilidad en los cambios en la estructura de las glicoproteínas terapéuticas, que pueden ser evidenciados por el uso de estas técnicas (Schiestl *et al.*, 2011; Berkowitz *et al.*, 2012). Debido a la naturaleza de las células en cultivo, es frecuente detectar pequeños cambios estructurales de un producto biotecnológico entre lote y lote. Estos cambios estructurales pueden no tener impacto en la actividad terapéutica de una glicoproteína o en la afinidad por un ligando, pero sí podrían afectar la estabilidad en una matriz biológica, su tendencia a formar agregados o su susceptibilidad a degradación, modificando su perfil farmacocinético. Del mismo modo, el uso de ciertos excipientes podría no influir directamente en la estructura de la glicoproteína terapéutica, pero si afectar su estabilidad a largo plazo, afectando el plazo de validez del producto formulado. La presencia de estructuras cuaternarias, como oligómeros y agregados puede causar reacciones inmunogénicas que reduzcan la eficacia del tratamiento o incluso pongan en peligro la vida de un paciente. Por esta razón, y en palabras de la FDA, antes de poder asegurar la calidad o biosimilaridad de una glicoproteína terapéutica es necesario evaluar el «peso completo de la evidencia», para lo que se requiere emplear una variedad de metodologías analíticas complementarias (Kirchhoff *et al.*, 2017).

Referencias bibliográficas

- ANUMULA, K.R.** (2006). Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem.*, 350(1), 1–23. 10.1016/j.ab.2005.09.037.
- BATTISTEL, M. D., AZURMENDI, H. F., YU, B. & FREEDBERG, D. I.** (2014). NMR of glycans: shedding new light on old problems. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 79, 48–68. 10.1016/j.pnmrs.2014.01.001
- BERKOWITZ, S. A., ENGEN, J. R., MAZZEO, J. R. & JONES, G. B.** (2012). Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 11(7), 527–40. 10.1038/nrd3746
- DEECHONGKIT S., AOKI K.H., PARK S.S. & KERWIN B.A.** (2006). Biophysical comparability of the same protein from different manufacturers: a case study using Epoetin alfa from Epogen and Eprex. *J Pharm Sci.* 5(9):1931–43. 10.1002/jps.20649.
- DILL K.A., OZKAN S.B., SHELL M.S. & WEIKL T.R.** (2008) The Protein Folding Problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37:289–316. 10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558.
- FERSHT A.R. & DAGGETT V.** (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* 108(4):573–82. 10.1016/S0092-8674(02)00620-7.
- GARIDEL P., HEGYI M., BASSARAB S. & WEICHEL M.** (2008). A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biotechnol J.* 3(9–10):1201–11. 10.1002/biot.200800091.
- GHASRIANI H, HODGSON D.J., BRINSON R.G., MCEWEN I, BUHSE L.F., KOZLOWSKI S., MARINO J.P., AUBIN Y. & KEIRE D.A.** (2016). Precision and robustness of 2D-NMR for structure assessment of filgrastim biosimilars. *Nature Biotechnol.* 34(2):139–41. 10.1038/nbt.3474.
- GREENFIELD, N. J.** (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890. 10.1038/nprot.2006.202.
- HARTL F.U., BRACHER A. & HAYER-HARTL, M.** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332. 10.1038/nature10317
- HAWE A., SUTTER M. & JISKOOT W.** (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res.* 25(7):1487–99. 10.1007/s11095-007-9516-9.
- HOUE D.J. & BERKOWITZ S.A.** (2014). *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*. 1st Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-0-444-59573-7. 10.1016/C2012-0-01163-5.

- JAIPURIA G., LEONOV A., GILLER K., VASA S.K., JAREMKO Ł., JAREMKO M., LINSER R., BECKER S. & ZWECKSTETTER M.** (2017) Cholesterol-mediated allosteric regulation of the mitochondrial translocator protein structure. *Nat Commun.* 30; 8:14893. 10.1038/ncomms14893.
- KELLY S.M., JESS T.J. & PRICE N.C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* 1751(2):119–39. 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- KIRCHHOFF C.F., WANG X.M., CONLON H.D., ANDERSON S., RYAN A.M. & BOSE A.** (2017). Biosimilars: Key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnol Bioeng.* 114(12):2696–2705. 10.1002/bit.26438.
- LAKOWICZ J.R.** (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer-Verlag. Boston, MA. ISBN 978-0-387-31278-1. 10.1007/978-0-387-46312-4.
- LALLI D., IDSO M.N., ANDREAS L.B., HUSSAIN S., BAXTER N., HAN S., CHMELKA B.F. & PINTACUDA G.** (2017). Proton-Based Structural Analysis of a Heptahelical Transmembrane Protein in Lipid Bilayers. *J Am Chem Soc.* 139(37):13006–13012. 10.1021/jacs.7b05269.
- MARION D.** (2013) An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics.* 12(11):3006–25. 10.1074/mcp.O113.030239.
- MARTIN S.R. & BAYLEY, P.M.** (2002). Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy. En: Vogel H.J. (eds) *Calcium-Binding Protein Protocols: Volume 2: Methods and Techniques*. *Methods in Molecular Biology*, 173. Springer, Totowa, N.J. 10.1385/1-59259-184-1:043.
- POPPE L., JORDAN J.B., LAWSON K., JERUMS M., APOSTOL I. & SCHNIER P.D.** (2013). Profiling formulated monoclonal antibodies by ¹H NMR spectroscopy. *Anal Chem.* 85(20):9623–9. 10.1021/ac401867f.
- ROBERTI M.J., BERTONCINI C.W., KLEMENT R., JARES-ERIJMAN E.A. & JOVIN T.M.** (2007). Fluorescence imaging of amyloid formation in living cells by a functional, tetracysteine-tagged alpha-synuclein. *Nat Methods.* 4(4):345–51. 10.1038/nmeth1026.
- ROYER C.A.** (2006). Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev.* 106(5):1769–84. 10.1021/cr0404390.
- SAHL S.J., HELL S.W. & JAKOBS S.** (2017). Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(11):685–701. 10.1038/nrm.2017.71.
- SCHIESTL M., STANGLER T., TORELLA C., CEPELJNIK T., TOLL H. & GRAU R.** (2011). Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol.* 29(4):310–2. 10.1038/nbt.1839.
- SELENKO, P., SERBER, Z., GADEA, B., RUDERMAN, J., & WAGNER, G.** (2006). Quantitative NMR analysis of the protein G B1 domain in *Xenopus laevis* egg extracts and intact oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32), 11904–11909. 10.1073/pnas.0604667103.
- SMITH M.J., MARSHALL C.B., THEILLET F.X., BINOLFI A., SELENKO P. & IKURA M.** (2015). Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments. *Curr Opin Struct Biol.* 32:39–47. 10.1016/j.sbi.2015.02.003.

- VALVERDE P, QUINTANA JI, SANTOS JI, ARDÁ A, JIMÉNEZ-BARBERO J.** (2019). Novel NMR Avenues to Explore the Conformation and Interactions of Glycans. *ACS Omega*. 4(9):13618-13630. 10.1021/acsomega.9b01901
- VISSEER J., FEUERSTEIN I., STANGLER T., SCHMIEDERER T., FRITSCH C. & SCHIESTL M.** (2013). Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs*. 27(5):495-507. 10.1007/s40259-013-0036-3.
- XIE J. & SCHULTZ P.G.** (2006). A chemical toolkit for proteins—an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(10):775-82. 10.1038/nrm2005.
- ZHANG J., CAMPBELL R.E., TING A.Y. & TSIEN R.Y.** (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(12):906-18. 10.1038/nrm976.