

# Glicosilación en células de glándula mamaria: potencialidades y limitaciones para la expresión de proteínas de interés biofarmacéutico

✉ José A Cremata, Raquel Montesino, Jorge R Toledo, Oliberto Sánchez, Elsa Rodríguez, María P Rodríguez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
 Ave. 31 e/ 158 y 190, AP 6162, CP 10600,  
 Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
 E-mail: jose.cremata@cigb.edu.cu

## RESUMEN

El análisis de la N-glicosilación de la eritropoyetina humana (EPOh) recombinante, expresada mediante transducción adenoviral de células epiteliales mamarias de una línea celular de cabra no transformada (línea GMGE; EPOh-GMGE) y en la leche de cabra (EPOh-Lc), se realizó mediante separación en HPLC en fase normal Amida-80 e intercambio aniónico de los oligosacáridos liberados enzimáticamente. Luego, estos oligosacáridos se marcaron con el fluoróforo ácido 4-aminobenzoico (4ABA) y su estructura se evaluó por espectrometría de masas MALDI, ESI-MS y LC/MS. Las estructuras de los N-glicanos más abundantes de la EPOh-GMGE son de tipo multiantenarias monosialiladas, fucosiladas en el núcleo y también en las antenas. La EPOh-Lc presentó N-glicanos poco ramificados y fucosilados mayormente en el núcleo. La fracción cargada mostró estructuras monosialiladas que contenían ácido siálico en las formas N-Acetiladas y N-Glicoliladas en una relación 1:1, principalmente enlazados  $\alpha$ 2,6 al extremo no reductor de la cadena oligosacáridica, mientras que en la EPOh-GMGE solo se detectaron ácidos siálicos terminales en su forma N-Acetilada. Un hallazgo importante fue la presencia mayoritaria de N-glicanos biantenados con motivos de lactosadamina (GalNAc-GlcNAc) neutros o sialilados en la EPOh-Lc, a diferencia de la EPOh-GMGE donde los N-glicanos con estos motivos resultaron minoritarios. Este tipo de terminal no reductor no ha sido descrito en la EPOh expresada en células CHO, donde los glicanos muestran estructuras multiantenarias altamente sialiladas. Estos hallazgos enfatizan la diferencia entre la población de N-glicanos de una glicoproteína dada, en dependencia del tipo celular y el entorno en que esta se expresa.

**Palabras clave:** N-glicosilación, Eritropoyetina recombinante, glándula mamaria, leche de cabras, perfil cromatográfico, espectrometría de masas

## Introducción

La producción de glicoproteínas recombinantes, con aplicaciones biofarmacéuticas en la leche de animales transgénicos, es cada vez más difundida debido a los bajos costos del proceso de producción del fármaco. En la leche de animales transgénicos se han expresado varias proteínas, como la lactotransferrina humana en ratón [1] y vaca [2]; la alfa 1-antitripsina [3] y el inhibidor C1 [4] en conejo; antitrombina humana [5] y el activador tisular del plasminógeno en cabras [6, 7]; el factor VIII humano [8] y la proteína C humana en puercos [9]; y la eritropoyetina humana (EPOh) en conejos [10] y puercos [11]. Sin embargo, la funcionalidad y especificidad de la maquinaria de glicosilación de la glándula mamaria no están determinadas del todo, en comparación con otras líneas celulares. Recientemente nuestro grupo expresó la EPOh en la leche de cabras no transgénicas (*Capra hircus*), mediante transducción adenoviral de células epiteliales mamarias [12].

La EPOh es la hormona que regula la producción de eritrocitos mediante la estimulación de la diferenciación de las células madres en la médula ósea. Es una glicoproteína que posee tres sitios potenciales de N-glicosilación, la Asn-24, Asn-38 y Asn-83, y un sitio de O-glicosilación en la Ser-126. La glicosilación de la EPOh es esencial para su actividad *in vivo* como hormona [13]. La proteína no glicosilada tiene actividad *in vitro* pero no actividad biológica *in vivo* [14]. Por tanto, un sistema alternativo para la producción de la EPOh debe tener una maquinaria biosintética similar a

la que poseen las células de ovario de hámster chino (CHO), que es la que actualmente se usa para la producción de EPO recombinante. Esta línea celular permite la síntesis de estructuras tetra-antenarias, que garantizan una molécula biológicamente activa, además de una adecuada vida media en sangre [15, 16].

La EPOh recombinante expresada en la leche de cabras (EPOh-Lc) mostró un menor peso molecular, abundantes isoformas básicas y muy baja actividad hematopoyética *in vivo*, al ser comparada con su homóloga producida en células CHO [17]. La EPOh producida en la línea celular epitelial mamaria de cabra GMGE (EPOh-GMGE), mostró un patrón de N-glicosilación que difiere del obtenido de su homóloga expresada en la leche de cabras y de la producida en células CHO (EPOh-CHO), con fucosilación en las antenas, bajo contenido de ácido siálico y una reducida actividad hematopoyética [18]. La baja actividad hematopoyética, tanto de EPOh-GMGE y EPOh-Lc, se atribuye a las diferencias de glicosilación de la EPOh producida en la línea celular CHO.

## Resultados y discusión

### N-glicosilación de las células epiteliales mamarias de cabra *in vitro* e *in vivo*: eritropoyetina humana como modelo

#### Purificación y caracterización preliminar

La EPOh-GMGE establecida y desarrollada en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB),

1. Nuijens JH, Van Berkel PH, Geerts ME, Hartvelt PP, De Boer HA, Van Veen HA, et al. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *J Biol Chem* 1997;272:8802-7.
2. Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, Van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 2002; 20:484-7.
3. Massoud M, Bischoff R, Dalemans W, Pointu H, Attal J, Schultz H, et al. Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J Biotechnol* 1991;18:193-203.
4. Koles K, Van Berkel PH, Pieper FR, Nuijens JH, Mannesse ML, Vliegenthart JF, et al. N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* 2004; 14:51-64.
5. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood* 1998;91(12):4561-71.
6. Denman J, Hayes M, O'Day C, Edmunds T, Bartlett C, Hirani S, et al. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology* 1991;9:839-43.

se purificó según el procedimiento descrito por Toledo y col. [19], que garantiza la recuperación de más del 90% de la población de glicofomas de la molécula. La metodología fue aplicada también para purificar la EPOh-Lc y la EPOh-CHO, esta última utilizada como referencia (Figura 1A).

El ensayo de desglucosilación con PNGasa F mostró que la EPOh-CHO migró en electroforesis desnaturalizante de poliácridamida (SDS-PAGE) a una talla aproximada de 20 kDa, lo que se corresponde

con la proteína N-desglucosilada, pero que mantiene ocupada la Ser 126 como sitio de O-glicosilación. Un comportamiento similar se observó en la EPOh-GMGE; sin embargo, la hormona expresada en leche predomina la banda de 18 kDa que debe corresponder a la proteína totalmente aglicosilada (Figura 1C).

El patrón de isoformas de las tres moléculas se comparó mediante separación por isoelectroenfoque (IEF), y permitió conocer la distribución de isoformas ácidas presentes en cada una de ellas (Figura 1B). La

7. Ebert KM, Di Tullio P, Barry CA, Schindler JE, Ayres SL, Smith TE, *et al.* Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology* 1994;12(7):699-702.

8. Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, *et al.* Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol* 1997;15:971-5.

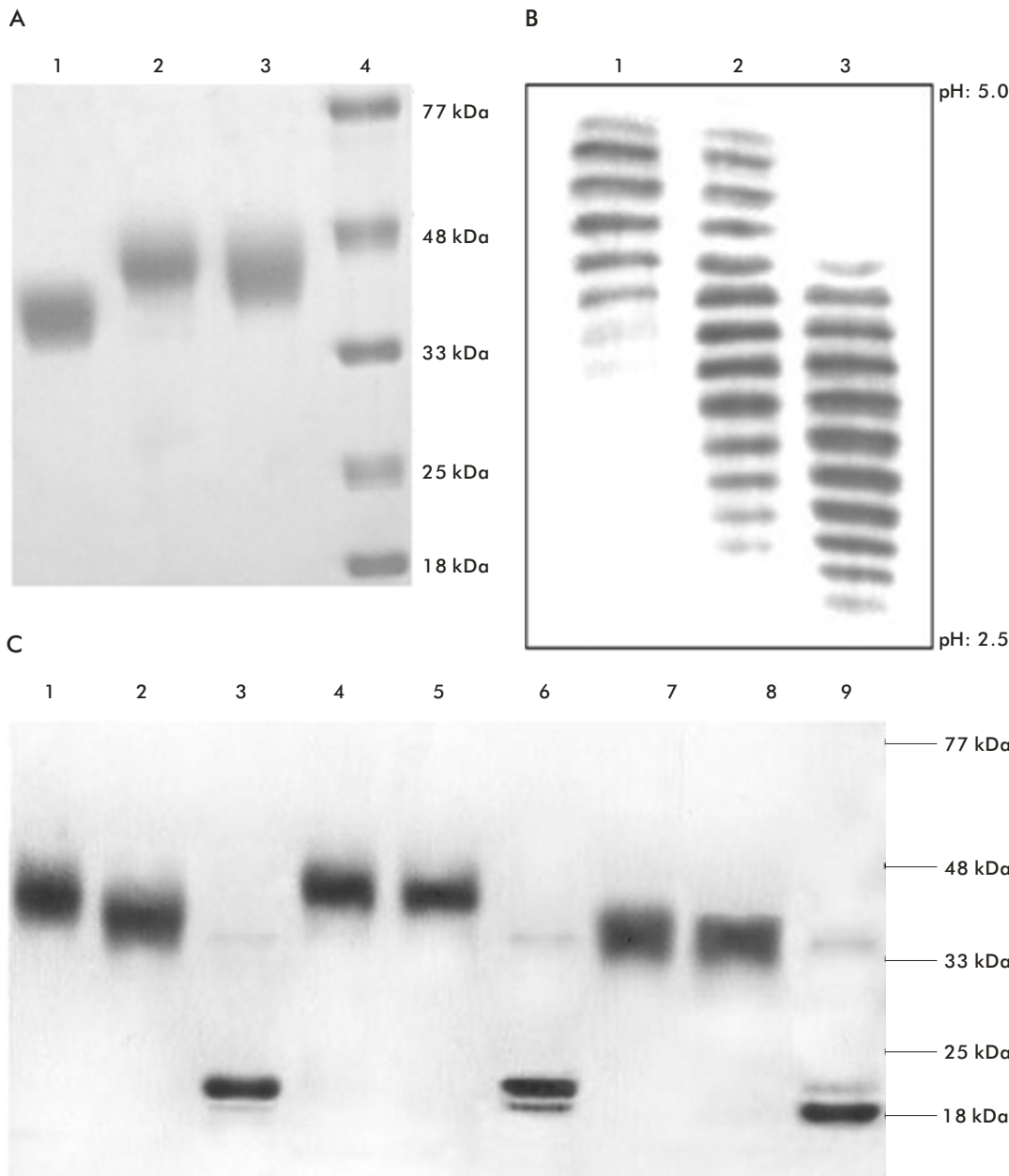


Figura 1. Variación en la migración electroforética y la composición de isoformas de la EPOh expresada en células epiteliales mamarias de cabra, *in vitro* e *in vivo*. A: SDS-PAGE al 12.5% teñida con azul de Comassie. Carriles: 1, EPOh-Lc; 2, EPOh-GMGE; 3, EPOh-CHO; 4, patrón de peso molecular. B: Isoelectroenfoque y subsiguiente inmunoidentificación con el anticuerpo antiEPO-HRP de las muestras analizadas en A. La corrida se realizó en un gel prehidratado de poliácridamina en gradiente de pH 2.5 a 5.0. Carriles: 1, EPOh-Lc; 2, EPOh-GMGE; 3, EPOh-CHO. C: SDS-PAGE al 12.5% teñida con azul de Comassie. Carriles: 1, 4 y 7, EPOh-CHO, EPOh-GMGE y EPOh-Lc, respectivamente; 2, 5 y 8, EPOh-CHO, EPOh-GMGE y EPOh-Lc tratadas con sialidasa de *Salmonella typhimurium*; 3, 6 y 9, EPOh-CHO, EPOh-GMGE y EPOh-Lc, tratadas con PNGasa F

EPOh-GMGE mostró un patrón de isoformas ácidas similar al de la EPOh-CHO, aunque se pudo detectar también una distribución abundante de isoformas menos ácidas que no se observaron en la molécula de referencia. En cambio, la EPOh-Lc mostró una mayor proporción de isoformas hacia pH neutro.

La desialización con sialidasa de *Salmonella typhimurium* evidenció un menor contenido de ácido siálico en EPOh-GMGE y menor aún en EPOh-Lc (Figura 1C), lo cual confirma los resultados de IEF sobre una mayor proporción de isoformas ácidas en la EPOh-CHO que en la EPOh-GMGE o la EPOh-Lc.

La determinación de las diferentes especies y contenido de ácido siálico, mediante HPLC-C18 (rp-C18) con detección de fluorescencia por derivatización específica de  $\alpha$ -cetoácidos con 1,2-diamino-4,5-metilén-dioxibenzeno, arrojó una relación 1:1 de ácido siálico de las formas N-Glicoliladas y N-Acetiladas (Neu5Gc: Neu5Ac) en la EPOh-Lc. Por el contrario, la EPOh-GMGE, similar a la EPOh-CHO mayormente presenta Neu5Ac (> 95%) [17, 18].

Adicionalmente, el análisis mediante secuenciación por espectrometría de masas de la cadena peptídica de la EPOh-Lc corroboró que las células epiteliales de la glándula mamaria de cabras son capaces de sintetizar correctamente la proteína, y mantener la formación de los enlaces disulfuro entre los residuos de Cys 7-161 y 29-33, y la ocupación de los sitios potenciales de N-glicosilación de los residuos Asn 24, 38 y 83 [17]. Por tanto, las diferencias en talla y patrón de isoformas observadas entre las tres moléculas de EPOh resultan del procesamiento y modificación de los N-glicanos en el aparato de Golgi, al transitar por la vía de secreción.

### Estudio de los oligosacáridos N-enlazados a la EPOh expresada en células epiteliales de glándula mamaria de cabra

El estudio de las estructuras oligosacáridicas N-enlazadas tanto a EPOh-GMGE como a EPOh-Lc se realizó por desglucosilación enzimática con PNGase F y separación en HPLC de fase normal en columna Amida-80 de la mezcla total de N-glicanos, derivatizados con el fluoróforo ácido 4-aminobenzoico (4ABA) (Figura 2). El fraccionamiento en HPLC-DEAE y estudio por espectrometría de masas MALDI, ESI y LC/MS [17, 18], permitió conocer las estructuras mayormente presentes en cada mezcla.

### Análisis de las fracciones de N-glicanos neutros y sialilados de EPOh-Lc

La separación en HPLC-DEAE dio lugar a una fracción neutra y una cargada (monosialilada), que se analizaron posteriormente por LC-ESI/MS. Se observó una gran heterogeneidad de N-glicanos, tanto en la fracción neutra como en la monosialilada. El N-glicano mayoritario de la fracción neutra correspondió a un ión de  $m/z = 1991.03$  que se asignó a una composición relativa Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub> (Hex = Hexosa, HexNAc = N-Acetil Hexosamina y dHex = desoxi-Hexosa). La fragmentación por colisión inducida (CID)-ESI-MS/MS del ión precursor produjo iones fragmentos que permitieron deducir la estructura del oligosacárido analizado como tipo diantenarrio, con terminales no-reductores del tipo GalNAc-GlcNAc ausentes en EPOh-CHO y muy

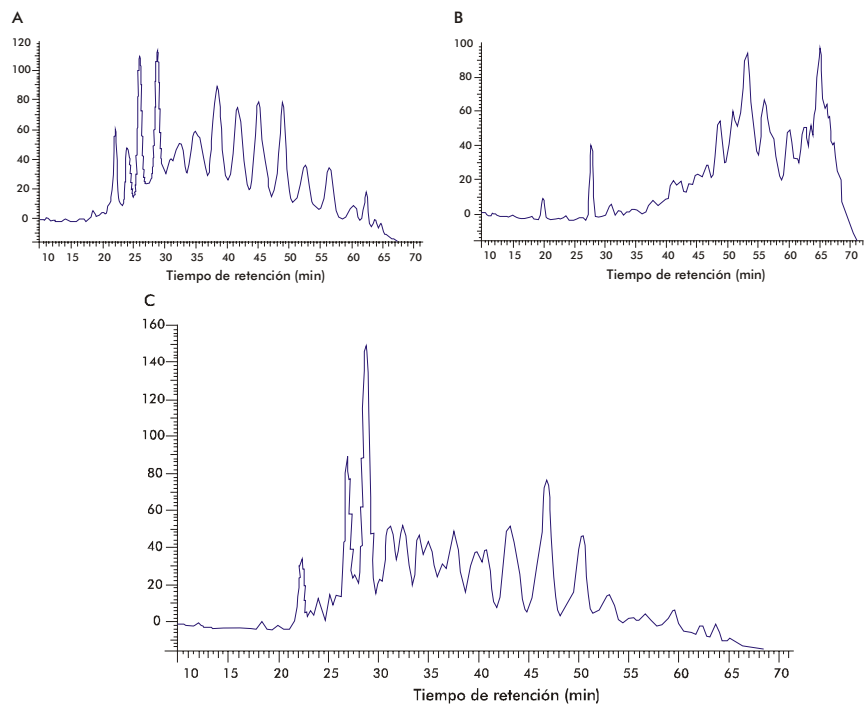
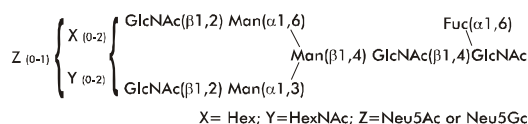


Figura 2. Cromatogramas de la separación en HPLC-Amida 80 (fase normal), de los oligosacáridos presentes en la EPOh expresada en células epiteliales mamarías de cabra y derivatizados con el fluoróforo 4ABA. Se muestra el perfil de la EPOh-CHO como referencia. A: EPOh-CHO; B: EPOh-GMGE; C: EPOh-Lc

escasos en glicoproteínas humanas en general. El compuesto mayoritario de la fracción ácida presenta una relación similar al mayoritario neutro, pero con un residuo de Neu5Gc (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>1</sub>dHex<sub>1</sub>Neu5Gc<sub>1</sub>). El correspondiente ión molecular de masa  $m/z = 2298.11$  generó iones fragmentos típicos de diantena fucosilada con terminales GalNAc-GlcNAc, y monosialilado con una relación 1:1 Neu5Gc:Neu5Ac. La composición monosacáridica relativa de los N-glicanos de la EPOh-Lc cumple con la fórmula general Hex<sub>3,8</sub>HexNAc<sub>3,8</sub>dHex<sub>1,2</sub>Neu5Gc/Neu5Ac<sub>1</sub> (Figura 3) [17].

9. Van Cott KE, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velandar WH. Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. *Transgenic Res* 2001;10:43-51.

10. Massoud M, Attal J, Thépot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, et al. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev* 1996;36:555-63.



	Hex	HexNAc	dHex	Neu5Ac	Neu5Gc
Neutra	3	6	1	-	-
	4	5	1	-	-
	5	4	1	-	-
Cargada	3	6	1	1	-
	3	6	1	-	1
	4	5	1	1	-
	4	5	1	-	1
	5	4	1	1	-
	5	4	1	-	1

Figura 3. Representación esquemática de los N-glicanos neutros y cargados más abundantes en EPOh-Lc. Posibles estructuras biantenarrias presentes en la mezcla de glicanos. En la parte inferior, composición relativa de monosacáridos en términos de Hex, HexNAc, dHex, Neu5Ac y Neu5Gc

**Análisis de las fracciones de N-glicanos neutros y sialilados de EPOh-GMGE**

El perfil obtenido en columna Amida-80 es altamente complejo en las fracciones que eluyen a altos tiempos de retención, poco representados en los perfiles de EPOh-CHO y EPOh-Lc. La presencia de ácido siálico fue descartada como principal factor que promueve tal retención en la columna, dado que el análisis de monosacáridos indicó un contenido tres veces menor que en la EPOh-CHO. El análisis de las estructuras enlazadas a EPOh-GMGE fue similar al descrito para EPOh-Lc.

Las estructuras neutras (ver Figura 4) más abundantes corresponden a la fórmula general Hex<sub>7</sub>-HexNAc<sub>6</sub>-dHex<sub>x</sub> donde x = 0-4. Según la relación de monosacáridos, este tipo de estructura pudiera corresponder a una tetra-antena. Sin embargo, la composición monosacáridica de Hex<sub>3</sub>-HexNAc<sub>6</sub>-dHex<sub>x</sub> y Hex<sub>4</sub>-HexNAc<sub>5</sub>-dHex<sub>x</sub> sugiere además la presencia de terminales GalNAc-GlcNAc en lugar de la estructura clásica de tipo N-acetil-lactosamina (Gal-GlcNAc). El estudio por MS/MS, en modo negativo, de m/z = 1988.7 [M-H]<sup>-</sup> confirma la fórmula global Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>1</sub>, similar al identificado en EPOh-Lc. Este oligosacárido se corresponde con una diantena fucosilada en el núcleo que presenta uniones del tipo GalNAc-GlcNAc en el extremo no reductor. A diferencia de la EPOh-Lc, esta estructura no resultó mayoritaria dentro de la población total de N-glicanos. Adicionalmente, la combinación Hex<sub>8</sub>-HexNAc<sub>6</sub>-dHex<sub>x</sub> pudiera estar asociada con terminales Galα(1-3)Gal, que son

altamente inmunogénicas en seres humanos. El análisis de uno de los glicanos de la fracción cargada de m/z = 1609.9 [M-2H]<sup>-2</sup>, de composición relativa Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>dHex<sub>3</sub>Neu5Ac<sub>1</sub>, indica la presencia de estructuras tetra-antennarias fucosiladas en el núcleo y en las antenas, además de monosialiladas en forma de Neu5Ac. En esta estructura la fucosilación de las antenas ocurre en el residuo de GlcNAc y no en la Gal terminal, lo que da lugar a epitopos del tipo Lewis X y Sialil Lewis X. Este evento de polifucosilación no ha sido descrito para células CHO. La composición relativa de los N-glicanos de la EPOh-GMGE cumple con la fórmula general Hex<sub>3-9</sub>HexNAc<sub>2-8</sub>dHex<sub>1-5</sub>Neu5Ac<sub>1</sub> [18].

Los resultados hasta aquí, aunque de forma resumida (Tabla 1), evidencian las diferencias substanciales de la maquinaria de glicosilación de las células epiteliales de la glándula mamaria *in vitro* e *in vivo*.

El motivo lactosadiamina (GalNAc-GlcNAc) no es común en vertebrados; sin embargo, está tanto en la EPOh-Lc como en la EPOh-GMGE, pero en menor proporción en esta última. Un elemento estructural distintivo de las células GMGE es la polifucosilación, no descrita hasta el momento para proteínas recombinantes expresadas en la leche de conejo, cabras o vacas ni en el sistema CHO. El bajo contenido de ácido siálico es común tanto en células GMGE como en leche; sin embargo, en GMGE predomina la forma N-Acetilada, mientras que en la leche la forma N-Glicolilada llega a ser el 50%. La presencia de N-glicanos de proteínas recombinantes expresadas en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras

11. Park JK, Lee YK, Lee P, Chung HJ, Kim S, Lee HG, et al. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. J Biotechnol 2006;122: 362-71.

12. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, Fernández García Y, Rodríguez MP, Cremata JA. Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. Biochim Biophys Acta 2005;1726:48-56.

13. Yuen CT, Storring PL, Tiplady RJ, Izquierdo M, Wait R, Gee CK, et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. Br J Haematol 2003;121:511-26.

14. Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. Blood 1995;86: 4097-104.

15. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1985;313:806-10.

16. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82: 7580-4.

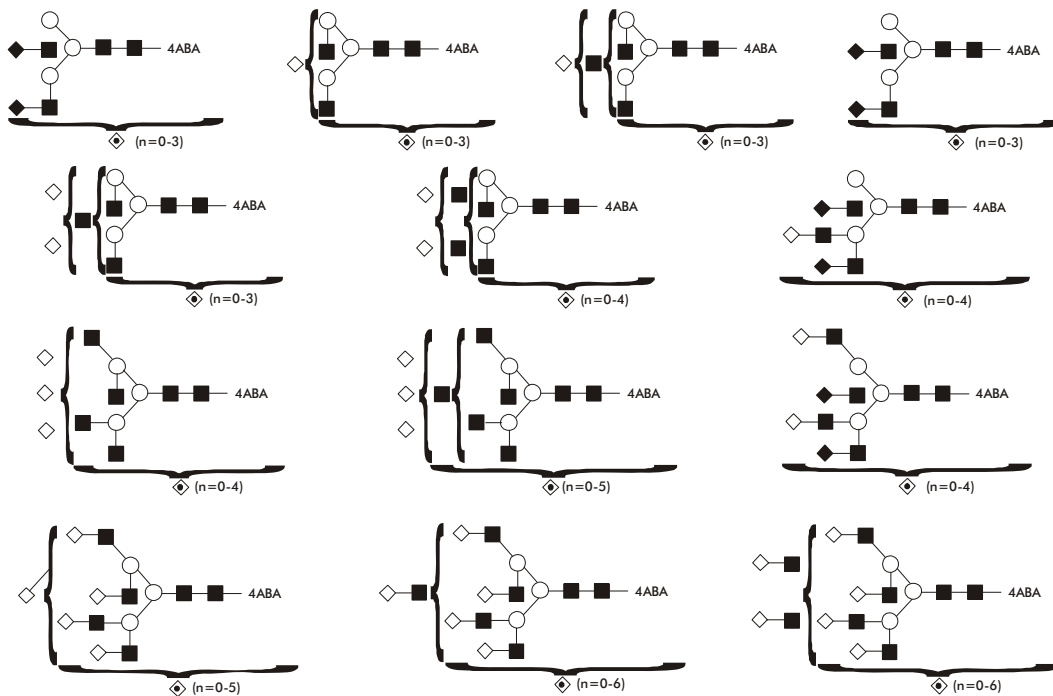


Figura 4. Representación esquemática de las posibles estructuras neutras presentes en EPOh-GMGE, deducida a partir de la composición de monosacáridos determinada por espectrometría de masas. Los símbolos utilizados son: GlcNAc, cuadrado relleno; GalNAc, rombo relleno; Man, círculo; Gal, rombo; Fuc, rombo con un punto en su interior; enlace α, línea discontinua; enlace β, línea continua; —, enlace 1-4; /, enlace 1-3; |, enlace 1-2; «n» número de residuos de Fuc, enlazados a la GlcNAc del núcleo o de las antenas

Tabla 1. Características de la N-glicosilación de la EPOh en células epiteliales de la glándula mamaria *in vitro* e *in vivo*

Estructura	EPOh-CHO	EPOh-Lc	EPOh-GMGE
Fuente	Células CHO	Leche de cabras	Línea celular GMGE no transformada de cabras
Número de antenas	Tetraténarias, tetrasialiladas	Dianténarias, monosialiladas	Di, Tri y Tetraténarias, polifucosiladas, monosialiladas
Contenido de ácido siálico	Promedio mayor de 10 mol/mol de proteína, más de 95% en forma de Neu5Ac	Promedio de menos de 1 mol/mol de proteína, en las formas Neu5Ac y Neu5Gc relación 1:1	Promedio aproximado de 6 mol/mol de proteína, más de 95% en forma de Neu5Ac
Neutras	Solo terminales tipo Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-	Abundantes terminales tipo GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc- y Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-	Abundantes terminales Gal $\alpha$ 1-4(Fuc)GlcNAc-
Cargadas	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-	Neu5Gc/Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc- y Neu5Gc/Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4(Fuc)GlcNAc-

con motivos Gal $\alpha$ (1-3)Gal pudiera ser una limitante para proteínas de interés farmacéutico por ser altamente inmunogénicos en seres humanos. Como consecuencia, la glicoproteína mostraría una altísima velocidad de eliminación del torrente sanguíneo.

#### Determinación de la actividad hematopoyética de la EPOh expresada en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras *in vivo* e *in vitro*

La actividad hematopoyética de la EPOh-GMGE y la EPOh-Lc se comparó con la de la EPOh-CHO, utilizada como referencia. La EPOh-Lc resultó ser hematopoyéticamente inactiva. La EPOh-GMGE, con menor actividad que la EPOh-CHO pero mayor que EPOh-Lc, mostró un incremento de la actividad biológica al aumentar la cantidad de hormona inyectada (Figura 5). Este resultado se corresponde con el contenido de ácido siálico, pues es bien conocido que los residuos de ácido siálico realizan una función determinante en la actividad hematopoyética de la hormona [13]. La presencia de ácido siálico en el extremo no reductor de la cadena de glicanos, previene el aclaramiento de la hormona debido a su interacción con receptores de manosa en riñones y de galactosa en hígado, lo que explica las diferencias entre las diferentes moléculas de EPOh estudiadas.

Las variaciones del patrón de glicosilación de las proteínas expresadas en la glándula mamaria *in vitro* e *in vivo* están por precisar, aunque se podrían relacionar con un mecanismo de economía celular. Durante la lactación la glándula funciona como una biofábrica que secreta una gran cantidad de proteínas al lumen de la cisterna. Por este motivo se pudiera inferir que durante la lactación existe un mecanismo de regulación de la maquinaria de glicosilación que incluye la batería de glicosiltransferasas y glicosidasas, que determinan la estructura de los glicanos enlazados a la cadena polipeptídica. Además de confirmar que la glicosilación es específica del tipo de célula, estos resultados indican que las variaciones del entorno provocan cambios apreciables en el funcionamiento de la maquinaria de glicosilación para un mismo tipo de células.

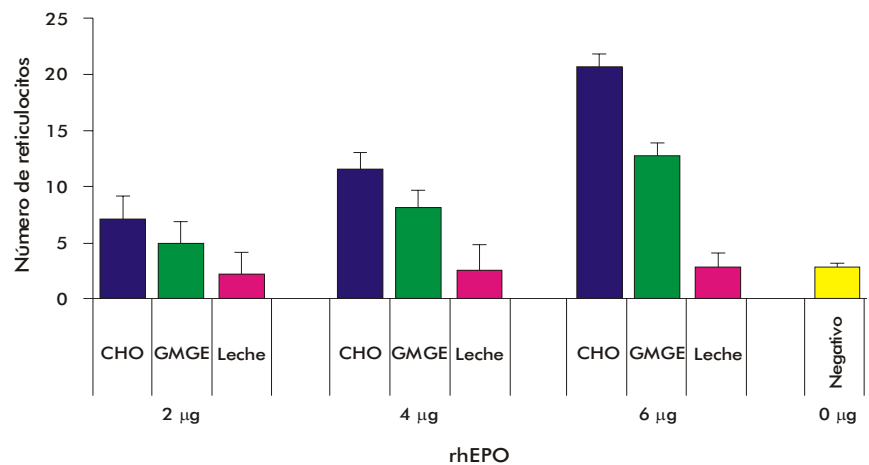


Figura 5. Actividad hematopoyética *in vivo* de la EPOh expresada en células epiteliales mamarias de cabra *in vitro* e *in vivo* EPOh-GMGE y EPOh-Lc. La actividad biológica se determinó como el incremento en el número de reticulocitos en ratones B6D2F1 inoculados con 2, 4 y 6 µg de la hormona. Después del cuarto día, se contaron los reticulocitos. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos

### Relevancia del estudio

Este trabajo aporta datos sobre las características de la N-glicosilación de glicoproteínas expresadas en células epiteliales de la glándula mamaria *in vivo* e *in vitro*, y da a conocer las potencialidades y limitaciones que desde el punto de vista de su maquinaria de glicosilación tiene la glándula mamaria para la expresión de moléculas biológicamente activas de interés farmacéutico. Por primera vez se realiza el reporte de la N-glicosilación de una proteína modelo expresada en células epiteliales de glándula mamaria de cabras, en cultivo celular y en leche.

La expresión de proteínas recombinantes en leche de cabras es un sistema atractivo por los altísimos niveles de expresión que se alcanzan (niveles sobre los 2 g/L). Conocer las particularidades de su maquinaria de glicosilación, permite seleccionar correctamente las glicoproteínas a expresar, sobre todo aquellas en que la actividad biológica no está comprometida con un patrón de glicosilación de tipo multiantenar y polisialilado.

17. Montesino R, Toledo JR, Sánchez O, Sánchez A, Harvey DJ, Royle L, et al. Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. Arch Biochem Biophys 2008;470:163-75.

18. Sánchez O, Montesino R, Toledo JR, Rodríguez E, Díaz D, Royle L, et al. The goat mammary glandular epithelial (GMGE) cell line promotes polyfucosylation and N,N'-diacetylactosediacylation of N-glycans linked to recombinant human erythropoietin. Arch Biochem Biophys 2007;464:322-34.

19. Toledo JR, Sánchez O, Montesino R, García G, Montañez M, Zamora PA, et al. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. J Biotechnol 2006;123:225-35.



Todo esto posibilita además un diseño más racional de la modificación genética de la maquinaria de glicosilación de la glándula mamaria de cabras, para obtener una glicosilación similar a la humana, que garantice los requerimientos necesarios en cuanto a estructura y función.

### Conclusiones

El estudio de la N-glicosilación de una glicoproteína modelo expresada en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras en cultivo celular (línea celular) y en el fluido (leche) de la glándula mamaria arrojó diferencias sustanciales en el patrón de glicosilación, que pudieran estar asociadas a un mecanismo de regulación de las glicosiltransferasas/glicosidasas durante la lactación.

El conocimiento de los eventos moleculares que modulan el perfil de glicofomas de las glicoproteínas que se expresan en la glándula mamaria, permite:

1. Decidir con mayor certeza si la glándula mamaria es un biorreactor apropiado para la expresión de una proteína, en particular si se conocen *a priori* los requerimientos glicosídicos relacionados con su función biológica.

2. Diseñar con mayor precisión la manipulación genética necesaria de las enzimas glicosiltransferasas/glicosidasas hacia un mayor grado de «humanización» de la glándula mamaria, que garantice la actividad biológica de las glicoproteínas recombinantes de uso farmacéutico en humanos.