



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA INFLUENZA HUMANA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Luis Ángel Cueto Bravo

TUTOR

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Fernando Esquivel (UAEM)
Dr. Baltazar Becerril (IBT-UNAM)

MÉXICO, D. F. abril , 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

La hemaglutinina (HA) es el principal factor antigénico del virus de la influenza y juega un papel importante en el diseño de vacunas preventivas contra la enfermedad causada por dicho virus. En el presente trabajo se realizó un estudio de estabilidad estructural con una vacuna basada en la hemaglutinina del virus de la influenza con el fin de determinar si la proteína es estable en diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica a las que puede encontrarse durante el proceso de producción o almacenaje. Como factor adicional se eliminó la N-glicosilación de la proteína para determinar su efecto en la estabilidad y capacidad como vacuna

Se determinó que el patrón de N-glicosilación de HA producida en células de insecto esta compuesto por estructuras ricas en manosa y paucimansa y su composición es diferente entre los subtipos H1N1 California 2009 y H3N2 Perth 2009. Dichas estructuras son típicas a las encontradas en otras glicoproteínas producidas en células de insecto pero difieren del patrón típico de N-glicosilación de HA producida en células de mamíferos.

Se observó que la proteína monoglicosilada es mas proclive a formar agregados que la proteína recombinante sometida a un aumento de temperatura. La temperatura de agregación (T_a) para la HA recombinante fue de 58°C, mientras que para HA monoglicosilada fue de 51°C. Al comparar el cambio en la energía de Gibbs de la reacción de agregación se determinó que la formación de agregados es favorable para HA

monoglicosilada a partir de los 45°C mientras para HA recombinante la reacción es favorable a partir de los 55°C.

Se observó que HA es susceptible a agregarse a pH diferentes a 6.8. A pH de 8, HA recombinante presenta una velocidad específica de agregación de 0.040 h^{-1} , la cual resultó ser la mayor en la serie de experimentos, mientras que a pH de 4 la velocidad específica de agregación fue de 0.019 h^{-1} siendo la velocidad más baja. Al calcular el cambio de la energía de Gibbs para la reacción de agregación por pH se observó que la formación de agregados no es favorable para pH de 6.8; para los pH de 3, 4, 5.7 y 8 se observó que la reacción de agregación es favorable.

Se observó que HA monoglicosilada tiende a agregarse a pH entre 3 y 8 mostrando una agregación progresiva con respecto al tiempo. Para hemaglutinina, el pH afecta la velocidad de agregación registrando el mayor efecto a pH 3 con un valor de $0.69 \mu\text{l}\cdot\text{hr}^{-1}$, mientras para pH 8 se obtuvo la menor velocidad de agregación con un valor de $0.6 \mu\text{l}\cdot\text{hr}^{-1}$. Al calcular la energía de Gibbs para el proceso de agregación por efecto de pH para HA monoglicosilada, se observa una tendencia similar a la registrada en HA recombinante, donde la reacción es más favorable a pH de 8.

Se inmunizó en ratones Balb/C con HA recombinante y monoglicosilada y se midieron los títulos de anticuerpos durante 8 semanas. Wang y colaboradores (2009) reportaron que al disminuir el tamaño de las glicosilaciones en hemaglutinina nativa aumenta la respuesta inmune. Se observó que HA monoglicosilada genera una mayor respuesta de anticuerpos que HA recombinante, llegando a ser un orden de magnitud mayor en la semana 5 de la

medición, concordando con los resusultados de Wang.

Finalmente se demostró que la N-glicosilación de HA producida en células de insecto evita la agregación de la proteína ante cambios de temperatura y pH. Bajo algunas condiciones de pH, la HA recombinante forma agregados homogéneos en forma de espinas que pueden observarse por microscopia de transmisión electrónica. Si se remueven las N-glicosilaciones de HA aumenta su capacidad para generar títulos de anticuerpos en ratones, sin embargo la estabilidad de la proteína se ve reducida. Tomando en cuenta dichos factores se puede desarrollar un protocolo de administración de la vacuna que tome en cuenta la eliminación de los N-glicanos y su pérdida de estabilidad, con el fin de aumentar la potencia de la vacuna y disminuir la cantidad necesaria para generar respuesta inmune.

1.Introducción

La influenza es causa de una enfermedad infecciosa altamente específica hacia el tipo de huésped que infecta y que provoca problemas respiratorios severos y afecta a varios tipos de aves y mamíferos, incluyendo al humano. En humanos, el virus ataca el tracto respiratorio (nariz, garganta y bronquios, y muy raramente pulmones), generando una infección que dura entre 7 y 15 días caracterizada por fiebre súbita, mialgia, dolor de cabeza y malestar severo, tos seca, garganta irritada y rinitis (WHO, 2009). La mayoría de la gente que contrae la enfermedad se recupera sin requerir de atención médica, pero en los grupos de alto riesgo (niños menores de dos años, adultos mayores de 65 años y las personas que padecen ciertas complicaciones clínicas, como son enfermedades crónicas del corazón, pulmón, hígado y riñones, además de aquellos que presentan enfermedades metabólicas como la diabetes o que debilitan el sistema inmune) puede resultar en hospitalizaciones y muerte (Ahmed et al; 2007) Las infecciones por influenza ocurren anualmente de forma estacional, presentándose en otoño e invierno en regiones de clima templado; reportándose entre 3 y 5 millones de casos por año (WHO; 2009) Además de esto, el virus de la influenza suele presentar cambios genéticos mayores en su genoma lo que puede resultar en pandemias globales con un alto costo tanto en lo económico con en

el número de decesos en la población (Hensley et al; 2010). En el siglo XX se presentaron tres brotes epidemiológicos de la enfermedad, siendo el más conocido el de la influenza española, que dejó 40 millones de muertos entre 1918 y 1919 afectando principalmente a adultos jóvenes y sanos (Subbarao y Joseph; 2007).

El virus se transmite rápidamente de persona a persona a través de partículas que excreta el huésped cuando estornuda o tose, entrando al nuevo huésped por la nariz o la garganta. Los síntomas suelen presentarse entre el primer y cuarto día después de la infección. Una persona enferma de influenza puede iniciar el proceso de infección un día posterior de desarrollar los síntomas y hasta siete días después (La Gruta et al; 2007)

El virus de la influenza es un virus de RNA de cadena sencilla negativa segmentada, envuelto en una membrana lipídica, siendo las proteínas membranales neuroaminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) los principales factores antigénicos que reconoce el sistema inmune (Lamb y Krug; 1996). NA es una glicoproteína tetramérica cuya principal función es catalizar la ruptura del enlace α glicosílico entre un ácido siálico terminal y una galactosa o galactosamina adyacente permitiendo el paso del virus a través de la mucosidad del tracto respiratorio y liberando al virión naciente de la célula infectada (Cheung y Poon; 2007) . HA es una glicoproteína trimérica que participa en el proceso de reconocimiento de la célula huésped por parte del virus y su posterior introducción al citoplasma del huésped. HA es utilizada en métodos de identificación del virus, debido a la capacidad de la proteína de aglutinar eritrocitos (Skehel y Wiley; 2002) Tanto HA como NA se han propuesto como modelos para la producción de vacunas contra la influenza, siendo HA la más utilizada por su mayor capacidad antigénica y mayor presencia en el virión con respecto a NA (4 HA por

cada NA) (Arias et al; 2009).

El virus de la influenza tiene una alta capacidad de mutación cambiando principalmente la secuencia de aminoácidos de HA y NA (Hensley et al; 2010) Esto ha provocado que las vacunas desarrolladas contra la influenza sean efectivas por tiempo limitado (Maurik et al; 2009). Aunado a esto, el virus tiene la capacidad de utilizar como huésped a varias especies de animales, lo que genera una mayor variabilidad en el virus y puede generar cepas altamente infecciosas (Arias et al;2009).

Uno de los principales retos en salud pública es evitar las infecciones masivas en poblaciones humanas. La vacunación dirigida a los grupos más vulnerables ha dado buenos resultados en el control de la influenza (WHO, 2009) Sin embargo, el proceso de producción actual de vacunas tiene largos tiempos de respuesta a nuevas cepas y el riesgo biológico intrínseco que se tiene al trabajar con virus completos. Por tal motivo se requiere de nuevas tecnologías de vacunas que permitan disminuir tales inconvenientes. En la actualidad se ha propuesto el uso de proteínas virales recombinantes como vacunas contra el virus de la influenza; destacando la hemaglutinina recombinante, ya que esta estrategia permite la obtención de vacunas altamente eficientes de forma rápida y segura (Cox y Hollister; 2009)

2. Antecedentes

2.1. Hemaglutinina del virus de la influenza.

HA es una proteína de reconocimiento celular integrada a la membrana del virus compuesta por 566 aminoácidos, un punto isoelectrico de 6.3 y un peso molecular promedio de 61 KDa. (Wang et al; 2005) Su nombre proviene de la capacidad de HA de aglutinar eritrocitos a través de su unión a los ácidos siálicos presentes en la membrana de la célula huésped. HA se presenta como un homotrímero con forma de bastón el cual esta embebido en la membrana lipídica y sobresale de esta aproximadamente 10nm. Cada virión de influenza tiene aproximadamente 500 trómeros de HA en su membrana y estas se encuentran en una

proporción de 4 a 1 respecto a la NA. (Lamb y Krug, 1996) Cada monómero de HA es sintetizado a partir del segmento 4 del genoma de RNA del virus, que da origen a un polipéptido simple conocido como HA₀, el cual es producido en el retículo endoplasmático. Posteriormente la proteína se une en trómeros y es exportada por el aparato de Golgi a la membrana celular. Al momento de la infección el trómero de HA es cortado por las proteasas del huésped para formar las subunidades HA₁ y HA₂ unidos por un enlace

disulfuro (Skehel y Wiley; 2002) Este corte resulta en un cambio conformacional que permite al virus fusionarse con las membranas endosomales en un proceso regulado por el pH. Se ha determinado que el sitio de unión de HA es altamente específico para cada especie; se une a los ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2,3$ presentes en las células epiteliales gastrointestinales de las aves (Wit et al; 2009) mientras que los virus de influenza humana se unen al ácido siálico con enlaces $\alpha 2,6$ presentes en el tejido epitelial de la tráquea (Shen et al; 2009) Sin embargo el cerdo presenta receptores $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en el tejido epitelial traqueal por lo que es un huésped que puede ser infectado con los virus de origen aviar y humano y generar por deriva antigénica un virus aviar capaz de infectar humanos (Arias et al. 2009) Uno de los principales factores que determina la unión entre HA y los receptores membranales son los patrones de N-glicosilación que adquiere la HA durante su modificación postraducciona (Reed et al; 2010). Además, se ha podido comprobar que los glicanos cerca del epitopo polipéptico interfieren con el reconocimiento de anticuerpos; mientras que los glicanos cerca del sitio proteolítico de activación de HA modulan el corte de la proteína, la selectividad e infectividad del virus de la influenza (Wang et al, 2009).

Los bastones de HA pueden ser aislados de los viriones de influenza por medio de la solubilización de la membrana con detergente. Entonces los dominios transmembranales de HA tienden a agregarse y formar estructuras homogéneas circulares denominadas rosetas (Remeta et al; 2002) No se conoce si la formación y el tamaño de las rosetas de HA es dependiente de variables ambientales como el pH, la temperatura o la fuerza iónica del medio o si dichas estructuras son estables en el tiempo o si solo se forman en presencia

del trímero de HA. El trímero de HA se extiende 13.5 nm de la membrana del virus y esta compuesto por dos regiones predominantes: la región troncal larga y fibrosa que se extiende 7.6 nm de la membrana que forma una espiral enrollada de tres cadenas conformada por α hélices y que forma parte de HA₂ (Skehel y Wiley; 2009) La segunda región es la cabeza globular la cual es derivada de los residuos de HA₁ y consiste predominantemente de hojas β -plegadas antiparalelas. Los péptidos de fusión hidrofóbicos están embebidos en el centro del trímero, aproximadamente a 3.5 nm de la membrana viral y 10 nm de la cabeza de la molécula (Skehel y Wiley; 2009) A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de HA H1N1 California 2009. En dicha secuencia se señala los fragmentos HA₁ y HA₂

H1N1 California-2009

10	20	30	40	50	60	
MKAILVLLLY	TFATANA	DTL	CIGYHANNST	DTVDTVLEKN	VTVTHSVNLL	EDKHNGKCLK
70	80	90	100	110	120	
LRGVAPLHLG	KCNIAGWILG	NPECESLSTA	SSWSYIVETP	SSDNGTCYPG	DFIDYEELRE	
130	140	150	160	170	180	
QLSSVSSFER	FEIFPKTSSW	PNHDSNKGVT	AACPHAGAKS	FYKNLIWLVK	KGNSYPKLSK	
190	200	210	220	230	240	
SYINDKGKEV	LVLWGIHHP	TSADQQSLYQ	NADTYVFGVS	SRYSKKFKPE	IAIRPKVRDQ	
250	260	270	280	290	300	
EGRMNYWTL	VEPGDKITFE	ATGNLVVPRY	AFAMERNAGS	GIIISDTPVH	DCNTTCQTPK	
310	320	330	340	350	360	
GAINSLPFQ	NIHPITIGKC	PKYVKSTKLR	LATGLRNIPS	IQRGLFGAI	AGFIEGGWTG	
370	380	390	400	410	420	
MVDGWYGYHH	QNEQSGSYAA	DLKSTQNAID	EITNKVNSVI	EKMNTQFTAV	GKEFNHLEKR	
430	440	450	460	470	480	
IENLNKKVDD	GFLDIWTYNA	ELLVLENER	TLDYHDSNVK	NLYEKVRSQL	KNNAKEIGNG	
490	500	510	520	530	540	
CFEFYHKCDN	TCMESVKNGT	YDYPKYSEEA	KLNREEIDGV	KLESTRIYQI	LAIYSTVASS	

550 560
 LVLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI

H3N2 Perth-2009

10	20	30	40	50	60
MKTIIALSYI LCLVFAQKLP GNDNSTATLC LGHHAVPNGT IVKTITNDQI EVTNATELVQ					
70	80	90	100	110	120
SSSTGEICDS	PHQILDGKNC	TLIDALLGDP	QCDGFQNKKW	DLFVERSKAY	SNCYPYDVPD
130	140	150	160	170	180
YASLRSLVAS	SGTLEFNNS	FNWTGVTQNG	TSSACIRRSK	NSFFSRLNWL	THLNFKYPAL
190	200	210	220	230	240
NVTMPNNEQF	DKLYIWGVHH	PGTDKQIFL	YAQASGRITV	STKRSQQTVS	PNIGSRPRVR
250	260	270	280	290	300
NIPSRISIIYW	TIVKPGDILL	INSTGNLIAP	RGYFKIRSGK	SSIMRSDAPI	GKCNSECITP
310	320	330	340	350	360
NGSIPNDKPF	QNVNRITYGA	CPRYVKQNTL	KLATGMRNVP	EKQTRGIFGA	IAGFIENGWE
370	380	390	400	410	420
GMVDGWYGFR	HQNSEGRGQA	ADLKSTQAAI	DQINGKLNRL	IGKTNEKFHQ	IEKEFSEVEG
430	440	450	460	470	480
RIQDLEKYVE	DTKIDLWSYN	AELLVALENQ	HTIDLTDSEM	NKLFEKTKKQ	LRENAEDMGN
490	500	510	520	530	540
GCFKIYHKCD	NACIGSIRNG	TYDHDVYRDE	ALNNRFQIKG	VELKSGYKDW	ILWISFAISC
550	560				
FLLCVALLGF	IMWACQKGNL	RCNICI			

Figura 2.1. Secuencia de aminoácidos presente en HA de la influenza H1N1 California-2009 y H3N2 Perth-2009. En amarillo se muestra el péptido señal, en verde el fragmento HA₁ y en rojo el fragmento de HA₂ (Obtenida de UniProt; 2012)

HA muestra N-glicosilaciones en su superficie lateral, además de en una en las

subunidades globulares en la parte superior de la estructura que parece estabilizar los contactos oligoméricos entre las diferentes subunidades, así mismo la ausencia o presencia de un sitio de N-glicosilación cerca del sitio de corte proteolítico de HA regula la capacidad infectiva del virus de la influenza (Deshpande et al; 1987).

Tanto la región globular como la región troncal de HA están glicosiladas, afectando las propiedades funcionales de la proteína. Entre los diferentes subtipos de HA, existe una gran variación en los sitios de N-glicosilación de la región globular, al contrario de la glicosilación en la región troncal, la cual es más conservada y se requiere para la actividad de fusión.

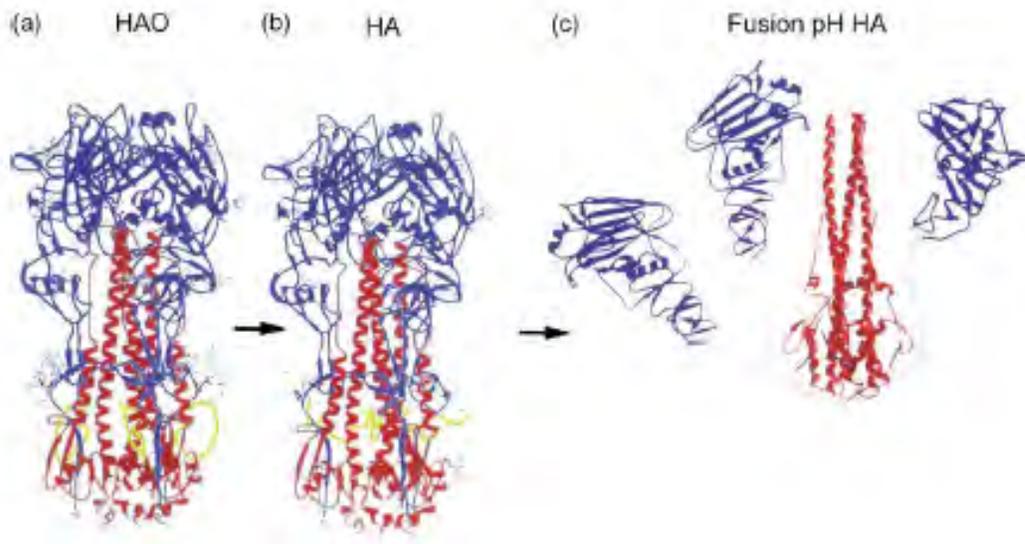


Figura 2.2 Esquema de la hemaglutinina. Se muestra el trímero : a) sin activar HA₀, b) después del corte proteolítico, c) exponiendo el sitio de fusión después del cambio conformacional debido al pH ácido. En rojo se muestra el fragmento HA₁, en azul el fragmento HA₂ y en amarillo la región que une los dos fragmentos por un puente disulfuro. (Tomado de Skehel y Wiley; 2002)

Stevens et al (2006) determinaron que HA esta normalmente glicosilado en tres sitios por monómero, lo que daría un maximo de entre 3 y 9 sitios ocupados en el trímero de HA dependiendo de su serotipo. Stevens; et al (2006) observaron que las secuencias de aminoácidos alrededor de la zona de glicosilación están altamente conservadas, lo que sugiere que las glicosilaciones son importantes. Wang; et al (2009) observaron que los patrones de glicosilación en HA también determinan la afinidad y la especificidad del virus, así como la respuesta inmune ante HA. Wang et al; observaron que mientras menos ramificados son los glicanos unidos a HA, la afinidad por el huésped aumenta mientras que la especificidad se ve disminuida y comprobaron que al reducir el tamaño de la N-glicosilación a la mínima requerida para el plegamiento y estabilización de HA se aumenta la capacidad inmunogénica de la proteína. (Wang et al, 2009)

2.2 Vacunas contra la influenza. Estado del arte y nuevas tecnologías

La tecnología actual de producción de vacunas contra la influenza utiliza huevos de gallina embrionarios. Los viriones se cosechan del fluido alantóico del huevo para ser desactivados químicamente por tratamiento con detergente. Posteriormente puede utilizarse el virus desactivado o en el caso de vacunas compuestas de subunidades, se purifican parcialmente las proteínas de la membrana con especial énfasis en HA y NA (Cox

y Hollister; 2009) El sistema de producción por huevos de gallina ha sido utilizado por 50 años y se encuentra bien caracterizado y se han encontrado dificultades en la producción de vacunas contra el virus de la influenza dentro de las que destaca:

- Falta de homogeneidad en la producción.
- La dificultad de purificación de la proteína.
- La probabilidad de tener componentes que provoquen una reacción alérgica.
- La utilización de una fase de desactivación con solventes orgánicos.
- Dependencia a la cantidad de huevos disponibles para el proceso.
- La existencia de virus de la influenza que no pueden ser producidos en huevos, puesto que provocan la muerte del embrión antes que se pueda replicar el virus.
(Cox y Hollister; 2009)

Estos factores resultan en procesos poco homogéneos en calidad y productividad. Dichas desventajas son especialmente críticas en situaciones en las que se requieren grandes cantidades de vacunas en poco tiempo. (Cox y Hollister; 2009)

Se ha propuesto como alternativa al proceso de huevos de gallina, la producción de proteínas recombinantes utilizando diversos sistemas de expresión. Se ha observado que la principal respuesta inmunológica del huésped contra el virus de la influenza se da al reconocer a la HA en la membrana de la cápside. Por tal motivo, se ha comprobado que sólo se requiere la presencia de HA para generar protección en el paciente, facilitando el proceso de producción a la expresión de una sola proteína en vez del virus completo(Cox y

Hollister, 2009). Flublok® es una vacuna basada en HA recombinante trivalente (presenta HA de tres cepas diferentes) expresada en células de insecto que fue aprobada en 2013 por la FDA. Las HA recombinantes en la vacuna se producen en líneas celulares continuas no transformadas y no tumorigénicas crecidas en medio libre de suero derivadas de la células Sf9 obtenidas de *Spodoptera frugiperda* (Wang et al; 2006)

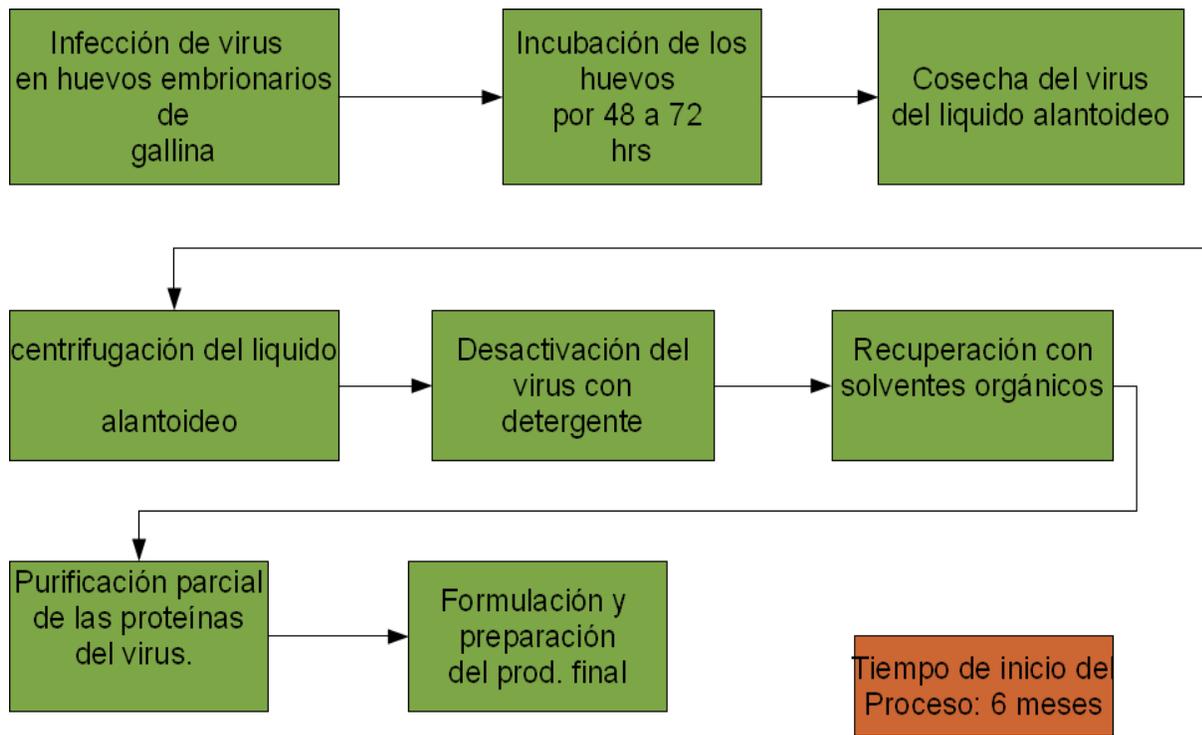


Figura 2.3 Diagrama de flujo del proceso de producción de vacunas en huevo de gallina. El proceso requiere 6 meses para producir una nueva vacuna desde que una nueva cepa del virus es identificada. (Cox y Hollister; 2009)

Cada una de las tres HA es expresada en la línea celular de insecto utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus. Del cultivo en reactor se obtienen las proteínas en su conformación nativa formando trímeros. Posteriormente la proteína pasa por un tren de purificación basado en una combinación de métodos de filtración y columnas cromatográficas (Cox y Hollister, 2009).

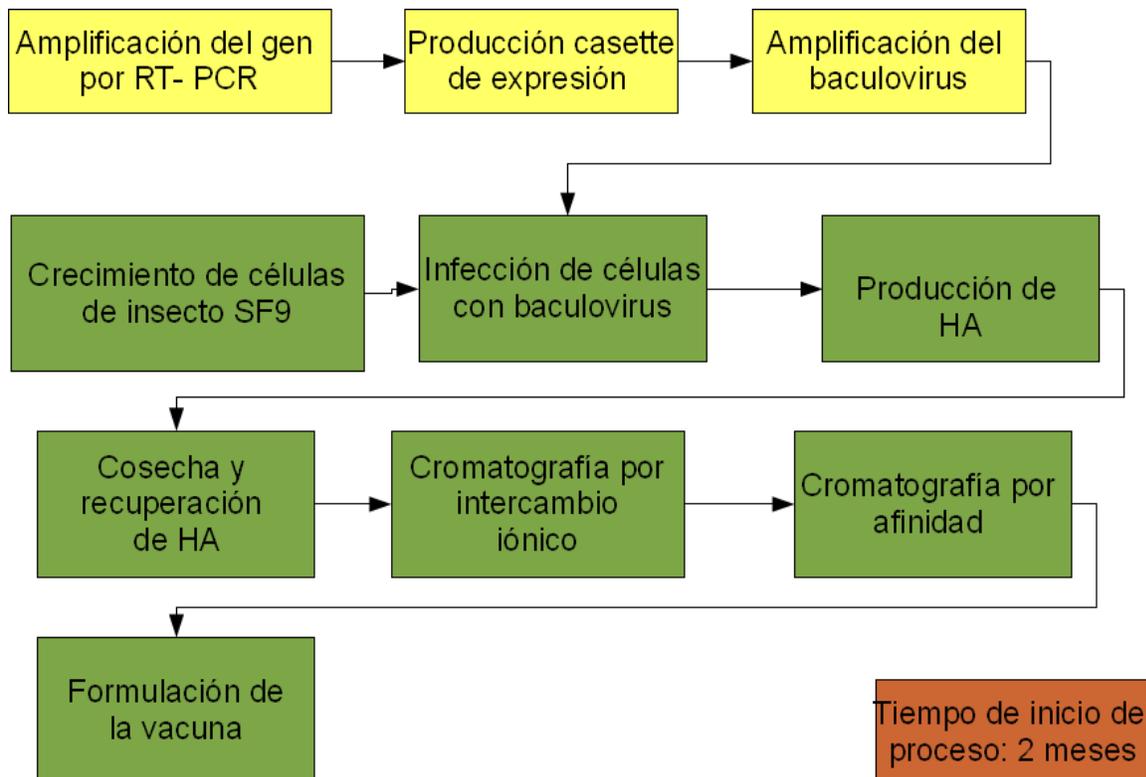


Figura 2.4. Diagrama de flujo del proceso de producción de vacunas basadas en HA recombinante. El proceso requiere 2 meses para producir una vacuna funcional desde que una nueva cepa de virus es identificada (Cox y Hollister; 2009)

El proceso de manufactura de HA recombinante en células de insecto ofrece varias

ventajas comparativas sobre las actuales tecnologías de producción de vacunas de influenza (Cox y Hollister; 2009)

1) Los antígenos de HA son producidos utilizando un sistema escalable y reproducible, resultando en una vacuna basada en proteína consistente y con bajo contenido de endotoxinas.

2) No se requiere la selección o adaptación de las cepas del virus de influenza para su producción a altos niveles en huevos, permitiendo un buen ajuste genético entre las cepas utilizadas en la vacuna y las causantes del contagio.

3) La expresión, clonación y manufactura de las vacunas se realiza en un corto periodo de tiempo, generalmente menor a los dos meses.

4) La manufactura de las vacunas no requieren un alto nivel de instalaciones biocontenedoras, lo que resulta en un menor costo de la vacuna contra la influenza.

5) Los procedimientos de purificación para la HA no incluyen la inactivación extracción orgánica, lo que evita la desnaturalización de la proteína y provee un mayor nivel de seguridad debido a la ausencia de residuos tóxicos en la vacuna. El producto final se encuentra libre de ovalbumina u otras proteínas antigénicas presentes en huevos; siendo destacable la independencia del proceso de suero fetal bovino u otro ingrediente derivado de animales, reduciendo significativamente la oportunidad de introducir agentes extraños durante la manufactura.

6) La distancia genética entre los insectos y los vertebrados reduce la capacidad de las células de insecto de servir como huéspedes para los virus de vertebrados.

7) El hecho de utilizar una sola proteína del virón evita generar resistencia o mutaciones en el virus que sean difíciles de controlar (Cox y Hollister, 2009).

Se sabe que HA recombinante tiene una buena capacidad antigénica y que es capaz de realizar hemaglutinación, demostrando (Wang et al., 2005) La formulación de Flubok contiene tres veces más HA en comparación con las vacunas producidas en huevo de gallina y es estable en refrigeración (Cox y Hollister, 2009) lo que aumentará el título de anticuerpos contra HA en el huésped.

2.3 N-glicosilación

La N-glicosilación es una modificación post y co-traducciona l que en muchos casos es requerida para una adecuada actividad proteica y para características farmacológicas deseables.

A diferencia de la estructura primaria de aminoácidos que es determinada por el código genético, los patrones de glicosilación no están basados en plantillas y varían dependiendo de la célula huésped y de la misma proteína (Palomares et al; 2004) Incluso células de diferentes tejidos pertenecientes a un mismo organismo generan patrones de glicosilación distintos. Aunado a esto, distintas condiciones de cultivo como el medio, el pH, el oxígeno disuelto y el mezclado pueden afectar la glicosilación en la proteína (Palomares y Ramírez; 2002) La N-glicosilación es un proceso que afecta un alto número de funciones en los seres vivos y en los virus, como puede ser el reconocimiento endógeno, vida media en el torrente sanguíneo de las proteínas, reconocimiento exógeno, el correcto plegamiento de la proteína, estabilidad, solubilidad, funcionalidad, entre otros (Palomares

et al; 2004) La modificación ocurre cuando un carbohidrato se une con un enlace N-glicosídico al aminoácido asparagina. La unión de carbohidratos a la proteína requiere la presencia de una secuencia “consenso”, formada por la asparagina, seguida por un aminoácido X (no prolina) y una serina o treonina. (Palomares et al; 2004) Es importante aclarar que no hay una glicosilación por cada secuencia “consenso” y que incluso el número de Asn glicosiladas es menor al que se podría esperar con base en estudio de la cadena polipeptídica.

Deshpande et al; (1987) determinaron que la presencia de la N-glicosilación de la Asp 11 en HA de H5N2 modifica la infectividad y selectividad del virus de la influenza. La presencia de la N-glicosilación favorece las interacciones con los receptores del huésped en la configuración $\alpha 2,3$ de los ácidos siálicos; mientras la ausencia de N-glicosilación en la Asp 11 favorece la interacción de HA con los receptores del huésped en la configuración $\alpha 2,6$ de sus ácidos siálicos. Según Deshpande et al; la diferencia se debe a que la N-glicosilación de Asp 11 afecta el corte proteolítico de HA afectando la capacidad de HA de unirse a los receptores del huésped. Wang et al; (2009) Demostraron que el patrón de N-glicosilación en la región globular de HA afecta la capacidad infectiva y la selectividad del virus de la influenza. Cuando la HA del virus de la influenza presenta las glicosilaciones mínimas para el correcto plegamiento de HA, la capacidad infectiva del virus de la influenza aumenta y su selectividad disminuye.

Wanzeck et al; (2011) Demostraron que diferencias en el patrón de N-glicosilación en la HA utilizada como vacuna, modifica la protección conferida a ratones contra diferentes cepas del virus de la influenza. Los ratones inmunizados con una HA con la menor cantidad

de N-glicosilación presentaron protección contra las variedades del virus de la influenza, tanto las que contaban con HA pocos sitios de N-glicosilación como aquellas variedades del virus que tiene HA con una mayor cantidad de sitios de N-glicosilación. Sin embargo los ratones vacunados con HA con una mayor cantidad de N-glicosilaciones, solo presentaron protección contra virus de la influenza cuya HA esta altamente N-glicosilada. Lo que indica que la cantidad de N-glicosilaciones en HA afecta la respuesta inmunológica y la protección conferida al paciente contra el virus de la influenza.

2.4 Agregación de proteínas

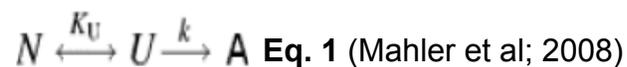
El termino agregación de proteínas ha recibido un gran número de definiciones y términos en la literatura. Mahler et al; (2008) definen la agregación de proteínas como “ la suma de las especies proteicas de un peso molecular mayor como oligómeros o multímeros en lugar de las especies definidas como deseadas. Los agregados son el termino universal para designar todos los tipos de especies multiméricas no definidas que son formadas por enlaces covalentes o interacciones no covalentes. ” (Mahler et al. 2008) En cambio Narhi et al; (2012) afirman que es difícil clasificar a los agregados y que cada grupo define los parámetros de lo que llama agregados sin que estos puedan llegar a ser extrapolables entre los diferentes grupos de investigación puesto que el proceso de agregación puede definirse como “una reacción donde la proteína se esta asociando consigo misma”. En el presente trabajo se definirá como agregado de HA toda aquella partícula que presente un tamaño mayor al trímero. Este tamaño debe ser caracterizado para cada técnica y en función de si la proteína se encuentra glicosilada o no.

El proceso de agregación ocurre a través de diferentes mecanismos que pueden generar la formación de distintos tipos de partículas, puesto que no existe una sola ruta que llegue a un solo estado final. Una proteína puede seguir diferentes rutas de agregación dependiendo de las condiciones ambientales, incluyendo diferentes tipos de estrés. Además, el estado inicial de la proteína que es susceptible a agregación puede cambiar. Esta puede estar constituida por la estructura nativa, una estructura degradada o químicamente modificada o si se encuentra parcial o totalmente desplegada. Es el caso de las proteínas que tienen efecto en diversas enfermedades como las encefalopatías espongiiformes y el Parkinson comúnmente denominadas enfermedades de proteína mal plegada (PMD por sus siglas en inglés) (Narhi et al; 2012)

El proceso de agregación de una proteína puede resultar en estructuras solubles y/o insolubles en el mismo proceso. La morfología de los agregados suele ser amorfa o fibrilar la cual es dependiente de la proteína y del ambiente. Los agregados no covalentes suelen formarse por la interacción de fuerzas débiles como las interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, mientras los agregados covalentes suelen formarse vía puentes disulfuro debido a grupos tiol libres o por vía de entrecruzamiento como la formación de ditirosinas (Mahler et al; 2008) Los agregados pueden ser tanto reversibles como irreversibles, siendo los agregados reversibles normalmente generados por el auto-ensamblaje de la proteína que puede ser inducido por el pH o la fuerza iónica en la solución de la proteína (Mahler et al; 2008).

Uno de los modelos que se han aplicado para describir la agregación irreversible de proteínas es el de “dos estados de Lumry-Eyring” el cual propone que la proteína nativa

primero sufre un cambio conformacional reversible a un estado susceptible a agregación el cual subsecuentemente llega al estado de agregación irreversible (Mahler et al; 2008) En este modelo la agregación de proteínas esta controlada por mecanismos conformacionales y coloidales. En la ecuación 1 se presenta la ecuación de Lumry-Eyring donde se relaciona el equilibrio de la proteína entre los estados nativo (N), desplegado (U) y agregado (A). Para la transición entre la proteína nativa y la desplegada es fenómeno reversible, mientras que la formación de proteína agregada partiendo de la proteína desplegada es un proceso irreversible.



En muchos casos, la agregación puede describirse como un proceso de polimerización parecido al de nucleación-propagación de los cristales. Es decir, la formación de un agregado sirve como núcleo o “semilla “ para el crecimiento de agregados.

Mahler et al; (2008) proponen la clasificación de agregados de proteínas en los siguientes grupos basados en sus características:

- a) Por tipo de enlace:** Agregados no covalentes y agregados covalentes
- b) Por reversibilidad:** Agregados reversibles y agregados irreversibles
- c) Por tamaño:** Agregados pequeños y solubles como dímeros, trímeros, tetrámeros, etc; agregados grandes solubles mayores a 10 oligómeros, agregados con un diámetro entre 20 nm y 1µm y agregados grandes insolubles visibles.
- d) Por la conformación de la proteína:** agregados con estructura nativa predominante

agregados con estructura predominantemente no nativa (parcialmente desplegada, o fibrilar.)

Mientras tanto Narhi et al; (2012) proponen la siguiente clasificación para los agregados de proteínas:

a) Tamaño: Clasifica los agregados por tamaño: mayores a $100\mu\text{m}$, entre 1 y $100\mu\text{m}$, entre 100 y 1000nm y menores de 100nm . Propone esta escala para evitar el uso de terminos subjetivos como visible y no visible o soluble o no soluble.

b) Reversibilidad de la reacción: Narhi et al; proponen la división entre agregados reversibles, aquellos que están en equilibrio con su fase nativa; y los agregados disociables, aquellos que al variar las condiciones del medio se puede recuperar la fase nativa. Se propone además que dentro de la clasificación se indique el tiempo en que la reacción llevo al equilibrio y las condiciones en que ocurrió la disociación (pH, temperatura, cambio de buffer, iones entre otros)

c) Tipo de estructura secundaria o terciaria: Propone el uso de los términos nativa (para agregados que conservan la estructura secundaria/terciaria de la proteína nativa) parcialmente desplegada (el cambio de estructura es visible sin importar el método, sin embargo la proteína aún conserva parte de su estructura nativa), desplegada (estructura similar a la obtenida al desnaturalizar la forma nativa con 6M de guanidina), mal plegada (La proteína tiene un cambio completo de estructura en comparación de la forma nativa, por ejemplo formación de hojas β cuando normalmente esta compuesto por hélices α), inherentemente desordenadas (para proteínas cuyo estructura es similar a la sinucleína, a

las β -amiloides u otras proteínas desordenadas que no muestran el patrón de una proteína amiloide) y amiloide (aquellas en que se encuentra un patrón de cruz- β de entre 45 Å y 1 nm de difracción).

d) Modificaciones covalentes: Los aminoácidos de la proteína pueden tener modificaciones que promuevan la agregación, como el entrecruzamiento o la modificación de sus residuos. Dentro de dichas modificaciones, la formación de puentes disulfuro de la cisteína, la oxidación de metionina y cisteína así como la desaminación tienen un papel importante en la formación de agregados.

e) Morfología: Al caracterizar la forma física de los agregados se puede obtener información sobre el mecanismo de reacción, así mismo como distinguir entre estructuras típicas encontradas en la solución (rastros del proceso de producción o purificación) y los agregados de la proteína. Cuando se discrimina por razón de aspecto se debe evaluar que tan cercana es la proteína a una forma geométrica buscando poder clasificar la formación de agregado de acuerdo a la estructura. Por ejemplo HA tiende a formar agregados tipo estrella o roseta. También se propone el uso de las propiedades ópticas como el índice de refracción y la transparencia de la muestra. Así mismo se propone la clasificación de agregados homogéneos si están compuestos de una misma proteína, mientras que los agregados heterogéneos son aquellos que se componen de varias proteínas o de algún otro compuesto. Además se puede clasificar a los agregados de acuerdo al número de subunidades del que esta compuesto (Narhi et al; 2012)

De esta forma se presenta una panorama amplio de la clasificación de agregados. La agrupación de agregados es difícil debido a que en la actualidad existen dos grandes

vertientes de investigación, una enfocada en el proceso de agregación durante el proceso de producción y purificación de la proteína y la otra en las enfermedades ocasionadas por proteínas mal plegadas que tienden a agregarse. Las características útiles para un grupo no suelen serlo para el otro, por lo que es difícil tener una clasificación única. Dentro de la presente tesis se clasificará los agregados de acuerdo al tamaño en relación al trímero, así mismo se buscará determinar la reversibilidad del agregado con el objetivo de clasificación y caracterización.

La agregación puede ser inducida por una gran variedad de condiciones, incluyendo temperatura, estrés mecánico como agitación, bombeo y por la formulación en que esté suspendida la proteína. A continuación se describen de forma general la forma en que se genera los agregados bajo distintas condiciones.

2.4.1 Temperatura

Un incremento de la temperatura acelera las reacciones químicas como la oxidación y la desaminación de las proteínas que pueden llevar a un alto nivel de agregados. Altas temperaturas tienen efecto directo en la conformación de la cadena peptídica a nivel de estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria y puede generar un desplegamiento inducido por temperatura que promueva la agregación. (Vazquez-Rey and Lang; 2011) Una medida de la estabilidad térmica de la proteína es la temperatura de fusión (T_m) la cual se define como la temperatura a la que el 50% de la proteína se encuentra desplegada durante la transición de desplegamiento térmico (Cirkovas and Sereikaite; 2011) Las T_m varían entre

proteínas y se encuentran usualmente en un rango entre los 40° y 80°C. Uno de los principales retos con el análisis de agregación es generado por el hecho que la agregación no sigue un comportamiento de Arrhenius por lo que es difícil extrapolar los resultados para predecir agregación a temperaturas menores a las que se hicieron las mediciones (Weiss et al: 2008) Al disminuir la temperatura se pueden promover la formación de cambios físicos y químicos que incluyen la creación de interfases hielo/solución, adsorción en las superficies del contenedor, crioconcentración de la proteína y de los solutos como sales que pueden conllevar a cambios en el pH. La tasa de congelamiento y el método también influyen la tasa de agregación de proteínas (Vazquez-Rey and Lang; 2011)

2.4.2 Concentración de proteína

El incremento en la concentración de proteína ha sido reportado por Mahler et al; (2008) como un promotor de la formación de agregados proteicos durante el almacenamiento. La formación de agregados depende directamente de las interacciones entre las moléculas de la proteína, por lo que al haber una mayor probabilidad de encontrarse e interactuar, aumenta la probabilidad de agregación (Narhi et al; 2012, Mahler et al; 2008) A altas concentraciones de proteína ocurre el amontonamiento macromolecular, el cual es un término que describe el efecto de un alto volumen ocupado por solutos macromoleculares. De acuerdo con esta teoría, a mayor volumen ocupado por macromoléculas el auto-ensamblaje y la agregación se ven favorecidos, pero al mismo tiempo el desplegamiento de la proteína, el cual suele ser necesario para muchas reacciones de agregación se ve reducido. Al mismo tiempo, un incremento de la concentración de proteína incrementa el tamaño de agregados. Sin embargo una disminución en la concentración de la proteína por

medio de dilución afecta el contenido de agregados formados por interacciones débiles reversibles, provocando una disminución de agregados conforme la proteína se va diluyendo. (Mahler et al; 2008)

2.4.3. Efecto de la solución y de la superficie

Cambios en el ambiente en el que se encuentra la proteína, como el pH, la fuerza iónica, el tipo de buffer, los excipientes y el material en que esta almacenada pueden inducir la formación de agregados de proteína (Majumdar et al, 2011) Un cambio en el pH tiene una fuerte influencia en la tasa de agregación debido al que el pH determina las interacciones electrostáticas a través de la distribución de carga de la superficie de la proteína (Salvatore et al; 2011) La ruptura de la cadena peptídica puede ocurrir bajo condiciones ácidas mientras que en condiciones alcalinas la deaminación y la oxidación se ven favorecidas. Dichas modificaciones dependen de la secuencia primaria así mismo como de la estructura de la proteína y puede generar un incremento de la agregación. De igual forma se han observado diferentes comportamientos de agregación con diferentes buffer a un mismo pH (Mahler et al, 2008) La cantidad de excipientes en el solvente puede impactar el comportamiento de agregación. La habilidad de surfactantes como los polisorbatos de estabilizar a la proteína contra la agregación depende de la razón de proteína por surfactante, por lo que un cambio en la concentración de excipiente/estabilizador puede tener una alta influencia en la formación de agregados (Vazquez-Rey and Lang; 2011) Además, materiales de contacto como el vidrio, acero, silicona, plástico, goma entre otros puede influenciar la agregación (Mahler et al; 2008)

2.4.4 Modificaciones químicas de la proteínas

Las reacciones de agregación pueden ocurrir después de una modificación química de la proteína. Las modificaciones químicas pueden incluir reacciones de desaminación isomerización, hidrólisis, oxidación y desglicosilación (Wang; 2009) Las modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos como la desaminación o la isomerización pueden distorsionar la conformación nativa de la proteína generando agregación y auto-asociación (Zhang et al; 2002) Las reacciones de oxidación como la formación de enlaces disulfuro o la oxidación de metioninas pueden presentarse cuando la proteína es expuesta a la luz, a contaminación por peróxidos, o simplemente por la presencia de oxígeno en el medio. La exposición a la luz puede generar degradación fotolítica de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos como Met, Tyr, Trp, His, Cys y Phe y se ha observado que induce la agregación de proteínas. La temperatura y la presencia de contaminantes puede generar la degradación de los glicanos unidos a la proteína, lo cual promueve el desplegamiento y la agregación de la proteína. (Narhi et al; 2011)

2.5 Cualidades clave en la capacidad inmunogénica de una vacuna.

Uno de los mayores retos al que se enfrentan los investigadores en vacunas es el como maximizar la capacidad inmunogénica sin comprometer la seguridad y tolerancia del paciente. Una forma de enfrentar este reto es diseñar vacunas que eliminen el factor patogénico del inmunógeno y conserve su tamaño, la forma y la estabilidad (Bachmann y Jennings; 2010)

El tamaño de los antígenos varia enormemente. El tamaño de partícula puede variar desde menos de 10nm (proteínas y subunidades virales) hasta tamaños cercanos a los 20

µm como las vacunas de células completas con coadyuvantes (Singh et al; 2007) El mecanismo de inducción de respuesta de las células T por medio de células presentadoras de antígeno (APC) depende específicamente de las células dendríticas y de macrófagos que son células altamente especializadas en atrapar y procesar el antígeno. El tráfico del antígeno por los nodos linfáticos, su captura por las células dendríticas y su maduración para generar una fuerte respuesta inmunológica son procesos altamente dependientes del tamaño del antígeno (Ahsan et al; 2002) Ciertos antígenos como las vacunas de célula completa, virosomas, las partículas pseudovirales y los antígenos formulados en adyuvantes particulares como liposomas o micropartículas tienen superficies grandes que se encuentran electrostáticamente cargadas, que cuentan con propiedades hidrofóbicas o de interacción con receptor (Bachmann y Jennings; 2010) Esto genera una mejor interacción de las APC de estas partículas con respecto a las proteínas solubles. Muchos patógenos cuentan en su superficie con estructuras altamente repetidas que permiten una unión eficiente de anticuerpos por medio de interacciones altamente ávidas, permitiendo el reclutamiento y activación de otros componentes que desencadenan la vía clásica de la cascada de complemento (Bottazzi et al. 2010) Las regiones hidrofóbicas en el antígeno estimulan el sistema inmune innato al activar la vía de la cascada de complemento resultando en un aumento de captura del antígeno por las APC. Lo anterior permite explicar el porqué una proteína desnaturalizada que presenta sitios hidrofóbicos expuestos genera una potente respuesta de las células T y B. En resumen, las partículas patógenas y los agregados proteicos son normalmente capturados por las APC y presentados de una forma más eficiente que los antígenos pequeños como proteínas sin agregar (Kovacsovics-Bankowski et al; 1993)

Posterior a la captura por las APC, el antígeno debe ser llevado a los compartimientos lisosomales donde serán degradados en péptidos. Estos péptidos serán posteriormente cargados en moléculas de MHC tipo II y serán transportadas a la superficie celular para la estimulación de las células T colaboradoras. Los antígenos de proteínas solubles son usualmente presentados de forma ineficiente, pero los antígenos cuyo tamaño de partícula es similar o mayor al de los virus activan de forma eficiente la vía de MHC tipo I sin necesidad de replicación intracelular (Batchman y Lennings; 2010)

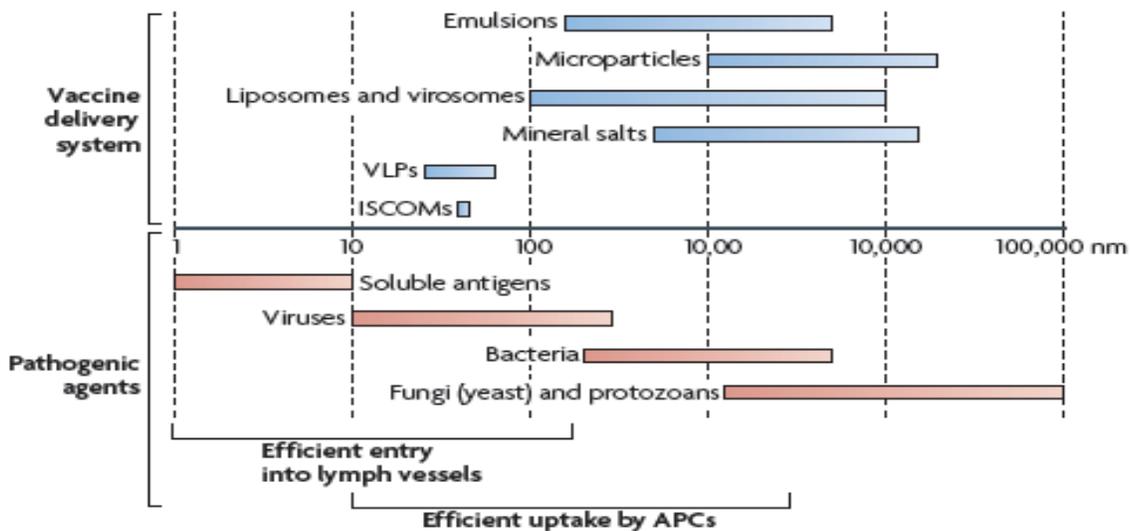


Figura 2.5 Comparación del tamaño de los sistemas de vacunas y los agentes patogénicos. Se indica el tamaño donde se da la máxima eficiencia de transporte por los vesículas linfáticas y de captura por las APC. (Tomado de Bachmann y Jennings; 2010)

Del mismo modo, la presentación de los péptidos derivados de antígenos grandes ocurre mucho más rápido que la presentación cruzada de los péptidos derivados de antígenos de

proteína soluble, teniendo una eficiencia similar en la presentación de los péptidos en la vía de MHC tipo II. (Harding et al. 1994, Storni y Bachmann; 2004).

Durante el procesamiento intracelular de antígenos, la dinámica de desplegamiento de proteínas es crucial. La estabilidad conformacional del antígeno proteico es importante al momento de determinar la respuesta inmune. Takatoshi et al; (2010) observaron que la activación de la respuesta de las células T y la respuesta inmune están controladas por el grado de la estabilidad conformacional de la proteína. Takatoshi y colaboradores (2010) demostraron que la producción de IgG esta directamente correlacionada con la estabilidad conformacional del antígeno, ya que una estructura altamente estable tiene una menor capacidad de producir una respuesta inmune adecuada.

3. Justificación

La producción de HA recombinante en células de insectos permite obtener una proteína homogénea con un sistema de producción más rápido y sencillo que el tradicional. Esto ha permitido que se proponga su uso como alternativa de vacuna contra las infecciones del virus de la influenza. Sin embargo su patrón de N-glicosilación pueden afectar la formación de agregados de HA y su estabilidad. Se desconoce si HA recombinante se ensambla en formas diferentes a los trímeros al variar las condiciones ambientales y diferentes patrones de N-glicosilación. De acuerdo a Wang et al; (2009) y Wanzeck et al (2011) es viable utilizar HA sin N-glicosilaciones para su uso como vacuna, sin embargo no se conoce si puede traer consecuencias la estabilidad de la vacuna final y que tanto repercute la eliminación de glicanos en el aumento de anticuerpos en el paciente. Se desconoce si la relación inmunogenicidad/estabilidad puede ser un factor a considerar al momento de diseñar la vacuna con el fin de generar una mayor protección a un menor costo y consumo del producto.

Finalmente se desea determinar la estabilidad de HA a diferentes condiciones físico-químicas lo cual permitirá predecir su comportamiento una vez que se encuentre como producto final. Se puede determinar su caducidad, las condiciones de almacenamiento y si sufrirá algún tipo de modificación al ser inyectada en el paciente.

4.Hipótesis

La estabilidad de la vacuna para la influenza a diferentes condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica se ve afectada por el patrón de N-glicosilación de HA recombinante.

5.Objetivo general

Caracterizar el patrón de N-glicosilación de HA recombinante del virus de la influenza y determinar su efecto en la estabilidad y capacidad inmunogénica de la vacuna contra la influenza.

5.1 Objetivos específicos.

1. Determinar el patrón de N-glicosilación de la HA recombinante producida en células de insecto

- √¹ Porcentaje del peso que es glicano

- √¹ Análisis de los sitios potenciales para la N-glicosilación

- √¹ Tipo de glicanos y su composición en la proteína

2. Determinar la estructura cuaternaria que forma HA recombinante sometida a diferentes condiciones

- √¹ Caracterizar la formación de agregados y determinar si alguno presenta una morfología homogénea que permita su clasificación.

3. Determinar la estabilidad de la HA recombinante sometida a diferentes condiciones ambientales.

√¹ Caracterizar la curva de desnaturalización variando la temperatura y pH para determinar los límites máximos y mínimos que soporta la proteína recombinante

√¹ Calcular las constantes de desnaturalización

4. Evaluar el papel de la N-glicosilación en la estructuras de la HA y su estabilidad a diferentes condiciones.

√¹ Evaluar la estabilidad a diferentes pH y temperaturas

5. Determinar el papel de las características de la HA recombinante en su eficiencia como inmunógeno.

√¹ Pruebas de inmunogenicidad en ratones.

6. Materiales y Métodos

6.1 Hemaglutinina recombinante del virus de la influenza (HA)

Las proteínas HA producidas en células SF+ de las cepas H1N1 California 2009 45-10017, H3N2 Perth 2009 4510013 y H5N1 Malaysia 4507015 fueron proporcionadas por la compañía Protein Sciences Corporation. Las proteínas purificadas estaban en viales de 500µl en buffer 10mM de fosfatos, 150mM de NaCl a pH 7 con 0.001% volumen de Tween 20. El vial con HA proveniente de H1N1 tuvo una concentración de 622 µg/ml, la concentración de HA de H3N2 fue 638 µg/ml y de H5N1 fue de 650µg/ml. Los viales se almacenaron a 4°C.

6.2 Determinación del peso molecular de HA

Se determinó el peso molecular de HA utilizando la técnica de electroforesis en un gel siguiendo la metodología reportada por Sambrook et al; (1989) concentrador al 4% de poliacrilamida y un gel de corrida al 12% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se cargó 5 µg de proteína por carril, diluida en 10 µl de buffer reductor (0.25M Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 20% glicerol, 2-mercapto-etanol, azul de bromofenol) La corrida duró 90 minutos a un voltaje constante de 100V. Se utilizó el marcador de peso molecular Bench Mark en el carril 1 de los geles. Posterior a la corrida, los geles se tiñieron con solución de azul de Coomassie por 30 min, siendo el exceso de colorante removido con una solución de ácido acético al 10%. Se utilizó el equipo ChemiDoc RS+ de BioRad y el

software ImageLab para el análisis de los geles obtenidos.

6.3 Determinación de la presencia de HA en viales de muestra

Se utilizó la técnica de inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF en condiciones desnaturalizantes reductoras siguiendo la metodología reportada por Sambrook et al; (1989). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% y el marcador de peso molecular Dual Color de BioRad. Para la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF se utilizó la cámara de transferencia húmeda Mini Trans-blot de BioRad durante 150 min a 250 mA constantes. Posteriormente se realizó una detección rápida con tinción rojo de Ponceau. Una vez retirado el colorante, se prosiguió con la incubación con anticuerpo primario contra HA producida en conejo con una dilución 1:500 y se dejó por 90 min a agitación constante. Se utilizó como anticuerpo secundario con suero de conejo anti-HA en una concentración 1:5000 y se incubó por 90 min a agitación constante. Finalmente se reveló por medio de carbazole y se analizó la membrana en el equipo ChemiDoc RS+ de BioRad y el software ImageLab. Como control negativo se utilizó una muestra de proteína p64 producida en cultivo de células SF+ infectadas con vaculovirus que se encuentra en cultivos de células de insecto.

6.4 Análisis del perfil de N-glicosilación de HA.

Se utilizó la metodología descrita por Guile et al. (1997) y Palomares et al. (2003). 100 µg de la proteína se concentraron utilizando el equipo Speed Vac Plus SC110A de Savant hasta un volumen de 32.5 µl y se incubó a 100°C por 5 min en una solución al 2% de SDS y 1M mercapto-etanol. Posteriormente se utilizó la enzima N-glicosidasa F de Sigma

(PNGasa F) en un buffer 250mM fosfato de sodio a pH 7.5 y se dejó incubar por 17 hrs a 37°C. Como control interno, se agregó 10 µl de maltosa 10 µM. Los glicanos fueron marcados con 2-aminobenzamida dejando incubar con el colorante fluorescente por 2 hrs a 65°C, el exceso de colorante se removió con una serie de lavados de ácido acético, acetonitrilo y agua. Los glicanos se concentraron a un volumen final de 100µl. El análisis de los glicanos se realizó mediante Cromatografía Líquida a Alta Presión (HPLC por sus siglas en inglés) en fase normal utilizando un equipo Waters y una columna TSKgel Amide-80 (TOSOH). Se utilizó un gradiente de acetonitrilo y formato de amonio 250 mM pH 4.4 en corridas de 180 min a 30°C.

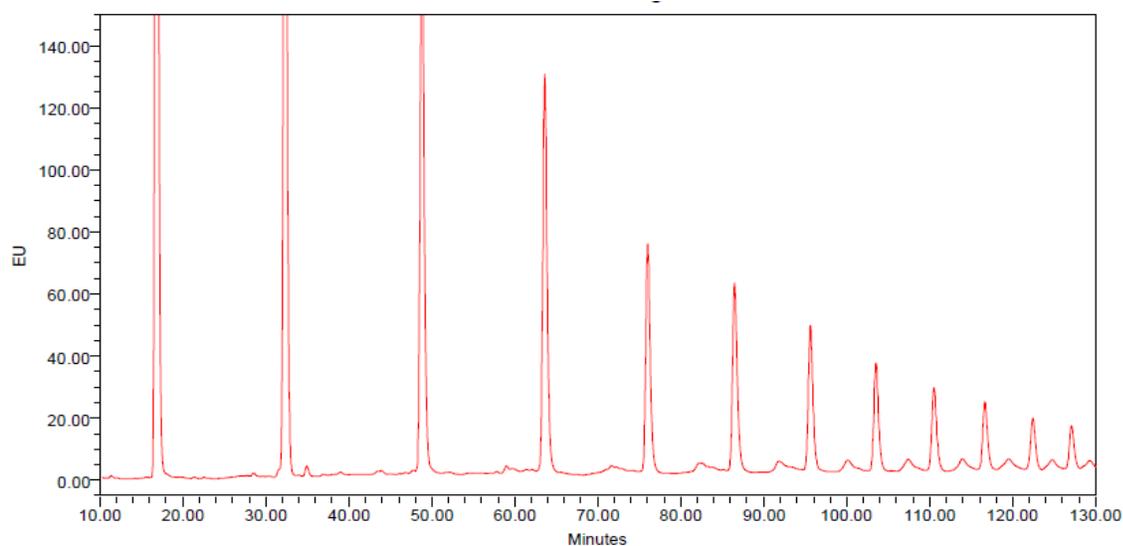


Figura 6.1. Escalera de dextrana para la columna de fase normal TSKgel Amide-80 (TOSOH).

Para cuantificar los glicanos, se utilizó un detector de fluorescencia Waters a una longitud de onda de excitación de 330 nm y 420 nm de emisión. Para la identificación de los glicanos obtenidos se calculó la migración de glicanos en unidades de glucosa a través

de una curva de calibración de elución en el HPLC de un homopolímero estándar de dextrana, de cuyo cromatograma se obtuvo una ecuación de tercer orden que relaciona el tamaño del homopolímero expresado en unidades de glucosa con el tiempo de migración. La migración en unidades de glucosa fue comparada con tablas estándar con el objetivo de proponer estructuras a los glicanos obtenidos. Los glicanos tratados fueron posteriormente tratados con la enzima α -manosidasa de Prozyme para determinar si poseían manosas terminales y corroborar su identidad. Los glicanos tratados con la enzima fueron nuevamente analizados mediante HPLC.

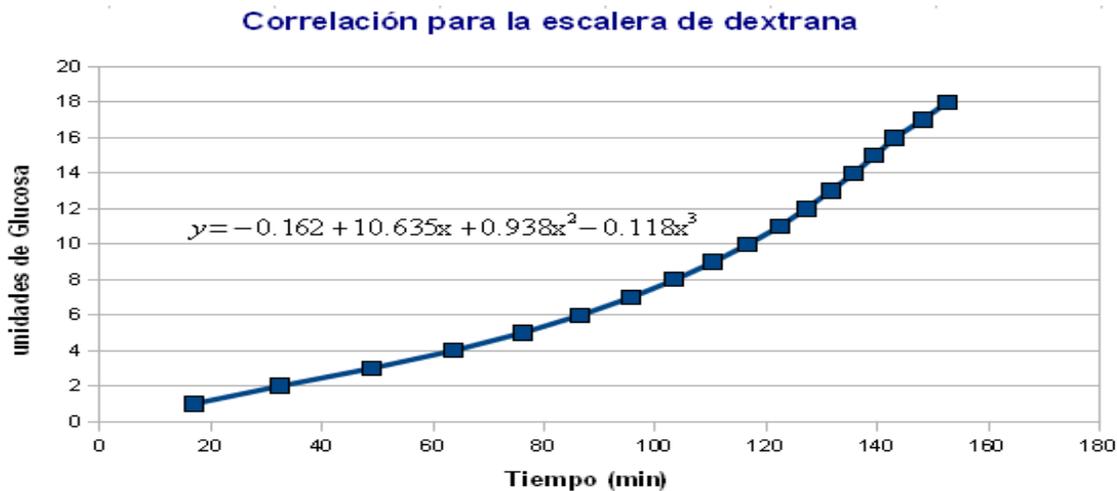


Figura 6.2 Correlación para la escalera de dextrosa. Se muestra la ecuación utilizada para el calculo de unidades de glucosa

6.5 Determinación del tamaño de HA

Se determinó el diámetro hidrodinámico de HA utilizando la técnica de HPLC de exclusión por tamaño en base a lo reportado por Rojas (2008) al cual se le hizo adecuaciones en la fase móvil para su uso con HA. Se utilizó la columna Biosuite 250 HUR (tamaño de poro 250 Å, 4mm tamaño de partícula) de Waters con un buffer 10mM

fosfatos, 150mM NaCl pH 7 y se caracterizó la columna con diferentes partículas a un flujo de 0.4ml/min. Se utilizaron partículas con diámetro hidrodinámico conocido para la calibración de la columna. Se utilizó azida de sodio para determinar el volumen total de la columna. Se realizó la curva de calibración relacionando el diámetro hidrodinámico con el volumen de elución de las partículas. Además se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz medida en un equipo Zetasizer Nano de Malvern para determinar el diámetro hidrodinámico de HA_{rec} y desglicosilada. Se realizó la medición por triplicado a 20°C equilibrando la muestra por 10 minutos en buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl pH 7 con una concentración de 100 µg/ml con el fin de caracterizar la población de HA en los viales.

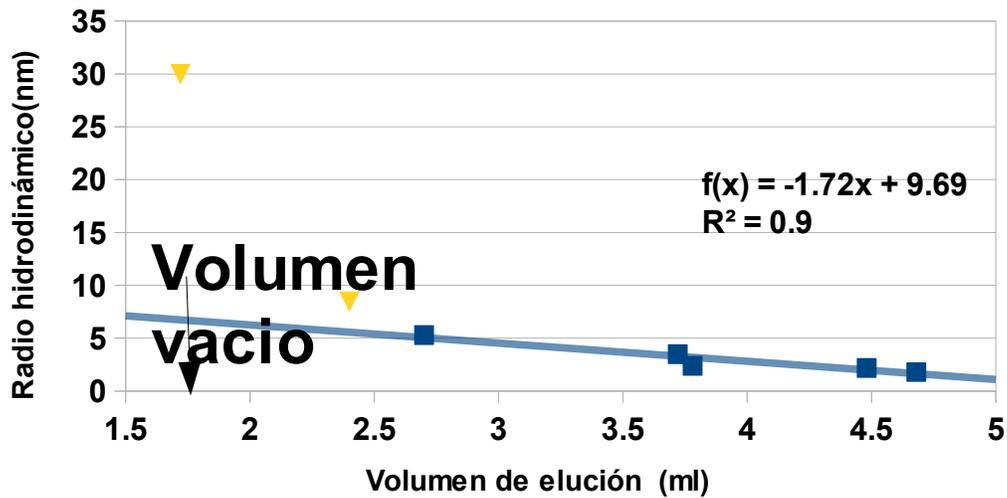
Para la elaboración de la curva de calibración de la columna *Biosuite250* (tamaño de poro de 250Å) se utilizaron las siguientes proteínas modelo: Lisozima (RH=1.8nm), tripsinógeno (RH=2.2nm), proteína verde fluorescente mejorada EGFP (RH=2.4nm), albúmina (RH=3.55 nm), IgG (RH=5.3nm), tiroglobulina (RH=8.5nm) y fluoroesferas (RH=30nm) En una columna de exclusión en gel, las partículas de mayor tamaño eluyen antes que las partículas pequeñas, ya que estas últimas se detienen entre los poros y cavidades del gel: mientras que las grandes, al no poder entrar en dichos poros, no se retienen y eluyen más rápido.

Vo(ml)	1.72			
Vt(ml)	5.2			
Ve(ml)	RH (nm)	Pm (kDa)	1-KD	Particula
4.68	1.8	14.3	0.96	Lisozima
4.48	2.2	24	0.9	Tripsinógeno
3.78	2.4	27	0.67	EGFP
3.72	3.5	65	0.65	Albúmina
2.7	5.3	150	0.32	IgG
2.4	8.5	660	0.23	Tiroglobulina
1.72	30		0.01	Fluoresfera

Tabla 6.1 Radio hidrodinámico y volumen de elución de las partículas usadas para la curva de calibración de la columna Biosuite 250 usando una fase móvil de buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl pH 7 a un flujo de 0.4 ml/min .

El volumen vacío de columna se determina a partir del volumen de elución de una partícula con radio hidrodinámico mayor o igual al tamaño de poro de la resina utilizada . Se utilizó a la flouoresfera como la partícula que determina el volumen vacío de la columna. El volumen total de la columna es el volumen máximo al cual ya eluyeron todas las partículas. Dicho volumen se determina con una partícula pequeña, normalmente azida de sodio. En la figura 6.3 se muestra la curva de calibración para la columna Biosuite 250 en función del radio hidrodinámico y el peso molecular. Para las fluoroesferas no fue posible obtener el radio hidrodinámico ya que exceden el tamaño de poro de la columna, además de la migración de la tiroglobulina esta fuera del rango lineal por lo que tampoco se fue considerada para la curva de calibración.

A) Curva de calibración de Biosuite 250 (Tamaño)



B) Caracterización de Biosuite 250 (Peso molecular)

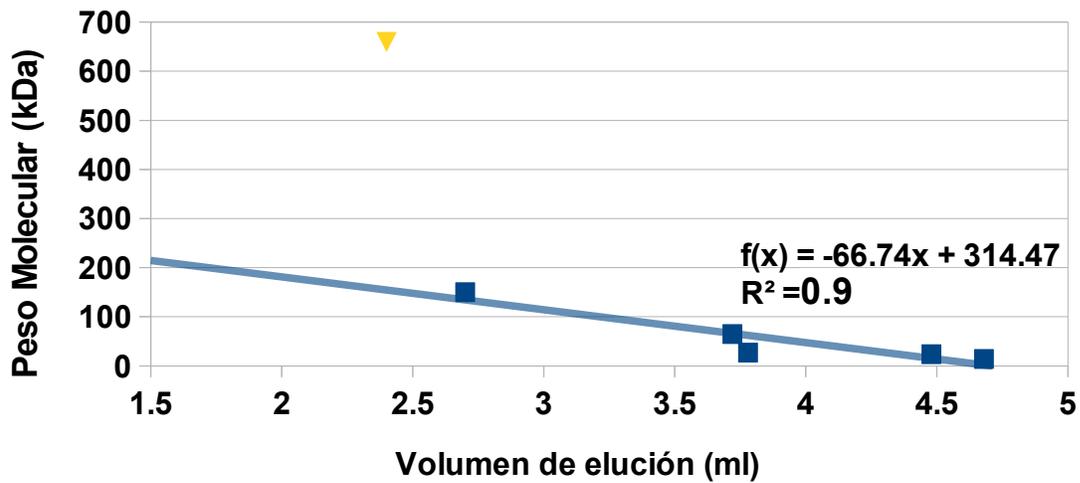


Figura 6.3 Curva de calibración de la columna Biosuite250. A) Se graficó el volumen de elución (tiempo de elución (min) por el flujo (ml/min)) contra el radio hidrodinámico (nm) B) Se graficó volumen de elución contra el peso molecular de la partícula. La fase móvil fue buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl pH 7 a un flujo de 0.4 ml/min

6.6 Estabilidad de HA a diferentes temperaturas, diferentes formas glicosiladas y a diferentes tiempos.

Se determinó la estabilidad de HA a diferentes temperaturas en buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl a pH 7 utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (light scattering). El método fue montado para este experimento. Se utilizaron muestras de HA a las que se les removieron los glicanos con la enzima Endoglicosidasa F1 de Sigma (EndoH). Esta enzima no requiere de la desnaturalización de la proteína para eliminar los azúcares. Para la desglicosilación por medio de Endoglicosidasa F1 la proteína fue concentrada utilizando el equipo Speed Vac Plus SC110A de Savant. 50 µg de proteína se diluyeron en 50µl de buffer 250mM NaH₂PO₄ a pH 5.5, se agregó 2µl de la enzima y se dejó incubar por 3 hr a 37°C. Se utilizó el equipo Zetasizer Nano de Malvern instruments para determinar los cambios del radio hidrodinámico a lo largo de las mediciones. Se midió 50 µl de una muestra con una concentración de 100 µg/ml equilibrándose a 10 min a cada temperatura. Se realizaron mediciones a 4°C, 20°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C y 65°C tanto para la proteína glicosilada como la desglicosilada. Muestras de la proteína desglicosilada fueron almacenadas a 4°C en buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl pH 7 con Tween-20 y se analizó el cambio del radio hidrodinámico de HA comparado con HA glicosilada a los 7 días. Se utilizó microscopía de transmisión electrónica para observar las estructuras formadas en HA a 20°C y a 65°C y determinar las diferencias en los agregados.

6.7 Estabilidad de HA a diferentes pH, diferentes formas glicosiladas y a diferentes tiempos.

Se determinó la estabilidad de HA a diferentes pH en buffer 10mM fosfatos, 150mM NaCl a 25°C utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (light scattering). El método fue montado en el laboratorio para este experimento. Se utilizaron muestras de HA a las que se les removieron los glicanos de acuerdo al procedimiento señalado en el punto 6.5. Se utilizó el dispositivo de filtración Nanosep 10K omega (Nanosep) con la centrifuga 5418 de Eppendorf para eliminar sales y realizar los cambios de buffer. Se utilizó el equipo Zetazizer Nano de Malvern instruments para determinar los cambios del radio hidrodinámico a lo largo de las mediciones. Se midió 50 µl de una muestra con una concentración de 100 µg/ml realizando mediciones a las 0, 1, 20, 24, 26, 48, 52, 72 y 112 horas para la proteína recombinante y a las 0, 1, 3, 20, 24, 26 y 48 horas para la proteína desglicosilada. Se realizaron mediciones a pH de 3, 4, 5.7, 6.8 y 8 tanto para la proteína glicosilada como la desglicosilada. Cuando la población total de HA se encontraba agregada, se cambió el buffer a un pH de 6.8 para comprobar si la agregación de la proteína es reversible. Se incubó a 25°C durante una hora y se realizaron mediciones a cada muestra. Posteriormente se realizaron mediciones cada 24 hrs por 3 días con el fin de observar un cambio en la distribución de la población. Se utilizó microscopía de transmisión electrónica para observar las estructuras formadas en HA a pH de 3, 4, 6 y 8 y determinar las diferencias en los agregados.

6.8. Estabilidad de HA a diferentes fuerzas iónicas y a diferentes tiempos.

Se determinó la estabilidad de HA a diferentes fuerzas iónicas variando la concentración de NaCl en un rango de 0.05M hasta 0.75M en buffer 10mM fosfatos, pH 6.8 a 25°C utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (light scattering). Para este experimento se utilizó el mismo protocolo que en el punto 6.5. Se midió 40 µl de una muestra con una concentración de 100 µg/ml equilibrándose durante 1 hr a cada fuerza iónica. Se realizaron mediciones a fuerza iónica de 0.05, 0.01, 0.15, 0.5 y 0.75 M tanto para la proteína glicosilada como la desglicosilada. Las muestras de la proteína desglicosilada y recombinante fueron almacenadas a 4°C en buffer 10mM fosfatos, y se realizó medición cada 24 horas.

6.9 Determinación de la capacidad inmunogénica de HA_{rec} y desglicosilada.

Se determinó la capacidad inmunogénica de HA recombinante y HA recombinante desglicosilada utilizando la técnica de ELISA para contabilizar el título de anticuerpos contra HA siguiendo la metodología indicada por Sambrook et al; (1989) para la parte de ELISA y se montó la técnica en el laboratorio para la inoculación de ratones. Se contó con tres grupos de cuatro ratones hembra de la cepa BALB/C y se les administró dos dosis con 20 µg de HA en buffer fosfatos 10mM, 150mM NaCl pH 7 con una diferencia de 15 días entre la primera inoculación y la segunda. Se inoculó un grupo sólo con buffer para fungir como control, a otro grupo se le administró HA recombinante y el último se inoculó con HA recombinante desglicosilada. Se obtuvo el suero de los ratones una semana antes de la

primera inoculación para comprobar la ausencia de anticuerpos contra HA. Se tomaron muestras de sangre en la semana 1, 3, 4, 5 y 6 posteriores a la primera inoculación. Se preparó una solución de HA en buffer 100mM de Carbonatos pH 9.6 a una concentración de 5µg/ml en una placa de 96 micropozos y se dejó incubando por 16 horas. Se realizaron lavados de la placa con buffer tris/HCl 50mM pH 8, 150mM NaCl y 0.05% Tween-20 para eliminar la proteína que no se unió a la placa. Se utilizó una solución de 0.5% gelatina, 0.2% tween 50mM Tris/HCl pH 8 durante 2 hrs a 37°C para bloquear la placa y un lavado para eliminar los residuos que no se unieron. Se preparó la placa con una solución de 50mM Tris/HCl pH8 500mM NaCl, 1mg/ml de gelatina, 0.05% Tween-20 y posteriormente se colocó 30 µl de suero en la primera hilera, haciendo una dilución 1:5. Se realizó posteriormente una dilución seriada 1:3 a lo largo de la placa con el fin de poder calcular el título de anticuerpos. Se incubó por 2 hrs a 37°C. Posteriormente se realizó un lavado y se agregó una solución con el anticuerpo conjugado a una dilución de 1:2500 y se dejó incubar por 90 min a 37°C. Posterior a otro lavado se adicionó la solución de revelado de 240µg/ml de PNPP en buffer de DEA al 1% y se deja incubar por 10 minutos. A los 10 minutos se agregan 20 µl de solución 2N de NaOH para detener la reacción y se lee la absorbancia a 405nm en el lector de microplacas. La absorbancia se graficó contra el inverso de la dilución y se ajustó a un modelo sigmoidal con el fin de obtener la dilución a la que hay 50% de respuesta a la cual corresponde el título de anticuerpo.

7.Resultados y discusión

7.1 Determinación del patrón de N-glicosilación de HA

7.1.1 Migración en geles de poliacrilamida de HA_{rec} y desglicosilada en condiciones desnaturalizantes.

La técnica de migración en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes permite determinar el peso molecular de una partícula por medio de la distancia total que se desplaza en el gel al hacerlo interactuar con una corriente eléctrica. El SDS se asocia a la proteína confiriéndole carga negativa, lo que permite en la mayoría de los casos que la migración sea debida al peso molecular de la proteína y no a su carga. Una vez que la proteína ha sido desnaturalizada y asociada a SDS, las proteínas más pequeñas se desplazarán más rápido que las proteínas grandes y por lo tanto recorrerán una distancia mayor en el gel en el mismo tiempo. Para la determinación del peso molecular se comparó la migración de la proteína de interés el marcador de peso molecular BenchMark utilizando el software ImageLab de BioRad. En la figura 6.1 se puede observar la migración de distintas HA_{rec} en comparación con HA a las que se le retiraron los glicanos.

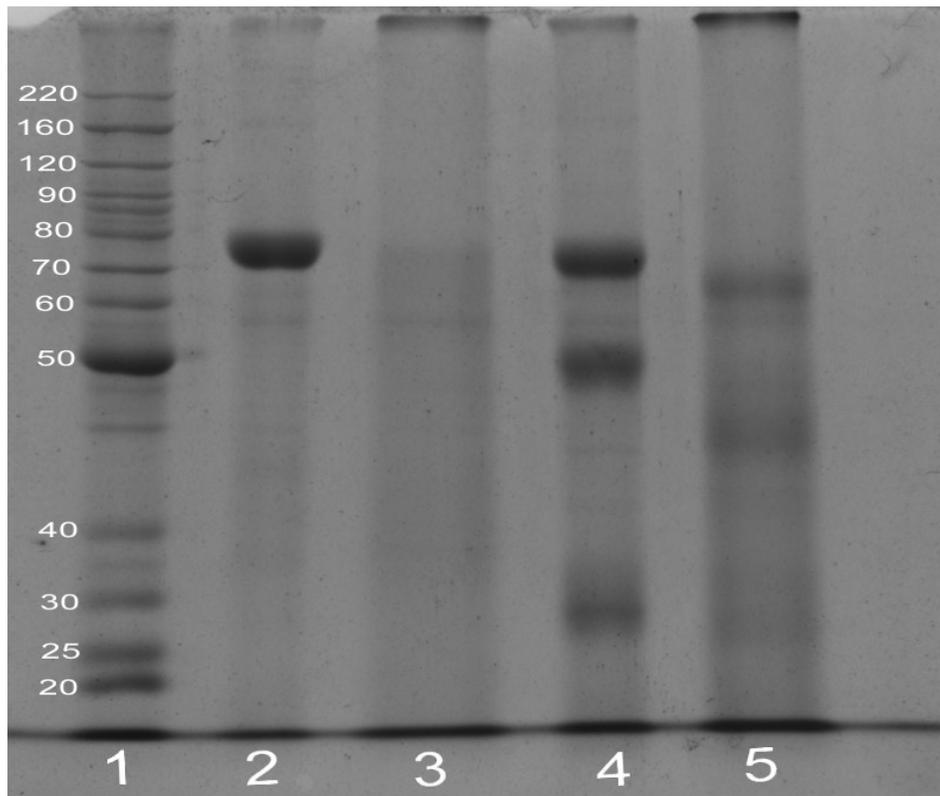


Figura 7.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida de HA. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: HABrec; carril 3: HAB desglycosilada; carril 4: HA1_{rec}; carril 5: HA1 desglycosilada.

En el gel se corrieron cuatro muestras: HAB recombinante y desglycosilada; y HA1 recombinante y desglycosilada para comparar la diferencia en la migración entre la proteína recombinante y la desglycosilada. La muestra de HAB tuvo un peso molecular promedio de 78 kDa. No se pudo obtener HAB desglycosilada en la concentración mínima requerida para observarla en el gel, ya que la proteína se encontraba agregada después de la desglycosilación. Con respecto a HA1 recombinante se observaron 3 bandas. La primera banda corresponde a HA₀, la cual es la proteína HA completa. Esta banda tuvo un peso molecular de entre 80 y 70kDa. Las otras dos bandas tienen pesos moleculares

correspondientes a los fragmentos denominados HA₁ y HA₂, productos de la proteólisis de HA₀. HA₁ es la fracción de HA que contiene el dominio transmembranal; el gel muestra un peso molecular de HA₁ entre los 50 y 45 kDa. HA₂ tuvo un peso molecular entre los 30 y 20 kDa. En la muestra de HA desglicosilada se observó un peso molecular de HA₀ entre los 70 y 60kDa, mientras HA₁ y HA₂ tuvieron pesos moleculares entre 40 y 35 kDa y 25 kDa respectivamente. El peso molecular teórico de HA₀ calculado a partir de la secuencia de aminoácidos y sin considerar glicosilaciones es de 61 kDa, mientras que los de HA₁ y HA₂ son de 33 y 29 kDa respectivamente (Lamb y Krug, 1996) En un principio se podría suponer que la diferencia de peso entre HA₀ de la proteína recombinante y la desglicosilada (aproximadamente 10kDa) debería corresponder a los glicanos en la proteína. Sin embargo, la diferencia entre el peso molecular del fragmento glicosilado y el desglicosilado es demasiado grande. Al utilizar la herramienta bioinformática NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), se determinó que de los 6 posibles sitios de N-glicosilación en HA (según su secuencia) sólo 5 están probablemente ocupados. Suponiendo que cada glicano tiene 6 carbohidratos y el peso molecular promedio de cada residuo de azúcar es similar al de la glucosa (180 Da), el peso molecular promedio que se esperaría de los glicanos es de 5.4 kDa. Esta diferencia puede deberse a la migración anómala de las glicoproteínas en SDS-PAGE. Si observamos la diferencia en el peso molecular entre las fracciones de HA₁ podemos observar un cambio de aproximadamente de 10 kDa entre la proteína recombinante y la desglicosilada. Sin embargo en las fracciones de HA₂ la diferencia de peso es despreciable. El corte proteolítico se da aproximadamente en la posición 328 de HA₀. Según el análisis de la secuencia de HA para el subtipo H1N1- California 2009, de las 5 posibles asparaginas que pueden estar

glicosiladas, 4 se encuentran antes del aminoácido 328, lo que indica que dichos sitios se encuentran ubicados en HA₁, mientras que HA₂ solo presenta un sitio de N-glicosilación. Ya que no se observó diferencia en la migración de HA₂, es probable que el único sitio potencial de N-glicosilación en ese fragmento no esté ocupado.

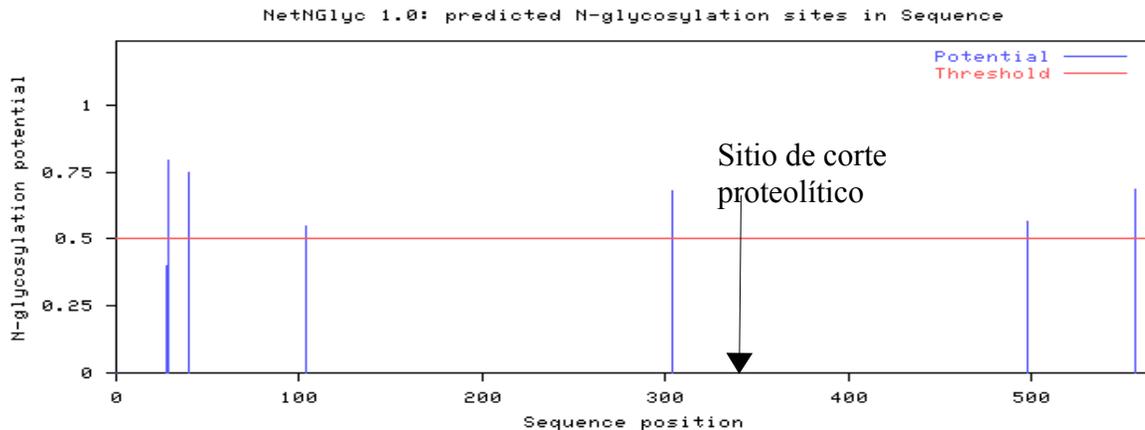


Figura 7.2 Análisis de la secuencia de HA para determinar los posibles sitios de N-glicosilación en HA del subtipo H1N1 California 2009. Los sitios que no superen por 0.1 o más la línea de umbral (línea roja) se consideran como sitios que probablemente no estén glicosilados. El análisis se realizó con NetNGlyc 1.0. Se señala el sitio del corte proteolítico en la cadena de aminoácidos.

En el gel se puede observar que tanto la HA_{rec} y HA_{rec} desglicosilada tienen agregación. Dicha agregación es mayor para la proteína desglicosilada. Como se puede observar más adelante HA_{rec} desglicosilada favorece la formación de agregados en comparación con HA_{rec}.

Un motivo por el cual la electroforesis en gel no permite determinar la migración de la proteína es el peso molecular relativo de los glicanos en la proteína es debido a desviaciones generadas por los glicanos. En primer lugar, pueden evitar que el SDS (la

molécula que se une a la proteína y le confiere una carga neta negativa) se una de forma regular en toda la estructura de la proteína. Otra posible interferencia es la contribución a la carga neta de la molécula. El interés de usar SDS en condiciones desnaturizantes es anular las cargas propias de la partícula y conferir una carga neta directamente proporcional al peso de la proteína. Eso permite que la velocidad de migración de la partícula en el campo eléctrico sea proporcional al tamaño de la partícula. Sin embargo, si el SDS no está distribuido de forma homogénea en la proteína, el peso molecular ya no será directamente proporcional a la carga de la partícula, pudiendo ser menor la velocidad de migración, dando la apariencia de un mayor peso molecular. El SDS no se une a los glicanos, por lo que la estructura conserva su carga original, que aunque normalmente es neutra llega a interferir con la migración de la proteína, lo que disminuye la velocidad de migración de la proteína en el gel. Sin embargo, el experimento nos permite confirmar que las glicosilaciones de HA producida en células de insecto siguen presentes y que se encuentran localizadas en la región HA₁ de la proteína.

7.1.2 Análisis de glicanos encontrados en HA por medio de HPLC en fase normal.

Se determinó el patrón de glicosilación de HA producida en células de insecto de los subtipos H1N1-California 2009 y H3N2-Perth 2009. En la Figura 7.3 se muestra el perfil de elución de los glicanos en la muestra de H1N1.

Se sabe que el proceso de N-glicosilación de insectos es diferente al de los mamíferos. Mientras las N-glicoproteínas humanas contienen estructuras complejas con terminaciones en ácido siálico, las de insectos contienen N-glicosilaciones altas en manosa y paucimansa debido a la alta actividad de la enzima hexosaminidasa en el aparato de

Golgi de las células de insecto.

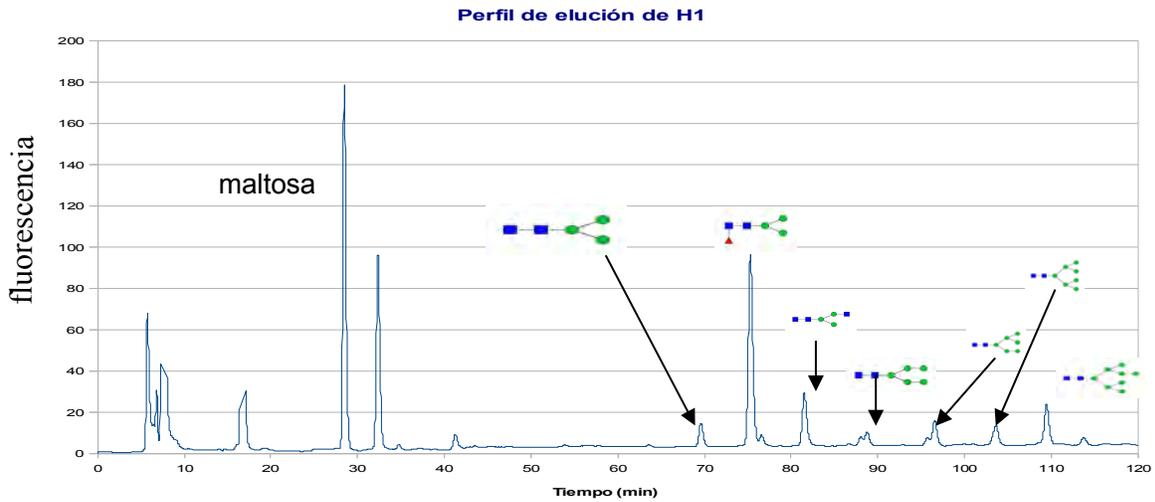


Figura 7.3. Perfil de elución de los N-glicanos de HA_{rec} de H1N1-California. Se señala el pico de elución del estándar interno (maltosa) y las estructuras propuestas obtenidas de acuerdo a la migración de unidades de glucosa. (simbología: Cuadrado, N-acetil-glucosamina; círculo, manosa; triángulo, fucosa).

Al analizar el patrón de elución de glicanos en HA obtenidos de H1N1 (figura 7.3) y de H3N2 (figura 7.4) podemos observar un perfil muy similar al de las HA producidas en células de insecto (Wang et al, 2006)

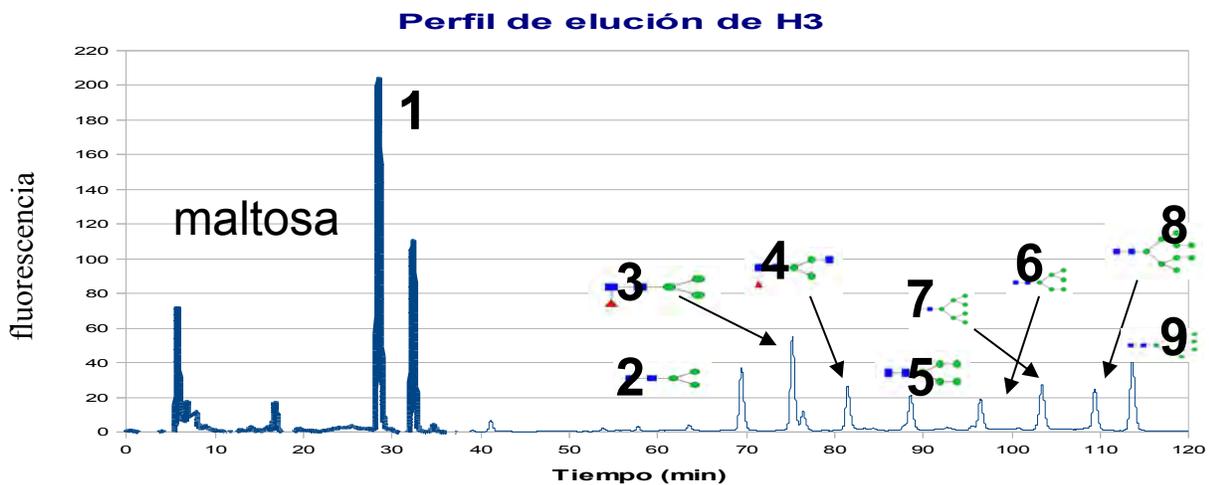


Figura 7.4. Perfil de elución de los N-glicanos de HA obtenida de H3N2-Perth. Se señala el pico de elución del estándar interno (maltosa) y las estructuras propuestas obtenidas de acuerdo a la migración de unidades de glucosa. (simbología: Cuadrado, N-acetil-glucosamina; círculo, manosa; triangulo, fucosa).

Se utilizó la enzima α -manosidasa que corta los enlaces α -glicosídicos de las manosas con el fin de confirmar la identidad de los N-glicanos. En el glicano, las ramificaciones de manosa están unidas en enlace α , mientras la primera manosa unida a la N-acetil-glucosamina esta unida con un enlace tipo β por lo que el tratamiento con α -manosidasa elimina todas las manosas ramificadas y sólo deja el extremo formado por las dos N-acetil-glucosaminas y la primera manosa. Utilizando esta enzima se puede determinar con mayor precisión si las estructuras encontradas coinciden con las propuestas, ya que se espera que los picos de elución donde se encuentran las estructuras altas en manosa desaparezcan y formen dos picos de elución que corresponden para las estructuras de manosa y dos N-acetil-glucosamidas (M1N2) y Manosa, dos N-acetil-glucosamina y fucosa (M1N2F). No fue requerido el uso de otras glicosidasas para la identificación de N-glicanos pues todos los glicanos fueron susceptibles a la digestión por manosidasa.

La figura 7.5 compara la migración de glicanos de H1N1 con el perfil de elución posterior al tratamiento con α -manosidasa. Se puede apreciar como los picos de elución propuestos como altos en manosa y el pico de paucimanosa desaparecieron de acuerdo a lo esperado, así mismo como la estructura que se suponía un glicano complejo fue digerida completamente. En el perfil de elución tratado con α -manosidasa se puede observar la

aparición de los productos de digestión, que son las estructuras conformadas por dos N-acetil-glucosaminas y una manosa (M1N2), y la conformada por dos N-acetil-glucosaminas, una manosa y una fucosa (M1N2F) Por tal motivo se determinó que las estructuras propuestas son las esperadas para el perfil de glicanos de HA. En la tabla 7.1 se resume los resultados obtenidos del análisis de las dos HA donde se puede observar que HA obtenida tanto de H1N1 como de H3N2 presentan perfiles de glicosilación similares, pero con distintas relaciones entre la cantidad de glicanos totales.

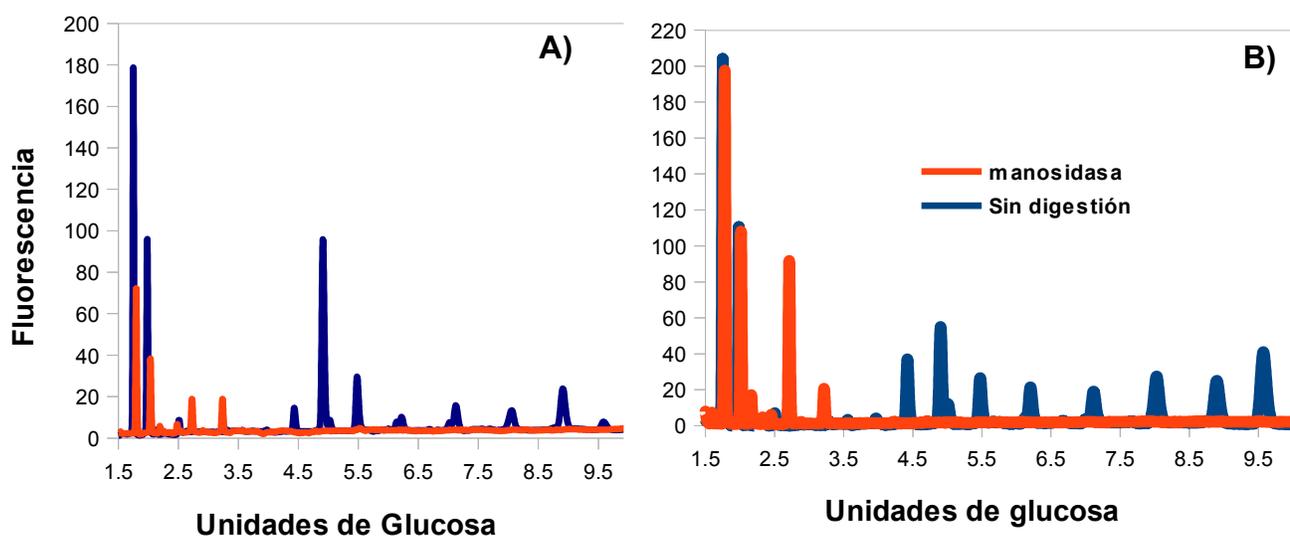


Figura 7.5. Perfil de elución de HA obtenida de A)H1N1 y B)H3N2 tratada con α -manosidasa. Se observa la diferencia en la migración entre el perfil tratado con PNGasa F y manosidasa.

Pico	UG	Estructura	%H1	%H3
1		Maltosa		
2	4.43	M3N2	8.37	12.84
3	4.9	M3N2F	45.86	20.27
4	5.48	M4N2	13.12	9.82
5	6.22	M5N2	5.6	8.8
6	7.13	M6N2	8.39	7.56
7	8.06	M7N2	5.9	11.09
8	8.81	M8N2	10.09	9.8
9	9.59	M9N2	2.67	19.82

	H1N1%	H3N2%
Paucimanosa	54.23	33.11
Altos en manosa	45.77	66.89
complejos	0	0

Tabla 7.1 Contenido relativo de N-glicanos en HA. Los datos se muestran en porcentaje en relación al total de glicanos encontrados en cada muestra. (Simbología: M, manosa; N, N-acetil-glucosamina; F, fucosa. El número representa la cantidad de glicanos presentes en la estructura. Se considera glicano complejo a aquel que tiene ramificaciones de glicanos diferentes a manosas. Se considera glicano alto en manosa al glicano que tiene mas de 3 manosas. Se considera glicano tipo paucimanosa a aquel que tiene menos de 4 manosas

Se sabe que el perfil de glicosilación puede afectar a la vida media de la proteína en el torrente sanguíneo, la solubilidad de la proteína en el medio, así como la identificación por parte del organismo de las regiones antigénicas de la proteína (Wang et al, 2009). Al analizar el perfil de glicosilación de HA de H1N1 y H3N2 podemos notar una diferencia significativa en la cantidad de paucimanosa entre las dos proteínas. Los glicanos de paucimanosa son más pequeños en comparación con las glicanos altos en manosa. Esto podría afectar la capacidad inmunogénica de la proteína, ya que se ha observado que mientras más pequeños sean los glicanos, la capacidad inmunogénica de la proteína aumenta (Wang et al; 2009). Esto se debe a que el glicano oculta potenciales epítomos y evita que sean detectados por el sistema inmune. Por lo tanto un glicano ramificado protege mejor al sitio antigénico mientras que una estructura pequeña no es tan efectiva (Cheng et al; 2009)

Además, el patrón de glicosilación repercute directamente en el diámetro hidrodinámico de la proteína, pudiendo afectar las interacciones entre proteínas, ya sea estimulando o

evitando su agregación. Más adelante se puede observar que HA obtenida de H3N2 presenta un diámetro mayor que HA obtenida de H1N1, probablemente por la diferencia en el perfil de glicosilación de la proteína.

7.2 Determinación del radio hidrodinámico de HA

7.2.1 Determinación del diámetro hidrodinámico de HA.

Para poder estudiar las diferentes formas de HA es necesario contar con una herramienta robusta que nos permita caracterizar las estructuras formadas. Con este fin se utilizó la técnica de HPLC con columnas de exclusión en gel.

La cromatografía de exclusión en gel permite separar las diferentes estructuras de la proteína presentes en una muestra específica, permitiendo resolver entre el monómero, trímero o los agregados de HA (Hong et al; 2012) El uso de esta técnica es fundamental para los posteriores objetivos de ensamblaje de HA, por lo que es necesario la caracterización de la proteína. El RH promedio de HA es de aproximadamente 8.6nm (obtenido en la presente tesis) (figura 7.6). Sin embargo este puede ser diferente debido al pH, la temperatura o a los patrones de glicosilación de la proteína. Así mismo el hecho que HA sea una proteína con forma de bastón y no globular generará un RH distinto al teórico.

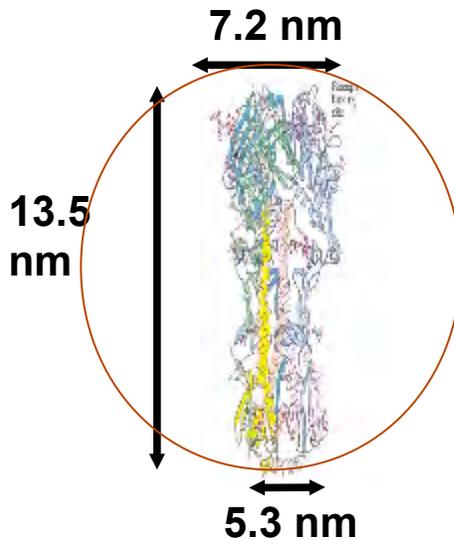


Figura 7.6 *Tamaño del trímero de HA. La región hidrofóbica tiene un diámetro aproximado de 5.3 nm, mientras la cabeza globular tiene un diámetro de 7.2 nm, el largo total de HA es de 13.5 nm. (Ruigrok et al; 1988)*

En la figura 7.7 se muestra el perfil de elución para HA de H1N1 y en la tabla 7.3 un resumen con los radios hidrodinámicos obtenidos. Se pueden observar cuatro diferentes poblaciones. El pico 1 migró en el volumen vacío de la columna por lo que su tamaño es mayor a 25nm. Al ser una muestra pura, este pico debe de corresponder a agregados de HA. El pico 2 presenta un radio hidrodinámico promedio (RHP) de 5.9 nm, un peso molecular promedio (PMP) de 169 kDa y un índice de polidispersión de 1, lo que nos indica que la población esta conformada por trímeros (Remeta et al; 2010) El pico 3 tuvo un RHP de 4 nm, tiene un PMP de 89 kDa y un IP de 1.18, lo que nos indica que dicha población esta compuesta de diferentes conformaciones de HA, aparentemente monómeros en su mayor composición. El pico 4 eluyó después del volumen total de la columna. Se determinó que dicho pico esta compuesto por sales del buffer de corrida. En la tabla 7.3 se muestra

un resumen de los datos obtenidos por HPLC-SEC para H1N1.

Tabla 7.3 Radio hidrodinámico promedio y porcentaje de la población de los picos obtenidos por HPLC-SEC para HA de H1N1.

Pico	RH (nm)	Dist. De población	PMP (kDa)	IP
1	>8.7	3.84	-	-
2	5.9	0.7	169	1
3	4	95.45	89	1.18
4	-	-	-	-

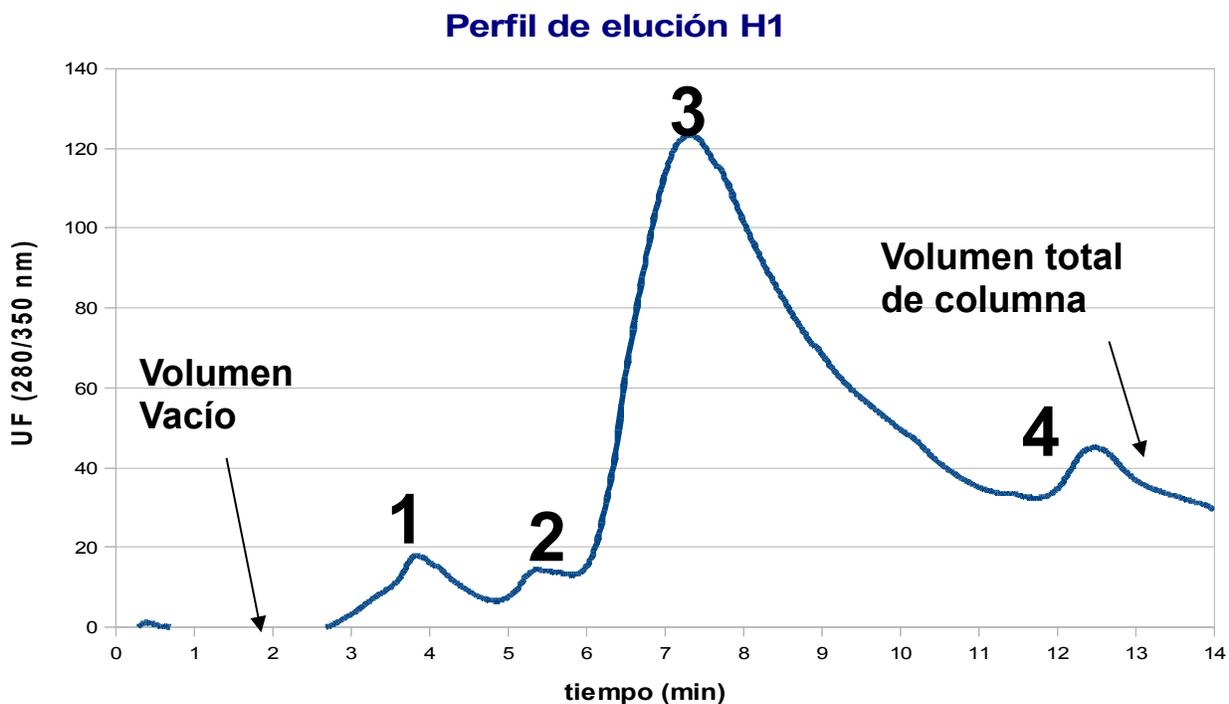


Figura 7.7. Perfil de elución de HA obtenida de H1N1.

En la figura 7.8, se muestra el perfil de elución para HA obtenida de H3N2. A diferencia de la figura 7.7, en HA de H3N2 se observó solo un pico con RHP de 5.2 nm, un PMP de

142 kDa y un IP de 1, lo que indicaría que esta conformada por una única población posiblemente de trímeros. No se observaron agregados en la muestra de H3N2 como H1N1 y muestra una única población. Las diferencias de N-glicosilación lo que podrían explicar la ausencia de agregados ya que la N-glicosilación también participa en la solubilidad de la proteína.

Perfil de elución de H3

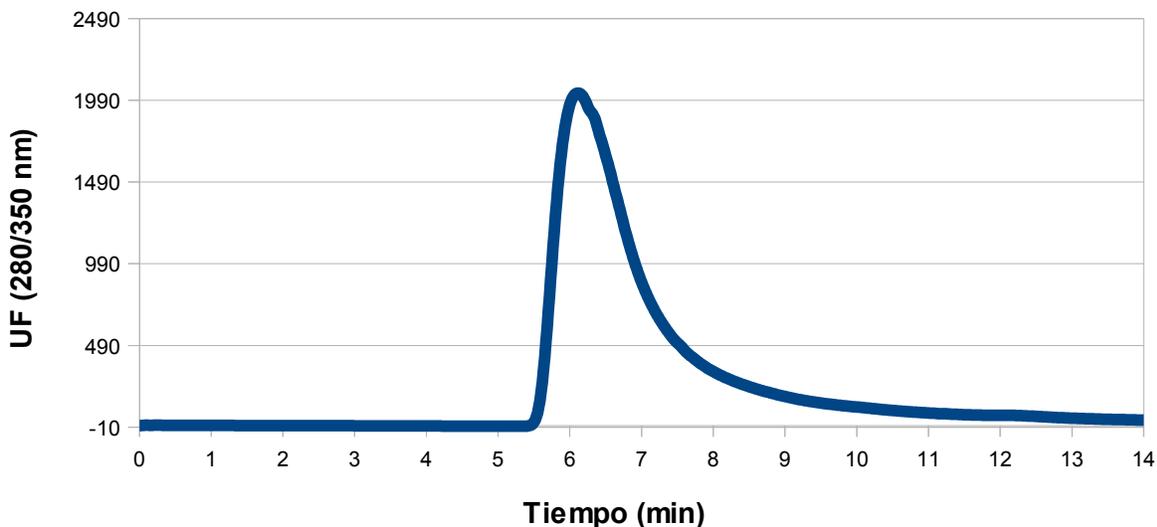


Figura 7.8. Perfil de elución de HA obtenida de H3N2. El tiempo de elución de Ha fue de 6.2 min y el volumen de elución fue de 2.48 ml.

Como se discutió en el punto 7.1, la mayoría de las glicosilaciones se encuentran en la región de H₁ la cual contiene la región hidrofóbica embebida en la membrana viral. Además de esto, H₁ cuenta con la cabeza globular y la región de contacto con los receptores de la célula a infectar (Wilson y Cox, 1990) En HA, los sitios altamente conservados de N-glicosilación sirven principalmente para dar estabilidad y un correcto plegamiento de HA

debido a que la glicosilación es un marcador para la célula de que la proteína ha sido correctamente plegada y además proporciona rigidez a la estructura, lo que impide que se despliegue fácilmente ante las presiones del medio, por lo que se esperaría que un cambio en el patrón de glicosilación cambie la estructura cuaternaria de HA. Con base en esto, se propone una relación entre las diferencias de glicosilación y la formación de agregados: si HA tiene un porcentaje relativo de glicanos que ocupan un gran volumen en comparación a otros glicanos, como sería en el caso de ramificaciones altas en manosa, las interacciones de las regiones hidrofóbicas son menores puesto que hay menor área de contacto y existe un impedimento físico y la tendencia a agregarse disminuye. Además de que hay un aumento del RH de la proteína debido al volumen ocupado por los glicanos. Sin embargo, mientras una HA cuyo volumen espacial relativo de glicanos es menor, como en el caso de los glicanos paucimansa, existe una mayor área de interacción entre las regiones hidrofóbicas de la proteína, una mayor flexibilidad y movimiento de la estructura interna y un menor RH, puesto que los glicanos ocupan menos volumen. Una forma de comprobar si existe correlación entre la estructura de HA y la glicosilación consiste en desglicosilar la proteína y exponerla a distintas situaciones ambientales y comparar los cambios con la proteína recombinante. Los resultados de dicho experimento serán expuestos en los siguientes apartados de la presente tesis.

7.3 Estabilidad y formación de estructuras de HA a diferentes temperaturas.

7.3.1 Comportamiento de HA_{rec} y desglicosilada a diferentes temperaturas

El plegamiento de las proteínas y su estructura tridimensional representan el estado más estable que la proteína toma a cierta temperatura y pH. Cuando se habla de estabilidad de una estructura proteica, se está refiriendo al estado en el que la energía para mantener la estructura es la menor en comparación a otras posibles conformaciones que pudiera tomar la misma proteína. Esto se puede observar en conformaciones con regiones hidrofóbicas en ambientes acuosos que tienden a formar micelas que permitan aislar la región hidrofóbica que está siendo repelida en el ambiente acuoso y que interactúa con otras regiones hidrofóbicas (Nicholls et al; 1991). El pH de la solución en la que se encuentra la proteína cambia la carga neta de los aminoácidos que la conforman y llegar a romper interacciones entre las cadenas y generar nuevas estructuras que pueden ser no funcionales (Date and Dominy; 2012). De la misma forma, la temperatura es una medida del movimiento interno de las moléculas, por lo que al aumentar el movimiento de las partículas la temperatura tiende a incrementarse, reduciendo las interacciones entre las moléculas de la proteína lo que genera un cambio conformacional en la estructura que afecta sus funciones (Baldwin, 1986)

La N-glicosilación puede afectar la estabilidad de las proteínas (Palomares et al, 2004) su solubilidad y su vida media en el paciente (Butler; 2005). Al considerar una solución acuosa donde hay una sustancia hidrofóbica, el equilibrio de dicha interacción está dado por la entropía del sistema debido a que el cambio de entalpía es igual a 0 (no hay reacción ni formación de puentes de hidrógeno) y la presencia de las partículas

hidrofóbicas tienden a ordenar a las partículas de agua a su alrededor. En la ecuación 2 se define la energía de Gibbs con base en la entalpía, temperatura y entropía y como se ve afectada cuando el cambio de entalpía es igual a 0.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Delta G = -T\Delta S$$

Donde ΔG es el cambio de energía de Gibbs en Julios, ΔH es el cambio de entalpía en Julios, T es la temperatura del sistema en $^{\circ}\text{K}$, y ΔS es el cambio de entropía en Julios/ $^{\circ}\text{K}$. En el equilibrio el ΔG debe ser igual a 0. En la interacción entre el agua y una sustancia hidrofóbica el ΔG se ve afectado por la temperatura y el ΔS . Un cambio en la entropía esta en función de cuanta energía no puede transformarse en trabajo y esta relacionada con el calor perdido (Julios) y la temperatura (Smith et al; 2000) Normalmente las proteínas se encuentran en medios acuosos lo que hace que las interacciones hidrofóbicas sean un factor importante en su correcto plegamiento, por lo que el cambio en la entropía y en la temperatura tienen un fuerte efecto en dicho plegamiento (Balwin, 1986) Como se mencionó anteriormente HA es una proteína rica en regiones hidrofóbicas (que en el virus interactúan con la membrana lipídica de la capsida) por lo que se esperaría que al aumentar la temperatura esta tienda a formar agregados (Schellman; 1997) La N-glicosilación aumenta la solubilidad de la proteína y al menos un sitio de N-glicosilación se encuentra en la región hidrofóbica de la proteína, lo que puede ocultar dicha zona. Por tal motivo puede esperarse que la proteína tendrá una tendencia a la agregación distinta en presencia o ausencia de la N-glicosilación (Ceriotti et al; 1998)

Para la observación de los cambios en HA se planteó la medición del diámetro

hidrodinámico (DH) de la proteína utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz. Esta técnica se basa en que las partículas en solución dispersan la luz. El movimiento de la partícula en la solución esta en función de su difusión y del movimiento browniano, por lo que matemáticamente puede medirse el RH utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$RH = \frac{kT}{3D\eta\pi} \quad \text{Eq. 3}$$

Donde RH es radio hidrodinámico (nm), k es la constante de Boltzman (J/K°), η es la viscosidad del medio (kg/(s m), D es el coeficiente de difusión traslacional (nm²/s) y π es un número irracional que relaciona la circunferencia y el diámetro y tiene valor de 3.141592.

Conforme va avanzando el tiempo, la correlación de intensidad comienza a decrecer debido a que las moléculas se van moviendo del sitio inicial; dicho decremento en la correlación de la intensidad debida al movimiento browniano esta relacionado con el coeficiente de difusión traslacional de la molécula en el solvente. El programa calcula el coeficiente de difusión traslacional y utilizando la ecuación de Stokes-Einstein calcula el DH promedio de la partícula. A diferentes tamaños de partícula, las fluctuaciones de la dispersión de luz son diferentes, lo que permite medir el DH de una mezcla de moléculas y medir el tamaño de partículas que se encuentran en la mezcla.

Utilizando el equipo de dispersión de luz *Zetasizer Nano* de Malvern se midió el DH tanto de HA_{rec} como desglucosilada y se comparó su DH a diferentes temperaturas. Se consideró como proteína agregada toda aquella partícula cuyo DH fuera mayor a 30 nm. Ya que por dispersión dinámica de luz se determinó que el DH del trímero de HA_{rec} es de 15

nm a 20°C y de HA desglucosilada es de 10 nm y se obtuvo el porcentaje de proteína agregada relativo al total de proteína presente en la muestra.

En la figura 7.9 se puede observar que la proteína recombinante mantiene un tamaño constante en la distribución de su población hasta los 45°C, mientras HA desglucosilada muestra una ligera disminución en el diámetro promedio en el rango de 20°C a 35°C. Posterior a los 45°C comienza la formación de agregados.

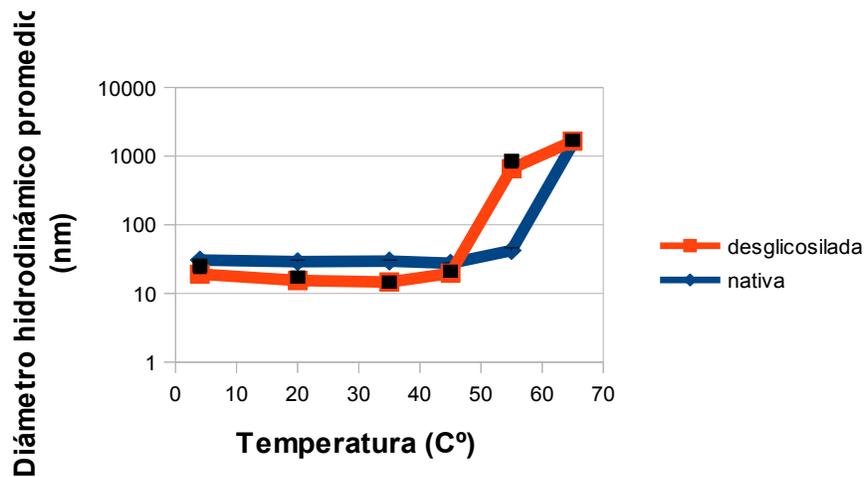


Figura 7.9. Variación del diámetro hidrodinámico promedio de HA_{rec} y HA_{rec} desglucosilada a diferentes temperaturas. Se utilizó muestras de H1N1. Los resultados mostrados son el promedio de 3 diferentes muestras con 3 repeticiones para cada muestra.

En un inicio se consideró que la agregación de HA tanto recombinante como desglucosilada seguía un modelo similar al de Lumry-Eyring de agregación (Weiss et al; 2008) Sin embargo no se pudo observar la presencia de intermediarios en el proceso de agregación. Se ajustaron los datos a una ecuación exponencial que permita predecir la agregación con respecto a la temperatura. Se propone que el cambio en el porcentaje de agregación con respecto a la temperatura puede ajustarse a una ecuación de primer orden

a partir de los 35°C, dada por:

$$\frac{dA}{dT} = KaA \quad A = A_0 e^{Ka * T} \quad \text{Eq. 4}$$

Donde el cambio de agregación con respecto a la temperatura es igual a una constante de agregación Ka ($1/^\circ\text{C}$) por la concentración de agregados A a cada temperatura. Cuando se integra dicha ecuación queda definido que la concentración de agregados a una temperatura es igual a la concentración de agregados iniciales A_0 por el producto de la función exponencial de la constante Ka por la temperatura. El ajuste de datos a la ecuación se muestra en la figura 7.10.

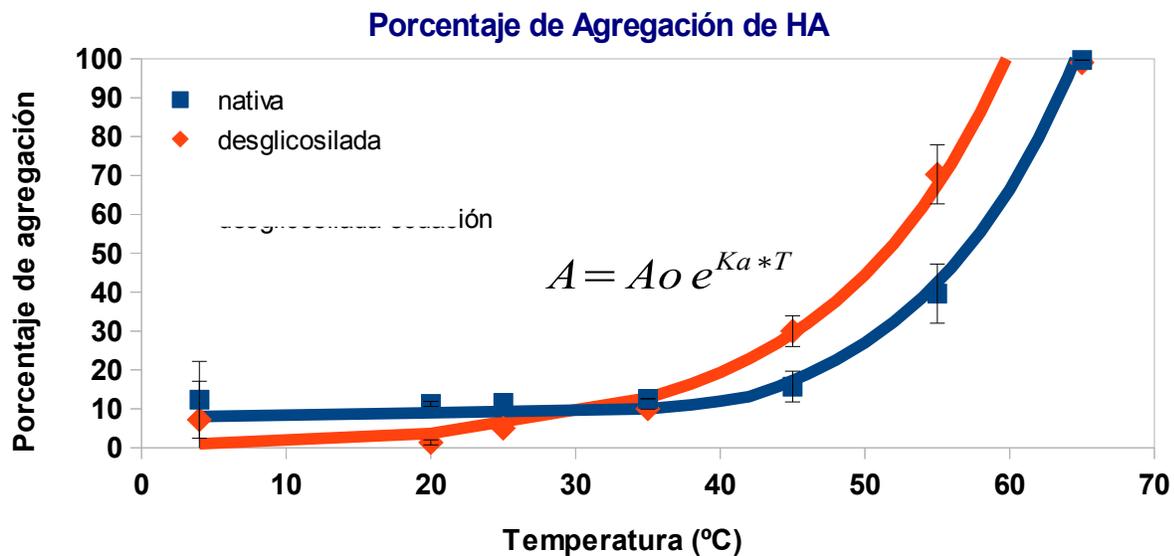


Figura 7.10. Comportamiento de H1N1 recombinante y desglucosilada a diferentes T° . La línea continua indica la predicción de la ecuación, los cuadrados indican los puntos experimentales. El porcentaje de agregación se calculó sumando el total de agregados con un DH mayor a 40 nm

Al determinar que la agregación por temperatura sigue una ecuación diferencial de primer orden indica que la cantidad de agregados iniciales es un factor determinante para la consecuente formación de agregados conforme la temperatura aumenta (Weiss et al;

2010) En la ecuación K_a indica que tan susceptible a agregarse es H1N1 remarcando que el cambio de agregación es con respecto a la temperatura.

En la tabla 7.4 se muestra una tabla con los valores calculados y el valor de la temperatura de agregación (T_a) la cual se define como la temperatura a la que la mitad de la población se encuentra agregada y se utiliza con la intención de ser una medida de comparación análoga a la temperatura de fusión (T_m).

Tabla 7.4 Valores de la constantes para la agregación de H1N1 a diferentes temperaturas.

Ecuación de la agregación dependiente de T°		
	Nativa	Desglicosilada
A_o (%agregación)	8.3	0.98
K_a ($1/^\circ\text{C}$)	0.09	0.083
T_a ($^\circ\text{C}$)	58	51

Kissmann et al; reportaron en 2011 que a pH 7 las partículas pseudovirales de influenza formadas por HA y NA comienzan a agregarse a temperaturas mayores de los 58°C , mientras que Remeta y colaboradores (2010) demostraron que para HA asociada en rosetas la temperatura a la que comenzaba a haber cambios en la estructura cuaternaria de la proteína era de 60°C Esto concuerda con los datos observados por DLS donde la T_a es de 58°C para HA_{rec} . En el caso de nuestro estudio el detergente que se encuentra en el buffer evita que las regiones hidrofóbicas de HA interactúen entre sí, escondiéndolas. A temperaturas altas HA comienza a perder su conformación estructural y expone regiones que antes estaban embebidas en el cuerpo de la proteína por lo tanto las regiones hidrofóbicas vuelven a estar libres para interactuar entre ellas, lo que provoca agregación. Al mismo tiempo, el movimiento de la partículas en el medio a mayores

temperaturas aumenta las posibilidades de contacto e interacción entre las proteínas. Por tal motivo a mayores temperaturas podemos observar un incremento en la agregación.

La agregación a la temperatura de HA se ve afectada por la N-glicosilación, hecho que se puede comprobar al comparar las T_a . La T_a de la proteína recombinante fue mayor que la proteína desglicosilada demostrando una mayor resistencia a la agregación.

En la figura 7.11 se muestran los sitios posibles de N-glicosilación para HA de H1N1 California 2009. Se puede observar que existe un sitio de glicosilación cercano al sitio de unión entre la subunidad HA_1 y HA_2 . Dicha unión está formada por un puente disulfuro, el cual en presencia de agentes reductores puede verse reducido y a temperaturas altas puede llegar a romperse. Los grupos tiol que forman los puentes disulfuro se comportan de manera similar a los grupos OH presentes en los glicanos, lo que puede generar que los ataques en contra del puente disulfuro se vean protegidos por el glicano al reaccionar de manera similar que el grupo tiol (tanto el oxígeno como el azufre se encuentran en el mismo grupo de la tabla periódica y los mecanismos de reacción de los grupos tiol son análogos a los del grupo hidroxilo) (Koritzinsky et al; 2013) Además de esto, el glicano genera un impedimento estérico que evita la exposición del puente disulfuro favoreciendo la estabilidad de la proteína (Sola y Griebenow; 2009) Así mismo el glicano da rigidez a la estructura de la proteína, evitando que esta se despliegue y se pueda romper el puente disulfuro. Del mismo modo, los glicanos pueden generar un impedimento estérico que evite la interacción entre las regiones con carga de la proteína evitando la formación de puentes de hidrógeno o la interacción entre las regiones hidrofóbicas de la proteína.

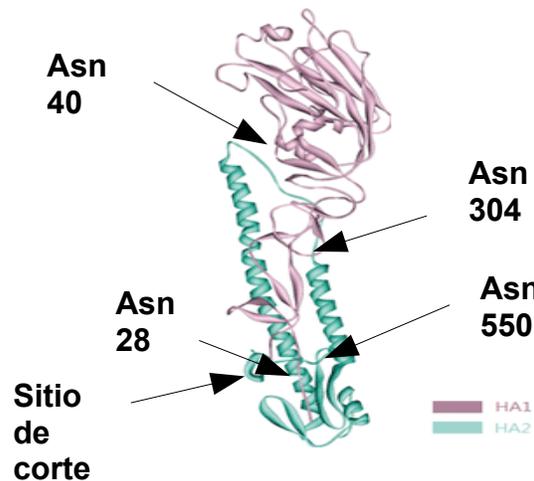


Figura 7.11. Sitios posibles de N-glicosilación de H1 California. Se muestra la región troncal (azul) la región globular (morado) tomado de Ge et al; 2010.

Con el fin de comparar la estabilidad de HA se propuso el cálculo de la energía de Gibbs como variable de comparación de la estabilidad entre HA_{rec} y glicosilada. Para el cálculo del cambio de la energía de Gibbs (ΔG) se dejó equilibrar cada muestra a la temperatura experimental por 10 minutos cuando no se observó cambio en la concentración de agregados y se supuso que la reacción (siendo la proteína sin agregar el reactivo y la proteína agregada el producto) llegaba al equilibrio aunque podría haber otros cambios a escalas mayores de tiempo. En el equilibrio se puede calcular la k_{eq} de la reacción y con ella se puede realizar el cálculo de ΔG . Se consideró como ΔG^0 el ΔG de la reacción de agregación de HA_{rec} a $25^\circ C$ y se considerando que ΔG^0 es la misma tanto para la proteína recombinante como la desglicosilada puesto que a esa temperatura el comportamiento de HA es similar para las dos condiciones, como se observó en la figura 7.10. La ecuación del cambio de energía de Gibbs es:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln(k_{eq}) \quad k_{eq} = \frac{\text{Productos}}{\text{Reactivos}} \quad \text{Eq. 5}$$

Donde R es la constante de gas ideal (J/mol^oK); T, temperatura absoluta (^oK) y k_{eq} es la constante de equilibrio (adimensional) En la figura 7.12 se puede observar el cambio de la energía de Gibbs con respecto a la temperatura. El sentido y la magnitud de la energía de Gibbs nos permite determinar si la reacción ocurre de manera espontanea (ΔG negativo) o si se requiere agregar energía para que se lleve acabo la reacción (ΔG positivo). En la figura 7.12 podemos observar que la reacción de agregación de HA desglicosilada no es favorable en el rango de 5°C a 35°C, incluso se puede observar un incremento en la ΔG debido a la disminución en el RHP de la HA desglicosilada durante ese rango de temperatura. A partir de los 40°C se observa una caída en el ΔG hasta valores negativos, indicando que a partir de esa temperatura la formación de agregados es espontanea. HA_{rec} se mantuvo estable hasta los 45°C, donde se ve una menor ΔG que favorece a la formación de agregados. La agregación de HA_{rec} es independiente de la temperatura en el rango de 5°C a 35°C, mientras que la agregación de HA glicosilada es dependiente de la temperatura en ese mismo rango. A partir de los 45°C la reacción de HA desglicosilada tiene una caída importante en su ΔG, llegando a los 65°C a ser negativo. De igual forma, HA_{rec} muestra una caída en su ΔG pero esta no es tan pronunciada como la de HA desglicosilada y su valor final es más cercano a 0 en comparación a la desglicosilada. Remeta et al; 2001 reporta que la temperatura en la que observa agregación de HA es a partir 63.5°C, mientras Kissmann et al; reporta una temperatura de agregación a partir de

los 55°C para partículas pseudovirales formadas por HA y NA. Luykx et al; reportó que la temperatura de agregación para tres diferentes cepas de HA (B/Guangdong, A/New Caledonia and A/Panama) es de 60°C. Esta comparativa indica que los valores obtenidos de estabilidad a temperatura para HA_{rec} son similares a los anteriormente reportados en la literatura. Sin embargo, hasta diciembre de 2012 no se habían encontrado reportes sobre la estabilidad de HA desglicosilada, sin embargo Wang et al; 1996 reportó que al remover los glicanos de varias proteínas glicosiladas la temperatura de desnaturalización disminuía con respecto a su estado nativo; lo que va en concordancia con lo observado en el presente trabajo.

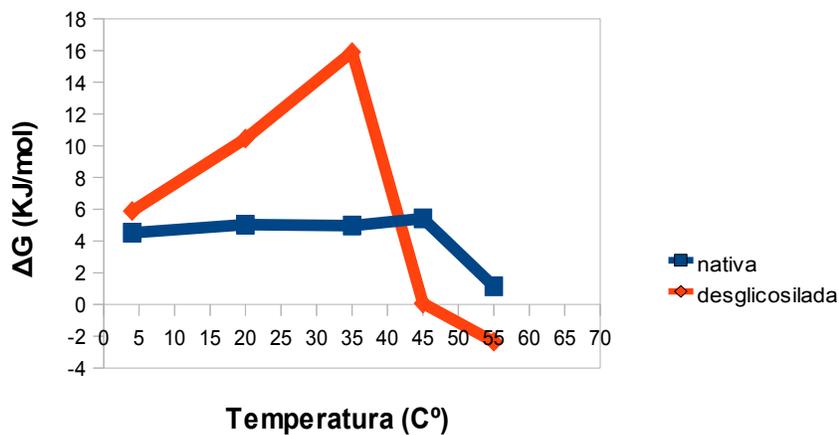


Figura 7.12. Gráfica del cambio de energía de Gibbs H1_{rec} y H1 desglicosilada con respecto a la temperatura.

El hecho de que a temperaturas menores a 35°C HA desglicosilada muestre un incremento en su ΔG es debido a que la proteína a esa temperatura no es propensa a formar agregados dentro del rango de tiempo en que se realizó la medición. Se observó

también que tanto para la proteína recombinante como desglicosilada la agregación provocada por temperatura es irreversible (apendice A2). Finalmente el comportamiento de HA_{rec} indica que es más estable a los cambios de temperatura que su homóloga desglicosilada. Sola y Griebenow; 2009 establecen que el efecto protector de los glicanos en la proteína es debido a que reduce su movilidad estructural y que el tamaño de la ramificación del glicano puede desestabilizar las formas desnaturalizadas de la proteína (Sola y Griebenow; 2006) Esto ultimo puede observarse en la ΔG y en la variación del RHP de la HA_{rec}, mostrando valores constantes durante un amplio rango de temperatura.

7.3.2 Comportamiento de HA_{rec} y desglicosilada a temperatura constante y diferentes tiempos.

Se determinó cómo el estado de agregación de HA varía a lo largo del tiempo y que tan importante es el efecto de la glicosilación en la estabilidad de la proteína. Para esto se comparó el cambio de DH de la proteína recombinante y desglicosilada almacenada en las mismas condiciones a 4°C durante una semana. Las mediciones se realizaron a 20°C (temperatura ambiental) y se observó el cambio de la distribución de tamaño de la población.

En la figura 7.13 y 7.14 se muestra la estabilidad a 4°C de H1N1 recombinante y desglicosilada. En la figura 7.13 se muestra como HA desglicosilada tuvo un cambio en el DH que indica agregación de la proteína. Dicho efecto se vio a la semana de haber sido removidos los glicanos, lo que indica que la glicosilación es necesaria para la estabilidad

de la proteína en almacenamiento y para su conservación por periodos largos de tiempo.

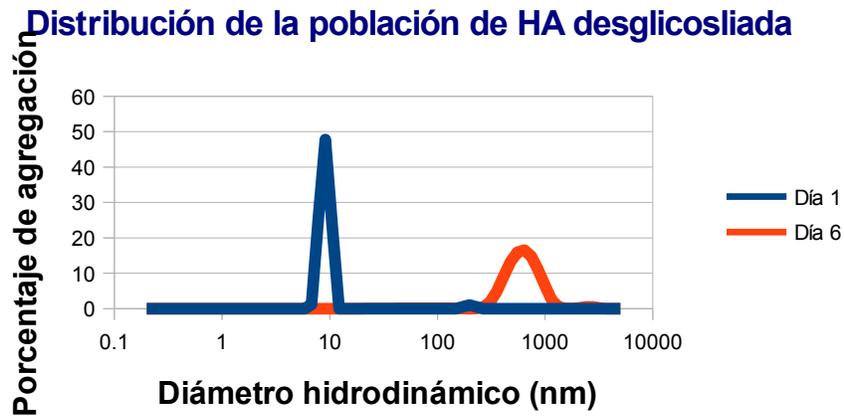


Figura 7.13. Comparación de la población de H1N1 desglucosilada almacenada a 4°C durante 6 días. Se muestra el cambio de tamaño del promedio de 3 diferentes muestras.

En la figura 7.14 se muestra como HA_{rec} es altamente estable en refrigeración. A 4°C no presentó un cambio significativo con respecto a su DH y a la distribución de población después de 90 días de almacenamiento. No mostró agregación o una disminución de su DH que podría indicar que los trímeros se hayan disociado.

Yannarell et al; 2002 reporta que la estabilidad de la hemaglutinina en el virus de la influenza a -20°C es de un año, así mismo las compañías que comercializan HA recomiendan su almacenaje a -20°C. Hasta diciembre de 2012 no se encontró ningún reporte sobre la estabilidad de HA a 4°C

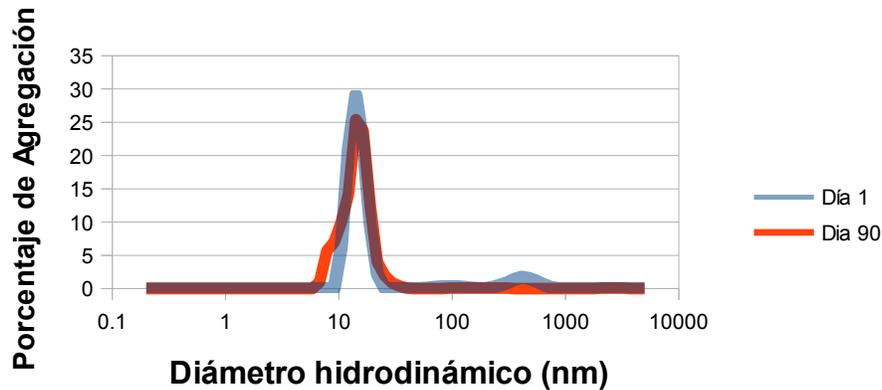


Figura 7.14 Comparación de la población de H1N1 recombinante almacenada a 4°C durante 90 días. La medición se realizó con 3 diferentes muestras y se gráfica el promedio. El IP de la población fue de 1.

7.4 Estabilidad y formación de estructuras de HA a diferentes pH.

7.4.1 Comportamiento de HA_{rec} y desglicosilada a diferentes pH

El valor de pH afecta directamente la ionización de los solutos en la solución, lo que genera un efecto directo en la carga de dicho soluto. En las proteínas el pH afecta directamente la carga neta de los aminoácidos que la conforman dependiendo del pKa de sus grupos ionizables: el extremo carboxilo, el extremo amino y su cadena lateral (Voet et al; 2007) En una cadena peptídica, es la cadena lateral la que mayor peso tiene en la carga de la proteína, puesto que los grupos carboxilos y amino están formando parte del enlace peptídico excepto en los aminoácidos al inicio y final de la cadena. Al pH en que la proteína tiene el mismo número de grupos ionizables cargados de forma positiva y de forma negativa se le conoce como punto Isoeléctrico (pI) En el pI la proteína tiene una

carga neta de 0. Por debajo del pI la proteína se considera cargada positivamente y por arriba del pI la proteína esta cargada de forma negativa (Voet et al; 2007) En la proteína, un aminoácido puede ver afectado su comportamiento de ionización por influencia de otros aminoácidos que tenga a su alrededor, lo que hace difícil predecir el pI de una proteína. Para HA se ha reportado un pI teórico de 6.3. Otro punto importante a recordar es que HA sufre de cambios conformacionales a pH ácido que exponen un bolsillo hidrofóbico que sirve de unión con la membrana del endosoma, lo que permite esperar un menor estabilidad de HA a condiciones ácidas debido a la exposición de zonas hidrofóbicas.

En la figura 7.15 se puede observar el efecto del pH en el diámetro hidrodinámico de HA_{rec}. A diferencia de la temperatura, la agregación provocada por pH no es inmediata, sino que requiere de un tiempo mucho mayor para agregarse por completo. En la figura 7.15 se puede observar que la proteína se agregó a pH diferente a 6.8 después de 3 días

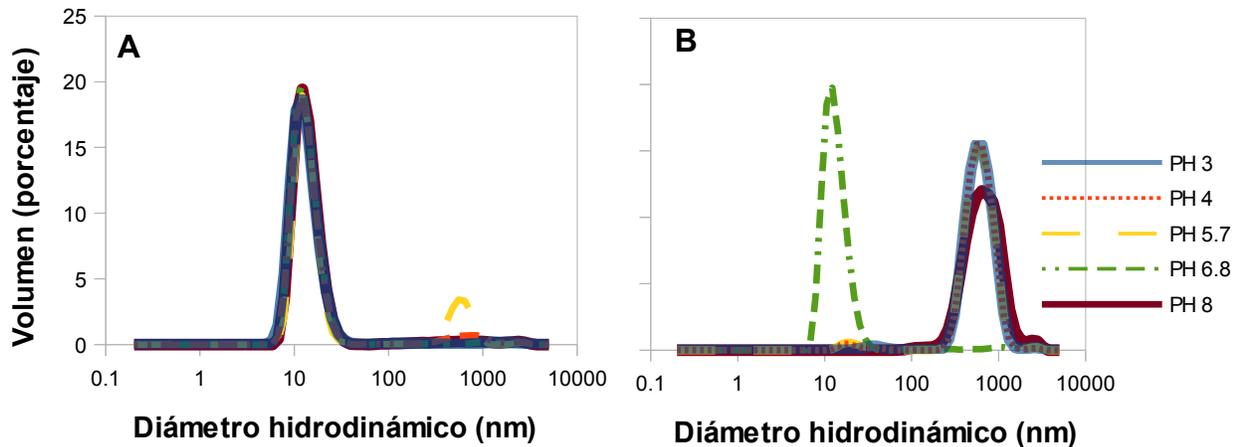


Figura 7.15. Distribución de la población de HA_{rec} H1N1 a diferentes pH y efecto del tiempo en la agregación de la proteína. A) HA_{rec} de H1N1 a 1 hr de incubación. B) HA_{rec} a 3 días de incubación.

Todas las poblaciones muestran un IP de 1.

Con el fin de determinar si la agregación es reversible se cambió el buffer a las muestras

agregadas para llevar de nuevo el pH a 6.8. En la figura 7.16 se puede observar la distribución de la población de HA a los 4 días después de un cambio de buffer. Se sonicó por un segundo con tres pulsaciones sin poder observar un cambio significativo en la distribución de la población. La proteína se mantuvo agregada, esto indica que en las condiciones analizadas, la proteína permanece agregada y posiblemente el proceso sea irreversible, esto en base a lo reportado por Skehel y Willey ;2000 y Earp et al; 2005 que reportan que los cambios por pH ácido en HA son irreversibles.

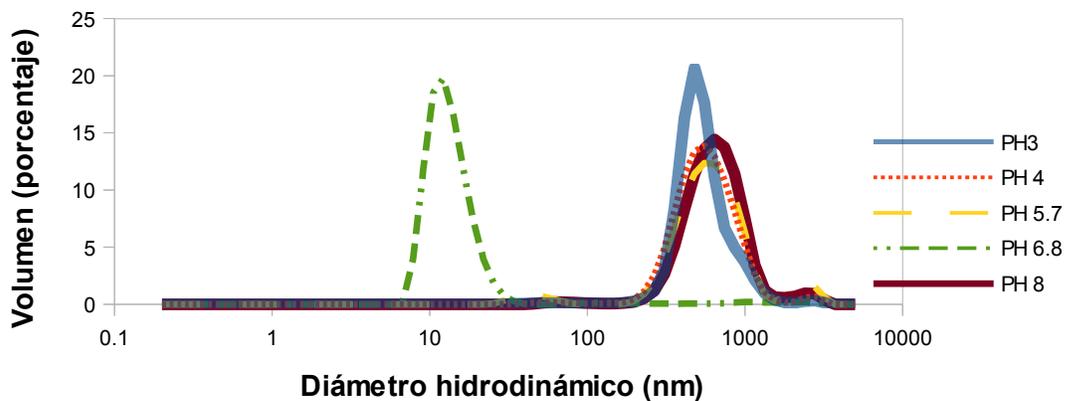


Figura 7.16. Distribución de población para HA_{rec} de H1N1 después del proceso de agregación por pH.

Las muestras fueron de devueltas a pH de 6.8 e incubadas por tres días para posteriormente ser sonicadas por un segundo. No se observó diferencia en el tamaño de la población.

En la figura 7.17 se muestra el efecto del pH en la HA desglucosilada. El efecto del pH en la agregación de HA inició a la hora de medición llegando a estar totalmente agregada a los 3 días. Primeramente es de notar que la proteína desglucosilada se agrega un día antes que la proteína recombinante.

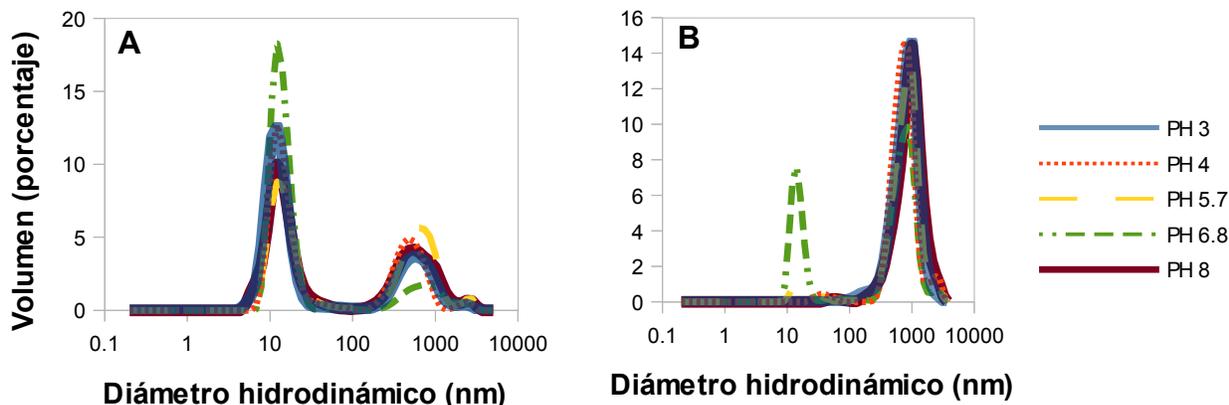


Figura 7.17 Distribución de la población de HA desglucosilada de H1N1 a diferentes pH y efecto del tiempo en la agregación de la proteína. A) HA a 1 h de incubación. B) HA a 3 días de incubación

Para determinar si la agregación de HA desglucosilada es reversible, se realizó una vez más el proceso de cambio de buffer a 6.8 y sonicación de tres pulsaciones por un segundo. En la figura 7.18 puede observarse que no hubo un cambio significativo en la distribución de la población de HA desglucosilada después del cambio de buffer y sonicación. Esto indica que probablemente se están formando enlaces covalentes entre la proteína ya que los agregados son estables. Sin embargo por medio de la técnica de DLS no se puede conocer la morfología de los agregados formados ni el tipo de interacción que se está dando durante el proceso de agregación.

Se calculó el cambio de energía de Gibbs al final de la reacción de agregación para determinar la estabilidad de HA en términos comparables. Para HA_{rec} se calculó la energía de Gibbs en el cuarto día, mientras que para HA desglucosilada se calculó la energía de Gibbs en el tercer día. Con respecto a este cálculo, es importante remarcar que para la proteína desglucosilada a pH 3 no se incluyó el cálculo del ΔG debido a que se encontraba completamente agregada en el tercer día.

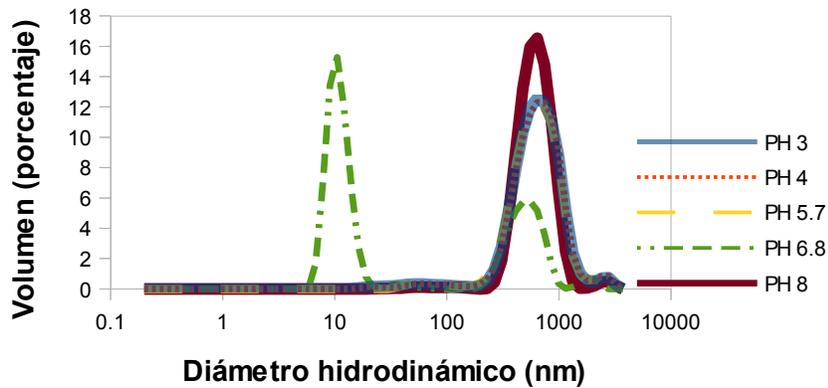


Figura 7.18. Distribución de población de HA desglucosilada después de la agregación por pH e incubación por 3 días en buffer a pH 6.8 y sonicación. No diferencia significativa se observa entre la figura 7.18 y 7.17 B.

En la figura 7.19 se puede observar el efecto del pH en el ΔG de agregación de HA tanto recombinante como desglucosilada. En primera instancia parecería que a pH básico HA es mas proclive a formar agregados, sin embargo hay que recordar que a pH 3 el valor del ΔG no pudo calcularse, puesto que HA esta completamente agregada. Se observa que a pH de 6.8 la proteína recombinante y desglucosilada tienen su máxima estabilidad, mientras a pH bajos la proteína se muestra inestable. Esto puede explicarse por el comportamiento típico de HA a pH ácido, donde sufre un cambio conformacional. (Skehel y Willey; 2000) Se sabe que los aminoácidos cercanos al péptido de unión a membrana son susceptibles al pH y que funcionan como sensores y activadores del cambio conformacional de HA (Langley et al; 2009) Este paso es vital para la infección y selectividad de HA. Chang y colaboradores (2009) observaron una correlación entre la glicosilación de HA y su capacidad de infección. Conforme HA muestra menor tamaño en sus N-glicosilaciones, su infectividad aumenta. Con base a esto se puede suponer que la

N-glicosilación de HA tiene impacto en el cambio conformacional durante el proceso de infección, ya sea restringiendo en cierta medida el movimiento del extremo N-terminal de HA el cual tiene que abrirse para exponer a región de unión con la membrana del huésped u ocultando las regiones hidrófobas que facilitan la unión de HA con la membrana celular. (Kawaoka y Webster; 1989) Del mismo modo la estabilidad dada por las glicosilaciones a HA reducen su capacidad inmunogénica al reducir la capacidad de identificación de las células presentadoras de antígeno ya que los glicanos protegen epítomos y dan solubilidad a la proteína (Wagner et al, 2007), Por tal motivo se podría suponer que al eliminar los glicanos de HA la capacidad inmunogénica se vería aumentada (Vigerust et al; 2007) sin embargo, la carencia de glicanos en la proteína reduciría la vida en anaquel de la vacuna.

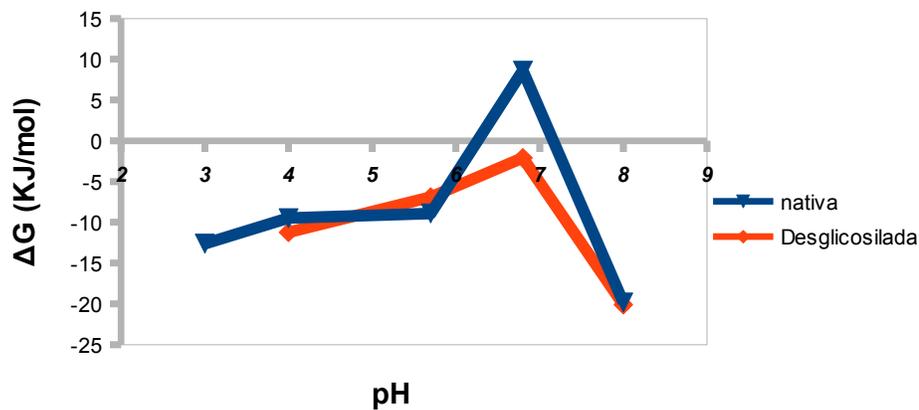


Figura 7.19 Energía de Gibbs para el proceso de agregación a diferentes pH para HA de H1N1 a temperatura constante. Para la proteína desglicosilada no es posible calcular el valor a pH 3 debido a la agregación completa de la proteína a ese pH. Los valores muestran que la reacción es favorable a formar agregados a pH distintos de 6.8.

7.4.2 Cinética de agregación de HA_{rec} y desglicosilada a diferentes pH.

Se realizaron mediciones cada 24 horas del cambio de tamaño de HA_{rec} y desglicosilada y con base en esto se ajustó una ecuación que permita describir y predecir la agregación de HA en función del pH y del tiempo. En un inicio se pensó que los resultados obtenidos podían ser descritos por la ecuación propuesta por el modelo de agregación de Lumry-Eyring (Weiss et al; 2008) sin embargo se decidió finalmente por una ecuación diferencial de primer orden donde la agregación de HA_{rec} es dependiente de la concentración inicial de los agregados de la proteína.

El comportamiento de agregación de HA a diferentes pH con respecto al tiempo quedo definido como:

$$\frac{dA}{dt} = Aka \quad A = A_0 e^{ka*t} \quad \text{Eq. 6}$$

Donde el cambio de agregación con respecto al tiempo esta dado por la velocidad específica de agregación k_a y la agregación A (porcentaje de volumen de muestra) en cada tiempo. Al integrar la ecuación se obtiene que la agregación a un tiempo t , es igual a la concentración de agregados inicial y la agregación es exponencial con respecto al tiempo. Para el ajuste de la ecuación se omitió los puntos al final de la cinética donde la proteína había llegado por completo a la agregación pues se consideró que la reacción habia terminado (Weiss et al; 2008) Los resultados se muestran en la figura 7.20 y los valores de la ecuación en la tabla 7.5

Al comparar el comportamiento de HA_{rec} de H1N1 se nota que es similar al observado

anteriormente para la agregación con respecto a la temperatura, con la particularidad de que el modelo presente es un modelo cinético, por lo que la constante k_a es una constante de velocidad específica de agregación, mientras la constante de temperatura K_a indica el efecto de la temperatura en HA. Para el ajuste matemático se consideró la fracción de proteína que se iba agregando contra la fracción de proteína que se mantenía en su estado nativo, que según Weiss y colaboradores (2008) es la forma más simple de hacer los cálculos.

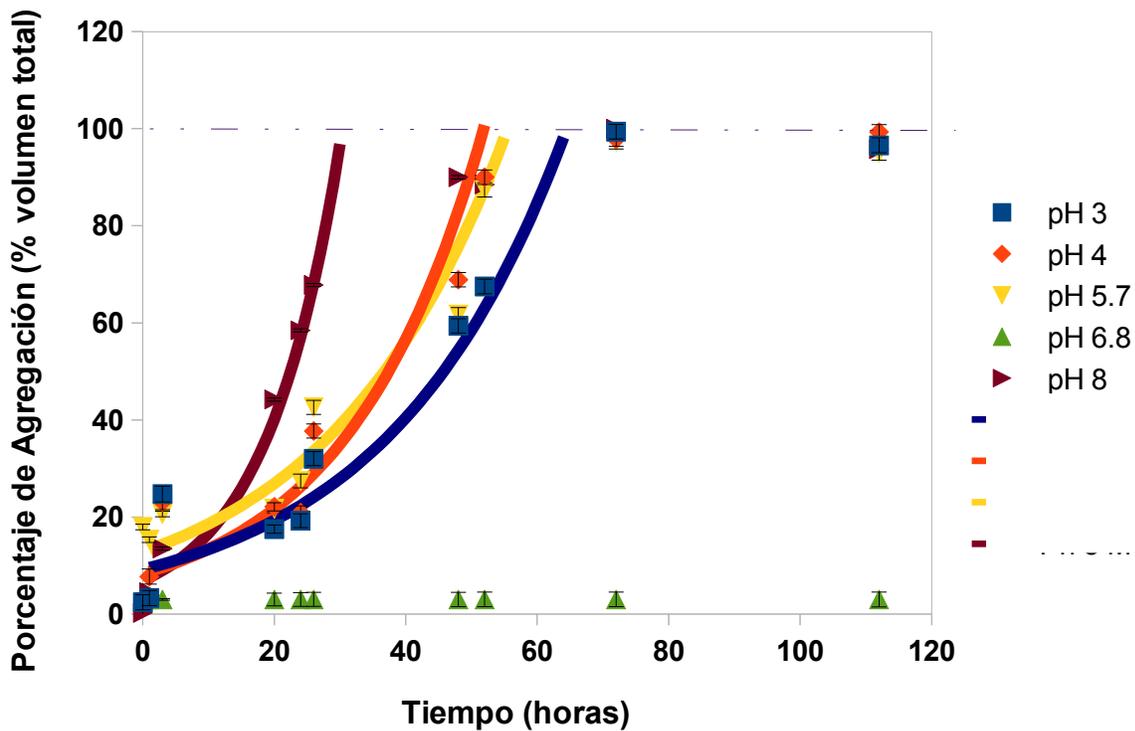


Figura 7.20. Cinética de agregación de HA_{rec} de H1N1 incubada a diferentes pH. Los puntos muestran el promedio de los datos experimentales de 3 repeticiones con 3 diferentes muestras. La línea continua es el comportamiento generado por la ecuación matemática. A pH de 6.8, HA_{rec} se mantiene sin cambio.

Tabla 7.5. Parámetros de la ecuación 6. para la velocidad de agregación para HA_{rec} a distintos pH

Ecuación de Agregación de primer orden				
	PH 3	PH 4	PH 5.7	PH 8
Ao (% volumen)	9.2	8.3	12.36	6.91
ka (1/hr)	0.037	0.048	0.037	0.088
R²	0.94	0.96	0.98	0.98

La constante ka permite la comparación del efecto del pH en la cinética de agregación. Mientras mayor sea ka mayor será el efecto del pH en la velocidad de agregación. El pH afecta a la proteína modificando el estado de protonación de los aminoácidos. Este cambio genera la ruptura y/o formación de puentes de hidrógeno que son importantes en la estructura secundaria y terciaria de la proteína, modifica los puentes salinos y genera repulsión entre regiones de la proteína que antes interactuaban. En el péptido de fusión de HA el aminoácido glicina se encuentra en una alta proporción (Cross et al; 2009) Sin embargo en el rango de pH en que se realizaron los estudios la glicina no se ve afectada. Otros aminoácidos que se encuentran presentes en el péptido de fusión son Asp (pKa 3.8), Glu (pKa 4.3) e His (pKa 6) cuyas cadenas laterales se ve afectadas en el rango de pH donde se realizó el estudio. A pH cercano a 3, estos aminoácidos se encuentran totalmente protonados y tienen carga positiva. A pH de 8 el efecto es el contrario, los tres aminoácidos están desprotonados y tienen carga negativa. En el rango de 4 a 6 la protonación de los aminoácidos varía. Remeta et al; (2002) observaron que la estructura secundaria de HA no cambia con respecto al pH en el rango de 3.5 a 7.5, sin embargo existe un cambio irreversible en la estructura terciaria. Del mismo modo se reportó que la

estabilidad de HA disminuye a pH ácidos siendo cerca de 5.4 donde HA experimenta una mayor inestabilidad en su estructura Kawaoka y Webster (1989) reportaron que se exponen regiones hidrófobas conforme el pH va disminuyendo lo que favorece el proceso de agregación. La exposición de las regiones hidrofóbicas explica el porque la proteína tiende a agregarse completamente a pH ácidos. Los datos reportados por Kissmann et al; 2010 para partículas pseudovirales formadas de NA y HA indican que estas partículas son más estables a pH 8 que a pH ácidos (Kissmann et al; 2010) lo cual contrasta con lo reportado en esta tesis donde la mayor velocidad específica de agregación para HA es a pH 8. Choi et al; (2006) con base en modelos computacionales y dinámica molecular determinaron que HA esta menos ionizada a pH cercanos a 8 que a pH ácidos, así mismo el pH de 8 favorece una estructura tipo bastón mientras que a pH ácido la estructura tiende a abrirse por la repulsión de cargas en la región troncal de la proteína. (Choi et al; 2006) La disminución de la ionización de HA disminuye la solubilidad de la proteína en el medio, lo que favorece que la agregación sea más rápida, disminuyen las interacciones dipolo y las interacciones hidrofóbicas tienden a tomar una mayor importancia en la velocidad de agregación de HA. Al observar las diferencias en la ΔG de agregación para cada pH de la proteína recombinante, se observa que a pH de 8 la reacción de agregación es más favorable que a otros pH en el estudio.

Para HA desglicosilada se planteó en un inicio que la agregación seguiría el mismo comportamiento que HA_{rec} . Sin embargo al observar los resultados se determinó que el comportamiento de HA desglicosilada no podía ser descrito de la misma forma que el de HA_{rec} . Se propuso que el cambio de la concentración de agregados con respecto al tiempo

no era función de la concentración de agregados, sino que era constante para cada tiempo. Por tal motivo se ajustó una ecuación de orden 0 para describir la cinética de agregación:

$$\frac{dA}{dt} = ka \quad A = ka * t + A_0 \quad \text{Eq. 7}$$

donde el cambio de agregación con respecto al tiempo es función de la velocidad de agregación ka y al integrar dicha ecuación se obtiene que la agregación a un tiempo t depende de la constante ka .

En la figura 7.21 se muestra la cinética de agregación de HA desglucosilada y en la tabla 7.6 se muestran los valores numéricos del modelo lineal.

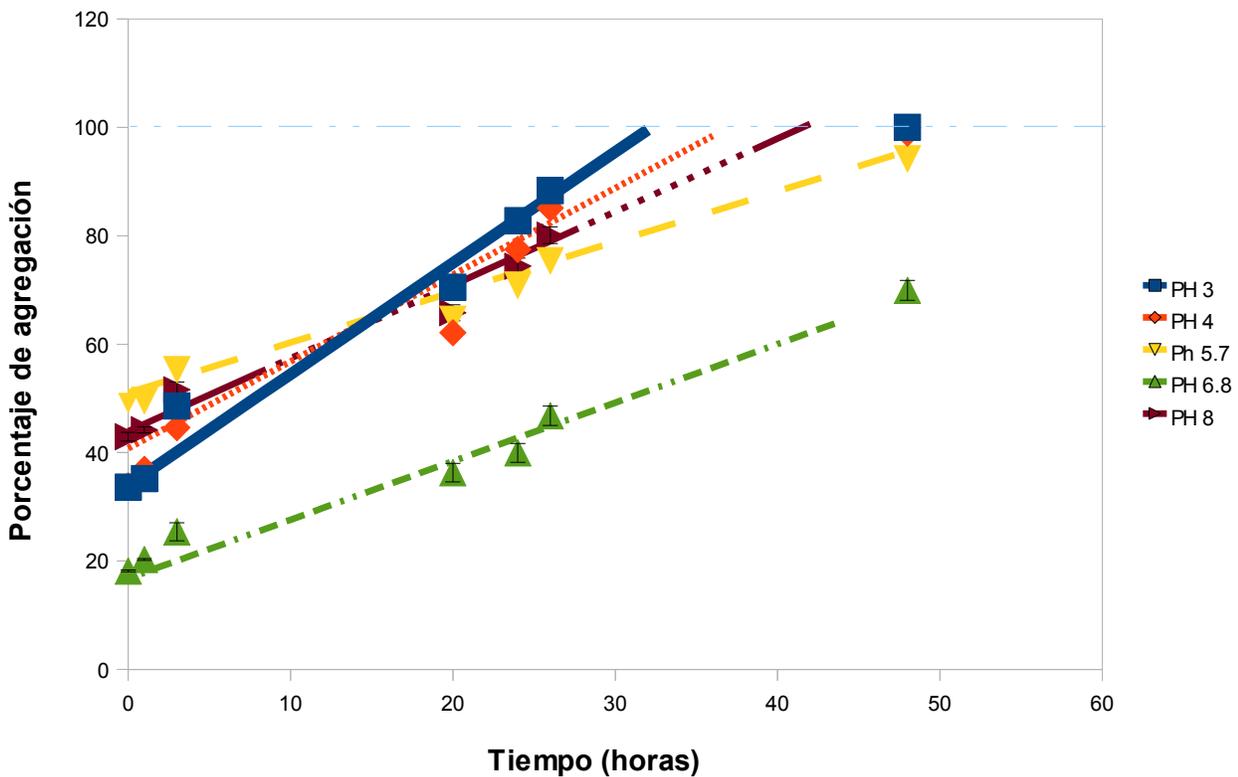


Figura 7.21. Cinética de agregación de HA desglucosilada de H1N1 incubada a diferentes pH. Los

puntos muestran el promedio de los datos experimentales de 3 repeticiones con 3 diferentes muestras. La línea continua es el comportamiento generado por la ecuación matemática. A pH de 6.8, HA desglucosilada se agrega a una velocidad menor que el resto.

Tabla 7.6. Parámetros de la ecuación 7. para la velocidad de agregación para HA desglucosilada a distintos pH

Ecuación de orden 0 para la agregación de HA desglucosilada					
constant	PH 3	PH 4	PH 5.7	PH 6.8	PH 8
ka (%agr /hr)	2.05	1.6	0.93	1.08	1.35
Ao % agr)	33.97	40.8	51	16.81	43.91
R ²	0.98	0.98	0.98	0.99	0.99

Una forma de explicar la diferencia entre los resultados obtenidos en la cinética de agregación de HA_{rec} y desglucosilada es la formación de núcleos de agregación que promueven la formación de nuevos agregados. Los agregados de HA_{rec} promueven la formación de nuevos agregados lo que provoca que al aumentar la agregación en el medio también se incremente la velocidad. Caso contrario ocurre con HA desglucosilada, donde la velocidad de agregación es independiente de la cantidad de agregados. Si se compara la constante de agregación *ka* se puede observar que la velocidad menor de agregación se obtuvo a pH 5.7, tanto para HA_{rec} como HA desglucosilada, así mismo se observó la mayor cantidad de agregados iniciales a ese pH. Sin embargo, a diferencia de HA_{rec}, existe una diferencia importante a los pH 3 y 8 indicando que HA desglucosilada es más susceptible a agregarse a pH ácido que HA_{rec}. La velocidad de agregación de HA desglucosilada se redujo conforme el pH se acerca a 5.7 y posteriormente vuelve a aumentar. Este

comportamiento de la velocidad de agregación parece indicar que el pI de la proteína esta cerca de 5.7. Esto puede apreciarse debido a que la proteína sin carga neta tendrá a interactuar menos con el resto de partículas neutras, que una partícula parcialmente cargada y por lo tanto será más susceptible a la agregación. Reed et al; 2009 reportan que entre 5.5 y 6 HA presenta cambios conformacionales que exponen el péptido de fusión para unirse al huésped y que este paso es esencial para la infectividad del virus. Panahi y Feig (2009) reportan que HA tiene un cambio de conformación en su estructura secundaria cuando el pH cambia de 7.4 a 5, lo que permite que HA se pueda fusionar con membranas lipídicas. Wang et al; (2009) reportó que HA disminuye su capacidad infectiva al aumentar el tamaño y cantidad de N-glicosilaciones, Mientras Vigerust et al; (2007) reportó que la N-glicosilación puede afectar el proceso de corte proteolítico de HA y reduce la movilidad de la estructura de HA. Al observar los diferentes comportamientos en la agregación de HA_{rec} y HA desglucosilada y compararlo con el efecto de la N-glicosilación en el proceso de infección, es posible suponer que las N-glicosilaciones aporten rigidez al trímero de HA lo que limita la exposición de regiones hidrofóbicas reduciendo la capacidad infectiva de HA en el virus, y su predisposición a agregarse en HA recombinante.

Las cinéticas que se pueden ajustar a una ecuación de primer orden pueden corresponder a dos tipos diferentes de agregación: Agregación limitada por desnaturalización de la proteína o agregación por nucleación (Weiss et al; 2008) En el primer caso el modelo de agregación indica que la desnaturalización de la proteína es más rápida que su correcto plegamiento lo que promueve que la proteína desnaturalizada forme el agregado en vez de que recobrar su forma nativa. Para la agregación por nucleación se entiende que la

formación de núcleos promueve la agregación de proteína. En este modelo los pasos limitantes son tanto la formación de núcleos como el crecimiento de estos (Weiss et al; 2008). En el caso de HA se buscó determinar el tipo de agregación que sigue la proteína por medio de microscopia de transmisión electrónica (TEM) Como se muestra en la figura 7.25 los agregados de HA a pH 3 y 8 muestran estructura homogénea de agregación y una gran cantidad de grupos de agregados, mientras que para los pH de 4 y 5.7 los agregados parecen no seguir un patrón y parecen estar acumulados en un gran montón. Por tal motivo se puede concluir que al menos para los pH de 3 y 8 la agregación es dependiente de nucleación, es decir de la velocidad con que los trímeros de HA interactúan entre si para formar núcleos de agregación, mientras para pH 4 y 5.7 parece ser que el mecanismo de agregación depende de la velocidad con que HA se desnaturaliza.

Con respecto a la proteína desglicosilada las cinéticas que siguen una ecuación de orden 0 indican que la agregación es dependiente de la difusión de las proteínas en el medio, es decir que la velocidad de desnaturalización e interacción de la proteína son despreciables en comparación a la velocidad con que se encuentra una proteína con otra (Weiss, 2006)

Se realizó el análisis de tamaño por HPLC-SEC al final de la reacción para HA_{rec} con el propósito de determinar el tamaño aproximado de los agregados. Con el tiempo de elución se calculó el radio hidrodinámico de los agregados

En la tabla 7.7 se puede observar que existe una relación entre el pH y el tamaño de los agregados. El tamaño de los agregados parece aumentar conforme se va alejando el pH del punto neutro. Para pH ácidos el mayor tamaño de agregado se observó a pH 3 mientras se observa un incremento en el tamaño en pH 8 en comparación con el de 6.8.

Con respecto a pH 8 el tamaño de los agregados estuvo por fuera de los límites de caracterización del equipo, por lo que el dato proporcionado es una extrapolación. En base a los datos de TEM que se analizan más adelante y a lo reportado por Remeta et al; (2002) los agregados obtenidos por los cambios de pH parecen tener forma de roseta. Sin embargo no se considera que la evidencia presentada sea concluyente.

Tabla 7.7 Tamaño y peso molecular promedio de los agregados de HA a diferentes pH cuando alcanzan el equilibrio. (* El valor de tiempo de elución se encuentra fuera de la curva de calibración) a pH 3, 5.7 y 8* las poblaciones son polidispersas.

pH	Ve (ml)	RH (nm)	PMP (kDa)	IP
3	1.72	29.15	1816	1.2
4	1.76	28.1	1748	1
5.7	1.92	23.8	185.8	1.08
6.8	2.98	4.6	114.9	1
8	3.07	4.4	109	1
8	1.6	32.31	2020	1.1

7.5 Estabilidad y formación de estructuras de HA a diferentes FI.

La fuerza iónica es una medida de la concentración total de iones en una solución. La concentración de iones juega un papel primordial en la estabilidad de la proteína. A altas concentraciones de iones la proteína puede precipitarse, pues esta compite con los iones para interactuar con los iones del agua. Los iones pueden enmascarar la carga neta de una proteína o ayudarla a formar interacciones con otras estructuras, formando los puentes salinos. Se ha observado para otras proteínas de virus que la fuerza iónica es importante para generar diferentes estructuras cuaternarias homogéneas como esferas y tubos. Con esto en mente se decidió analizar la estabilidad de HA a diferentes condiciones de fuerza iónica variando la concentración de NaCl en el buffer fosfatos a pH 6.8 y a 25°C de

temperatura. En un principio se esperaba que la proteína se comportara de forma estable, sin embargo como se muestra en la figura 7.22 la agregación HA_{rec} a distintas fuerzas iónicas no mostró una tendencia a lo largo del tiempo.

También se midió el diámetro hidrodinámico (figura 7.23) de HA_{rec} a diferentes FI donde tampoco se observó una tendencia que permita un análisis de la estabilidad de HA. HA solo es estable a concentraciones de 150 mM de NaCl.

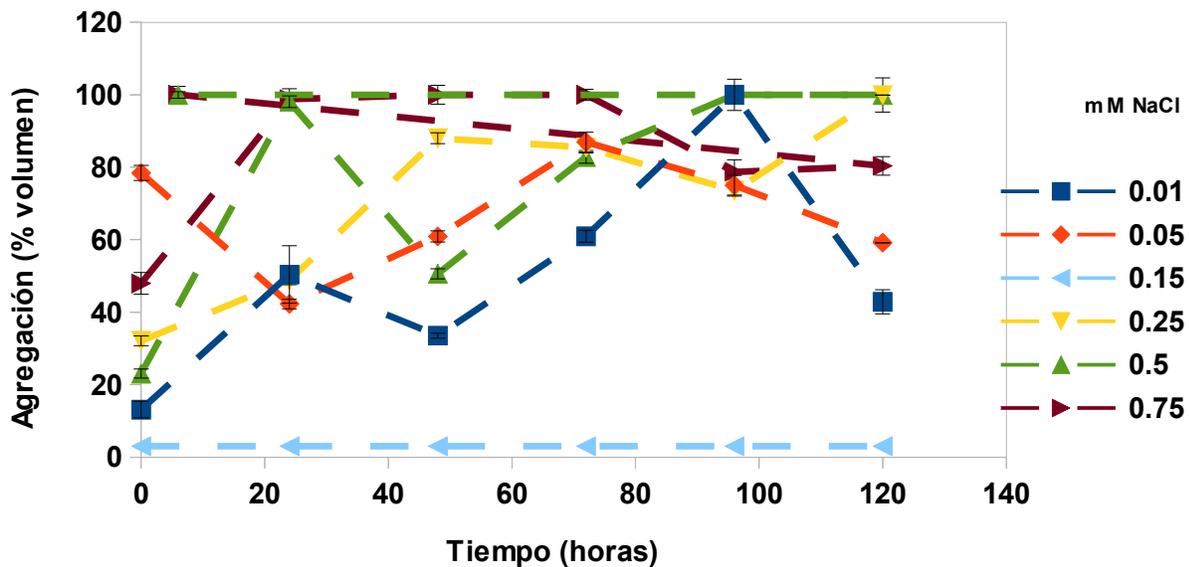


Figura 7.22. Cinética de agregación de HA_{rec} de H1N1 a diferentes concentraciones de NaCl. Se muestra el promedio de tres repeticiones de tres diferentes muestras.

Se observaron las estructuras de HA_{rec} con tratamiento de FI por TEM donde se observó agregación heterogénea de la proteína.

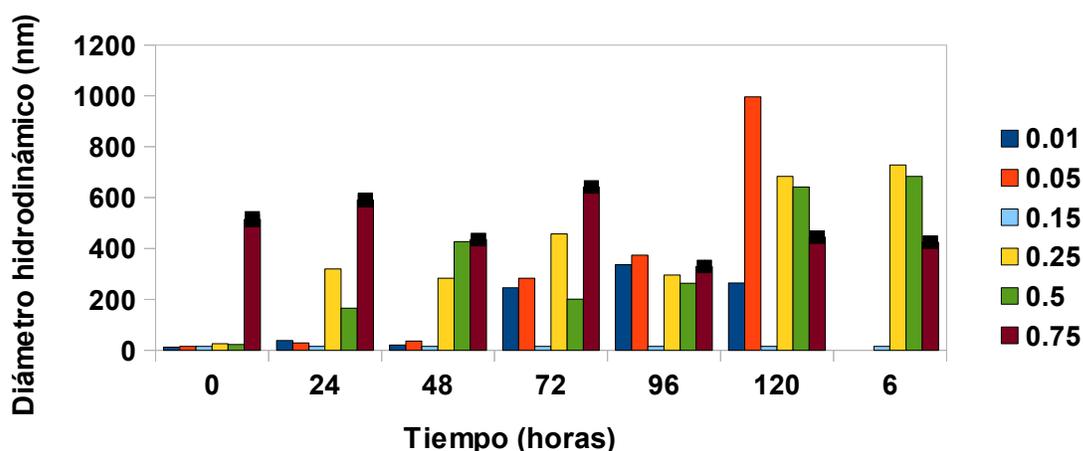


Figura 7.23. Diámetro hidrodinámico promedio de HA a lo largo del tiempo a distintas concentraciones de NaCl. Se muestra el promedio de tres repeticiones de 3 diferentes muestras.

7.6 Determinación de la morfología de los agregados de HA.

7.6.1 Agregados de HA_{rec} y desglucosilada en función de la temperatura.

Los agregados formados a cada temperatura de HA_{rec} y desglucosilada fueron observados por medio de microscopia de transmisión electrónica (TEM) Esta técnica permite complementar los resultados obtenidos por HPLC SEC y DLS, pues proporciona información sobre la morfología de los agregados. Por medio de TEM, se puede determinar si existen estructuras homogéneas que puedan clasificarse como rosetas y así se puede determinar si algún tratamiento consiguió generar dichas estructuras.

Se cuantificó por TEM las muestras de los agregados sin poder observar ninguna estructura homogénea en las imágenes de HA. Los agregados se muestran como

amontonamientos proteicos sin patrón común.

En la figura 7.24 se muestran imágenes de agregados de HA obtenidos por tratamiento de temperatura. No se muestran todas las imágenes obtenidas, sino solo aquellas que se consideraron representativas del tipo de agregado.

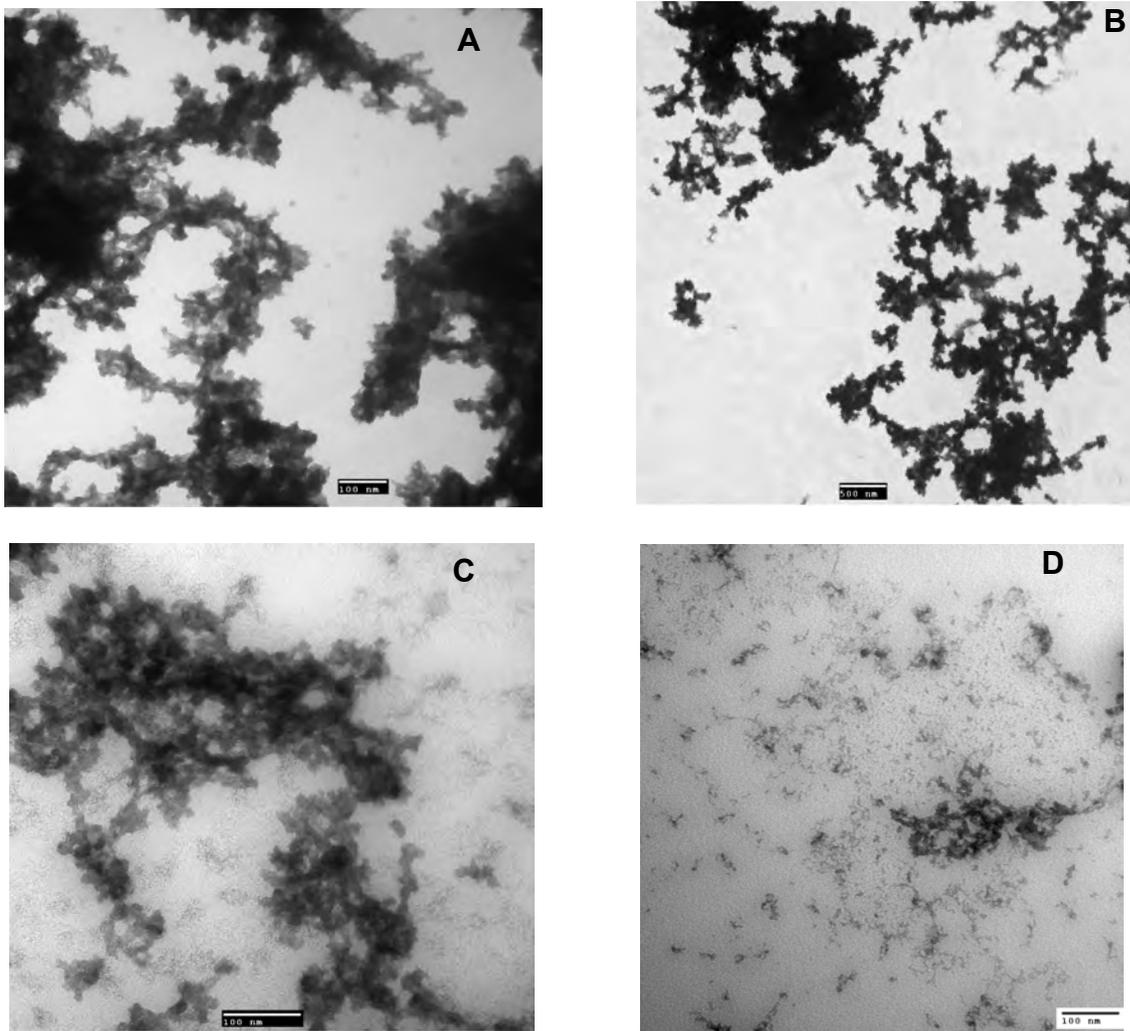


Figura 7.24. Agregados de HA de H1N1 vistos por microscopía de transmisión electrónica. A) HA desglucosilada tratada a 55°C a 120K de aumento B) HA desglucosilada a 65°C a 25K de aumento. C) HA_{rec} a 65°C a 200K de aumento, D) HA_{rec} a 25°C a 150K de aumento.

Según lo reportado por Weiss et al; 2006 determinan que los agregados observados en la figura 7.24 son del tipo amorfos y no generan fibras. Dichos agregados son similares a los reportados por Dom y Helenius (1986) para HA de virus de la influenza.

7.6.2 Agregados de HA_{rec} y desglicosilada en función del pH

Los agregados de HA con tratamiento de pH muestran estructuras homogéneas de un tamaño cercano a 60 nm de radio. Dichos agregados se obtuvieron con la proteína recombinante a un pH de 3. Las estructuras homogéneas presentan formas de radios unidos por un extremo que pueden considerarse rosetas. HA_{rec} a pH 8 parece formar estructuras homogéneas con forma de rosetas, sin embargo no fue posible tener una buena definición de la morfología (figura 7.25) La proteína desglicosilada no formó agregados homogéneos observables. No se pudo observar agregados homogéneos a pH de 4 y 5.7 en la proteína recombinante, lo que parece indicar que el grado de protonación de los aminoácidos en la proteína juega un papel importante en el proceso de formación de agregados homogéneos. Con base en los resultados observados a pH 3 y 8 se consideró que existía una correlación entre la velocidad de agregación y la formación de rosetas en HA_{rec}, puesto que el modelo propone la formación de núcleos de agregación, sin embargo no se puede indicar que exista dicha correlación debido a que no se encontró rosetas en el resto de muestras a diferentes pH.

En la figura 7.25 se muestra las imágenes de HA_{rec} a pH 3, los agregados de HA_{rec} a pH 8 y los agregados de HA desglicosilada a pH 8 como muestra representativa.

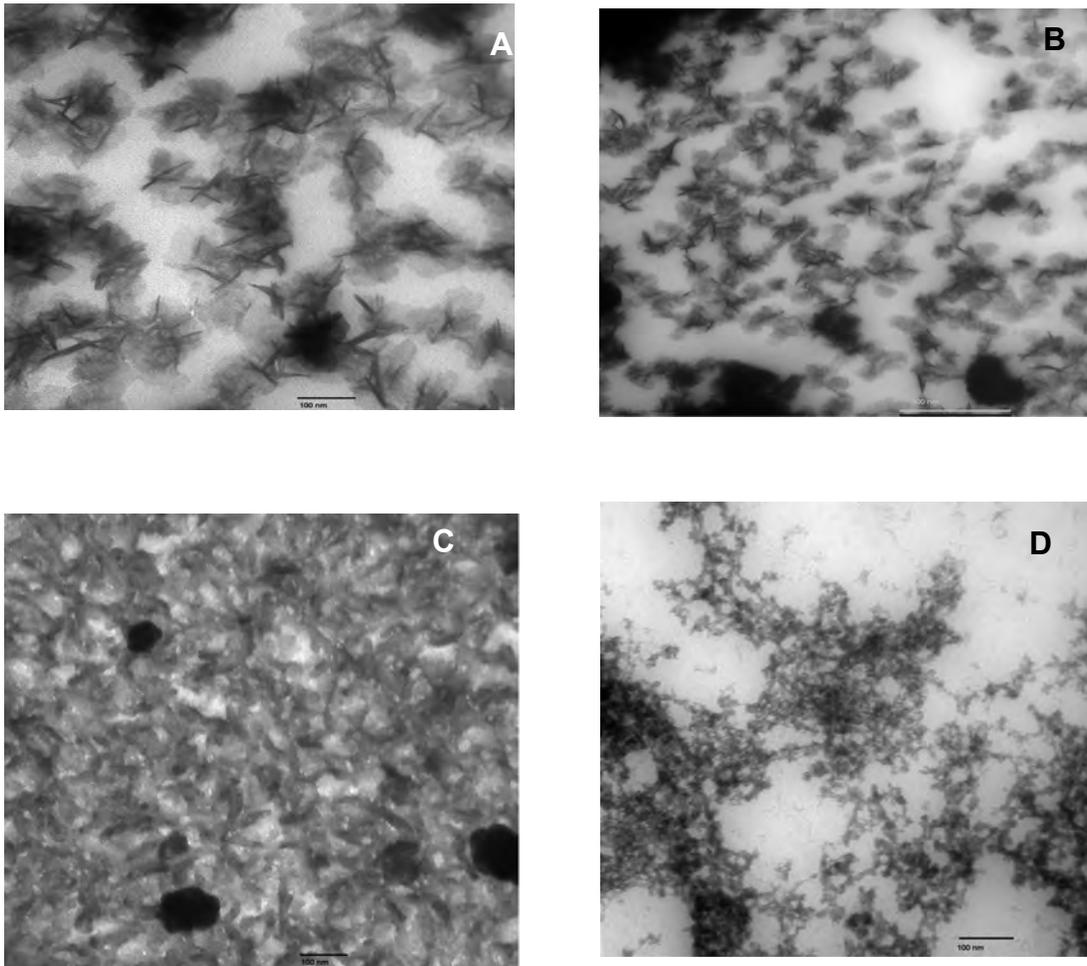


Figura 7.25. Agregados homogéneos de HA con tratamiento de pH 3. A) HA_{rec} a 150K. B) HA desglycosilada a pH 3 a 60K. C) HA_{rec} a pH 8 a 120K. D) HA desglycosilada a pH 8 a 120K

Los agregados observados en la figura 7.25 A y B son diferentes a los reportados por Remeta et al; 2002 para una roseta sin embargo los de 7.25 C y D son similares. Comparando con lo reportado por Doms y Helenius (1986) y Kissmann et al; (2010) los agregados de la imagen 7.25 A y B tampoco son similares al virus completo o a partículas pseudovirales de HA y NA. En la tabla 7.7 se mostró que el radio hidrodinámico de las partículas de la figura 7.25 son de 29 a 32 nm y polidispersos, contrastando con los 20 nm

que reportó Remeta et al; (2002) para rosetas. Lo que se observa en la figura 7.25 muestra agregados con forma de roseta pero que difieren con las características (uniformidad de la población y tamaño) reportadas anteriormente.

7.7 Determinación del título de anticuerpos en ratones inmunizados con HA_{rec} y desglicosilada.

Como se comentó en los antecedentes, la efectividad de una proteína soluble como vacuna depende del tamaño y la estabilidad de esta en el huésped. Además de esto es importante el reconocimiento por parte del sistema inmune de los epítopos relevantes (Bachmann et al; 2010). Con el objetivo de determinar la capacidad de respuesta del sistema inmune contra HA, se suministró la proteína a ratones Balb-C hembras en buffer de fosfatos a pH fisiológico sin adyuvante con el fin de comparar la respuesta inmunogénica que genera HA_{rec} y desglicosilada.

La proteína fue administrada por vía subcutánea a los 0 y 15 días con el objetivo que la segunda dosis fuese un refuerzo para la primer inyección. Cada semana se recolectó la sangre de los ratones para obtener el suero y por medio de la técnica de ELISA medir el título de IgG de los ratones contra HA_{rec} y desglicosilada. Se graficó el resultado de los cuatro ratones (figura geométrica) y el promedio geométrico (línea) con respecto a la semana en que se hizo la medición. Así mismo se calculó la significación estadística para cada tratamiento comparado con el control de dicha semana y entre tratamientos utilizando la prueba T de Student. Se determinó que existía diferencia significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$. Así mismo se determinó la significación estadística entre los valores obtenidos

antes de la inmunización y su cambio cada semana. Se utilizó la prueba T de Student para el calculo del valor p, y se consideró que existía diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$. En la figura 7.26 se muestra el titulo de anticuerpos obtenidos para ratones inmunizados con la proteína recombinante, desglicosilada y el control negativo en el transcurso del tiempo después de la primera dosis. No se gráfica la semana dos pues en esta se realizó el refuerzo de la vacuna.

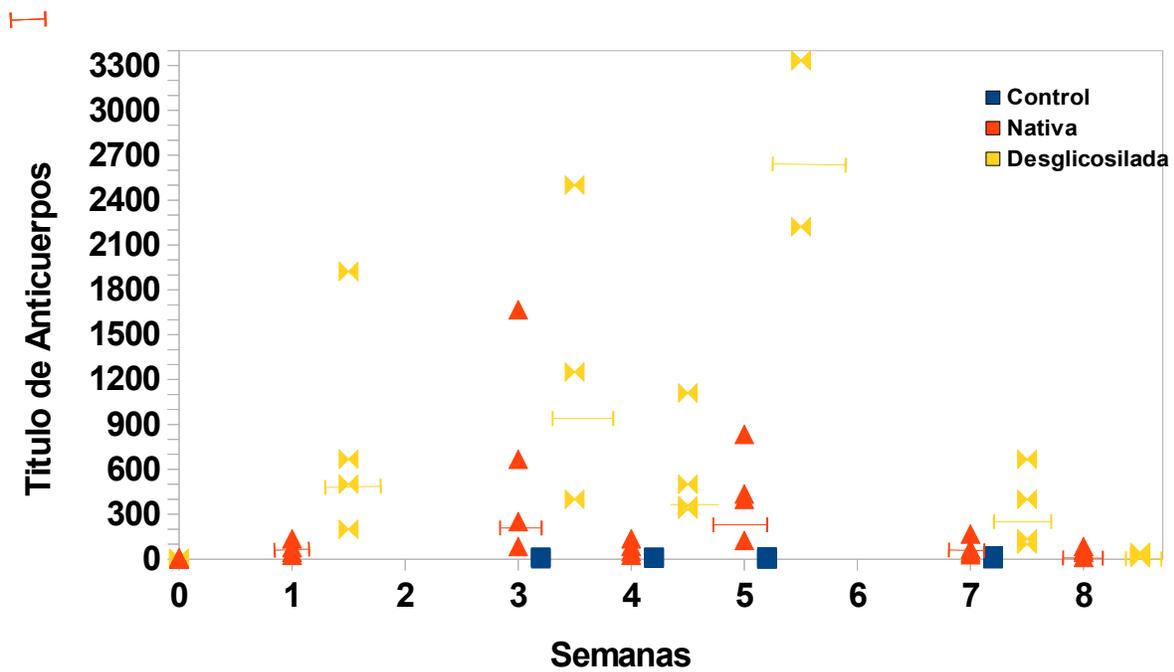


Figura 7.26 Titulo de anticuerpos para animales control e inmunizados con HA_{rec} y desglicosilada.

Cada símbolo representa el título de anticuerpos.

En la figura 7.26 se puede observar que HA desglicosilada genera una mayor titulo de anticuerpos que HA_{rec} llegando a su máximo en la semana 5 . En algunos casos la diferencia es de un orden de magnitud mayor para HA desglicosilada y existe diferencia

significativa entre tratamientos en la semana 4 y 5 (tabla 7.8) El análisis estadístico indica que para todos los casos, cuando se inoculó con HA tanto recombinante como desglicosilada hay una diferencia estadísticamente significativa con respecto a inocular con buffer a pH fisiológico usado como control negativo. Así mismo, se obtuvo valores de p menores a 0.05 cuando se comparo los tratamientos de cada semana con el inicial. Esto indica que la diferencia a lo largo del tiempo no son debidas al azar. Cuando se compara el efecto de HA_{rec} y HA desglicosilada, se puede observar que existe diferencia significativa en la semana 4 y 5. Para el resto de los tiempos no se puede determinar que la diferencia en los datos sea debido a la diferencia entre los tratamientos.

Tabla 7.8. Títulos promedio de anticuerpos generados por HA_{rec} HA desglicosilada, y control (-). Se presenta los valores de p obtenidos en los siguientes casos: Diferencia entre tratamientos (Diferencia significativa entre HA_{rec} y HA desglicosilada) entre HA_{rec} y el control (-) y Ha desglicosilada y el control (-). Se determinó que existe diferencia significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$.

Semana	Titulo de anticuerpo promedio			Valor p		
	HA rec	HA deg.	Control	Entre tratamientos	HA rec y (-)	HA desg y (-)
0	1	1	-	-	-	-
1	58	598	5	0.06	0.03	0.02
3	390	1078	4	0.1	0.05	0.05
4	61	507	5	0.03	0.04	0.03
5	367	3012	4	0	0.03	0
7	61	245	3	0.08	0.05	0.05
8	40	25	3	0.13	0.04	0.04

El aumento en los títulos de anticuerpos al eliminar las N-glicosilaciones se ha observado en otros virus como en el caso del VIH donde al eliminar N-glicosilaciones cercanas al sitio de unión de la proteína gp120 (proteína altamente glicosilada y principal objetivo para producir una vacuna) se ha visto un aumento en la capacidad inmunogénica generando

anticuerpos neutralizantes contra el virus (Huang et al; 2011) Así mismo se han observado efectos similares para el virus de la influenza donde se han usado cepas con una menor cantidad de glicanos en HA y que han mostrado una mayor producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Wanzeck et al; 2011)

La estructura tridimensional de HA muestra N-glicosilaciones en la superficie lateral de HA y en las subunidades globulares en la parte superior de la estructura que sirven a la proteína como unión a los receptores de las células blanco. Tanto la región globular como la región troncal de HA están glicosiladas, afectando las propiedades funcionales de la proteína. Entre los diferentes subtipos de HA, existe una gran variación en la glicosilación de la región globular, al contrario de la glicosilación en la región troncal, la cual es más conservada y se requiere para el correcto plegamiento de la proteína. Se ha observado que las secuencias de péptidos alrededor de la zona de glicosilación están altamente conservados, lo que sugiere que las glicosilaciones son significativamente importantes. Wang et al; (2009) observaron que los patrones de glicosilación en HA también determinan la afinidad y la especificidad del virus, así como la respuesta inmune ante HA. Observaron que mientras menos ramificados son los glicanos unidos a HA, la afinidad por el huésped aumenta mientras que la especificidad se ve disminuida. Así mismo al aumentar el número de glicosilaciones en HA el virus puede unirse más fácilmente a las células del huésped pero disminuye su capacidad de infección (Vigerust et al; 2007) debido a que el virus puede verse atrapado por esas mismas glicosilaciones a la célula huésped. Además de esto el aumento de glicosilaciones en HA es un proceso de adaptación dado en el virus al irse incorporando a humanos. Los virus de origen aviar tienen pocos sitios de glicosilación en

comparación de los virus que infectan a mamíferos, esto debido a la necesidad del virus a adaptarse a los receptores de los nuevos huéspedes. Por tal motivo una de las características de los virus pandémicos es su baja cantidad de glicosilaciones en HA (Reichert et al; 2010) Wang et al; (2009) comprobaron que al reducir las N-glicosilaciones a las mínimas requeridas para el plegamiento y estabilización de HA se aumenta la capacidad inmunogénica de la proteína y protege al huésped contra infecciones del virus. Esto puede deberse a que HA utiliza en parte la glicosilación para proteger epítopes del reconocimiento por el sistema inmune del huésped lo que justificaría el aumento en la respuesta inmune al eliminar dichas protecciones. Otro motivo por el cual la proteína desglicosilada puede tener un mayor título de anticuerpos puede ser a la estabilidad de la proteína. Takatoshi y colaboradores (2010) demostraron que la producción de IgG esta inversamente correlacionada con la estabilidad conformacional del antígeno, lo que nos indica que una estructura altamente estable tiene una menor capacidad de producir una respuesta inmune adecuada. Como se demostró en los objetivos obtenidos en este trabajo, la proteína desglicosilada es menos estable que la proteína recombinante, lo que favorece su asimilación y la activación de células T generando una mayor respuesta inmune. Sin embargo aún queda la duda de si la generación de IgG contra HA desglicosilada genera una adecuada protección contra la infección del virus puesto que los antígenos de proteínas solubles son usualmente presentados de forma ineficiente (Harding et al; 1994, Storni y Bachmann; 2004) y no se evaluó si los anticuerpos obtenidos neutralizan el virus

Wanzeck et al; (2011) realizó un experimento en ratones a los que infectó con diferentes

cepas de virus de la influenza con cantidades diferentes de glicosilaciones en HA. Al retar a los ratones que habían sido infectados primeramente con virus altamente glicosilados usando virus con mínimas glicosilaciones, los ratones mostraron signos de infección fuerte y sólo un 17% de sobrevivencia. En contraste, cuando los ratones fueron retados con virus altamente glicosilados cuando habían sido infectados primeramente con virus con pocas glicosilaciones los ratones mostraron altos títulos de anticuerpos neutralizantes y tuvieron 100% de sobrevivencia. (Wanzeck et al; 2011) Además de esto, Wanzeck et al; 2011 observó que el efecto anteriormente observado era debido a la respuesta de las células T por lo que se concluyó que a pesar de que los virus altamente glicosilados generaban anticuerpos estos no eran eficientes en detener la infección e hipotetizar que los efectos del contagio del virus pandémico en la población podían ser derivados de una inadecuada respuesta inmunológica de las células T. Por tal motivo, derivado de este estudio y apoyado en los datos observados de HA desglicosilada presentados en la figura 7.27 se puede concluir que para una mayor eficiencia en la protección contra el virus de la influenza, la proteína HA debe ser desglicosilada para poder generar adecuados títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus y ampliar la protección generada por la vacuna. En este sentido la capacidad de desglicosilar a HA antes de su administración como vacuna podría ayudar a combatir cepas del virus altamente infecciosas y combatir de forma parcial el contagio contra virus de temporada no esperados. Sin embargo el principal problema de desglicosilar HA, como se demostró anteriormente es la tendencia de la proteína a agregarse al ser desglicosilada. Esto impide que se realice el tratamiento de desglicosilación de HA desde la fabrica pues reduciría significativamente su vida de anaquel. Una alternativa para el tratamiento de HA puede ser desglicosilar la proteína antes

de administrar la dosis. Como se observó en la figura 7.26 la proteína desglicosilada genera una respuesta mayor que la proteína recombinante, lo que permitiría formular la vacuna con una menor cantidad de inmunógeno y tener aún una buena respuesta inmune. Se requiere de un estudio económico que no esta dentro de los alcances de la presente tesis para determinar si industrialmente es factible y redituable el tratamiento de HA con endoglicosidasas puesto que el tratamiento propuesto requiere el cambio de soluciones buffer para el correcto funcionamiento de la enzima y el buffer fisiológico para su administración en el paciente lo que podría ser un proceso difícil para el usuario final. Sin embargo las ventajas comparativas en el aspecto funcional de la desglicosilación de HA son de consideración al momento de tomar la decisión final, puesto que el objetivo final de una vacuna es generar protección contra el mayor número de posibles infecciones incluso como una herramienta útil en caso de epidemias.

8. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se demostró la importancia de la N-glicosilación en la estabilidad y capacidad inmunogénica HA recombinante producida en células de insecto.

Se demostró que los patrones de glicosilación de HA H1N1 y H3N2 son diferentes en la cantidad de glicanos ricos en manosa y paucimansa. Esto está correlacionado con la diferencia de radios hidrodinámicos de ambas así como una diferencia en las poblaciones presentes, mostrando que el patrón de N-glicosilación puede tener relación con la capacidad de de HA de formar agregados.

Se demostró que la N-glicosilación favorece la estabilidad de HA tanto a cambios de temperatura y pH. HA tiene un comportamiento de agregación distinto al remover los N-glicanos de su estructura. HA_{rec} tiende a agregarse a temperaturas mayores de los 45°C. La HA desglicosilada tiende a agregarse a temperaturas superiores a los 35°C, por lo que la N-glicosilación da mayor estabilidad a la agregación a HA.

HA demostró ser estable a pH de 6.8. Al variar el pH, HA_{rec} se agregó completamente a los 3 días. HA_{rec} se agregó de forma exponencial mostrando un mecanismo dependiente de la concentración de agregados iniciales. A pH 8 se obtuvo la máxima velocidad de agregación para HA_{rec}. HA desglicosilada se agregó completamente a cualquier pH en 2 días y tuvo una agregación directamente proporcional al tiempo. A pH de 3 se obtuvo la

mayor velocidad de agregación para HA_{rec}. A pH de 5.7 se obtuvo la velocidad de agregación más lenta tanto para HA_{rec} como desglicosilada. Se formaron agregados homogéneos de HA_{rec} incubados a pH de 3 y 8 y fueron observados por medio de microscopia de transmisión electrónica. Se confirmó que al remover los glicanos de HA recombinante se obtiene un mayor título de anticuerpos en ratones Balb-C en comparación con HA_{rec}. Sin embargo en el presente estudio no se demostró que HA desglicosilada genere una protección eficiente contra la infección del virus de la influenza.

Los resultados presentados en este trabajo muestran un avance necesario para el desarrollo de nuevas vacunas basadas en proteínas. Sin embargo existe una gran área de oportunidad de investigación en el área de N-glicosilación y sus efectos en la capacidad inmunogénica. Sería interesante generar formas glicosiladas complejas y evaluar si el tipo de glicano afecta la estabilidad de la proteína. Así mismo el desarrollo de nuevas cepas capaces de glicosilaciones complejas con rendimientos iguales o mayores a las actuales cepas productoras.

Finalmente es de importancia comercial desarrollar un método económico para generar HA desglicosilada y comprobar la eficacia de la vacuna en la generación de anticuerpos neutralizantes. Determinar qué tipo de anticuerpos se genera así mismo saber si los agregados son más inmunológicos que la proteína recombinante son áreas aún por investigar.

9. Apendices

A.1 El virus de la influenza

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* (del griego *orthos*, “correcto, estandard” y *myxo* “mucosa”) la cual comprende a los géneros influenza A, B y C, siendo solo A y B de relevancia para la salud humana. Recibió este nombre debido a su habilidad de unirse a la mucosa. Los *Orthomyxoviridae* son virus envueltos con un genoma de RNA de cadena simple (ssRNA) negativa el cual sirve como templado para la síntesis de mRNA y para la síntesis de la cadena positiva de RNA que servirá para la producción del genoma viral. El genoma del virus esta compuesto por 8 segmentos (Influenza C cuenta solo con 7) de RNA que codifican para 10 proteínas (el segmento 7 y 8 pueden ser modificados por splicing). La partícula viral esta cubierta por una membrana lipídica (derivada de la membrana plasmática del huésped) donde tres proteínas están insertadas. La neuroamidasa (NA) y hemaglutinina (HA) están embebidas a lo largo de la membrana formando estructuras similares a púas y actúan en la identificación e infección al huésped así como en la liberación de la progenie viral de la célula infectada. La proteína transmembranal M2 se encuentra atravesando la membrana y actúa como canal iónico. La capa lipídica rodea una capa interna formada por la proteína matricial M1 que encierra el genoma viral asociado a la proteína NP (solo el RNA asociado a las proteínas NP se expresan) y pequeñas cantidades de las proteínas PB1, PB2 y PA que forman el complejo

RNA polimerasa. Dentro de la partícula viral se encuentra la proteína exportadora del núcleo NEP. (Lamb y Krug, 1996).

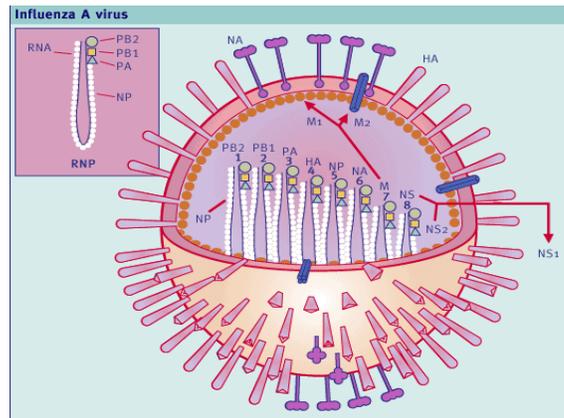


Figura A.1 Esquema del virus de la influenza. (Arias et al; 2009)

A.1.1 Ciclo de replicación del virus de la influenza.

El proceso de infección comienza cuando los residuos de ácido siálico presentes en los proteoglicanos y glicolípidos encontrados en la superficie de la célula blanco son reconocidos por el virus. El sitio de unión al receptor localizado en HA es el encargado de reconocer y unir al virión con la célula objetivo. En este proceso, el virus es altamente selectivo. Se ha observado que HA puede unirse al ácido siálico unido a la galactosa en enlaces α 2-3 (encontrados en células epiteliales gastrointestinales de las aves y tejido epitelial de cerdos) o en enlaces α 2-6 (encontrados en el tejido epitelial de la tráquea de humanos y cerdos) permitiendo que el virus sea altamente selectivo con la especie a la que infecta. Una vez que el virus ha entrado en contacto con la célula objetivo, el virus entra al

citoplasma por un proceso conocido como endocitosis mediada por receptor. El virus es internalizado en una vesícula formada por la invaginación de dominios especializados localizados en la membrana plasmática. Una vez internalizado, la vesícula se fusiona con los endosomas (organelos que presentan un pH altamente ácido). El pH ácido de los endosomas provoca un cambio conformacional en HA que fusiona la membrana viral con la membrana del endosoma. El canal iónico M2 permite el flujo de iones del endosoma al interior del virón, favoreciendo la disociación de las proteínas NP (unidas al RNA del virus) de la estructura formada por la proteína M1. Una vez fusionadas las membranas viral y del endosoma, el materia genético es transportado al citoplasma y llevado al núcleo de la célula. La replicación y transcripción del RNA viral es llevada acabo por el complejo RNA polimerasa en el núcleo de la célula infectada y posteriormente exportados al citoplasma por las proteínas NEP y M1 (Arias et al; 2009)

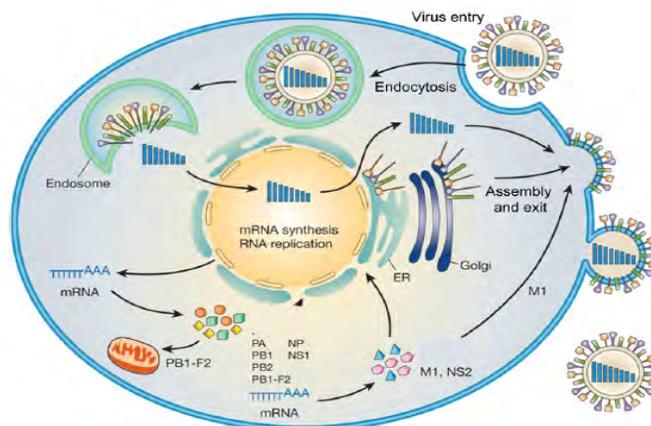


Figura A.2 Ciclo de replicación del virus de la influenza (Arias et al; 2009)

Las proteínas de membrana comienzan a sintetizarse y se asocian a la membrana plasmática de la célula infectada, posteriormente el ssRNA- se asocia con la proteína NP y M1 para ser empacados en el nuevo virón. El virón empacado es liberado de la célula huésped aprovechando la actividad neuroaminidasa de NA, comenzando nuevamente el

ciclo de infección (Lamb y Krug, 1996).

A.1.2 Variabilidad en el virus de la influenza.

El virus de la influenza es bien conocido por su habilidad de mutar para evadir al sistema inmune y reinfectar el huésped. Esto se debe a dos fenómenos: la deriva génica (genetic drift) y el cambio antigénico (antigenic shift). La deriva génica es una fuerza evolutiva que actúa en conjunto con la selección natural cambiando las características de la especie con respecto al tiempo. La deriva genética se puede definir como los cambios al azar en la frecuencia de una variable mutacional en la población que por probabilidad tiene la posibilidad de fijarse en los genotipos de la descendencia y que no encaja con las predicciones de la herencia mendeliana. En una población muy grande, los efectos aleatorios de la deriva genética tienden a promediarse, por lo que existe un cambio pequeño en la frecuencia de cada variante. Sin embargo, en poblaciones pequeñas los cambios aleatorios pueden ser significativos y la deriva génica tiene un efecto mayor en la variación genética de la población. La deriva génica es un proceso aleatorio por lo que el destino eventual de una variante particular no puede ser estrictamente predecible pero puede asignarse una probabilidad de acuerdo a la frecuencia de la variable (Krebs et al, 2010) El factor principal que genera las mutaciones en la influenza es la falta de actividad de corrección de errores de la RNA polimerasa viral durante la replicación.(Arias et al, 2009) El cambio antigénico es un mecanismo de evolución derivado del genoma segmentado que tiene el virus que permite la formación de nueva progenie cuando los segmentos de dos o mas subtipos de virus infectan a la misma célula huésped. Este proceso permite introducir nuevas proteínas en las poblaciones virales circundantes que

pueden cambiar drásticamente las propiedades biológicas del virus. El cambio antigénico esta comúnmente asociado a la aparición de virus pandémicos y a la capacidad de que un virus altamente afín a una especie pueda introducirse en otra diferente, como sucede en el caso en que la influenza de aves infecta a humanos (Arias et al, 2009). La combinación de la deriva génica y el cambio antigénico afectan principalmente a las proteínas HA y NA. Se han identificado 16 tipos diferentes de HA que en combinación con 9 tipos de NA sirven para la clasificación del virus (Lamb y Krug, 1996).

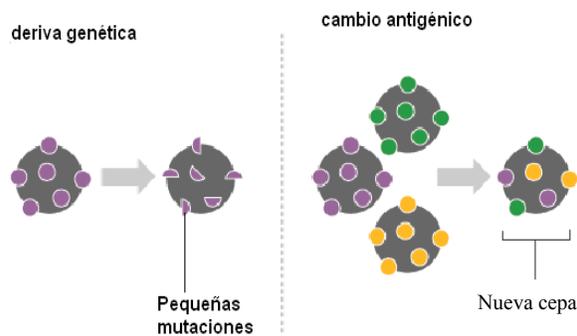


Figura A.3. Mecanismo mutacional del virus de la influenza.

La alta variabilidad de las proteínas antigénicas del virus hace que sea necesario vacunar anualmente con las cepas circulantes durante la época de alta incidencia del virus del año anterior. La vacuna anual es una combinación de factores antigénicos de tres diferentes cepas del virus seleccionadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y suele ser efectiva durante la siguiente temporada de infecciones (Wang et al; 2005).

A.2. Reversibilidad de HA_{rec} a los cambios de temperatura.

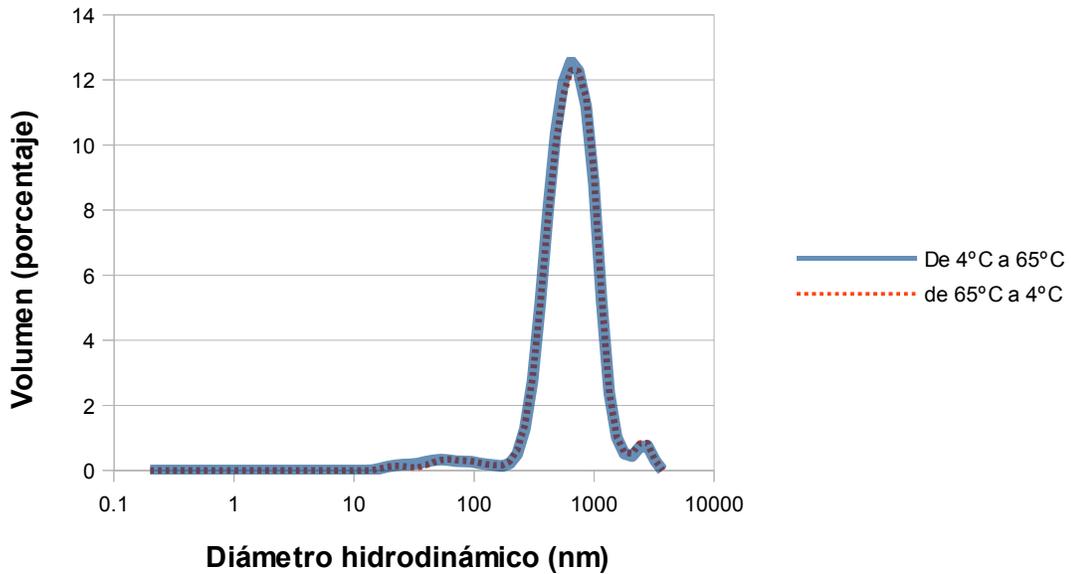


Figura A4. La agregación de HA_{rec} no es reversible a cambios de temperatura. Se llevo HA de 4°C a 65°C en cambios de 5°C y nuevamente de 65°C a 4°C sin que el DH se recuperara.

En la figura A4 se muestra la distribución de la población de 3 muestras de HA_{rec} llevadas desde 4°C a 65°C. Dichas muestras fueron llevadas posteriormente de 65°C a 4°C con el fin de determinar si la población de HA_{rec} regresaba al mismo tamaño que al inicio. En la figura A4 se muestra el proceso al final del ciclo de 4°C a 65°C y de 65°C a 4°C. Se observó que el proceso no es reversible en las condiciones medidas.

10.Bibliografía

- √¹ Ahmed R, Oldstone M, Palese P. Protective Immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nature Immunology* (8) 1118- 1193. (2007)
- √¹ Ahsan F, Rivas IP, Khan, Torres Suarez AI. Targeting to macrophages: role for physiochemical properties of particulate carriers- liposomes and microspheres. On the phagocytosis by macrophages. *J Control Release*. (79) 29-40 (2002)
- √¹ Arias C, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río D, Cobian-Güemes A, Pavel I, López S. Molecular anatomy of 2009 Influenza virus A (H1N1). *Archives of Medical Research*.(8). 643-654. (2009).
- √¹ Bachmann, M; Zinkernagel R. Neutralizing antiviral B-cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* (15) 235-270 (1997)
- √¹ Bachmann, M; Jennings G. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature* (10) 787-796 (2010)
- √¹ Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: petraxins as a paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* (28) 157-183 (2010)
- √¹ Cheung T, Poon L. Biology of influenza virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1102) 1-25. (2007)

- √¹ Ceriotti A, Duranti M, Bollini R. Effect of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *Journal of experimental Botany* (49). 1091-1103 (1998)
- √¹ Baldwin R L. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (83) 8069–8072. (1986)
- √¹ Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. *Annu. Rev. Immunol.* (28)157–83. (2010)
- √¹ Cox M, Hollister J. FLublok; a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals.* (37). 182-189. (2009)
- √¹ Choi H, Huh J, Ho jo W, Electrostatic energy calculation on the pH induced conformational change of influenza virus hemagglutinin. *Biophysical journal.* (91) 51-60 (2006)
- √¹ Cirkovas, A. Sereikaite J. Different effects of L-Arginine on the heat induced unfolded and aggregation of proteins. *Biologicals,* (39) 181-188 (2011)
- √¹ Cross KJ, Langley WA, Russell RJ, Skehel JJ, Steinhauer DA. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein. Pept. Lett.* (16) 766-778. (2009)
- √¹ Deshpande K, Fried V, Ando M, Webster R. Glycosilation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (84) 36-40. (1987)
- √¹ Date, M. Dominy B. Modeling the influence of salt and hydrophobic effect in

- protein stability. *Commun.Comput Phys.* (13) 90-106 (2012)
- √¹ Doms RW, Helenius A. Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment. *J. Virol* (60) 833-839 (1986)
- √¹ Ge H, Wang Y, Xu J, Gu Q, Lui H, Xiao P, Zhou J, Liu Y, Yang Z, Su H. Anti-influenza agents from Traditional Chinese Medicine *Nat. Prod. Rep* (27) 1758-1780 (2010)
- √¹ Guile, G., Rudd, P., Wing, D and Dwek, A. 1997 “HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides”. In *BioMethods Vol. 9 A laboratory guide to glycoconjugate analysis*. Jackson, P. and Gallagher, J. Eds. Ed. Berlin. Pp :199-233.
- √¹ Harding, C. V. & Song, R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* **153**, 4925–4933 (1994).
- √¹ Harlan J; Picot D, Loll P, Garavito M. Calibration of size-exclusion chromatography: use of a double Gaussian distribution function to describe pore sizes. *Anal. Biochem.* (224) 557-563 (1995)
- √¹ Hensley S, Das S, Bailey A, Schmidt L, Hickman H, Jayaraman A, Viswanathan K, Raman R, Sasisekharan R, Bennink J, Yewdell J. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. *Science* (326) 734 -736 (2009)
- √¹ Hong P, Koza S, Bouvier E. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of

- Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 35(20): 2923–2950. (2012)
- √¹ Huang X, Jin W, Hu K, Luo S, Du T, Griffin G, Highly conserved HIV-1 gp120 glycans proximal to CD4-binding region affect viral infectivity and neutralizing antibody production. *Virology* (423) 97-106 (2012)
- √¹ Jang H, Michaud- Agrawal N, Johnston J, Woolf T. How to lose a king and gain a helix: pH independent conformational changes of the fusion domain form influenza hemagglutinin in heterogeneous lipid bilayers. *Proteins* (72) 299-312) 2008
- √¹ Kawaoka Y, Webster RG. Interplay between carbohydrate in the stalk and the length of the connecting peptide determines the cleavability of influenza virus hemagglutinin. *J.Virol* (63) 3296-3300. (1989)
- √¹ Kissmann J, Joshi B, Haynes J, Dokken L, Richardson C, Russel C. H1N1 influenza virus-like particles: physical degradation pathways and identification stabilizers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (100) 634-645 (2011)
- √¹ Knossow M, Gaudler M, Douglas A, Barrere B, Bizebard T, Barbey C, Gigant B, Skehelt J, Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. *Virology* (302) 294-298 (2002).
- √¹ Koritzinzy M, Levitin F, Beucken T, Rumantir R, Harding N, Chu K, Boutros P, Braakman I, Wouters B. Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *JCB* (203) 615-627 (2013)

- Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major Histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (90) 4942-4946. (1993)
- √¹ Krebs J, Goldstein E, Kilpatrick S. Genome Evolution. En Krebs J, Goldstein E, Kilpatrick S. *Genes X.* 10 edición. Capítulo 8 159-188. Jones and Bartlett. (2010)
- √¹ La Gruta N, Kedzierska K, Stambas J, Doherty P. A question of self preservation: Immunopathology in influenza virus infection. *Immunology and cell biology.* (85) 85-92. 2007.
- √¹ Lamb R, Krug R. Orthomyxoviridae: the virus and their replication. En Fields B, Kipe D, Howley P. *Fields Virology.* 3rd Edición. Capítulo 45 1353-1395. Lippincott. (1996).
- √¹ Larkin A, Imperiali B. The expanding horizons of Asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry* (50) 4411-4425 (2011)
- √¹ Luykx DM, Casteleijin MG, Jiskoot W, Westdijtk J, Jongen PM. Physicochemical studies on the stability of influenza haemagglutinin in vaccine bulk material. *Eur J Pharm Sci.* (23):65-75 (2004)
- √¹ Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.,* 98: 2909–2934 (2008)
- √¹ Manalova, V; et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Europeana Journal of immunology.* (38) 1404-1413 (2008)

- √¹ Majumdar S, Ford B, Mar K, Sullivan V, Ulrich R, D'Souza A. Evaluation of the effect of syringe surfaces and protein formulations. *J Pharm Sci* (100) 2563-2573 (2011)
- √¹ Maurik A, Sabarth N, Dacho H, Brühl P, Schenwendinger M, Crowe B, Barrett P, Kistner O, Howard M. Seasonal influenza vaccine elicits heterosubtypic immunity against H5N1 that can be further booster by H5N1 vaccination. *Vaccine* (12) (2009)
- √¹ Moss T, Subbarao K, Robinson H, Katz J. Impact of glycosylation on the immunogenicity of a DNA-based influenza H5 HA vaccine *Virology* (308) 270-278 (2003)
- √¹ Narhi, L. O., Schmit, J., Bechtold-Peters, K. and Sharma, D. , Classification of protein aggregates. *J. Pharm. Sci.*, 101: 493–498. (2012)
- √¹ Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association insights: from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* (11) 281-296 (1991)
- √¹ Panahi A, Feig M. Conformational sampling of influenza fusion peptide in membrane bilayers as a function of termini and protonation states. *J.phys. Chem.* (114) 1407-1416 (2010).
- √¹ Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramirez OT. Production of Recombinant Proteins. Challenges and solutions. En: Balbás P, Lorence A. *Methods in Molecular Biology*. Human Press; 15-52. (2004)

- √¹ Palomares LA, Joosten C, Hughes P, Granados R, Shuler M. Novel. Cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant protein. *Biotechnol Prog* (1). 185-192. (2003)
- √¹ Palomares LA, Ramirez OT. Complex N-glycosylation in recombinant proteins by insect cells. *Bioprocessing*. Fall 2002. 70-74. (2002)
- √¹ Reed M, Bridges O, Seiler P, Kim J, Hui Ling Y; Salomon R, Govorkova E, Webster R, Russell C. The pH of Activation of the Hemagglutinin Protein regulates H5N1 Influenza Virus Pathogenicity and Transmissibility in Ducks. *Journal of Virology*.(84). 1527-1535. (2010)
- √¹ Remeta P, Krumbiegel M, Coneiçaõ A, Minetti AU, Ginsburg A, Blumenthal R. Acid induced changes in thermal stability and fusion activity of influenza hemagglutinin. *Biochemistry* (41) 2044-2054 (2001)
- √¹ Reichert T, Chowell G, Nishiura H, Christensen RA, McCullers JA. Does glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza *BMC Infect Dis* (10) 2010
- √¹ Ruigrok R, Aitken C, Martin Skehel. Studies on the structure of the influenza virus. *Journal of Gen. Virol.* (69). 2785-2795. (1988).
- √¹ Salvatore D, Croguennec T, Bouhallab S, forge V, Nicolai T. Kinetics and structure during self assembly of oppositely charged proteins in aqueous solution. *Biomacromolecules* (12) 1920-1926 (2011)

- √¹ Shen J, Ma J, Wang Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918. *PLoS ONE*. (4) e7789 (2009)
- √¹ Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* (69) 531-569 (2000)
- √¹ Smith, J.M, H.C. Van Ness y M.M. Abbott. Introducción a la Termodinámica en Ingeniería Química McGraw-Hill. D.F. México.(2000).
- √¹ Schellman, JA. Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. *Biophysical Journal* (73) 2960-2964.(1997)
- √¹ Singh M, Chakrapani A, O' Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine delivery systems. *Expert Rev. Vaccines*. (6) 797- 808 (2007)
- √¹ Skehel J, Wiley D. Influenza hemagglutinin. *Vaccine* (20). s51-s54. (2002)
- √¹ Sola RJ, Griebenow K, Chemical glycosylation: New insights on the interrelation between protein structural mobility thermodynamic stability and catalysis. *FEBS* (580) 1685-1690. (2006)
- √¹ Sola RJ, Griebenow K, Effect of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (98) 1223-1245 (2009)
- √¹ Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. Abril ;(312) 404-414 (2006)
- √¹ Storni, T. & Bachmann, M. F. Loading of MHC class I and II presentation pathways

- by exogenous antigens: a quantitative *in vivo* comparison. *J. Immunol.* **172**, 6129–6135 (2004).
- √¹ Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against the avian influenza viruses. *Nature.* (7) 267- 278 (2007)
- √¹ Takatoshi O, Nagatomo S; Kenji O, Takanori S, Taiji A, Tadashi U. A Protein's Conformational Stability Is an Immunologically Dominant Factor: Evidence That Free-Energy Barriers for Protein Unfolding Limit the Immunogenicity of Foreign Proteins. *J Immunol* ;185;4199-4205 (2010)
- √¹ Universal Protein Resuorce (UniProt) C3W5S1[18-344], Hemagglutinin, Influenza http://www.uniprot.org/uniprot/C3W5S1#section_features Publicado 31 octubre 2009. Ultima revisión 15 Noviembre 2012.
- √¹ Vasquez-Rey M. Lang D. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes *Biotechnol,Bioeng* (108) 1494-1508 (2011)
- √¹ Vigerust DJ, Ulett KB, Boyd KL, Madsen J, Hawgood S, McCullers JA.N-Linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol* (81) 8593–8600 2007
- √¹ Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de Bioquímica 2ª Ed* Editorial Médica Panamericana, Madrid, (2007)
- √¹ Wagner R, Hleuter T, Wolff A, Herwing, Klenk. N-glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *J. Gen. Virol* (83) 601-609 (2002)
- √¹ Wang C, Eufemi M, Turano C, Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety

- on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* (35) 7299-7307 (1996)
- √¹ .Wang C, Chen J, Tseng Y, Hsu C, Hung Y, Chen S, Chen C, Khoo K, Cheng T, Cheng Y, Jan J, Wu C, Ma C, Wong, C. Glycans in influenzahemagglutinin affect receptor binding and immune response. *PNAS* (106). 18137-18143. (2009).
- √¹ Wang W. Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J Phar.* (185) 129-188 (1999)
- √¹ Wang K, Holtz K, Anderson K, Chubert R, Mahmoud W, Cox M. Expression and purification of an influenza hemagglutinin-one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine. *Vaccine* (24). 2176-2185. (2006)
- √¹ Wanzeck K, Boyd K, McCullers J. Glycan shielding of the influenza virus hemagglutinin contributes to immunopathology in mice. *American Journal of Respiratory and critical care medicine* (183) 767-773 (2011)
- √¹ Weiss W, Young T, Roberts C. Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (98) 1246-1277 (2008)
- √¹ Wilson I, Cox N. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev Immunol.* (8). 737-771 (1990).
- √¹ Wit E, Munster V, Van Riel D, Beyer W, Rimmelzwaan G, Kuiken T, Osterhaus A, Fouchier R. Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *J.Virol.* (84), 1597-1606. (2009)

√¹ World Health Organization. Influenza Fact sheet. (211)[http://www.who.int/mediacentre /factsheets/fs211/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html) Publicado en Abril 2009. Ultima visita 13/05/2010.

√¹ Yannaell D, Goldberg K, Hjorth R. Stabilizing cold adapted influenza virus vaccine under various storage conditions. Journal of virological methods. (102) 15-25. (2002)

√¹ Zhang W, Czupryn MJ, Boyle PT, Amari J. Characterization of asparagine deamination and aspartate isomerization in recombinant human interleukin-11. Pharm. Res. (19) 1223-1231 (2002)

Indice temático

	Página
Resumen - - - - -	1
1. Introducción - - - - -	4
2. Antecedentes - - - - -	7
2.1 Hemaglutinina del virus de la influenza. - -	7
2.2 Vacunas contra la influenza. Estado del arte y nuevas tecnologías - - - - -	12
2.3 N-glicosilación - - - - -	17
2.4 Agregación de proteínas - - - - -	19
2.4.1 Temperatura - - - - -	24
2.4.2 Concentración de proteína - - -	25
2.4.3. Efecto de la solución y de la superficie - -	26

2.4.4 Modificaciones químicas de la proteínas	-	-	-	-	-	-	-	26
2.5 Cualidades clave en la capacidad								
inmunogénica de una vacuna.	-	-	-	-	-	-	-	27
3. Justificación	-	-	-	-	-	-	-	31
4. Hipótesis	-	-	-	-	-	-	-	32
5. Objetivo General	-	-	-	-	-	-	-	33
5.1 Objetivos específicos	-	-	-	-	-	-	-	33
6. Materiales y métodos	-	-	-	-	-	-	-	35
6.1 Hemaglutinina recombinante del virus								
de la influenza (HA)	-	-	-	-	-	-	-	35

6.2 Determinación del peso molecular de HA	-	-	35
6.3 Determinación de la presencia de HA			
en viales de muestra	-	-	36
6.4 Análisis del perfil de glicosilación de HA.	-	-	36
6.5 Determinación del tamaño de HA	-	-	38
6.6 Estabilidad de HA a diferentes temperaturas,			
diferentes formas glicosiladas y a diferentes tiempos.	-		42
6.7 Estabilidad de HA a diferentes pH, diferentes			
formas glicosiladas y a diferentes tiempos.-	-		42
6.8. Estabilidad de HA a diferentes fuerzas iónicas			
y a diferentes tiempos. -	-	-	44
6.9. Determinación de la capacidad inmunogénica			
de HA nativa y desglicosilada.	-	-	44
7. Resultados y discusión.	-	-	46
7.1 Determinación del patrón de N-glicosilación de HA			46

7.1.1 Migración en geles de poliacrilamida de HA nativa y desglicosilada en condiciones desnaturalizantes. - - -	46
7.1.2 Análisis de glicanos encontrados en HA por medio de HPLC en fase normal. - - - - -	50
7.2 Determinación del radio hidrodinámico de HA - -	55
7.2.2 Determinación del diámetro hidrodinámico de HA. -	55
7.3 Estabilidad y formación de estructuras de HA	
a diferentes temperaturas. - - - - -	60
7.3.1 Comportamiento de HA _{rec} y desglicosilada a diferentes temperaturas - - - - -	60
7.3.2 Comportamiento de HA _{rec} y desglicosilada a temperatura constante y diferentes tiempos. - -	70
7.4 Estabilidad y formación de estructuras de HA a diferentes pH. - - - - -	72
7.4.1 Comportamiento de Ha _{rec} y desglicosilada a diferentes pH - - - - -	72
7.4.2 Cinética de agregación de HA _{rec} y desglicosilada	

a diferentes pH.	-	-	-	-	-	-	77
7.5 Estabilidad y formación de estructuras de HA a diferentes FI.							86
7.6 Determinación de la morfología de los agregados de HA.							88
7.6.1 Agregados de HA _{rec} y desglicosilada en función de la temperatura.	-	-	-	-	-	-	88
7.6.2 Agregados de HA _{rec} y desglicosilada en función del pH	-	-	-	-	-	-	90
7.7 Determinación del título de anticuerpos en ratones inmunizados con HA _{rec} y desglicosilada.				-	-	-	92
8. Conclusiones y perspectivas	-	-	-	-	-	-	99
9. Apéndices	-	-	-	-	-	-	101
A.1. El virus de la influenza	-	-	-	-	-	-	101
A1.1 Ciclo de replicación del virus de la influenza.					-	-	102
A1.2 Variabilidad en el virus de la influenza.					-	-	104
A.2 Reversibilidad de HA _{rec} a cambios de temperatura					-	-	106
10 Bibliografía	-	-	-	-	-	-	107

Indice de figuras

	Página
<i>Figura 2.1. Secuencia de aminoácidos presente en HA de la influenza H1N1 California-2009 y H3N2 Perth-2009.</i>	10
<i>Figura 2.2 Esquema de la hemaglutinina.</i>	11
<i>Figura 2.3 Diagrama de flujo del proceso de producción de vacunas en huevo de gallina.</i>	14
<i>Figura 2.4. Diagrama de flujo del proceso de producción de vacunas basadas en HA recombinante.</i>	15
<i>Figura 2.5 Comparación del tamaño de los sistemas de vacunas y los agentes patogénicos.</i>	29
<i>Figura 6.1. Escalera de dextrana para la columna de fase normal TSKgel Amide-80 (TOSOH).</i>	37

<i>Figura 6.2 Correlación para la escalera de dextrosa.</i>	38
<i>Figura 6.3 Curva de calibración de la columna Biosuite250.</i>	41
<i>Figura 7.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida de HA.</i>	47
<i>Figura 7.2 Análisis de la secuencia de HA para determinar los posibles sitios de N-glicosilación en HA del subtipo H1N1 California 2009.</i>	49
<i>Figura 7.3. Perfil de elución de los N-glicanos de HA_{rec} de H1N1-California.</i>	51
<i>Figura 7.4. Perfil de elución de los N-glicanos de HA_{rec} obtenida de H3N2-Perth</i>	52
<i>Figura 7.5. Perfil de elución de HA obtenida de H1N1 y H3N2 tratada con α-manosidasa.</i>	53
<i>Figura 7.6 Tamaño del trímero de HA.</i>	57
<i>Figura 7.7. Perfil de elución de HA obtenida de H1N1.</i>	57
<i>Figura 7.8. Perfil de elución de HA obtenida de H3N2.</i>	58
<i>Figura 7.9. Variación del diámetro hidrodinámico promedio de</i>	

<i>HA_{rec} y HA_{rec} desglicosilada a diferentes temperaturas.</i>	63
<i>Figura 7.10. Comportamiento de HA_{rec} y HA_{rec} desglicosilada a diferentes T°.</i>	64
<i>Figura 7.11. Sitios posibles de N-glicosilación de HA California.</i>	67
<i>Figura 7.12. Gráfica del cambio de energía de Gibbs con respecto a la temperatura.</i>	69
<i>Figura 7.13. Comparación de las distribuciones de población de HA_{rec} almacenada a 4°C.</i>	71
<i>Figura 7.14 Comparación de las distribuciones de población de HA_{rec} desglicosilada almacenada a 4°C</i>	72
<i>Figura 7.15. Distribución de la población de HA_{rec} a diferentes pH y efecto del tiempo en la agregación de la proteína.</i>	73
<i>Figura 7.16. Irreversibilidad a la agregación por pH de HA nativa.</i>	74
<i>Figura 7.17 Distribución de la población de HA_{rec} desglicosilada a diferentes pH y efecto del tiempo en la agregación de la proteína.</i>	75
<i>Figura 7.18 Irreversibilidad de la agregación HA desglicosilada causada por pH</i>	76

<i>Figura 7.19 Energía de Gibbs con diferentes pH de HA a temperatura constante.</i>	77
<i>Figura 7.20. Cinética de agregación de HA_{rec} a diferentes pH.</i>	79
<i>Figura 7.21. Cinética de agregación de HA desglucosilada a distintos pH.</i>	82
<i>Figura 7.22. Cinética de agregación de HA_{rec} a diferentes concentraciones de NaCl.</i>	87
<i>Figura 7.23. Diámetro hidrodinámico promedio de HA a lo largo del tiempo a distintas concentraciones de NaCl</i>	88
<i>Figura 7.24. Agregados de HA vistos por TEM.</i>	89
<i>Figura 7.25. Agregados homogéneos de HA</i>	91
<i>Figura 7.26 Título de anticuerpos para animales control e inmunizados con HA_{rec} y desglucosilada.</i>	93

<i>Figura A.1 Esquema del virus de la influenza.</i>	102
<i>Figura A.2 Ciclo de replicación del virus de la influenza</i>	103
<i>Figura A3. Mecanismo mutacional del virus de la influenza.</i>	105
<i>Figura A4. La agregación de HA_{rec} no es reversible a cambios de temperatura.</i>	106

Índice de Tablas

	Página
<i>Tabla 6.1 Radio hidrodinámico y volumen de elución de las partículas usadas para la curva de calibración de la columna Biosuite 250</i>	40
<i>Tabla 7.1 Contenido relativo de N-glicanos en HA de H1N1 (H1) y H3N2 (H3)</i>	54
<i>Tabla 7.2 Radio hidrodinámico y volumen de elución de las partículas usadas para la curva de calibración de la columna Biosuite 250</i>	55
<i>Tabla 7.3 Radio hidrodinámico promedio para HA de H1N1.</i>	57
<i>Tabla 7.4 Valores de la constantes para la agregación de HA a diferentes temperaturas.</i>	65
<i>Tabla 7.5. Parámetros de la ecuación de la velocidad de agregación para HA_{rec} a diferentes pH</i>	80
<i>Tabla 7.6. Valores para las constantes de la ecuación de la cinética de agregación de HA desglucosilada</i>	83

<i>Tabla 7.7 Tamaño y peso molecular promedio de los agregados de HA a diferentes pH cuando alcanzan el equilibrio.</i>	86
<i>Tabla 7.8. Títulos promedio de anticuerpos generados por HA_{rec} HA desglucosilada, y control (-).</i>	94