

## **Influencia de la sialilación y de la «pegilación» de la molécula de ciertos medicamentos en su actividad**

Recibido el 6 de marzo de 2008

**JOSÉ ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO\***  
*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia  
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca*

### **RESUMEN**

Desde el esclarecimiento de la estructura del ácido *N*-acetilneuramínico por Klenk y Faillard en la década de 1950, el interés por el estudio de la composición y características de la cincuentena actualmente conocida de ácidos siálicos (mayoritariamente *N*-acilneuramínicos) ha ido en incesante aumento paralelamente con el hallazgo de sus diversas e importantísimas funciones biológicas.

En relación con el papel biológico del ácido siálico integrante de la molécula de la hormona eritropoyetina, se ha comprobado que la concentración del mismo determina la pervivencia (semi-vida) de ella en el plasma sanguíneo y, por tanto, la duración de la actividad biológica de esta hormona.

Además, a un incremento, artificialmente conseguido mediante técnicas recombinantes, del contenido de este ácido en la composición de dicha molécula corresponde una ampliación de la semi-vida de la hormona, que pasa a ser de unas ocho horas a una semana como mínimo; lo que constituye una enorme ventaja en la administración de tal fármaco a las personas que lo necesitan en tratamientos antianémicos (pacientes con trastornos renales, de SIDA o sometidos a quimioterapia).

Curiosamente, la actividad de la eritropoyetina carente de ácido siálico se mantiene en los ensayos *in vitro*. Pero no así en los *in vivo*.

Estudios paralelos, aunque no tan profundos, también han sido realizados con otras sialoglicoproteínas y con la enzima glucocerebrosidasa.

---

\* Contacto:

José Antonio Cabezas Fernández del Campo.  
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.  
Paseo Carmelitas, 43. Salamanca (España).

Otros datos se refieren a los agentes antianémicos obtenidos por incorporación en la molécula de derivados del polietilenglicol: «pegilación».

**Palabras clave:** Eritropoyetina.—EPO.—rHuEPO.—Ácido siálico.—Ácido *N*-acetilneuramínico.—Glucocerebrosidasa.—Pegilación.

## ABSTRACT

### Effect of the degree of sialilation of certain drugs on their activity

Since the elucidation of the structure of the *N*-acetylneuraminic acid by Klenk and Faillard in the 1950s, interest in the study of composition and characteristics of the about 50 sialic acids (mainly *N*-acylneuraminic acids) currently recognized has undergone an unceasing increase in parallel with the finding of their diverse and important functions.

Regarding the biological role of the sialic acid component of the erythropoietin hormone, it has been demonstrated that the concentration of this acid determines the half-life of the hormone in blood plasma and hence the duration of the activity of the hormone.

Furthermore, to an expansion of the half-life of the hormone, which passes from 8 hours to about one week, corresponds to an increase in the content of this acid in the composition of the hormone molecule (this increase being achieved by recombinant techniques). This expansion allows a remarkable advantage in the administration procedure of this drug to people who require it for their antianaemic treatment (renal disorders and immunodeficient patients as well as persons subjected to chemotherapy).

Curiously, the desialilated erythropoietin keeps its activity in *in vitro* but not in *in vivo* assays.

Parallel studies, although not as deep as these, have also been carried out with other sialoglycoproteins and with the cerebrosidase enzyme, as well as other polyethylene glycol (PEG) derivatives.

**Key words:** Erythropoietin.—EPO.—rHuEPO.—Sialic acid.—*N*-acetylneuraminic acid.—Glucocerebrosidase.—Pegylation.

## 1. INTRODUCCIÓN: HIPÓTESIS

1.<sup>a</sup>) ¿Influye *per se* la molécula del ácido siálico (integrante de la fracción oligosacáridica del glicoconjugado), como constituyente de la composición de un medicamento de naturaleza glicoconjugada, en la actividad de éste?

2.<sup>a</sup>) ¿Influye, no *per se*, sino indirectamente, pero eficazmente, prolongando la semi-vida de dicho medicamento?

3.<sup>a</sup>) ¿Pueden coexistir ambas posibilidades?; (o sea, las hipótesis 1.<sup>a</sup> y 2.<sup>a</sup>).

4.<sup>a</sup>) ¿Depende la actividad de la eritropoyetina (que es un sialoglicoconjugado) no de la molécula del ácido siálico *per se* sino de algún otro monosacárido también integrante de su fracción glicánica?

Recuérdense las características de los ácidos siálicos:

## 2. PECULIARIDADES DE LA MOLÉCULA DEL ÁCIDO NEURAMÍNICO (ESQUELETO DE LA MAYORÍA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS)

- Es un monosacárido excepcional, con mayor número de átomos de carbono que todos los otros monosacáridos, resultante de la condensación de una molécula de ácido pirúvico con otra de manosamina.
- Es un ácido ónico (R-COO<sup>-</sup>), lo que le confiere una marcada polaridad.
- Es un polihidroxiácido.
- Es un derivado tipo cetosa (-C=O).
- Es un δ-aminoácido peculiar.
- Su estructura acíclica (Figura 1) se halla en equilibrio con la cíclica, siendo ésta la muy mayoritariamente predominante (1).

## 3. ÁCIDOS SIÁLICOS

### 3.1. Antecedentes históricos

- Ernest KLENK, en Colonia (Alemania), prosiguiendo sus estudios de la década de 1930, hacia 1941 identificó un nuevo compuesto a partir de cerebros de ciertos pacientes fallecidos por enfermedades del sistema nervioso, al que denominó

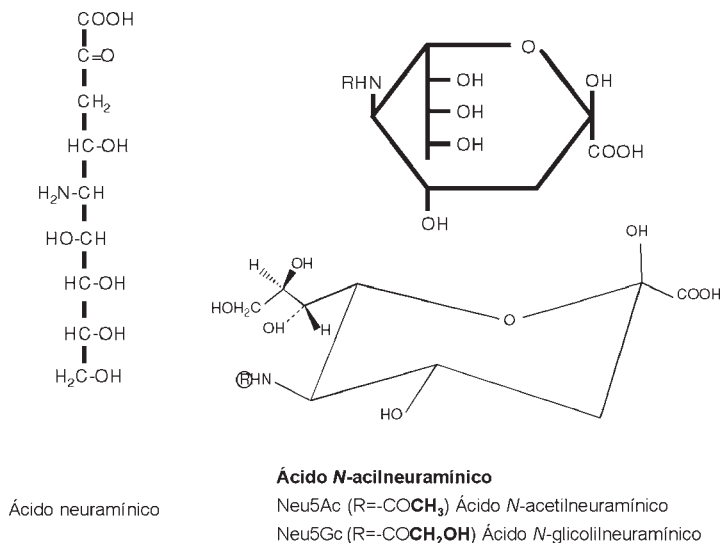


FIGURA 1. Estructura (acíclica) del ácido neuramínico y cíclica de dos ácidos acilneuramínicos: el *N*-acetil- y el *N*-glicolilneuramínico.

Neuramin Säure (= ácido neuramínico), y le asignó una estructura que resultó ser inexacta (1, 2).

- Gunnar BLIX y colaboradores (Lars SVENNERHOLM y otros), en Uppsala (Suecia), hacia 1936, aislaron, a partir de la mucina submaxilar bovina, un compuesto que, erróneamente, consideraron como un disacárido, al que denominaron *sialic acid* o *Sialin Säure* (= ácido siálico), por encontrarse en la saliva (sialon, en griego) (1, 2).
- Alfred GOTTSCHALK, judío alemán residente en Canberra (Australia), sometió, hacia 1949, ciertas glicoproteínas a un tratamiento con virus de la gripe, obteniendo un producto —por acción de la RDE (*receptor destroying enzyme*, que es la sialidasa)— con propiedades muy similares a las de los compuestos aislados por Klenk y Blix (1, 2).
- KLENK y su discípulo Hans FAILLARD, hacia 1954, determinaron la estructura correcta de dicho compuesto (1, 2).
- BLIX, GOTTSCHALK y KLENK acordaron conjuntamente denominar neuraminic acid al esqueleto fundamental de nueve

átomos de carbono del mismo, cuyos derivados acilados (acetilados o glicolilados) —hoy sabemos que los hay también no acilados— se llamarían *sialic acids* (= *ácidos siálicos*). Su propuesta fue publicada en *Nature*, en 1957; pero no siempre ha sido seguida con fidelidad, especialmente por los virólogos no europeos (1-3).

- FAILLARD y José A. CABEZAS, en Colonia, en 1962 separaron por primera vez, mediante cromatografía en capa fina, los ácidos *N*-acetil- y *N*-glicolilneuramínico cristalizados, procedentes de suero de ternera y de gallina (4). Cabezas, en 1965, en Colonia, puso a punto la separación de estos y otros ácidos siálicos mediante cromatografía en fase gaseosa (5).
- Leonard WARREN, en Filadelfia, logró la determinación de los ácidos siálicos en numerosos materiales biológicos mediante un método muy sensible puesto a punto por él, en la década de 1960. Roland SCHAUER, en Bochum y Kiel, prosiguiendo brillantemente las investigaciones de Klenk y Faillard, está consiguiendo la identificación de nuevos ácidos siálicos y profundizar en el conocimiento de sus funciones.

### 3.2. Estructura de ácidos siálicos naturales

Esquemáticamente la Figura 2 muestra dicha estructura, según Schauer (6).

### 3.3. Peculiaridades y funciones biológicas de los ácidos siálicos

- Se conoce actualmente la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos, hecho que no sucede con ningún otro monosacárido.
- Se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte.
- Sólo se hallan en:
  - Vertebrados.
  - Algunos invertebrados (como estrellas de mar).

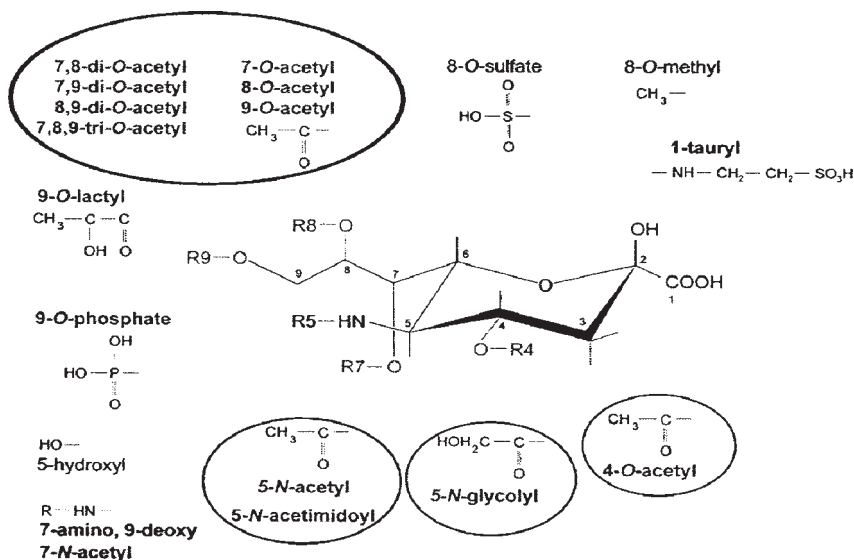


FIGURA 2. *Ácidos siálicos existentes en la naturaleza* (6).

- Algunos tipos de bacterias y virus.
- No se han encontrado en vegetales.
- Se biosintetizan por la unión de hexosamina + piruvato.
- El derivado nucleotídico con el que se activan es el CMP, no el UDP o el GDP.
- Trabajos llevados a cabo principalmente por el Académico de la RANF, Profesor Roland Schauer, han puesto de manifiesto que los *ácidos siálicos* presentan «varias importantes e incluso diametralmente opuestas **funciones biológicas**», entre las que se hallan:
  - Las debidas a su carga negativa.
  - Su influencia sobre la estructura de macromoléculas.
  - Su protección frente a ataques enzimáticos.
  - Su influencia sobre la especificidad de antígenos.
  - Tener sitios de reconocimiento.
  - Poseer efecto anti-reconocimiento (efecto de enmascaramiento).

Puede deducirse que algunas funciones de los glicoconjugados están determinadas, al menos parcialmente, por participar en su composición los ácidos siálicos.

### 4. GLICOCONJUGADOS

#### 4.1. Composición y estructura

Glicoconjugados —equivalente a *glycoconjugues* y a *glycoconjugates*— son aquellos compuestos resultantes de la unión fuerte (covalente) de una fracción glucídica (denominada *glicano*) y otro componente, que puede ser protídico o lipídico. En el primer caso se trata de las *glicoproteínas* (o *glicoproteidos*) (Figura 3), de los *glicopéptidos* o de los *péptidoglicanos*. Estos últimos compuestos contienen los *glicosaminoglicanos*, antes llamados *mucopolisacáridos* o *mucopolisacáridos ácidos*.

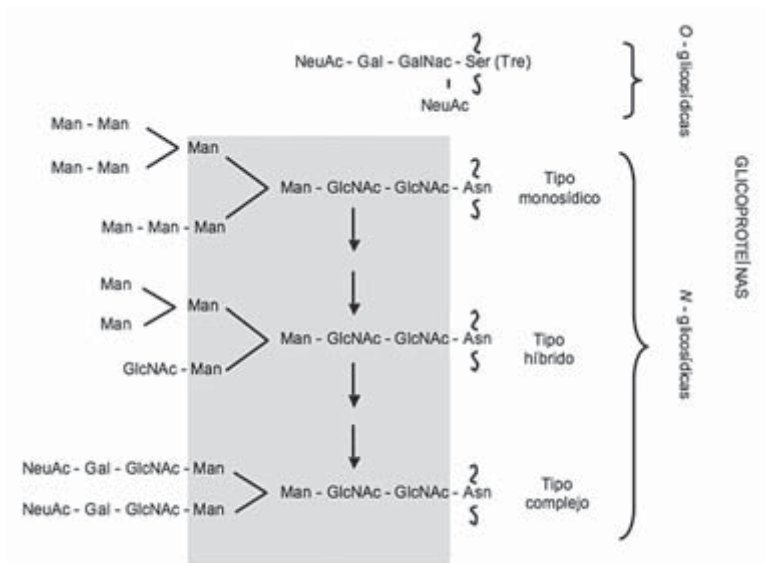


FIGURA 3. Estructura de O- y N-glicoproteínas con indicación de los tres tipos de éstas (9). NeuAc = Ácido N-acetilneuramínico; Gal = Galactosa; Man = Manosa; GlcNAc = N-acetilglucosamina; Ser = serina; Tre = Treonina; Asn = Asparragina.

En el caso de las glicoproteínas y glicopéptidos, las uniones pueden ser o bien del tipo *N*-glicosídico (que algunos denominan *N*-glicosílico) o del tipo *O*-glicosídico (paralelamente, *O*-glicosílico).

Si el enlace, fuerte, tiene lugar entre porción glicánica y lípido, se trata de los *glicolípidos*. Entre los *glicoesfingolípidos ácidos* destacan los *gangliósidos*.

Un tercer grupo de glicoconjugados, cuyo estudio se ha intensificado notablemente en la última década, comprende compuestos conteniendo *fosfatidilinositol* unido a lípidos fuertemente, que además se enlazan (mediante etanolamina) a una porción peptídica, por lo que podrían considerarse como *glicolipoproteidos*, si bien este término se usa poco (7-10).

En el establecimiento de la estructura de glicoconjugados han sido muy importantes los trabajos de la escuela francesa del Profesor Jean MONTREUIL, en Lille; y en el descubrimiento de los mecanismos de biosíntesis de las glicoproteínas han destacado, entre otros, el Premio Nobel Luis F. LELOIR (en Buenos Aires) y su discípulo Ranwell CAPUTTO (en Córdoba, Argentina).

La enorme complejidad estructural que se presenta en los glicoconjugados puede comprenderse fácilmente si se compara este aspecto con el de otras entidades moleculares como los *péptidos* o los *ácidos nucleicos*, por ejemplo. En éstos, cuatro aminoácidos o cuatro nucleótidos diferentes pueden originar únicamente 24 tetrámeros distintos, mientras que cuatro monosacáridos diferentes pueden formar, hipotéticamente, hasta ¡36.000! tetrasacáridos distintos. Basta tomar en consideración para comprender esto el hecho de que pueden entrar en juego, en el caso de los glúcidos, factores como los siguientes:

- Naturaleza de los monosacáridos componentes.
- Tipos de enlace con la cadena peptídica.
- Tipos de enlace entre los monosacáridos y posición de dichos enlaces (ramificación).
- Anomerías  $\alpha$  y  $\beta$ .
- Secuencia de la cadena glicánica (10).



El fenómeno de la *microheterogeneidad*, con la subsiguiente producción de microformas (o mejor, *glicoformas*), se debe al peculiar mecanismo de biosíntesis propio de los glicoconjugados.

Resumidamente:

- Proteínas diferentes producidas por la misma célula pueden contener *glicanos completamente distintos*.
- *Cada cadena polipeptídica* contiene frecuentemente *múltiples sitios de glicosilación*.
- *En cada sitio de glicosilación* puede hallarse una *estructura glicánica distinta* («heterogeneidad de sitio»).
- Dicha «heterogeneidad de sitio» tiene *composición definida y reproducible*, en condiciones constantes.
- Hay aspectos de la *glicosilación* que son *específicos* del tipo de célula (10).

## 4.2. Importancia y funciones

Los glicoconjugados tienen su importancia primordial en facetas estructurales y funcionales, por formar parte de:

- Membranas celulares (actuando de *receptores*).
- *Colágeno*.
- *Inmunoglobulinas*.
- *Hormonas* (tirotropina, gonadotropina, etc.).
- *Enzimas* (glicosidasas, proteasas, ribonucleasa B, glucosa-oxidasa, etc.).
- Factores de coagulación (*fibrinógeno*).
- *Agentes de protección y lubricación* (*mucinas*).
- Con actividad antivírica (*interferón  $\gamma$* ).
- Con *actividad transportadora* (de  $\text{Fe}^{2+}$ , la transferrina).
- Promotores de la liberación de linfocitos (*interleucina 2*).
- *Anticongelantes* en peces de la Antártida (glicoproteínas).

- Relacionados con el funcionamiento del *sistema nervioso (gangliosidos)*.
- *Lectinas*.

El Premio Nobel francés François JACOB señalaba que «los glúcidos representan la tercera dimensión en la biología celular» (10).

Estrictamente, hay que recordar que resulta aún difícil distinguir cuál es la parte que corresponde en esas funciones biológicas al componente glicánico y cuál al glicoconjugado en su conjunto. En 1993, Ajit VARKI, eminente especialista de Estados Unidos, destacó que en relación con el «papel biológico de los oligosacáridos: todas las teorías son correctas», «pudiéndose encontrar excepciones a todas ellas». Y lo resume así:

- 1.º) «Es difícil predecir *a priori* las funciones de los oligosacáridos de un glicoconjugado.
- 2.º) La misma secuencia oligosacáridica puede mediar diferentes funciones en sitios distintos dentro del mismo organismo, o en diferentes momentos de su ontogenia.
- 3.º) Los papeles biológicos específicos y cruciales de los oligosacáridos actúan frecuentemente mediados por secuencias oligosacáridicas inusuales, por la presencia inusual de secuencias terminales comunes, o por ulteriores modificaciones de los propios monosacáridos (11)».

Se ha confirmado la importancia metabólica fisiológica y asimismo patológica de los glicoconjugados, desde que se descubrió que:

- Son antígenos de la superficie celular, y su estructura o posición en la membrana pueden ser modificadas en células transformadas y en las cancerosas.
- Son sitios receptores de virus.
- Desempeñan un papel importante en la adhesión y en el reconocimiento intercelular.
- Actúan en la conformación de las cadenas peptídicas.
- Los grupos glicánicos regulan la salida de proteínas al exterior de las células y regulan el catabolismo por el hígado de

las proteínas circulantes, y el tiempo de vida de proteínas y células. En relación con este punto, véase lo siguiente:

### **4.3. Influencia del grado de sialilación de las glicoproteínas en su pervivencia en la circulación sanguínea**

Exceptuada la transferrina, la concentración a la que permanecen en el plasma (*survival*) otras glicoproteínas (que contienen también ácidos siálicos en su composición) disminuye notablemente cuando se les elimina el ácido siálico.

Experimentos en conejos así lo demostraron ya en la década de 1970 para la ceruloplasmina (que se mantiene, si es intacta, en un 95% durante 70 minutos y, en cambio, si es desialilada baja a un 20% a los 15 minutos de su introducción). Análogamente ocurre con la *asialo- $\alpha_2$ -macroglobulina*, la *asialotiroglobulina* y la *asialohaptoglobina* (aunque en éstas no tan intensamente como con la *asialoceruloplasmina*), mientras que la *asialofetuina* y el *asialo-orosomucoide* descienden en su concentración plasmática con mayor intensidad aún que la *asialoceruloplasmina* (12, 13).

Ello es debido a que la molécula de galactosa de las glicoproteínas es un «determinante críptico» de su catabolismo (13). Este fenómeno se halla estrechamente relacionado con la expresión del receptor de las asialoglicoproteínas (14). En este sentido, resulta particularmente significativo el caso de la antes mencionada ceruloplasmina (marcada con Cu-64), que se mantiene en el suero, si es intacta (o sea, *sialilada*) casi en el 100% todavía a los 25 minutos de su inyección en conejos, mientras que, desprovista del ácido siálico, desciende enormemente su concentración sérica ya a los 12 minutos (Figura 4), coincidiendo con la situación de la *galactosa* como residuo terminal de la molécula.

La causa radica en que los hepatocitos, responsables de la extracción de las moléculas circulantes, captan rápida e intensamente la galactosa, mientras que lo hacen muy débilmente con el ácido siálico o con la *N-acetilglucosamina* (si ésta se halla por sucesiva degradación del glicoconjugado en la posición terminal de éste expuesta a la captación) (15).

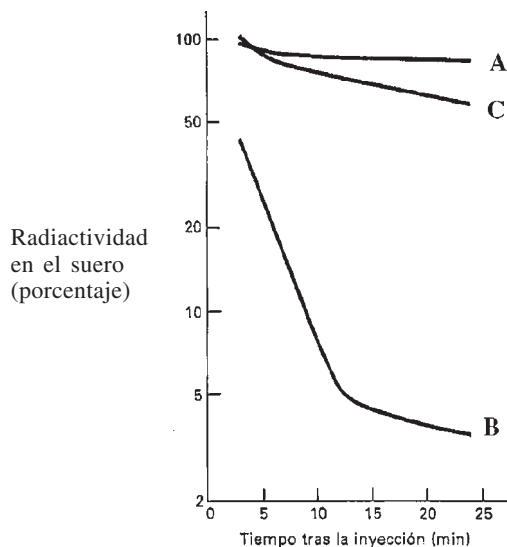


FIGURA 4. *Desaparición en suero de [<sup>64</sup>Cu] ceruloplasmina de conejo nativa y modificada, inyectada en el sistema circulatorio de conejos. A) Ceruloplasmina: proteína sérica normal con el oligosacárido completo, con ácido siálico expuesto. B) Asialoceruloplasmina: proteína sin el ácido siálico y con galactosa expuesta. C) Asialoagalactoceruloplasmina: proteína sin galactosa ni ácido siálico, con N-acetilglucosamina expuesta.*

## 5. ERITROPOYETINAS (Hu-EPO)

### 5.1. Composición y estructura

La eritropoyetina humana (Hu-EPO), hormona principalmente producida por el riñón en el ser humano adulto, es llevada a la médula ósea por la circulación sanguínea. Una vez obtenida a partir de grandes cantidades de orina de pacientes de anemia aplásica (*urine human EPO* = uHu-EPO), se ha purificado y caracterizado bioquímicamente, deduciéndose que se trata de una glicoproteína mayoritariamente tetraantenaria (o sea, con cuatro cadenas glicánicas), con un alto contenido glucídico, portadora de uniones —NH— y O-glicosídicas (10). Su composición es la siguiente (Figura 5) (16).

Como puede verse en la Figura 5, la eritropoyetina humana contiene tres cadenas glicánicas del tipo N-glicosídico y una de tipo

O-glicosídico, con un porcentaje glucídico del 40% en el que se integran hasta 14 moléculas de ácido *N*-acetilneuramínico, siendo su masa molecular de unos 30.400 dalton.

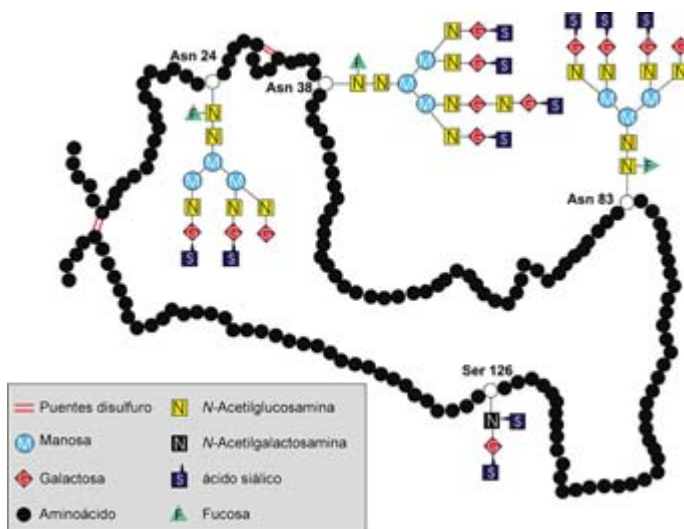


FIGURA 5. *Eritropoyetina humana (Hu-EPO) (16)*.

«El producto resultante de la actividad del gen de la EPO es una cadena polipeptídica conteniendo 193 aminoácidos, que sufre modificaciones» (17), tales como: glicosilación, formación de dos enlaces disulfuro, eliminación de 27 aminoácidos de carácter hidrofóbico y de la arginina del extremo C-terminal, quedando constituida finalmente por 165 aminoácidos. Las tres cadenas glicánicas (las más voluminosas) se unen por enlace *N*-glicosídico en las posiciones 24, 38 y 83; y la de enlace *O*-glicosídico a la serina de la posición 126.

La obtención de EPO por tecnología recombinante es difícil, puesto que es necesario atender no sólo a las síntesis de la secuencia protéica correcta —que puede quedar parcialmente modificada— sino a la de la fracción glicánica, produciéndose diversas glicofomas, generalmente no todas ellas activas.

Por ejemplo, si la estructura conseguida es biantenaria en vez de tetraantenaria, la actividad biológica es notablemente menor. Para lograr la estructura biológicamente activa es necesario efectuar,

mediante enzimas adecuadas, glicosilaciones y desglicosilaciones (un resumen sobre esta técnica es fácilmente accesible) (18).

Así se ha conseguido la obtención de eritropoyetinas recombinantes (rHuEPO) como «Aranesp<sup>®</sup>» («darbepoetin alfa») y «Epogen», patentadas por «Angen», entre las llamadas «NESP» (= *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*), que constan de seis cadenas glicánicas (cinco *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica), alcanzándose un porcentaje glucídico del 51% del que forman parte hasta 22 residuos de ácido siálico, siendo la masa molecular del conjunto 35.500 dalton. Aunque se han fabricado cuatro eritropoyetinas recombinantes (alfa, beta, delta y omega), se han comercializado únicamente las dos primeras (17).

## **5.2. Diferencias en la semi-vida de las eritropoyetinas con distinto grado de sialilación, y diferencias en su actividad según la vía de administración; aspectos económicos**

El descenso en la concentración sérica de la eritropoyetina rHuEPO —con sólo cuatro cadenas glicánicas (tres *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica) y  $\leq 14$  residuos de ácido siálico— es notablemente mayor que el experimentado por la eritropoyetina que contiene seis cadenas glicánicas (cinco *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica) y  $\leq 22$  residuos de ácido siálico (19).

En cuanto a las diferencias que para una misma eritropoyetina (la hipersialilada) pueden presentarse a causa de la distinta vía de administración. Por vía intravenosa se produce un lento descenso gradual de dicha concentración sérica, mientras que por vía subcutánea el nivel asciende rápidamente, y se mantiene incluso más de una semana (19). La ventaja de la administración subcutánea sobre el uso de la modalidad intravenosa se incrementa al tener en cuenta que los escasos riesgos de autoinmunización que pueden presentarse son menores con la primera (17).

El interés por la utilización de la eritropoyetina recombinante hipersialilada se ha incrementado, dadas sus indudables ventajas, al ser ampliamente utilizada por: *a*) pacientes necesitados de diálisis renal, incapacitados para biosintetizar esta hormona; *b*) personas

sometidas a tratamientos quimioterápicos que presenten esta deficiencia; c) pacientes de SIDA. Además, recuérdese que en competiciones ciclistas internacionales se ha usado ilícitamente como agente estimulante de la producción de eritrocitos que favorecen un mayor rendimiento físico (fueron famosos los casos de «Juanito» Muelegg, en 2002, y Rasmussen, en 2007, portadores temporalmente del maillot amarillo).

Así se explica que las ventas de Aranesp<sup>®</sup> hayan pasado desde aproximadamente 500 millones de \$ (EE.UU.) en el año 2002, a 1.400 en el 2003, a 2.500 en el 2004, superando los 3.500 en el 2005, frente a otros productos competidores (20).

### 5.3. Causas de la diversidad en la bioactividad de las eritropoyetinas

Por ser la EPO «el primer medicamento producido en células heterólogas de mamíferos [...] es un modelo excelente para investigar los papeles que cumplen las cadenas glucídicas en las glicoproteínas, puesto que su gen y sus múltiples glicofomas están disponibles, así como los bioensayos sensibles para su examen» (21). Se ha deducido que la parte interior del componente glicánico (*core*), formada por tres residuos de manosa (véanse las Figuras 3 y 5) constituye «el mínimo requerimiento para que la HuEPO exprese su actividad biológica completa» (21).

Además, según se apuntó anteriormente, «la eritropoyetina desialilada es eliminada de la circulación (*cleared*) con extrema rapidez, en cuestión de minutos. [...] Se ha comprobado que existe una relación directa entre la proporción de glúcidos conteniendo ácido siálico, la semi-vida sérica [de la EPO] y su actividad biológica» (19).

Cabe preguntarse: ¿Son debidas estas diferencias en la bioactividad a causa de la desaparición por depuración (= «aclaramiento» = *clearance*) en el suero de la EPO motivada ésta por su distinta afinidad con respecto a los receptores?

Según Egrie *et al.* (22) el «aclaramiento» o depuración «es el determinante primario de la bioactividad *in vivo* [ya que] las isoformas que tienen pocos ácidos siálicos presentan mayor afinidad hacia el

receptor, pero semi-vida sérica más baja. En contraste, las isoformas que tienen un contenido más elevado en ácido siálico muestran afinidad más baja para el receptor y semi-vida más larga». (La hipótesis segunda del comienzo de la presente publicación quedaría así comprobada; pero no quedan excluidas las restantes.)

Modulando la vectorización de la eritropoyetina desde el riñón a la médula ósea, que es el órgano diana de esta hormona, sus componentes «siálicos pueden funcionar como un contador de tiempo (*timer*)» (21) en su disponibilidad. Tales «componentes glucídicos de la HuEPO no son una simple decoración sino que tienen realmente funciones fisiológicas como las de un sistema de liberación de un fármaco» (21). Se los ha comparado también con un escudo protector en el transporte de dicha hormona.

Sin embargo, existen otros aspectos que deben ser también analizados.

#### **5.4. ¿Es la misma o es diferente la semi-vida de la eritropoyetina en los ensayos *in vivo* e *in vitro*? ¿De qué monosacáridos depende dicha semi-vida?**

Téngase en cuenta que los ensayos *in vivo* se suelen hacer midiendo la incorporación de Fe-59 en eritroblastos de ratones policitémicos, mientras que los *in vitro* se efectúan según diversos procedimientos entre los cuales uno consiste en determinar la incorporación de Fe-59 en células cultivadas de médula ósea (21).

Así como en los ensayos *in vivo* se halla una relación directa entre la semi-vida de la eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO), producida en células de mamíferos, y su contenido en ácido siálico, «la eritropoyetina humana desialilada, obtenida a partir de orina (uHuEPO), y la eritropoyetina recombinante (rHuEPO) escasamente sialilada, pierden su actividad *in vivo*; pero la mantienen o incluso la incrementan *in vitro*» (21).

Asimismo, según Ueda y Sasaki (21), «la actividad biológica de la eritropoyetina humana (HuEPO) aumenta *in vitro*, por la acción de la sialidasa, la galactosidasa y la  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa; pero la eliminación adicional de cadenas glucídicas por la acción de  $\alpha$ - y



$\beta$ -manosidasa disminuye la actividad. Finalmente, la eliminación de todas las cadenas glucídicas de la HuEPO unidas a la asparragina [...] produce pérdida casi completa de actividad» (21).

Se deduce, pues, que además de ser indispensable para la actividad de la EPO (incluso *in vitro*) el mantenimiento del núcleo («core») de los tres restos de moléculas de manosa (según antes se apuntó), lo es también el de las *N*-acetilglucosaminas contiguas a la asparragina de la cadena peptídica (véanse Figuras 3 y 5). Por el contrario, la pérdida de los residuos de ácido siálico, de los de galactosa unidos a éstos, y de *N*-acetilglucosamina enlazados a galactosa —todos ellos situados periféricamente— no disminuiría la actividad *in vitro*, sino que la aumentaría. Por tanto, como continuación de lo relativo a la segunda hipótesis aquí planteada (matizando de si se trata de la actividad *in vivo* o *in vitro*), pueden ser contestadas las preguntas de las hipótesis primera y tercera, y considerar afirmativamente la cuarta.

Independientemente de todo lo anterior, Erbayraktar *et al.* (23) han dado a conocer un aspecto peculiar relativo a una «asialoeritropoyetina [rHuEPO], originada por desialización enzimática total [la cual] es totalmente neuroprotectora» *in vivo*, actuando como «una citocina protectora de tejidos, espasmos vasculares, apoptosis, y respuestas inflamatorias».

## 6. OTRAS SIALOGLICOPROTEÍNAS QUE HAN SIDO HIPERSIALILADAS O SON SUSCEPTIBLES DE SERLO; Y GLUCOCEREBROSIDASA

De modo paralelo a lo indicado para la eritropoyetina y con objeto de mejorar la eficacia terapéutica, se ha conseguido enmascarar residuos de galactosa terminal mediante hipersialilación, en la molécula de las siguientes sialoglicoproteínas: **asparraginas**, **hormona luteinizante** y **leptina**. De este modo se ha incrementado su respectiva semi-vida y se ha reducido la inmunogenicidad de tan importantes agentes (24).

Parece ser que aún no se han realizado modificaciones estructurales similares en otras sialoglicoproteínas asimismo muy interesantes; pero resulta fácil aceptar que ello será factible oportunamente.

Entre ellas: biomarcadores de carcinomas ( **$\alpha$ -fetoproteína** humana, **osteopontina** y **CD44**); glicoproteínas de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (la **GP 120**); las que actúan como receptores de proteínas del parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum* (**glicoforinas A y C**); la **hormona foliculoestimulante**; o **anticuerpos** como la **IgG** (24).

Por último, otro glicoconjugado de gran interés es la enzima **glucocerebrosidasa** (= glicosilceramidasa, EC 3.2.1.62), que libera el resto glucídico de la *N*-acilesfingosina, y es destinada a tratar pacientes de la enfermedad de Gaucher (que son deficitarios de ella). Aunque en este caso no es una sialoglicoproteína, para su obtención o transformación con finalidad terapéutica se han seguido procedimientos análogos a los antes indicados.

Se ha usado la enzima procedente de la placenta humana asegurándose de que iría a su sitio diana. Para ello, se la modifica convenientemente por acción de otras glicosidasas hasta conseguir que pueda ser dirigida a las células reticuloendoteliales (mediante el reconocimiento del extremo de manosa por dichas células). Pero resulta más rentable obtener glucocerebrosidasa por técnicas recombinantes, incorporando en ella el componente de manosa adecuado. Ya en 1998 unas 1.700 personas de todo el mundo se habían beneficiado de este tratamiento, que ha sido el primero perteneciente a «terapia por reemplazamiento de enzima».

## 7. INFLUENCIA DE LA «PEGILACIÓN» DE CIERTOS FÁRMACOS EN SU ACTIVIDAD

No solamente la mayor concentración del ácido siálico (*N*-acetilneranámico) componente de un glicoconjugado puede incrementar la semi-vida de éste y, por ello, su actividad biológica sino que el aumento de tamaño molecular de ciertas proteínas obtenido mediante enlace covalente con polietilenglicol (PEG) —por unión de éste al grupo amino de la proteína (= «pegilación»)— puede lograr el mismo efecto (24).

Así se ha conseguido para enzimas como la asparraginasas (empleada en el tratamiento de la leucemia) (25), y la adenosindesami-

nasa (relacionada con casos de infecciones recurrentes) (26) o para el interferón  $\alpha$  (27), entre otros agentes.

El incremento del tamaño molecular del compuesto modificado de este modo determina un descenso en la velocidad de filtración glomerular (24), además de una disminución de la proteólisis de la proteína en cuestión, por enmascaramiento de los sitios de su degradación (27).

Sin embargo, la «pegilación» tiene inconvenientes tales como el de producir isoformas (análogamente a lo que sucedía con la sialilación) pero otros, más graves, como el de originar productos derivados difíciles de ser completamente catabolizados, al ser polímeros sintéticos, a diferencia de los ácidos siálicos, que son metabolitos ordinarios (24).

Manteniendo la misma composición y estructura de la eritropoyetina humana (rHuEPO) —con las mismas cadenas glicánicas y contenido de ácido siálico (con sólo 14 residuos de éste)—, pero incorporando a dicha molécula una cadena polimérica mediante el **ácido succinimilbutanóico-metoxipolietilenglicol**, se ha logrado el «primer activador continuo del receptor de la eritropoyetina» (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator*, C.E.R.A.) (28).

Se trata de un nuevo agente antianémico que difiere por su composición, tamaño molecular (61.000 dalton), mecanismo de acción y prolongada vida media —ésta con sólo una administración mensual— respecto a todos los anteriores. De él existe actualmente menos bibliografía que de otros fármacos usados como antianémicos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Académico Profesor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, por facilitar publicaciones acerca de la eritropoyetina.

A don Manuel Tirado, de esta Real Academia, por la transcripción del texto.

A la Real Academia Nacional de Farmacia, mediante cuyo asesoramiento (solicitado por la Fundación Juan March) dicha Fundación concedió al autor sendas becas para trabajar en Colonia durante nueve meses (en 1962), bajo la dirección de los Profesores E. Klenk

y H. Faillard, y durante seis meses (en 1966), al lado del Profesor L. Warren, en Filadelfia.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) CABEZAS, J. A. (1961): Acides sialiques: Leur Signification Biochimique. *Le Pharm. Biol.* 2: 9-19.
- (2) CABEZAS, J. A. (1968): Estudio de los ácidos siálicos en diversos materiales biológicos (*discurso de incorporación como Académico Correspondiente de la Real Acad. Farm.*). *An. Real Acad. Farm.* 24: 154-172.
- (3) BLIX, C.; GOTTSCHALK, A. and KLENK, E. (1957): Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179: 1088.
- (4) FAILLARD, H. and CABEZAS, J. A. (1963): Isolierung von *N*-Acetyl- und *N*-Glykoly- neuraminsäure aus Kälber und Hühnerserum. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 333: 266-271.
- (5) CABEZAS, J. A. (1965): Neuraminic acid. – IV. Gas-Liquid Chromatography of *N*-Acetyl- and *N*-Glycolylneuraminic Acids. *Rev. Esp. Fisiol.* 21: 125-130.
- (6) SCHAUER, R. (2007): *The diversity of sialic acids in their interplay with lectins in Glycobiology* (C. Sanson and O. Markman, eds.), Scion Publishing Limited, p. 137.
- (7) CABEZAS, J. A. (1993): Glicobiología: Antecedentes y evolución de su contenido. *Discurso de apertura del curso 1993-94*, Universidad de Salamanca, 1-102.
- (8) CABEZAS, J. A. (1995): Glicoconjugados: Algunos aspectos bioquímicos y farmacéuticos. *An. Real Acad. Farm.* 61: 177-188.
- (9) CABEZAS, J. A. (1995): Glicoconjugados: Su participación en funciones de los seres vivos. *Mundo Científico.* 159: 634-659.
- (10) CABEZAS, J. A. (2000): Glicociencia: Glicobiología, Glicopatología, Glicoterapéutica, Glico(bio)tecnología. *Instituto de España*, Madrid: 1-54.
- (11) VARKI, A. (1993): Biological roles of oligosaccharides: all the theories are corrects. *Glycobiology.* 3: 97-130.
- (12) MORELL, A. G.; [...] and ASHWELL, G. (1971): The Role of Sialic Acid in Determining the Survival of Glycoproteins in the Circulation. *J. Biol. Chem.* 246: 1461-1467.
- (13) ASHWELL, G. and MORELL, A. G. (1971): Galactose: A Cryptic Determinant of Glycoprotein Catabolism, en *Glycoproteins of Blood Cells & Plasma* (G. A. Jamieson, ed.), Lippincott Company, Philadelphia, 173-189.
- (14) WEISS, O. and ASHWELL, G. (1989): Ligand-induced Modulation of the Hepatic Receptor for Asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 264: 11572-11574.
- (15) ASHWELL, G. and MORELL, A. G. (1974): En *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 41: 99-128.
- (16) SCHLAGS, W. *et al.* (2002): Two-dimensional electrophoresis of recombinant human-erythropoietin: A future method for the European Pharmacopoeia. *Proteomics.* 2: 679-682.

- (17) STOAN, I. *et al.* (2007): New alternatives for erythropoietin therapy in chronic renal failure. *Central Europ. J. Medicine* 2: 361-378.
- (18) STIEGLER, G.; KRESSE, G. B. and BUCKEL, P. (1997): Biotecnología de fármacos. *Inv. Ciencia*. 254: 55-57.
- (19) MACDOUGALL, I. C. (2000): Novel Erythropoiesis Stimulating Protein. *Seminars in Nephrology*. 20: 315-381.
- (20) MELNIKOVA, F. (2006): Anaemia therapeutics. *Nature Reviews*. 5: 627.
- (21) TAKEUCHI, M. and KOBATA, A. (1991): Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*. 1: 337-346.
- (22) EGRIE, J. C. *et al.* (1993): The role of the carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. *Glyconjugate J.* 10: 263.
- (23) ERBAYRAKTAR, S. *et al.* (2003): Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 644-6746.
- (24) BYRNE, B.; DONOHO, G. C. and O'KENNEDY, R. (2007): Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*. 12: 319-326.
- (25) GRAHAM, M. L. (2003): Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1293-1302.
- (26) LEVY, Y. *et al.* (1988): Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *J. Pediatr.* 113: 312-221.
- (27) HARRIS, J. M. and CHESN, R. B. (2003): Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 214-221.
- (28) MACDOUGALL, I. C. *et al.* (2006): Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous and Subcutaneous Continuous Erythropoietin Receptor Activator (C.E.R.A.) in Patients with Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, Sept 13 (doi: 10.2215).