

Monitoreo de condiciones de replegamiento de proteínas por medio de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

Aurora Antonio-Pérez, Claudia Ivonne Flores-Pucheta, Octavio Montes Flores, Gerardo Reséndiz Cardiel, Jaime Ortega López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco. México D.F. C.P. 07360. jortega@cinvestav.mx.

Replegamiento de Proteínas, Agregación, DLS (Dinamic Ligth Scattering).

Introducción.

El replegamiento de proteínas es un proceso complejo para renaturalizar proteínas recombinantes producidas en *E. coli* como agregados insolubles conocidos como Cuerpos de Inclusión (CI). La eficiencia del replegamiento depende de lavado de los CI, su solubilización y la purificación de la proteína. La agregación es un fenómeno presente durante todo el proceso producción y la vida útil de toda proteína terapéutica, especialmente durante el replegamiento, por lo que el monitoreo del tamaño de la proteína es crítico para garantizar la calidad del producto final [1]. Entre las metodologías disponibles, la dispersión dinámica de luz (DLS), ofrece la ventaja de evaluar el tamaño de partículas (0.1nm- 1000nm) en una muestra de forma directa, sin manipulación previa por lo que se considera una tecnología analítica viable para los procesos de replegamiento y agregación [2].

En este trabajo se presentan resultados del monitoreo del tamaño de la proteína a diferentes condiciones de solubilización de los CI y replegamiento del antígeno recombinante TSA-1 de *T. cruzi*

Metodología.

La proteína TSA-1 se expresó en *E. coli*, como CI (350 mg TSA/L de cultivo). Los CI se recuperaron mediante la ruptura celular con amortiguadores adicionados con detergentes y lisozima y DNAsa. Se analizaron 12 condiciones de solubilización y desnaturalización de TSA-1. Previo al replegamiento se eliminaron la mayoría de los contaminantes y endotoxinas mediante cromatografía de intercambio iónico, se determinó el tamaño de la proteína desnaturalizada mediante DLS y se procedió a replegar la proteína por dilución (1:10, a 20°C) con agitación orbital constante durante 24 h usando un amortiguador previamente seleccionado de 46 condiciones analizadas

Resultados.

Del análisis de condiciones de solubilización se encontró que la adición de EDTA y detergentes redujo las dimensiones de la proteína solubilizada. Entre los aditivos que tuvieron un efecto positivo en la cinética de replegamiento se encontraron: detergentes (Tween 20, NP 40), PEG 3350, 8000, glicerol, cisteína, entre otros.

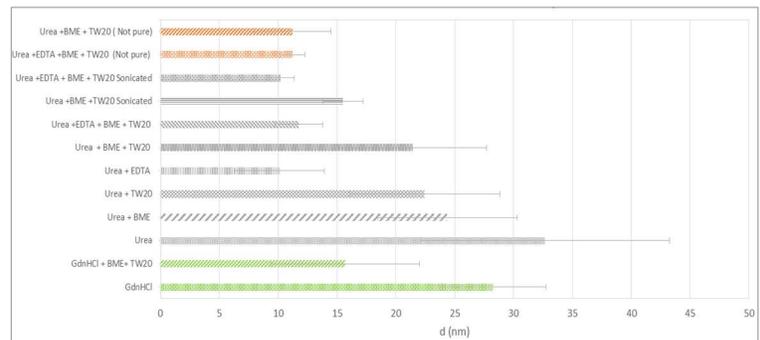


Fig. 1. Análisis por DLS del tamaño de TSA-1 solubilizada de CI.

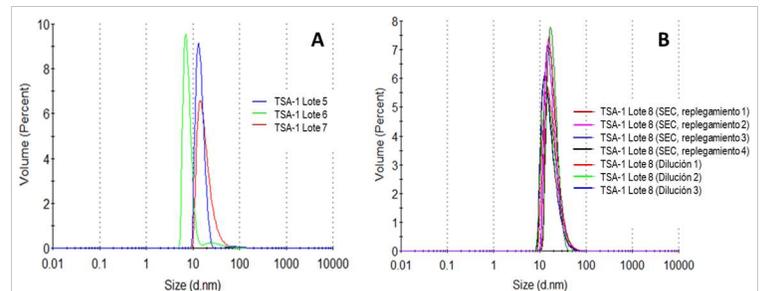


Fig.2. Análisis por DLS del tamaño de TSA-1 replegada por dilución (A) y por SEC (B)

Conclusiones. El DLS es una tecnología analítica viable para monitorear el tamaño de la TSA-1 recombinante en las etapas de solubilización, replegamiento.

Agradecimientos. Por el apoyo para la realización de este trabajo a CINVESTAV, al CONACyT; donativo INFR-2016-269657 a JOL y a la Fundación Carlos Slim.

Bibliografía.

- [1] Rinas U, Garcia-Fruitós E, Corchero JL, Vázquez E, Seras-Franzoso J, Villaverde A (2017) Bacterial inclusion bodies: discovering their better half. Trends Biochem Sci 42:726–737
- [2] Yu Z, Reid JC, Yang Y-P (2013) Utilizing dynamic light scattering as a process analytical technology for protein folding and aggregation monitoring in vaccine manufacturing. J Pharm Sci 102:4284–4290