



CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE PARTICIÓN DE CONJUGADOS PROTEÍNA-POLÍMERO EN ATPS FORMADOS CON PEG Y SALES

Luisa F. Cueto, Marco Rito-Palomares, Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, Depto. de Biotecnología e Ing. Alimentos, Av. E. Garza Sada 2501 Sur, Col. Tecnológico, 64849 Monterrey, N.L., México, Fax: (81) 8328-4262, mrito@itesm.mx

Palabras clave: conjugados proteína-polímero, sistemas de dos fases acuosas, pegilación

Introducción. La biotecnología farmacéutica se enfoca en el desarrollo de productos biológicos potencialmente utilizables en fármacos orientados al tratamiento efectivo de enfermedades con el mínimo de efectos secundarios. Sin embargo, las dificultades en su fabricación, bioseparación y purificación ocasionan problemas de efectividad al ser administrados en el torrente sanguíneo, lo cual implica la administración de dosis altas para mantener su eficacia (1) y la incursión en costos de producción sustancialmente elevados. La modificación de las proteínas biológicamente activas con polímeros como el polietilenglicol (PEG) (2), resulta en una molécula más compleja, denominada conjugado proteína-polímero. Estos representan candidatos potenciales en su aplicación como biofármacos (3).

En este trabajo, se aprovecharon los mecanismos de partición de Sistemas de Dos Fases Acuosa (ATPS) formados por PEG y sales de fosfato (4), para determinar el comportamiento de partición de dos conjugados de α -lactalbúmina de suero de bovino: el monopegilado (mono- α -lac) y el dipegilado (di- α -lac).

Metodología. Se construyeron ATPS de diferentes pesos moleculares (PM) de PEG (600, 1000, 3350, 8000) y sales de fosfatos a pH 7.0, variando los valores de la longitud de línea de corte (LLC, 15, 25, 35 y 45) y la relación de volúmenes ($V_r \approx 1/3, 1, 3$) para determinar el coeficiente de partición (K) de los conjugados mono- α -lac y di- α -lac. La medición de proteína en cada una de las fases se realizó con el método espectrofotométrico de Bradford a $\lambda=595\text{nm}$ y temperatura ambiente.

Resultados y discusión. El Cuadro 1 muestra los mejores valores de K obtenidos para el conjugado mono- α -lac. Los sistemas sobre una LLC de 25%, así como con PM intermedio (1000, 3350), presentan un K mayor que el resto de los ATPS. El V_r no impacta de manera significativa a K, pero sí hay una dificultad en la separación de las fases debido al poco volumen de la fase polimérica, en donde se ha observado la precipitación de proteína, extendiéndose hasta la interfase. La afinidad del conjugado a PM de 1000 y 3350 se explica en términos de su grado de complejidad estructural, incrementando el volumen ocupado en la fase PEG, así como su afinidad por estos PM, parámetros que son diferentes para la α -lac nativa y la α -

lac pegilada. La forma pegilada muestra valores altos de K a valores de bajo PM, disminuyendo conforme el PM aumenta. Por otro lado, el conjugado dipegilado, di- α -lac, se concentra en la fase inferior, indicando que un tamaño molecular mayor y estructura más compleja tienen baja afinidad incluso por el PEG8000 (resultados no mostrados).

Cuadro 1. Coeficiente de partición del conjugado mono- α -Lac a $T=25^\circ\text{C}$ en ATPS de PEG-fosfato

Sistema	PM PEG	LLC (%)	V_r	K
1	400	25	1.0	0.97
2	1000	25	1.0	1.12
3	3350	25	1.0	1.12
4	1000	25	0.3	1.15
5	3350	25	0.3	1.20
6	400	15	3.0	1.11
7	1000	15	3.0	1.08
8	3350	25	3.0	1.10
9	8000	15	3.0	1.12
10	8000	25	3.0	1.09

Conclusiones. El conjugado mono- α -lac presenta los mayores valores de K en ATPS con una fase polimérica de PM intermedio. En términos generales este conjugado proteico se concentra en ambas fases con una ligera preferencia por la fase superior.

Agradecimiento. Los autores agradecen el apoyo otorgado por CONACyT a través del proyecto CB-53654 así como de la estancia postdoctoral de LFC, #290523.

Bibliografía.

- Harris, J M, Chess, R B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 214-221.
- Greenwald, R B, Choe, Y H, McGuire J, Conover, C D. (2003). Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Delivery Reviews.* 55:217-250.
- Bailon, P, Berthold, W. (1998). Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Research Focus Reviews.* 1:352-356
- Benavides, J, Rito-Palomares, M. (2004). Bioprocess intensification: A potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chromatogr. B.* 807:33-38.