



CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIÓN DE LOS CONJUGADOS RIBONUCLEASA A-POLIETILÉNGLICOL EN SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS

José González-Valdez, Jorge Benavides y Marco Rito-Palomares. Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnológico de Monterrey. Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, CP 64849, México. Teléfono y Fax (81) 83 58 2000 Ext. 4820. mrito@itesm.mx

Palabras clave: Conjugados Proteína-Polímero, Sistemas de Dos Fases Acuosa, PEGilación

Introducción. La PEGilación consiste en la modificación de una molécula uniendo covalentemente por lo menos una cadena de polietilenglicol (PEG) a la misma (1). Una biomolécula PEGilada conserva su bioactividad y en el caso de compuestos terapéuticos prolonga su acción al reducir el grado de eliminación. Las reacciones de PEGilación dan como resultado especies que varían en el número de cadenas de polímero adheridas siendo normalmente una de estas especies la de interés farmacéutico (2). Los Sistemas de Dos Fases Acuosa (SDFA) representan una potencial metodología para la separación y purificación de compuestos PEGilados. Los SDFA han demostrado ser capaces de lograr el fraccionamiento, recuperación y purificación primaria de un gran número de compuestos biológicos (3).

El objetivo de este trabajo es el estudiar el comportamiento de partición de Ribonucleasa A y Ribonucleasa A monoPEGilada en SDFA, y demostrar el potencial de esta técnica puede para fraccionar selectivamente dichas especies.

Metodología. Se evaluó el comportamiento de la partición de la RNasa A nativa y la RNasa A monoPEGilada por separado en SDFA polímero – sal construidos a base másica fija (2.0 g), relación de volúmenes (V_R) 1 y pH 7. El efecto de la longitud de línea de corte (LLC) y el peso molecular del PEG (PM PEG) fue estudiado. La fase superior e inferior de cada sistema fue recuperada para determinar la concentración de proteína por absorción UV a 280 nm. Se prepararon curvas de calibración para cada una de las fases de todos los sistemas seleccionados para lograr cuantificar la proteína. Para el cálculo del porcentaje de recuperación en cada fase se considero la interfase del sistema como parte de la fase inferior. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Resultados y discusión. El PM PEG influye en el comportamiento de partición de ambas especies de RNasa A. Para la proteína nativa, conforme aumenta el peso molecular del PEG se observa una disminución en el porcentaje de recuperación de la fase superior mientras que para la RNasa A mono-PEGilada se observan de igual forma variaciones en la recuperación de la fase superior. Sin embargo, para esta última, la mayor parte de la proteína se concentra en la fase inferior independientemente del peso molecular del polímero. La LLC también influye en la partición de las

proteínas pero no se observa una tendencia específica para esta partición. La Tabla 1 muestra el comportamiento de partición de ambas proteínas en los sistemas diseñados para este trabajo.

Tabla 1. Partición de la RNasa A Nativa y la RNasa A monoPEGilada en SDFA PEG-Fosfato de Potasio

Sistema	PEG (g/gmol)	LLC (% p/p)	RNasa A Nativa (%)		RNasa A mono-PEGilada (%)	
			Fase Superior	Fase Inferior	Fase Superior	Fase Inferior
I	400	17	69.65 ± 4	30.35 ± 0	9.48 ± 0	90.52 ± 0
II		25	72.54 ± 2	27.46 ± 1	10.94 ± 0	89.06 ± 0
III		35	94.29 ± 1	5.71 ± 0	12.53 ± 0	87.47 ± 0
IV	1000	45	94.94 ± 1	5.06 ± 1	12.75 ± 0	87.25 ± 0
V		15	35.19 ± 1	64.29 ± 3	14.89 ± 1	85.11 ± 0
VI		25	40.52 ± 0	59.48 ± 1	15.32 ± 0	84.68 ± 0
VII	3350	35	26.46 ± 0	61.71 ± 1	10.93 ± 1	89.07 ± 0
VIII		45	75.30 ± 1	24.38 ± 2	19.45 ± 1	80.55 ± 0
IX		15	12.26 ± 1	75.15 ± 1	11.81 ± 1	88.19 ± 0
X	8000	25	5.32 ± 1	83.20 ± 1	13.63 ± 0	86.37 ± 0
XI		35	14.91 ± 0	85.09 ± 1	29.08 ± 0	70.92 ± 0
XII		45	7.13 ± 1	83.91 ± 1	15.33 ± 0	84.67 ± 0
XIII		15	4.95 ± 1	95.05 ± 2	9.21 ± 0	90.79 ± 0
XIV		25	0.53 ± 0	98.57 ± 2	14.08 ± 1	85.92 ± 0
XV		35	2.93 ± 1	92.56 ± 1	8.91 ± 0	91.09 ± 0
XVI		45	9.74 ± 2	77.11 ± 7	8.96 ± 0	91.04 ± 1

Los sistemas construidos con PM PEG 400 g/gmol demostraron ser candidatos potenciales para el fraccionamiento selectivo de ambas especial al lograr particionar la Ribonucleasa A en la fase superior, mientras que la migración de Ribonucleasa A monoPEGilada fue favorecida hacia la fase opuesta.

Conclusiones. Mediante el uso de SDFA contruidos con polímero de bajo peso molecular (PM PEG 400 g/gmol) es posible fraccionar selectivamente Ribonucleasa A y Ribonucleasa A monoPEGilada, logrando de esa manera su recuperación. Los resultados obtenidos demuestran el potencial de los SDFA para llevar a cabo el fraccionamiento de proteínas nativas y sus conjugados PEGilados.

Agradecimiento. A la Cátedra de Investigación CAT161 del ITESM por el apoyo económico otorgado.

Bibliografía.

- Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*. 10 (21): 1451-1458.
- Roberts, M., Bentley, M., & Harris, J. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54: 459-476.
- Rito-Palomares, M. (2004). Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B* 807: 3-11