



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PURIFICACION DE RNasa A MONOPEGILADA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA (HIC)

Karla Mayolo-Deloisa^a, Maria Elena Lienqueo^b, Barbara Andrews^b, Marco Rito-Palomares^a y Juan A. Asenjo^b.

^aCentro de Biotecnología-FEMSA, Tecnológico de Monterrey. Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México. ^bInstituto de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB): un centro para Biología de Sistemas, Universidad de Chile, Beauchef 861, Santiago, Chile.

karla.mayolo@itesm.mx

Palabras clave: PEGilación, purificación, HIC.

Introducción. Las proteínas PEGiladas son una importante clase de drogas terapéuticas modernas. Al producir proteínas PEGiladas se genera una mezcla de reacción que incluye la proteína nativa, el exceso de polietilenglicol (PEG), proteínas con diferentes grados de PEGilación y en algunos casos, isómeros[1]. Debido a la complejidad de la reacción, la proteína de interés (generalmente la proteína monoPEGilada) debe de ser altamente purificada. Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para resolver dichas mezclas, especialmente las cromatografías de exclusión molecular (SEC) e intercambio iónico (IEX). En comparación, muy poco trabajo se ha publicado sobre el uso de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) en la resolución de mezclas de proteínas PEGiladas [2]. El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones óptimas de separación de RNasa A monoPEGilada utilizando Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Metodología. RNasa A fue PEGilada utilizando mPEG (20kDa) [2]. Los productos de la reacción fueron separados por SEC, concentrados por UF (10 kDa) y liofilizados [2]. Para la separación en HIC se utilizó una columna de 1 mL (100mm x 5mmID) y las resinas: *phenyl*, *octyl* y *butyl sepharose*. Los experimentos se realizaron a un flujo de 0.8 mL/min. Se analizaron los efectos del tipo de resina, tipo y concentración de sal (NaCl y sulfato de amonio (SA)) y CV. El rendimiento y la pureza se calcularon utilizando el modelo de platos.

Resultados. La reacción de PEGilación fue analizada y separada por SEC, de dicha reacción se obtuvieron: RNasa A monoPEGilada, RNasa A diPEGilada y la proteína no modificada. Los productos de la reacción fueron analizadas por separado en columnas empacadas con resinas hidrofóbicas. Utilizando un gradiente de 25 CV y SA, la *butyl sepharose* es la única resina en la que se aprecia una mayor diferencia en los tiempos de retención de las proteínas PEGiladas, mientras que las 3 resinas son capaces de separar la proteína nativa de las especies PEGiladas dentro del gradiente de elución. Cuando se utiliza NaCl es posible separar las proteínas utilizando *phenyl sepharose*, sin embargo la resolución es menor. Por lo anterior se seleccionó a la resina *butyl sepharose* para optimizar la separación de RNasa A

monoPEGilada. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos variando la concentración de la sal y los CV.

Tabla 1. Rendimiento y pureza de la RNasa A monoPEGilada obtenidos cuando se utiliza la resina *butyl sepharose*.

	SA	CV	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Butyl sepharose	2	45	54.66	99.26
	1.75	35	62.30	98.50
	1.5	35	66.88	97.80
	1	35	84.80	97.00

Al disminuir la concentración de sal el rendimiento aumenta y el % de pureza sigue siendo alto. En la Fig. 1 se muestra parte del perfil cromatográfico en donde se aprecia la separación de las proteínas PEGiladas, bajo estas condiciones, la proteína nativa ya no es retenida por el gradiente y sale en el tiempo muerto.

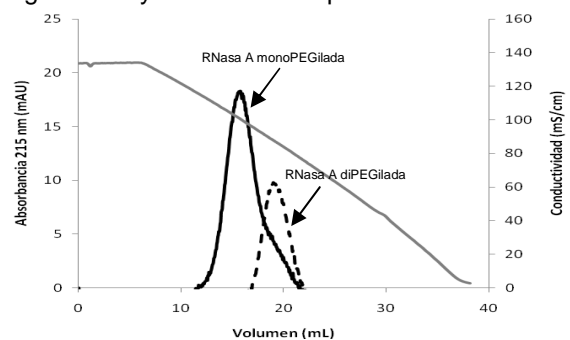


Fig. 1. Purificación de RNasa A monoPEGilada utilizando *butyl sepharose*. Condiciones: 1M SA, 35 CV.

Conclusiones. HIC puede ser utilizada para purificar RNasa monoPEGilada con una pureza del 97% y un rendimiento mayor al 80%, cuando se utiliza *butyl sepharose* y SA 1M. HIC es capaz de resolver la mezcla de la reacción de PEGilación en un solo paso.

Agradecimiento. Cátedra de Bioprocesos del ITESM (CAT161) e Inst. de Dinámica Celular y Biotecnología de la Universidad de Chile. Karla Mayolo-Deloisa agradece al CONACYT por la Beca-Mixta No. 27470.

Bibliografía.

- Fee CJ, Van Alstine JA. (2006). *Chem. Eng. Sci.* 61:924-939.
- Cisneros-Ruiz M, Mayolo-Deloisa K, Przybycien TM, Rito-Palomares M. (2009). *Sep. Purif. Technol.* 65:105-109.