



EFECTO DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LA INTERACCIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA-POLIELECTROLITO

Arturo Gómez-Aquino y Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Cuernavaca, Mor. Av. Universidad #2001 Col. Chamilpa C.P. 62250. Tel: (777) 3291617.
e-mail: itzcoat@ibt.unam.mx

Palabras clave: dispersión dinámica de luz, polielectrolitos, glicoproteínas.

Introducción. Los anticuerpos monoclonales y la eritropoyetina (EPO) son glicoproteínas de uso terapéutico. La producción de estos biofármacos puede dividirse en dos etapas. La primera incluye un cultivo generalmente de células eucariotas superiores, necesarias dadas las características del producto (glicosilado). En la segunda etapa se purifica la proteína, teniendo como primer paso la remoción de células ya que el producto de interés se encuentra en el sobrenadante. Esta operación puede efectuarse por medio de tecnologías tradicionales (microfiltración y centrifugación) o por alternativas como el uso de polielectrolitos para mejorar la sedimentación (floculación). En éste trabajo se estudió la interacción entre glicoproteínas modelo y un polielectrolito para identificar si el uso de este polímero afecta la recuperación primaria del producto.

Metodología. Se realizaron ensayos de interacción proteína-polielectrolito usando concentraciones de proteína típicas obtenidas en cultivos (IgG 1 mg/mL; EPO 40 µg/mL). La proteína pura se resuspendió en buffer de fosfatos 0.02 mM pH 6.8 y buffer de citratos 0.02 mM pH 5. Se utilizaron dos IgG, una proveniente de suero de humano purificado (Sigma) y otra producida en células CHO (Xolair®, Novartis). La eritropoyetina fue producida en células CHO (Bioyatin®, PROBIOMED). El polielectrolito utilizado fue polietilenimina (polímero catiónico de 25 kDa, Sigma) a 100 ppm. La interacción proteína-polielectrolito fue determinada como el cambio de diámetro hidrodinámico (DH) en la población por medio de dispersión dinámica de luz (1), medida en un equipo ZetasizerNano (Malvern).

Resultados. El DH de la polietilenimina es de 5.9 ± 2.2 nm. El DH teórico de un IgG es de 11.3 nm (2), mientras que los obtenidos en este trabajo fueron de 12.37 ± 3.1 nm (suero humano) y 11.67 ± 1.1 nm (CHO). Al adicionar el polielectrolito el DH fue de 10.39 ± 2.9 nm y 9.86 ± 1.3 nm respectivamente. Por medio de una prueba *t*, se determinó que no existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) y por lo tanto las moléculas no interaccionan (Figura 1). El DH de la EPO fue de $6.46 \text{ nm} \pm 0.6$ nm, correspondiente a una proteína de 47 kDa. Al añadir la PEI, el DH aumentó 1.6 veces, indicando así una interacción con la EPO. Se realizó un ensayo para determinar la influencia de los ácidos siálicos en la interacción EPO – polietilenimina. Se removieron los ácidos siálicos de la EPO por un método químico (4), esto fue verificado por Western-Blot (5). El DH de la

asialoeritropoyetina (aEPO) fue de 5.7 ± 0.83 nm e incrementó más de 200 veces al adicionar PEI. En pH 5 la carga neta de la aEPO es positiva y por lo tanto no interacciona con el polímero (Figura 2).

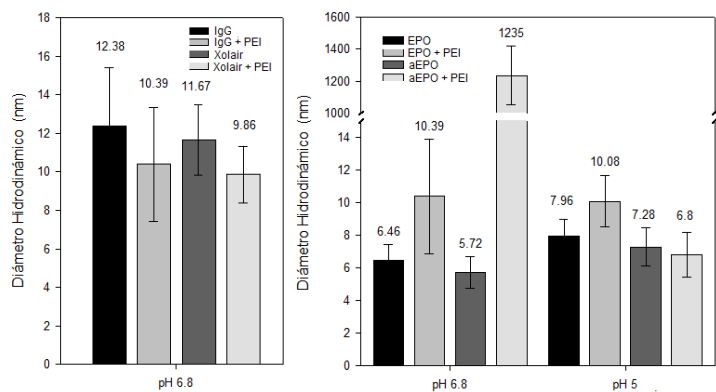


Fig. 1. Interacción IgG-PEI

Fig. 2. Interacción EPO-PEI

Conclusiones. Es posible que el uso de polielectrolitos en la recuperación de IgG no afecte su concentración debido a que no se detectó la formación de un complejo proteína-polielectrolito. Sin embargo para la otra glicoproteína modelo (EPO) es posible que esta sea removida en conjunto con otros contaminantes. Lo anterior se puede explicar ya que los IgG al pH empleado tienen una naturaleza catiónica mientras que la EPO es de naturaleza aniónica debido a la presencia de ácidos siálicos. El cambio de DH en la interacción aEPO-PEI puede deberse al pH de trabajo (6.8) ya que en condiciones nativas la EPO tiene un pI de 4.8 y al desialidarse su pI se eleva a 6.7, obteniéndose una paridad de cargas expuestas y posiblemente interaccionando mediante parches electrostáticos.

Agradecimiento. A la empresa PROBIOMED por donar amablemente EPO. Financiamiento CONACyT-Salud-126663 y PAPIIT-UNAM-224409.

Bibliografía.

- Cooper C, Dubin P, Kayitmazer A, Turksen S. (2005). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. (10):52-80.
- Imrem D, Gümüşdereelioğlu M, Güner A. (2007). *Hacettepe J. Biol. & Chem.* (3):163-171.
- Guile G, Rudd P, Wing D, Prime S y Dwek R. (1996). *Anal Biochem.* (240):210-226.
- Higuchi M. (2007). Patent Application WO/2007/083683.
- O'Shannessy D, Voorstad P, y Quartes R. (1987). *Anal Biochem.* (163). 204-209.