

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PEQUEÑAS CON UN POTENCIAL EFECTO INMUNOMODULADOR

Juan C. Vargas-Coto^{1,3}, Luis Elizárraras-Rodríguez^{1,3}, Yamile Pelcaster-Gómez^{1,3}, Aneth González-Martínez^{1,3}, Ana Fragozo, Keyla M. Gómez-Castellano^{1,3}, Francisco A. Aguilar-Alonso^{1,3}, Juan C. Almagro^{1,2}, Sonia M. Pérez-Tapia^{1,3}.

¹Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México, 11340.

²GlobalBio, Inc., 320 Concord Ave, Cambridge, MA 02138, USA ³Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I + D + i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT), Ciudad de México, México, 11340.

jvargasc1503@alumno.ipn.mx

Palabras clave: UBIQUITINA, TRANSFERON, CXCR4/CXCL12.

Introducción. Transferon oral™ es un Extracto Dializado de Leucocitos (EDL) de origen humano fabricado por el Instituto Politécnico Nacional. Es usado como auxiliar terapéutico en alergias, autoinmunidades e infecciones (1). Está compuesto por péptidos menores a 10 kDa derivados de 22 proteínas de leucocitos y eritrocitos, complejidad que dificulta el estudio de su mecanismo de acción. Recientemente, se encontró por espectrometría de masas que la Ubiquitina (Ub) y una ubiquitina carente de las 2 glicinas terminales (UbΔGG) son sus componentes mayoritarios (1). También se reportó que Ub incrementa la sobrevivencia de ratones infectados con el virus del HSV-1 cuando es administrada vía oral (1). Se sabe que la Ub extracelular modula la producción de citocinas en modelos de endotoxemia (2), probablemente al activar parcialmente al receptor CXCR4 (3-4). Por otra parte, los escasos reportes sobre la UbΔGG sugieren que puede jugar un papel protector en patologías cardíacas al prevenir la proliferación de fibroblastos cardíacos (5). Ambas Ubiquitinas son piezas fundamentales para comprender el mecanismo de acción de Transferon oral® y tienen un potencial para el desarrollo de inmunomoduladores innovadores orales. Este trabajo muestra un proceso para la producción y purificación de Ub monomérica (mUb) y su variante UbΔGG.

Metodología. Los genes de Ub y UbΔGG fueron clonados en pET25b y fueron producidas de forma independiente por la adición de 3mM de IPTG por 16 h en *E. coli* BL21. Las ubiquitinas fueron purificadas de lisados bacterianos mediante cromatografía de intercambio iónico y pasos secuenciales de ultrafiltración. La determinación de la pureza y caracterización de ambas ubiquitinas se realizó por SDS-PAGE, SEC analítico, cuantificación de

endotoxinas (por el método de LAL) y ELISAs específicos para la detección de ambas ubiquitinas.

Resultados. Se estableció un protocolo de purificación de ambas ubiquitinas con un rendimiento de 17-18 mg/L. En ambas ubiquitinas se obtuvo una pureza del monómero >90%. Mediante SEC y SDS-PAGE fueron identificadas como proteínas con pesos aproximados de 8-9 kDa. La cantidad de endotoxinas fue <0.5 [UE/mL]. De igual forma los ensayos de ELISA confirmaron la pureza de nuestras preparaciones comparado con un estándar de ubiquitina comercial (R&D systems, U-100H).

Conclusiones. Se logró purificar Ub y UbΔGG con una alta pureza y con parámetros de endotoxinas aceptables para su uso en estudios preclínicos. Se determinará su mecanismo de acción y funcionalidad terapéutica en etapas posteriores.

Agradecimiento. Esta investigación se realizó en la UDIBI-IPN con equipamiento del LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT. JC V-C, L E-R, Y P-G y ZS M-P becarios de posgrado CONACyT.

Los autores agradecen a Said Vázquez, Zaira Macías, Lenin Pavón y Luis Vallejo por su apoyo en la realización de este trabajo.

Bibliografía.

1. Vallejo-Castillo, L., Favari, L., Vázquez-Leyva, S., Mellado-Sánchez, G., Macías-Palacios, Z., López-Juárez, L. E., ... & Pérez-Tapia, S. M. (2020) *Frontiers in pharmacology*. 11(569039).
2. Majetschak, M. (2011) *Journal of leukocyte biology* 89: 205-219.
3. Saini, V., Marchese, A., & Majetschak, M. (2010) *Journal of Biological Chemistry* 285: 15566-15576.
4. Scofield, S. L., Daniels, C. R., Dalal, S., Millard, J. A., Singh, M., & Singh, K. (2018) *Life sciences* 211, 8-16.
5. Dalal S, Shook PL, Singh M, Singh K. (2021) *Cardiovasc Drugs Ther.* 35: 1227-1232.