XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

MODIFICACION QUIMICA DE MONOLITOS CROMATOGRAFICOS CON ESTRUCTURAS DENDRITICAS PARA LA RECUPERACION DE PROTEÍNAS PEGILADAS MEDIANTE INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

Beatriz E. De los Santos-González, Jesús A. Valencia-Gallegos, Marco A. Mata-Gómez, José González-Valdez
Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 C.P. 64849, Monterrey, N.L. México. jose_gonzalez@tec.mx.

Palabras clave: monolitos cromatográficos, dendrón, proteínas PEGiladas

Introducción. La cromatografía sigue siendo la técnica de purificación de biomoléculas más utilizada y estandarizada, por lo que numerosos esfuerzos se han enfocado en la creación de nuevos y más eficientes soportes cromatográficos (1). En este estudio se propone el desarrollo de un nuevo monolito funcionalizado con estructuras dendríticas que consisten en moléculas ramificadas con arquitectura definida, para la recuperación de proteínas PEGiladas. Estas proteínas modificadas con polietilenglicol (PEG) poseen propiedades mejoradas en donde el conjugado mono-PEGilado presenta las mejores actividades terapéuticas e inmunosupresoras en la mayoría de los casos (5). Para separar las mezclas de reacciones tradicionales de PEGlación, discos monolíticos activados con etilen-diamino se funcionalizaron con dendrones 2,2-bis (hidroximetil) ácido propiónico (bis-MPA) de tercera generación (G3), los cuales a su vez fueron modificados con grupos butil como ligandos para cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). El uso de monolitos cromatográficos ha demostrado ventajas de proceso como es la ausencia de volúmenes vacíos y mejor transferencia de masa en comparación con las columnas empacadas (2), mejorando los tiempos de proceso sin perder resolución. La modificación de monolitos con dendrones representa una estrategia atractiva para el desarrollo de soportes más eficientes gracias a su arquitectura ramificada, su alta selectividad y flexibilidad (1)(3).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un soporte monolítico funcionalizado con dendrones con ligandos hidrofóbicos para la separación de proteínas PEGiladas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.

Metodología. Para la síntesis del monolito dendronizado, se realizó la activación de los grupos primarios (EDA) del soporte con glutaraldehído, y posteriormente se acopló el dendrón de tercera generación (G3) mediante una aminación reductiva utilizando $NaBH_3CN$ como agente reductor, seguido de la esterificación de los grupos hidroxilo libres presentes en el dendron con ácido valerico. Se usaron proteínas PEGildas puras como modelo, obtenidas de acuerdo a lo descrito por Mayolo-Deloisa *et. al* (4). La separación de proteínas PEGiladas en la mezcla de PEGilación se llevó a cabo de forma dinámica con un gradiente de elución lineal (100 a 0% fase B) o por pasos (75, 40, 25 y 0% fase B) usando sulfato de amonio (SA) (1.5 ó 2 M). Los picos fraccionados (PI y P2) fueron analizados mediante SDS-PAGE. También, se evaluó la adsorción dinámica usando BSA.

Resultados. El monolito dendronizado fue capaz de separar las diversas especies PEGiladas mostrando una resolución de 1.19 (Fig. 1a) que se pudo ver afectada al aumentar la concentración de SA a 2M al favorecer interacciones proteína-proteína (Fig. 1b). En el análisis de electroforesis (Fig. 1c) se observó una sola banda (carril 4, P1) correspondiente al conjugado mono-PEGilado (~22 kDa). Es importante mencionar que el aumento en la capacidad de adsorción del monolito puede ser producto del aumento en la densidad de ligandos (clústeres) en la superficie del monolito.

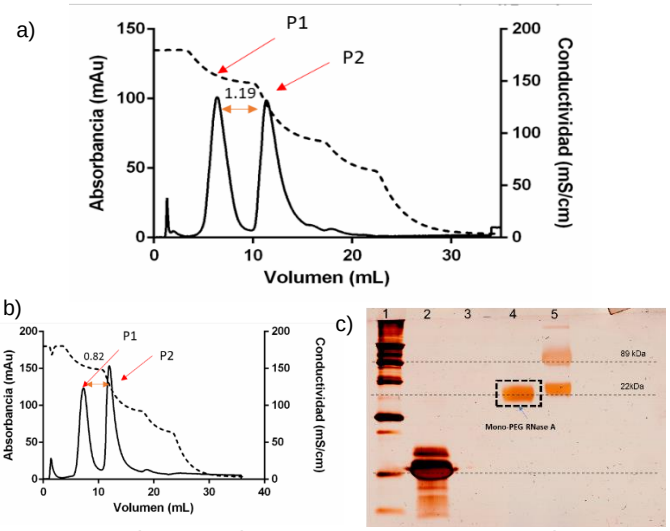

Fig 1. Separación de proteínas PEGiladas por HIC con elución por pasos. a) [SA]= 1.5M, flujo de 1mL/min. b) [SA]= 1.5M, flujo de 2mL/min. c) Gel SDS-PAGE teñido con plata y I_2-BaCl2 para la detección de PEG; 1) Marcador; 2) RNasa A; 3) PEG 10 kDa; 4) P1; 5) P2.

Conclusiones. Se desarrolló un nuevo soporte monolítico con estructuras dendríticas que permitio separar una mezcla de proteínas PEGiladas con buena resolución. Esta tecnología representa una plataforma prometedora para la recuperación de proteínas de interés industrial y tecnológico.

Agradecimientos. Los autores agradecen al grupo de enfoque estratégico de bioprocesos y al CONACyT por el financiamiento otorgado (No. Proyecto 242286).

Bibliografía.

1. Mata-Gómez, M.A. *et al.* (2016). *J Chromatogr A*, 1443:191–200.
2. Li Y., Dennis Tolley H., & Lee M.L. (2010). *J Chromatogr A*, 1217(30): 4934–4945.
3. Inoue K. (2000). *Prog Polym Sci*, 25(4), 453–571.
4. Mayolo-Deloisa K, González-Valdez J, & Rito-Palomares M. (2016). Biotechnol Prog, 32(3):702–707.
5. Fang, E. F., & Ng, T. B. (2011). Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1815(1), 65–74.