

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO UN PÉPTIDO BIFUNCIONAL

Leopold, María J^{1,2}.

¹Centro Biotecnológico del Litoral FCB-UNL
²CONICET

Directora: Ceaglio, Natalia
Codirector: Oggero, Marcos

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Etiqueta peptídica, Cromatografía, Inmunofinidad

INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio hemos diseñado un péptido de 15 aminoácidos denominado mGMOP como etiqueta para la preparación de proteínas de fusión. Esta etiqueta deriva de la región N-terminal del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF) y se caracteriza por dos propiedades. Por un lado, presenta una elevada probabilidad de O-glicosilación, con 6 sitios potenciales para la unión de O-glicanos; y, por otro lado, contiene un epítipo lineal en su N-terminal (secuencia APAR) reconocido por un mAb (CC1H7), también obtenido en nuestro laboratorio (Oggero y col., 2004). Ambas características determinan la bifuncionalidad del péptido mGMOP, que puede ser utilizado simultáneamente para conferir propiedades biológicas mejoradas a las proteínas de fusión por su capacidad de hiper-O-glicosilación, y como sistema para la cuantificación y/o purificación de las mismas. En trabajos previos se logró fusionar la etiqueta mGMOP a la región N-terminal del interferón- α 2b recombinante humano (rhIFN- α 2b), exhibiendo la quimera mGMOP-IFN una mejora significativa en sus propiedades farmacocinéticas con respecto al rhIFN- α 2b no modificado (Sales y col., 2021). En el presente trabajo, se propuso evaluar el potencial de la etiqueta como herramienta para la purificación de proteínas, explotando el aumento de la afinidad que se produce en la interacción mAb CC1H7-mGMOP en presencia de alta fuerza iónica.

OBJETIVOS

- Evaluar la capacidad de la etiqueta peptídica bifuncional mGMOP para ser empleada en procedimientos de purificación de proteínas por inmunofinidad.

Título del proyecto: "EVALUACIÓN DE UN NUEVO PÉPTIDO DERIVADO DEL GM-CSF HUMANO PARA LA GENERACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN ALTAMENTE GLICOSILADAS CON MEJORES PROPIEDADES TERAPÉUTICAS"

Instrumento: CAI+D –Categoría: Proyectos e Investigación para Grupos Consolidados (PIC)

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Director: Kratje, Ricardo

Co-Director: Ceaglio, Natalia

Diseño de Experimentos

Teniendo en cuenta que se ha demostrado un aumento de afinidad entre el epítopo APAR y el paratopo CC1H7 en un entorno de alta fuerza iónica (Perotti y col., 2013), se llevó a cabo un diseño de experimentos (DOE) con la finalidad de maximizar dicha propiedad. Para ello, en primer lugar se desarrolló un ensayo de ELISA sándwich combinado, que se basó en la captura del antígeno (mGMOP-IFN) por el mAb CC1H7 y su posterior detección por inmunoglobulinas (Igs) de conejo anti-hIFN- α 2b, que luego interaccionaron con anticuerpos de cabra anti-Igs de conejo conjugados con peroxidasa.

Se eligió un DOE de dos factores en tres niveles para estudiar el efecto de tres sales anti-caotrópicas (KCl, NaCl y Na₂SO₄) a diferentes concentraciones (mol/L) y pH (6-8) sobre la afinidad epítopo-paratopo. Este efecto fue evaluado durante la etapa de incubación del antígeno con el mAb en el ensayo de ELISA, determinando el cambio en la afinidad aparente ($K_{ap} = 1/\text{concentración}$) mediante el cociente de la K_{ap} en una condición con respecto a la del control (incubación de la muestra en diluyente sin agregado de sal a pH 7,5). Previamente, se evaluó la solubilidad de cada sal en sobrenadantes de cultivo para evitar el fenómeno de precipitación, teniendo en cuenta su posterior aplicación en una cromatografía de inmutofinidad. El diseño se realizó mediante el software *Design Expert 7.0*. Se realizaron 12 corridas para cada sal consistentes en 9 tratamientos más 3 repeticiones del punto central del diseño. Se obtuvieron superficies de respuesta y puntos máximos, que permitieron seleccionar las condiciones óptimas a evaluar en la cromatografía de inmutofinidad.

Producción de mGMOP-IFN empleando cultivo de células animales

Con el fin de obtener material para evaluar la purificación de la proteína de interés por cromatografía de inmutofinidad (CIA), empleando las condiciones de concentración de sal y pH óptimas determinadas previamente mediante el DOE, se llevó a cabo la producción de la misma mediante el cultivo de la línea celular CHO-K1 productora de mGMOP-IFN. Las células fueron cultivadas en medio DMEM/HAM's F12 suplementado con suero fetal bovino 0,5% (V/V) en frascos T-175 cm². Se cosecharon los sobrenadantes de cultivo cada 48-72 h y se conservaron a -20°C. En total se llevaron a cabo 13 cosechas, en las cuales se determinó la concentración de mGMOP-IFN por ELISA sándwich. Los sobrenadantes de cultivo se mezclaron y la muestra resultante se dividió en cuatro alícuotas para contar con idéntico material para su acondicionamiento de acuerdo con el procedimiento seleccionado para la purificación por CIA.

Determinación de la capacidad dinámica (CD) de la matriz de IA Sepharose-mAb CC1H7 para la purificación de mGMOP-IFN en diferentes condiciones de sal y pH

Para evaluar la funcionalidad de la etiqueta mGMOP como herramienta de purificación, se analizó la CD de la matriz *Sepharose*-mAb CC1H7 en las condiciones seleccionadas de acuerdo con los resultados del DOE. Para ello, se acondicionaron los sobrenadantes de cultivo cosechados mediante el agregado de la concentración óptima de cada sal y ajustando al pH correspondiente. También se llevó a cabo una cromatografía en ausencia de sal como referencia. Las muestras se sembraron en 2 ml de resina a un flujo de 1 ml/min, recolectándose el *flowthrough* (FT) en fracciones de 2 ml. El volumen de siembra se calculó teniendo en cuenta la concentración de la proteína con el objetivo de alcanzar la saturación de los sitios de interacción de la resina, considerando una capacidad teórica

de ~600 µg de mGMOP-IFN/ml de resina. De esta forma, la masa sembrada en todos los casos fue similar. La concentración de mGMOP-IFN en la siembra (C_0) y en las diferentes fracciones del FT (C) se determinó mediante ELISA sándwich, graficándose el cociente C/C_0 en función del volumen sembrado (curva de *breakthrough*).

RESULTADOS

Los resultados del DOE demostraron, para todas las sales, un incremento de la afinidad aparente en forma concomitante con el incremento de la concentración de sal, obteniéndose modelos con un valor de $R^2 > 0,92$. El valor máximo de incremento de afinidad fue de 68, 58 y 32 para NaCl, KCl y Na_2SO_4 , respectivamente. Las sales constituidas por aniones cloruro presentaron el máximo de afinidad en torno a pH 7, mientras que la de sulfato mostró mayor afinidad a pH 8. En función de estos resultados, las condiciones que presentaron el máximo incremento de la afinidad aparente con respecto al control en ausencia de sal a pH 7,5 (Tabla 1) se seleccionaron para la continuidad de los experimentos.

Tabla 1: Condiciones de unión seleccionadas para evaluar la CD de la resina de IA.

CONDICIONES DE UNIÓN (Acondicionamiento de muestra)	CONDICIÓN DE ELUCIÓN
1. Sin sal pH 7,5	Fosfato 50 mM pH 11
2. KCl 3,75 M pH 7,5	
3. NaCl 4,5 M pH 7,5	
4. Na_2SO_4 1 M pH 8	

Los resultados de la determinación de la CD de la resina *Sepharose-mAb CC1H7* para cada condición se muestran en la Figura 1.

Como se puede observar, en ninguna de las condiciones se alcanzó una relación $C/C_0=1$, es decir, que la concentración de mGMOP-IFN en el FT no igualó en ningún momento a la concentración de la proteína en la siembra. Esto implicaría que no se alcanzó una saturación de los sitios de interacción de la resina a pesar de sembrar un exceso de proteína de acuerdo con los cálculos teóricos. Este comportamiento podría deberse a una baja afinidad del mAb CC1H7, que derivaría en un equilibrio que permite la unión y desorción constante de la proteína a la matriz, no permitiendo que todos los sitios sean ocupados en el tiempo evaluado. Esta baja afinidad también se ve evidenciada por la pérdida temprana de proteína en el FT (aproximadamente después de las fracciones 6-7 en todos los casos).

Si bien en todas las situaciones ensayadas, a medida que se incrementó el volumen de siembra se incrementó la pérdida de proteína en el FT, tal pérdida fue más lenta cuando la siembra se realizó en presencia de cualquiera de las sales, lo que quedó de manifiesto por una pendiente menor de sus curvas de *breakthrough* en comparación con la curva correspondiente a la siembra sin sal (Tabla 2). Más aún, en presencia de las sales, la máxima relación C/C_0 rondó un valor entre 0,2-0,3, mientras que en ausencia de sal la relación alcanzada fue mayor, con un valor cercano a 0,7. Esto sugeriría que un entorno de elevada fuerza iónica permitiría incrementar la fuerza de unión del mAb CC1H7 por la proteína mGMOP-IFN, permitiendo sembrar mayor cantidad en menor tiempo.

La CD se determinó como la masa de proteína retenida en la matriz cuando en el FT comenzó a detectarse un 10% de la concentración de la muestra sembrada. Como se puede observar en la Tabla 2, la capacidad dinámica a $C/C_0=0,1$ fue claramente superior para la condición de Na_2SO_4 1 M con respecto a la condición en ausencia de sal. Para el resto de las sales, la capacidad dinámica fue similar o ligeramente mayor en relación con la condición en ausencia de sal.

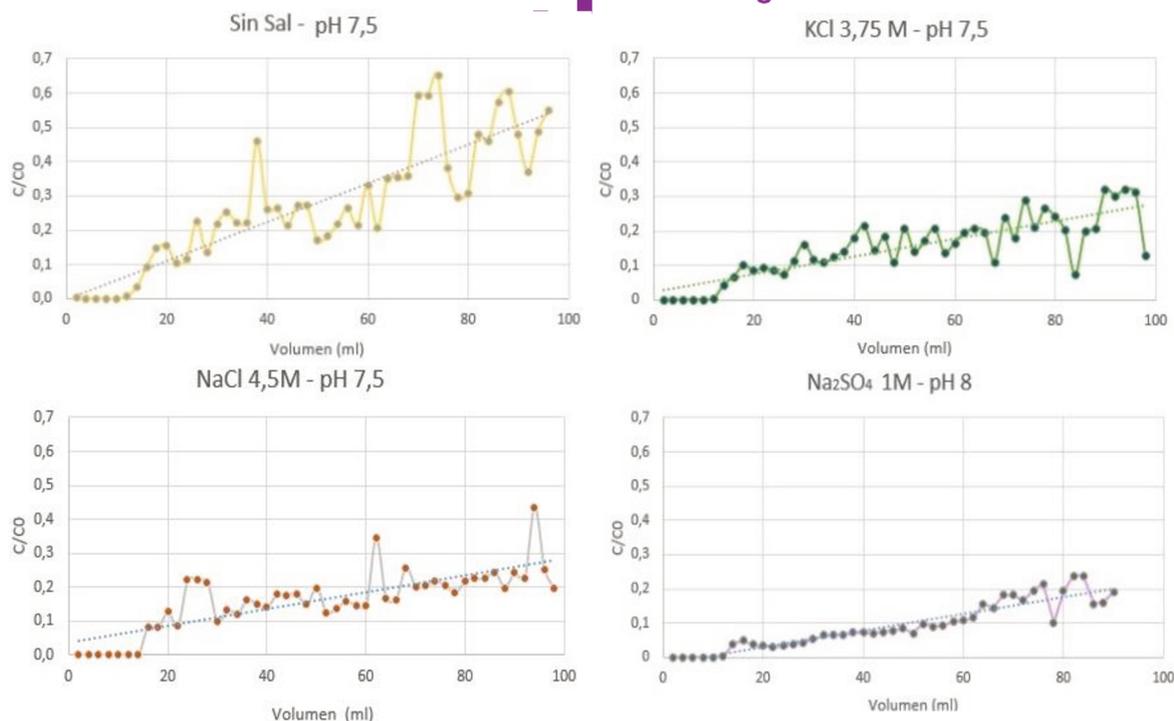


Figura 1: Curvas de *breakthrough* para cada condición de unión a la matriz Sepharose-mAb CC1H7.

Tabla 2: Capacidad dinámica de la matriz Sepharose-mAb CC1H7 en diferentes condiciones de unión.

CONDICIONES DE UNIÓN (Acondicionamiento de muestra)	CD al 10% ($\mu\text{g/ml}$ de resina)	Pendiente (ml^{-1})
1. Sin sal	73	$0,00522 \pm 0,00061$
2. KCl 3,75 M	80	$0,00213 \pm 0,00031$
3. NaCl 4,5 M	84	$0,00169 \pm 0,00033$
4. Na_2SO_4 1 M	231	$0,00248 \pm 0,00019$

CONCLUSIÓN

La capacidad dinámica a $C/C_0=0,1$ fue 3,2 veces mayor para la condición Na_2SO_2 1 M pH 8 con respecto a la siembra en ausencia de sal, mientras que para el resto de la sales fue similar o ligeramente mayor. No obstante, a relaciones $C/C_0>0,1$ estas diferencias se acrecentaron, lo que quedó evidenciado por la menor pendiente de la línea de tendencia de las curvas de *breakthrough* cuando se sembró en presencia de sales con respecto a las realizada en ausencia de sal. En conclusión, la presencia de sal permitiría sembrar una mayor masa de mGMOP-IFN en el mismo volumen de matriz. Así, resultaría una estrategia eficaz para optimizar el proceso de purificación de proteínas de fusión al novedoso péptido.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Oggero, M. y col., 2004. Defining the antigenic structure of human GM-CSF and its implications for receptor interaction and therapeutic treatment. *Molecular Diversity*. Vol. 8, p. 257-269.

Perotti, N. y col., 2013. A versatile ionic strength sensitive tag from a human GM-CSF-derived linear epitope. *Protein Expression and Purification*, Vol. 91, p.10-19. Elsevier.

Sales, M. y col., 2021. Bifunctional GM-CSF-derived peptides as tools for O-glycoengineering and protein tagging. *Journal of Biotechnology*, Vol. 327, p. 18-27. Elsevier.