

047/12

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**NUEVOS MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN Y
ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA COMO
SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE
PROTEÍNAS DE INTERÉS INDUSTRIAL**

**TESIS DOCTORAL
POR
M^a PILAR ARMISÉN GIL**

MADRID 1997
HISPANAGAR S.A.
INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA
(CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)



* 5 3 0 9 8 2 4 9 7 9 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

21.742

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**NUEVOS MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN Y
ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA COMO
SOPORTES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE
PROTEÍNAS DE INTERÉS INDUSTRIAL**

**TESIS DOCTORAL
POR
M^a PILAR ARMISÉN GIL**

**DIRECTORES: JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJAS
M^a JOSÉ DE FRUTOS DE FRUTOS**

MADRID 1997

A mis padres y a Miguel Ángel

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una Beca del Ministerio de Educación y Ciencia, bajo la dirección de José Manuel Guisán Seijas y M^a José de Frutos de Frutos.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. José Manuel Guisán por todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos cuatro años, a nivel científico y humano. Su afán de superación y su buena dosis de imaginación y creatividad que contagia día a día a todo el laboratorio.

A M^a José de Frutos por su amistad, consejos y ayuda en todo momento.

A Hispanagar S.A. y en especial a su Presidente Fernando Galatas por todas las facilidades que me ha proporcionado, así como los medios que ha puesto a mi alcance en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Javier Soria, director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica por las facilidades prestadas.

Mi más sincera gratitud a la Dra. Rosalía Rodríguez por su gran colaboración y disponibilidad, así como sus consejos para la preparación del manuscrito definitivo.

A José Luis García y a Jorge que me prepararon las enzimas fusionadas.

A Roberto Fernández-Lafuente por sus consejos y críticas que tanto han contribuido a la presentación de esta Tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, Julio, Cesar, Pili, Roberto, Rosa, Ágatha, Gloria, Enma, Marieta, Enrique, Silene, Paola y Luciana por la ayuda desinteresada que he encontrado en ellos y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. A todos los compañeros que han ido pasando por el laboratorio, en especial a Cristina Molina que me ayudó en los primeros pasos y al Dr. Lorenzo Rodés por sus consejos y por su ayuda. A M^a Carmen que me ha ayudado a presentar una "Tesis a todo color" y con la que he compartido muchas horas al ordenador.

Y por último a mi familia, a mi madre, Ana, Marta, Rafa, Margarita, José, Laura, Yolanda, Félix y Toni en los que he encontrado apoyo y cariño en todo momento. A Miguel Ángel, por toda la ayuda que me ha prestado y por la paciencia que ha tenido conmigo en los últimos momentos de la Tesis. Y de una manera muy especial a mi padre, por todo el interés que ha mostrado y el entusiasmo por el trabajo que me ha comunicado en todo momento.

INDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.- INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	2
1.1.- USO DE ENZIMAS EN PROCESOS INDUSTRIALES	2
1.2.- IMPORTANCIA DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	2
1.3.- ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN	3
1.4.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	3
2.- SOPORTES	5
2.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS SOPORTES	5
2.1.1.- Porosidad	5
2.1.2.- Propiedades mecánicas y rigidez	6
2.1.3.- Morfología interna	7
2.2.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES	7
2.2.1.- Necesidad de activación	7
2.2.2.- Inmovilización de ligandos y proteínas	7
2.3.- BLOQUEO DE GRUPOS	8
3.- AGAROSA COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS	8
3.1.- PROPIEDADES DE LA AGAROSA	8
3.2.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA: GLIOXIL/EPÓXIDO	11
3.3.- UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL	12
3.4.- INMOVILIZACIÓN ORIENTADA	12
3.5.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LIPASAS	14
3.6.- CROMATOGRAFÍA DE QUELATOS METÁLICOS	14
3.7.- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CON PROTEÍNA A	15

OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO	16
I.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA	21
INTRODUCCIÓN	21
1.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES PARA INMOVILIZAR LIGANDOS Y PROTEÍNAS	21
1.1.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA: MÉTODOS MUY VARIADOS	22
1.1.1.- Activación con Bromuro de cianógeno (CNBr)	22
1.1.2.- Activación con <i>Glutaraldehído</i>	22
1.1.3.- Activación con Hidrazinas	22
1.1.4.- Activación con N-Hidroxisuccinimida (NHS) Y Carbonildiimidazol (CDI)	23
1.1.5.- Activación con Divinilsulfona (DVS)	24
1.1.6.- Activación con Cloruro de Tresilo	24
1.1.7.- Activación con Glicidol	25
1.1.8.- Activación con Epihalohidrinás	26
2.- ENTRECruzAMIENTO DE GELES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA	26
3.- UTILIZACIÓN DE EPICLORHIDRINA COMO AGENTE ACTIVANTE	27
OBJETIVOS	28
PARTE EXPERIMENTAL	29
1.- REACCIÓN DE ACTIVACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA	29
2.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS GLICERIL PROCEDENTES DE LA ACTIVACIÓN	29
2.1.- HIDRÓLISIS DE LA AGAROSA ACTIVADA CON EPICLORHIDRINA	29
2.2.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS GLICERIL POR MEDIDA DEL CONSUMO DE PERIODATO	30
3.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS EPÓXIDO PROCEDENTES DE LA ACTIVACIÓN CON EPICLORHIDRINA	32
4.- ESTABILIDAD DE LOS EPÓXIDOS EN DISTINTAS CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA	32
5.- REACTIVIDAD DE LOS EPÓXIDOS	34

5.1.- REACTIVIDAD CON AMINAS	34
5.1.1.- Aminas Primarias (Etilendiamina)	34
5.1.2.- Aminas Secundarias (Ácido iminodiacético (IDA))	34
5.2.- REACTIVIDAD DEL SOPORTE AGAROSA-EPÓXIDO CON ALCOHOLES	35
5.2.1.- Reacción del soporte Agarosa-Epóxido con Butanol	35
5.2.2.- Reacción del soporte Agarosa-Epóxido con Fenol	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
1.- ACTIVACIÓN CON EPICLORHIDRINA PARA OBTENER SOPORTES GLICERIL -	37
AGAROSA	
1.1.- INFLUENCIA DE LA ALCALINIDAD DEL MEDIO	37
1.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA	38
1.3.- EFECTO DE LA CANTIDAD DE REACTIVO ACTIVANTE (EPICLORHIDRINA)	39
AÑADIDO	
1.4.- EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN	41
2.- SOPORTES AGAROSA - EPÓXIDO	43
2.1.- INFLUENCIA DE LA ALCALINIDAD DEL MEDIO	43
2.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE DISOLVENTE	45
2.3.- INFLUENCIA DE LA REALIZACIÓN DE ADICIONES SUCESIVAS DE	46
EPICLORHIDRINA	
2.4.- EFECTO DE LA TEMPERATURA	47
3.- ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS EPÓXIDOS	48
4.- REACTIVIDAD DE LOS EPÓXIDOS CON LIGANDOS	49
4.1.- REACTIVIDAD CON AMINAS	51
4.1.1.- Aminas Primarias (Etilendiamina)	51
4.1.2.- Aminas Secundarias (IDA)	52
4.2.- REACTIVIDAD CON ALCOHOLES	54
4.2.1.- Reacción de los Epóxidos con Butanol	54
4.2.2.- Reacción de los Epóxidos con Fenol	56
CONCLUSIONES	58

II.- AGAROSA COMO SOPORTE PARA INTERACCIONES MULTIPUNTUALES	61
INTRODUCCIÓN	61
1.- UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL DE ENZIMAS SOBRE SOPORTES ACTIVADOS	61
2.- PROCESOS DE INMOVILIZACIÓN QUE ENVUELVEN UNA UNIÓN MULTIPUNTUAL EN LA PRIMERA ETAPA	63
3.- ADSORCIÓN HIDROFÓBICA MULTIPUNTUAL DE LIPASAS A SOPORTES DE AGAROSA	65
OBJETIVOS	67
PARTE EXPERIMENTAL	69
1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA	69
1.1.- PREPARACIÓN DE GELES GLICERIL-AGAROSA	69
1.2.- OBTENCIÓN DE SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA CON ELEVADA DENSIDAD SUPERFICIAL DE GRUPOS GLIOXIL (75 μ moles/ml gel)	69
1.3.- OBTENCIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA CON BAJA DENSIDAD (15 μ moles/ml gel) SUPERFICIAL DE GRUPOS GLIOXIL	70
2.- PREPARACIÓN DE SOPORTE MANA-AGAROSA	70
3.- PREPARACIÓN DE SOPORTE GLUTARALDEHIDO-AGAROSA	71
4.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE RESINA TOYOPEARL. PREPARACIÓN DE SOPORTE GLIOXIL-TOYOPEARL	71
5.- PREPARACIÓN DEL SOPORTE GLUTARALDEHIDO-TOYOPEARL (15 μ moles/ml gel)	71
6.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	71
6.1.- ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE PGA	71
6.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASA DE <i>Kluyveromyces lactis</i>	73
7.- INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS A SOPORTES CON DISTINTO TIPO DE ACTIVACIÓN	73
7.1.- INMOVILIZACIÓN A SOPORTES GLUTARALDEHIDO	73
7.2.- INMOVILIZACIÓN A SOPORTES GLIOXIL	74

7.2.1.- Inmovilización de PGA a soportes Glioxil	74
7.2.2.- Inmovilización de β -Galactosidasa a soportes Glioxil	74
8.- UNIÓN DE CEFALEXINA A DISTINTOS SOPORTES	75
9.- ADSORCIÓN HIDROFÓBICA MULTIPUNTUAL DE LIPASAS	75
9.1.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD	75
9.2.- PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ENZIMÁTICAS	76
9.3.- ADSORCIÓN DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
1.- INTERACCIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL GLIOXIL AGAROSA-PROTEÍNA	78
1.1.- MECANISMO DE UNIÓN DE PROTEÍNAS A SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA	78
1.1.1.- Influencia de la densidad superficial de grupos reactivos en el soporte	78
1.1.2.- Influencia de la temperatura de inmovilización	79
1.1.3.- Unión de Cefalexina a soportes Glioxil-agarosa	80
1.2.- COMPARACIÓN CON OTROS TIPOS DE UNIONES PROTEÍNA-SOPORTE:UNIÓN A SOPORTES GLUTARALDEHIDO-AGAROSA	81
1.2.1.- Influencia de la densidad superficial de grupos del soporte	82
1.2.2.- Influencia de la Temperatura	83
1.2.3.- Unión de la molécula de Cefalexina a soportes Glutaraldehido-agarosa	84
1.3.- IMPORTANCIA DE LA MORFOLOGÍA DEL SOPORTE EN UNIONES UNI Y MULTIPUNTUALES	86
1.3.1.- Influencia de la morfología del soporte (fibras anchas/fibras finas) en la unión de proteínas a soportes glioxil	86
1.3.2.- Influencia de la morfología del soporte (fibras anchas/fibras finas) en la unión de proteínas a soportes glutaraldehido	88
2.- ADSORCIÓN MULTIPUNTUAL DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS	90
2.1.- EFECTOS DE LA ADSORCIÓN DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS	91
2.2.- ADSORCIÓN A SOPORTES CON DISTINTA MORFOLOGÍA Y DIFERENTE GRADO DE HIDROFOBICIDAD	92
2.2.1.- Velocidad de unión lipasa-soporte	93

CONCLUSIONES	98
III.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A QUELATOS METÁLICOS	100
INTRODUCCIÓN	101
1.- CROMATOGRAFÍA DE PROTEÍNAS NATIVAS SOBRE QUELATOS METÁLICOS	101
2.- PROTEÍNAS DE FUSIÓN	102
3.- GELES DE AGAROSA COMO SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD SOBRE QUELATOS METÁLICOS	105
4.- CROMATOGRAFÍA DE PROTEÍNAS NATIVAS, PROTEÍNAS DE FUSIÓN MONOMÉRICAS Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN MULTIMÉRICAS	106
OBJETIVOS	108
PARTE EXPERIMENTAL	110
1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES	110
1.1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA-QUELATO METÁLICO	110
1.1.1.- Preparación de soporte agarosa-epóxido	111
1.1.2.- Preparación de soporte agarosa-quelato	111
2.- APLICACIÓN DE LOS SOPORTES DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A	111
PROCESOS DE PURIFICACIÓN	
2.1.- EXTRACTOS PROTEICOS	111
2.2.- PROTEÍNAS FUSIONADAS	112
3.- D-AMINOÁCIDO OXIDASA <i>Trigonopsis variabilis</i>	113
3.1.- ENSAYO ENZIMÁTICO	113
3.2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE DETERMINADOS CATIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA DAO Y DAO FUSIONADA	114
4.- ELECTROFORESIS	115
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
1.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS POR ADSORCIÓN SELECTIVA	116
1.1.- OPTIMIZACIÓN DE SOPORTES Y CONDICIONES PARA LA ADSORCIÓN SELECTIVA	116

2.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS	122
2.1.- GLUTARIL ACILASA FUSIONADA	118
2.2.- PURIFICACIÓN DE DAO FUSIONADA <i>Trigonopsis variabilis</i>	128
2.2.1.- Fortaleza de unión: Inmovilización	129
2.2.2.- Estudio de las variables que afectan a la fuerza de unión de la DAO	132
2.2.3.- Influencia de la presencia de distintos cationes (0,5mM) en la actividad de DAO T. soluble y DAO T. Fusionada soluble	138
CONCLUSIONES	141
IV.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A PROTEÍNA A	143
INTRODUCCIÓN	144
1.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	144
2.- CROMATOGRAFÍA INMOVILIZADA-PROTEÍNA LIGANDO	145
3.- GELES DE AGAROSA COMO SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA PROTEÍNA- PROTEÍNA	146
4.- LA PROTEÍNA A: UN RECEPTOR Fc DE ANTICUERPOS	149
OBJETIVOS	153
PARTE EXPERIMENTAL	155
1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES	160
1.1.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA CON GLICIDOL	155
1.2.- OBTENCIÓN DE SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA DE 45µmoles/ml gel	155
1.3.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE RESINA TOYOPEARL: PREPARACIÓN DE SOPORTE GLIOXIL-TOYOPEARL	155
1.4.- PREPARACIÓN DE SOPORTES AGAROSA-DEXTRANO	155
2.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE PROTEÍNA A	159
2.1.- UNIÓN DE PROTEÍNA A DIRECTAMENTE AL SOPORTE	159
2.1.1.- Derivados orientados por N-terminal	159
2.1.2.- Derivados orientados por la zona más rica en lisinas	160
2.2.- UNIÓN DE LA PROTEÍNA A A TRAVÉS DE "BRAZOS ESPACIADORES"	160

3.- UNIÓN DE IgG _H A DERIVADOS DE PROTEÍNA A	161
4.- INFLUENCIA DE LA ORIENTACIÓN/DISTORSIÓN DE LOS DISTINTOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A EN LA ELUCIÓN DE ANTICUERPOS	161
5.- DERIVADOS DE PROTEÍNA A ORIENTADOS POR LA ZONA MÁS RICA EN LISINAS: INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE UREA EN LA ELUCIÓN DE IgG	162
6.- DERIVADOS DE PROTEÍNA A ORIENTADOS POR EL N-TERMINAL: EFECTO DE LA PRESENCIA DE UREA EN EL PROCESO DE ELUCIÓN	162
7.- PREPARACIÓN DE DERIVADO DE PROTEÍNA A UNIDA A SOPORTES DE AGAROSA (comerciales) ACTIVADOS CON CNBr	163
8.- ESTABILIDAD QUÍMICA DE LOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A	163
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	164
1.- MODULACIÓN DE LA ORIENTACIÓN RELATIVA DE LA PROTEÍNA SOBRE EL SOPORTE	164
2.- IMPEDIMENTOS ESTÉRICOS OCASIONADOS POR LA MORFOLOGÍA DE LA AGAROSA	166
3.- UTILIZACIÓN DE DEXTRANO COMO AGENTE ESPACIADOR	169
4.- INFLUENCIA DE LA DISTORSIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE ANTICUERPOS	171
4.1.- INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA A ORIENTADA POR LOS GRUPOS ε-AMINO SUPERFICIALES (Lys)	171
4.2.- INMOVILIZACIÓN A TRAVÉS DE GRUPOS AMINO DE BAJO pK (N-TERMINAL)	172
5.- DISTORSIÓN DE LA PROTEÍNA A POR UNIÓN MULTIPUNTUAL AL SOPORTE: INFLUENCIA EN LA FORTALEZA DE UNIÓN PROTEÍNA A-ANTICUERPO	173
6.- ESTABILIDAD QUÍMICA DE LOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A	179
CONCLUSIONES	181
CONCLUSIONES GENERALES	184
PRODUCTOS COMERCIALES	190

ABREVIATURAS

DAO	D-aminoácido oxidasa
DAO.T	D-aminoácido oxidasa de <i>Trigonopsis variabilis</i>
GA	Glutaril Acilasa
TMAB	Trimetilamino borano
EPI	Epiclorhidrina
BDGE	1,4-Butanodiol diglicidil éter
PGA	Penicilina G acilasa
MANA	Monoaminoetil-N-aminoetil
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
pNPP	p-nitrofenil propionato
GLUT	Soporte activado con Glutaraldehido
TOYO	Toyopearl
SDS	Dodecil sulfato sódico
BIO	Biosynth
PA	Proteína A
CL	Entrecruzada
NIPAB	Ácido 6-nitro-3-(fenilacetamido)-benzoico
EPI-x-IDA -Me	Soporte activado con Epiclorhidrina con x μmoles de quelatos metálicos/ ml gel
BDGE-x-IDA-Me	Soporte activado con 1,4-Butanodiol diglicidil éter con x μmoles de quelatos metálicos/ml gel
BIO-x-IDA-Me	Soporte Biosynth con x μmoles de quelatos metálicos/ml soporte

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

1.1.- USO DE ENZIMAS EN PROCESOS INDUSTRIALES

Las enzimas son estructuras proteicas que catalizan reacciones biológicas. Las propiedades intrínsecas de estas estructuras son:

- Gran eficiencia catalítica en condiciones suaves de reacción: siendo suficiente con pequeñas cantidades de enzima para catalizar la reacción.
- Alta selectividad: las enzimas son quimo y regioselectivos.
- Gran especificidad frente al sustrato, siendo extraordinariamente útiles en la obtención de compuestos ópticamente puros.

Por esto, podemos considerar a las enzimas como catalizadores ideales para procesos en los que intervengan compuestos muy complejos y lábiles que requieran condiciones suaves de reacción. Esto se manifiesta en el amplio espectro de aplicaciones potenciales de las enzimas (Edwards, V.H. 1972; Wong C.H, 1989): industrialmente, para síntesis o modificación de antibióticos, hormonas, vitaminas, aminoácidos, en la producción de edulcorantes, quesos, estabilización de alimentos; en el campo de la medicina en el tratamiento de algunos cánceres, defectos hereditarios de enzimas, etc.

1.2.- IMPORTANCIA DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

A pesar del gran campo de aplicación de las enzimas, su implantación como catalizadores en procesos químicos a gran escala se ha visto condicionada por el difícil control de los procesos de catálisis homogénea: el alto coste del extracto enzimático, la pérdida de actividad durante las reacciones, la contaminación del producto final por la presencia del catalizador en solución, la dificultad de su eliminación de la mezcla de reacción y la imposibilidad de su reutilización. Todos estos inconvenientes son debidos a que trabajamos con catalizadores lábiles y solubles en el medio de reacción, en reacciones prolongadas.

Como respuesta a estos problemas, en los años 60 comienzan a desarrollarse las técnicas de Inmovilización de enzimas. El confinamiento o localización de las moléculas de enzima en un cierto espacio definido y limitado, de forma que retengan su actividad catalítica y que permitan su uso repetido, se recoge bajo el nombre de técnicas de inmovilización. Las numerosas técnicas de inmovilización desarrolladas (atrapamiento, adsorción, encapsulación, entrecruzamiento, copolimerización, etc.) (Royer, 1980; Bullock, 1989, White, C.A. y col. 1980), aportan solución para la recuperación de las enzimas y su posterior reutilización pero no al problema de la estabilización, siendo en este caso, la estabilización de los derivados enzimáticos mínima o prácticamente nula.

1.3.- ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN

Las enzimas son proteínas con escasa estabilidad, por consiguiente, únicamente mantienen su conformación y actividad en un limitado rango de condiciones experimentales, y en segundo lugar, las enzimas son catalizadores homogéneos, por tanto se disuelven impidiendo su recuperación y reutilización.

Como acabamos de mencionar, cualquier técnica de inmovilización soluciona el problema de la recuperación y reutilización. Sin embargo, lo ideal es emplear un método de inmovilización que solucione también el primero de los problemas, la estabilidad (ya que no siempre se trabajará con enzimas muy estables, sino que es posible que las enzimas que utilizemos necesiten de procesos de inmovilización-estabilización). Un óptimo sistema de inmovilización-estabilización será el que posibilite una intensa unión multipuntual enzima-soporte, sin provocar distorsiones graves de la estructura enzimática. Así, las moléculas enzimáticas "más rígidas" son más resistentes frente a diversos agentes desnaturizantes que provocan la inactivación por desplegamientos de la estructura proteica.

1.4.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD

El gran número de proteínas presentes en un extracto enzimático impuro, la diversidad de sus funciones biológicas así como las diferencias químicas entre ellas, determinan que la purificación de la proteína de interés constituya una etapa fundamental

en toda investigación biotecnológica. La purificación de enzimas constituye una herramienta importante en la preparación de buenos derivados enzimáticos.

Al inmovilizar soluciones enzimáticas con un alto grado de pureza evitamos que los grupos reactivos de la superficie del soporte se involucren con otras proteínas, pudiendo así:

- Obtener derivados con mayor carga enzimática
- Y evitar reacciones laterales catalizadas por otras enzimas

La Cromatografía de Afinidad es una importante Técnica de purificación, obteniéndose de forma fácil y rápida proteínas con un alto grado de pureza.

El soporte puede presentar afinidad por la proteína a purificar, a través de un ligando:

- **Pequeño:** Es preciso que no existan interacciones no deseadas de otras proteínas y que el soporte solo presente reactividad a través de los ligandos introducidos en procesos de activación y derivatización. En el capítulo III se abordará la purificación proteínas fusionadas a soportes agarosa-quelato (donde el grupo quelato sería el ligando pequeño) por adsorción selectiva. De manera que un buen control del número de ligandos introducidos en el soporte podría permitir la adsorción selectiva de la proteína de interés.
- **Macromolecular:** es posible que el soporte pueda ejercer impedimentos estéricos limitando el acceso de la molécula a purificar. El empleo de brazos espaciadores entre ligandos y soporte se desarrolló principalmente en Cromatografía de Afinidad para lograr que el ligando inmovilizado pudiese interactuar con el centro de reconocimiento de las proteínas, situado generalmente en una cavidad, más o menos expuesto. En el Capítulo IV se ha escogido como modelo el sistema Proteína A (ligando macromolecular)/anticuerpo. La fuerte energía de unión anticuerpo-soporte de afinidad hace que sea necesario emplear desorciones drásticas que podrían afectar a la proteína o al anticuerpo. En este caso, lo ideal sería lograr estrategias de inmovilización que estabilicen la Proteína A a la vez que debiliten algo la interacción Proteína A-Anticuerpo con el fin de lograr desorciones más suaves de este.

2.- SOPORTES

Para la elección del soporte más adecuado para procesos de inmovilización y estabilización de enzimas, es fundamental el análisis de sus propiedades físicas (resistencia mecánica, porosidad, morfología interna, etc.) y químicas (grupos susceptibles de ser activados, presencia de grupos que puedan dar lugar a interacciones inespecíficas, etc.). A continuación se estudiarán algunas características físicas de los mismos pasando seguidamente a tratar la activación.

2.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS SOPORTES

2.1.1.- POROSIDAD

Los soportes se pueden clasificar en porosos y no porosos.

- **SOPORTES NO POROSOS**

El área superficial de estos soportes es extremadamente baja, estando muy limitada para la inmovilización de proteína.

- **SOPORTES POROSOS**

Estos soportes pueden presentar un gran área superficial por unidad de volumen permitiendo obtener derivados muy cargados ideales para procesos industriales. Por otro lado, estos soportes deben permitir un fácil acceso de las proteínas con el fin de minimizar los problemas difusionales.

Como se observa en la tabla 1: a medida que el tamaño de poro es mayor la superficie interna que presentan para la inmovilización es menor.

Tabla 1: Relación entre el tamaño de poro del soporte y su superficie interna.

TAMAÑO DE PORO (nm)	SUPERFICIE INTERNA ^a (m ² /g)
7,5	356
12,5	214
17,5	153
37	72
70	38
125	21
200	13

^a Volumen de poro: 1,0 cm³/g

Es importante tener un amplio rango de tamaño de poro ya que para cada proteína, el soporte ideal es aquel que presente la mayor superficie posible para la inmovilización a la vez que el tamaño de poro sea suficiente para que no presente problemas el acceso de la proteína al interior del poro.

Los soportes porosos con morfología interna tipo superficie, serán los más adecuados para la estabilización de enzimas pues permitirán un mayor acoplamiento enzima-soporte. En todos los procesos de inmovilización, lo deseable es disponer de la máxima área superficial, pudiendo así inmovilizar una mayor cantidad de enzima, para lograr de esta forma derivados enzimáticos con una elevada actividad enzimática/ml de soporte con lo que se reduce el volumen de catalizador.

2.1.2.- PROPIEDADES MECÁNICAS Y RIGIDEZ

Las propiedades mecánicas del soporte están en función del empleo que se le vaya a dar al mismo.

En Cromatografía de proteínas los flujos empleados no son demasiado altos con lo que la resistencia mecánica no es un factor muy decisivo.

En procesos de Inmovilización: dependiendo del reactor empleado las propiedades mecánicas requeridas serían diferentes. Si, por ejemplo, se trata de un reactor de lecho fijo el soporte ha de ser muy resistente. Pero si empleamos reactores tipo tanque agitado no se necesitan soportes tan resistentes

2.1.3.- MORFOLOGÍA INTERNA

En la unión proteína-soporte un factor a considerar es la morfología interna del soporte. Cuando el soporte está constituido por un entramado o red tridimensional de cadenas moleculares químicamente unidas por entrecruzamientos (sephadex, polímeros sintéticos como eupergit, toyopearl, etc.) el acoplamiento será proteína-cadena molecular.

En el caso de los sólidos porosos, su estructura interna está constituida por espacios huecos rodeados de superficies (geles de agarosa, sílica, alúmina etc.) permitiendo una intensa congruencia geométrica proteína-soporte.

2.2.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES

2.2.1.- NECESIDAD DE ACTIVACIÓN

Para obtener grupos reactivos en el soporte capaces de interactuar con aminoácidos de proteínas es preciso realizar una activación previa. Un control exhaustivo de la reacción puede proporcionarnos soportes con distinta carga de grupos reactivos, lo que permitirá un mayor control de procesos de purificación de proteínas. Por otra parte, los grupos introducidos en el soporte pueden ser más o menos estables. Esto, si bien puede no tener excesiva importancia a escala de laboratorio, cuando la utilización y preparación está próxima; es de gran importancia en procesos realizados a escala industrial en los que pueden transcurrir largos periodos de tiempo desde su preparación hasta su utilización.

2.2.2.- INMOVILIZACIÓN DE LIGANDOS Y PROTEÍNAS

A continuación de la etapa de activación del soporte tiene lugar el proceso de inmovilización.

- **Inmovilización de proteínas:** las proteínas son estables en un limitado rango de condiciones, por lo que para la inmovilización de proteínas es preciso emplear soportes con grupos muy reactivos en condiciones suaves.
- **Inmovilización de ligandos:** la reactividad del soporte no es un factor tan decisivo en este caso, ya que la reacción de inmovilización puede tener lugar en condiciones drásticas. Podemos inmovilizar en presencia de un exceso de ligando (barato) y empleando tiempos largos de reacción para lo cual si que se requiere que los grupos del soporte sean estables. De esta forma se podría controlar el grado de modificación del soporte al reaccionar con el ligando.

2.3.- BLOQUEO DE GRUPOS

Cuando ha tenido lugar la inmovilización, es posible que no todos los grupos reactivos del soporte estén involucrados en la unión del ligando o proteína. De manera que si la estabilidad de estos grupos es alta, con el tiempo podrían darse interacciones molécula-soporte no controladas. En el caso de las proteínas sería un grave problema ya que podría ocasionar fenómenos de distorsión de la proteína. Por este motivo, cuando los grupos reactivos del soporte son muy estables es preciso realizar una etapa de bloqueo (por adición de ligandos pequeños) posterior a la inmovilización u otro mecanismo que inactive estos grupos sin alterar a la proteína.

Cuando los grupos del soporte son poco estables, esta etapa no es precisa.

Lo más adecuado para procesos de inmovilización sería emplear soportes inertes con un grado de activación controlada y con grupos muy estables que tras finalizar la reacción dieran grupos totalmente inertes.

3.- AGAROSA COMO SOPORTE PARA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS

3.1.- PROPIEDADES DE LA AGAROSA

En 1937, Araki consideraba a la agarosa como una molécula neutra, formada por residuos de D-galactopiranosas conectados por C₁-C₃ repetidos alternativamente con residuos de L-galactopiranosas conectadas por C₁-C₄ (Araki, C.1956). Sin embargo,

posteriormente Hirase observó que la agarosa era un polímero de la agarobiosa (Hirase, S. y col. 1968). Y en 1971 (Duckwort, M. y col. 1971), la detección de pequeñas cantidades de grupos electronegativos (sulfatos y piruvatos) llevó a definir a la agarosa como *“una mezcla de moléculas de agar con un contenido en carga más bajo y, por ello, mayor capacidad de gelificación, fraccionadas de un complejo de moléculas llamadas agar”*. Recientemente, Lahaye y Rochas (Lahaye, M. y col. 1991) definieron el agar como *“nombre genérico dado para un continuo de moléculas relacionadas con la agarobiosa como unidad repetitiva”, y “la agarosa como la molécula menos sustituida del agar”*.

Entre las propiedades podemos destacar (Armisen, R. 1992):

- 1.- Muy bajo contenido de grupos electronegativos (fundamentalmente sulfatos y ácido pirúvico) resultando un polisacárido bastante inerte y adecuado para técnicas cromatográficas.
- 2.- Fácil disolución acuosa.
- 3.- Estructura macroporosa, en la que es posible variar el tamaño de poro, por simple cambio de la concentración.
- 4.- Excelente transparencia óptica, tanto en las regiones del espectro visible como del ultravioleta, que permite una mejor cuantificación por técnicas espectrofotométricas.
- 5.- Fácil activación y derivatización de los soportes.
- 6.- Ausencia de toxicidad.

Las características que se acaban de mencionar son características generales de la agarosa, sin embargo lo novedoso de este trabajo se va a centrar en las ventajas e inconvenientes de la agarosa derivados de otra característica de dicho soporte (la morfología).

- **Morfología de la Agarosa**

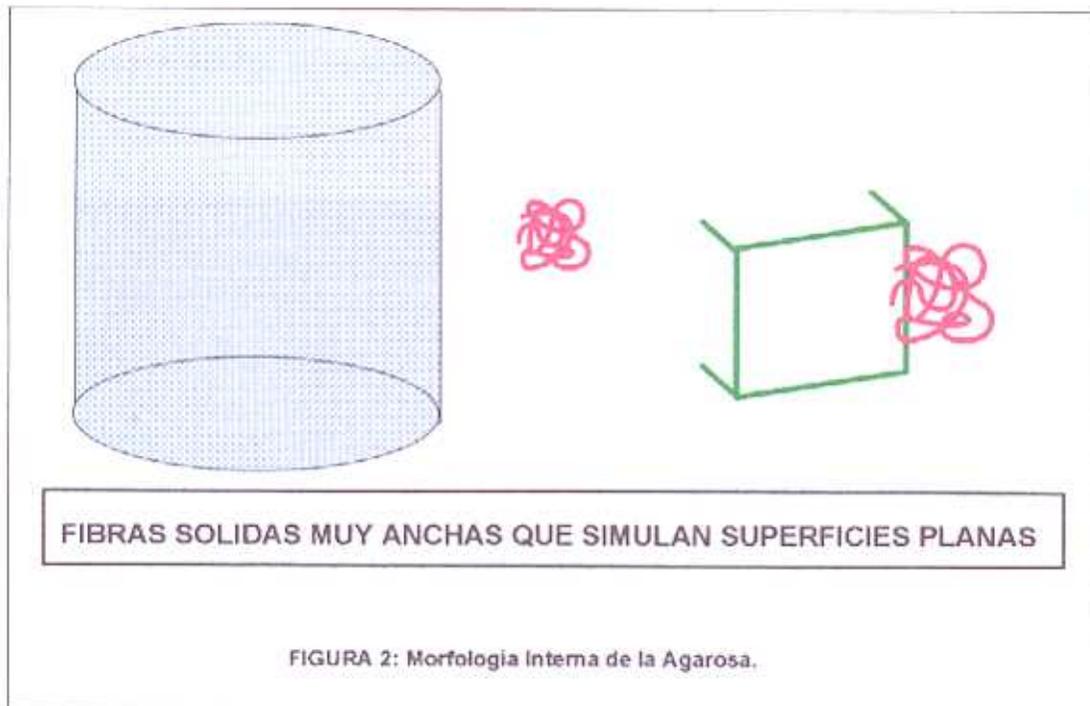
Por microscopía electrónica es posible ver como estos polisacáridos dan lugar a una estructura macroporosa constituida por fibras de agarosa (Figura 1). En esta estructura

a modo de esponja, es posible distinguir poros de distinto tamaño (Medín, A.S. 1995), pudiendo variar el tamaño de estos poros con la concentración de agarosa empleada.



FIGURA 1: Microscopía electrónica de la agarosa.

Un dato importante, es el gran tamaño de estas fibras (diámetro:200 Å) frente al tamaño de la proteína a purificar o inmovilizar, de manera que las fibras semejan una superficie-plana (depende del tamaño de la proteína) contra la que interaccionan las proteínas. Esta morfología posibilitaría un buen acoplamiento proteína-soporte favoreciendo la interacción multipuntual (figura 2).



Las propiedades de la agarosa hacen de esta un soporte ideal para procesos de Cromatografía (soporte inerte, no da interacciones adicionales). Sin embargo, este soporte debido a su alto coste no se emplea tanto en procesos de inmovilización y sólo en el caso de que gracias a la morfología tipo superficie plana de la agarosa, la inmovilización se acoplase a la estabilización, presentaría muchas ventajas que potenciarían su empleo frente a otros más baratos.

3.2.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA: GLIOXIL/EPÓXIDO

La activación de geles de agarosa con Epíclorhidrina (el mismo reactivo empleado en el entrecruzamiento), podría dar lugar a:

- **Grupos Glioxil:** Son grupos muy estables (en un amplio rango de condiciones) que reaccionan con aminas primarias, (muy frecuentes en proteínas), por lo que, en principio podrían ser útiles para procesos de inmovilización de proteínas.
- **Grupos Epóxido:** Son grupos muy estables que presentan una gran versatilidad en la unión ya que pueden unirse a grupos -OH, -NH₂, -SH. Para ello, es preciso que los alcoholes se encuentren ionizados, las aminas sin protonar y los grupos -SH como tioles; por lo que se necesita forzar las condiciones para la reacción. El empleo de condiciones drásticas podría ser un problema grave en procesos de inmovilización de proteínas, sin embargo en el caso de inmovilización de ligandos parece que estos grupos serían adecuados.

•

3.3.- UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL

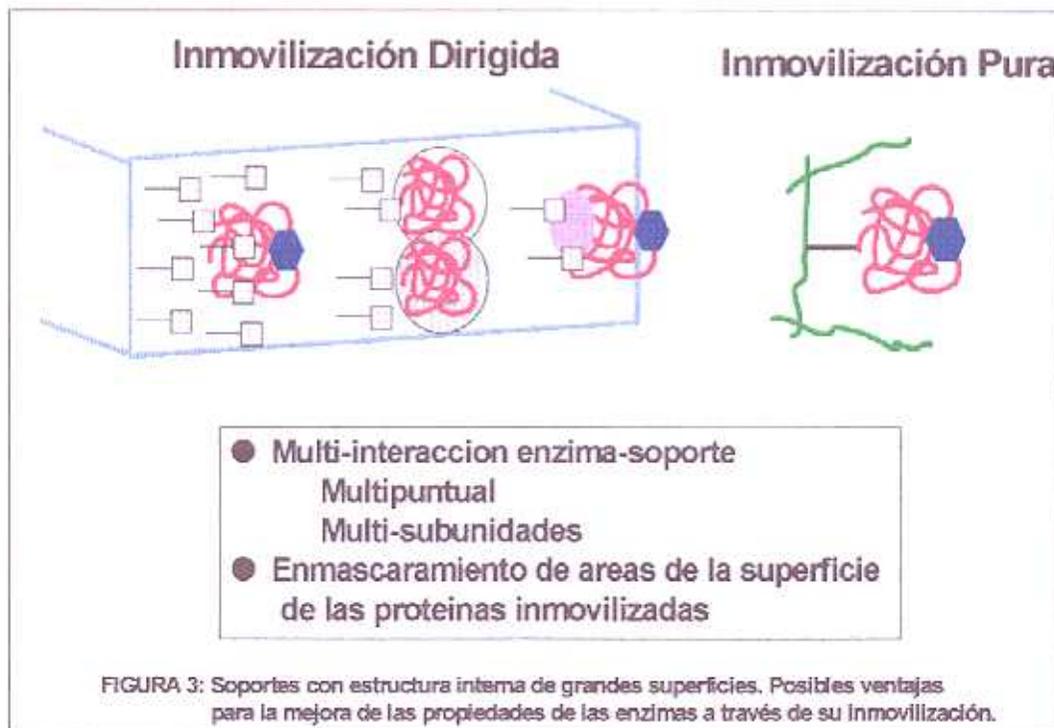
La inmovilización irreversible de enzimas por formación de enlaces covalentes (Leckband, D. y col. 1990) con el soporte supone grandes ventajas a la hora de utilizar catalizadores estables. Si además, el proceso permite la formación de numerosos enlaces entre cada molécula de enzima y el soporte con el que se une (multiinteracción) las posibles distorsiones provocadas por el medio se verán limitadas.

La morfología del soporte podría jugar un papel importante en el efecto estabilizador. La agarosa, derivatizada con grupos adecuados, dada su morfología tipo superficie plana presentaría una buena congruencia geométrica con la proteína. Esto podría ser un factor clave a la hora de estabilizar la proteína por inmovilización por unión covalente multipuntual.

3.4.- INMOVILIZACIÓN ORIENTADA

- Una de las ventajas que presenta la agarosa gracias a su morfología interna, es el poder realizar protocolos de inmovilizaciones dirigidas que permitan la estabilización de proteínas por multiinteracción con el soporte (Figura 3). La inactivación de enzimas suele empezar con pequeños desplegamientos reversibles de la estructura proteica, a los que les sigue la inactivación irreversible. Si se trata de enzimas multiméricas; la

disociación de subunidades es el primer paso (Porter, J.E. y col. 1992) en el proceso de inactivación. El estudio de gran número de proteínas oligoméricas, sitúa al centro activo en la interfase entre las distintas cadenas polipeptídicas y que la función catalítica requiere la participación conjunta de los residuos de aminoácidos de cada monómero (Eisenstein, E. y col. 1989). Por lo que, para la mayoría de las enzimas multiméricas, los monómeros son inactivos aunque conserven intacta su estructura tridimensional (Ziegler, M.M. y col. 1993). La inmovilización orientada de enzimas multiméricas por unión del máximo número de subunidades está favorecida en la agarosa (pudiendo desarrollar procesos de estabilización de enzimas multiméricas por unión del máximo número de subunidades al soporte (Guisán, J.M. y col. 1993) (Figura 3).



- Las proteínas son susceptibles de sufrir cambios por reacción con gran número de agentes químicos. Estos efectos, pueden ser la causa que limite la utilización de una enzima a nivel industrial, especialmente cuando el agente químico se encuentra en la reacción que cataliza este enzima. Esto ocurre, por ejemplo, en la modificación química que produce el H_2O_2 liberado en la reacción que catalizan las D-aminoácido oxidasas. Otra de las ventajas derivadas de la morfología de la agarosa es la posibilidad de realizar inmobilizaciones orientadas que permitan ocultar la zona sensible a un determinado agente (Rodríguez, V. 1995) (Figura 3).

3.5.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LIPASAS

Las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos con formación de ácidos grasos y glicerol. Su centro activo se encuentra cerrado por una cadena proteica en α -hélice sumamente hidrofóbica que actúa como tapadera ("lid"). En medio acuoso homogéneo, la enzima se encuentra en equilibrio (tapadera abierta/tapadera cerrada), estando el equilibrio muy desplazado hacia la forma abierta (Malcata, F.X. y col. 1992; Mingarro, Y. y col. 1995). Sin embargo, si las lipasas se encuentran con una interfase lípido-medio acuoso, el equilibrio se desplaza hacia la forma abierta de la lipasa (Sarda, L. y col. 1958). Se pretende encontrar sólidos hidrofóbicos que simulen la interfase lípido-medio acuoso provocando la adsorción interfacial de la lipasa mediante un mecanismo de apertura de la tapadera.

3.6.- CROMATOGRAFÍA DE QUELATOS METÁLICOS

La purificación de proteínas por Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos tiene lugar por la interacción entre grupos quelato (ligandos pequeños previamente generados en el soporte) y pares de His, Cys, Trp (de las proteínas a purificar). En la actualidad está cobrando mucho interés la fusión de proteínas con colas de 4 ó 6 histidinas, de manera que las proteínas fusionadas poseen una gran afinidad por los soportes quelato. La fortaleza de unión proteína fusionada-soporte es muy grande por lo que se necesitan

condiciones drásticas para la desorción . Sería de gran utilidad caracterizar soportes de afinidad en los que la proteína fusionada pudiera obtenerse purificada mediante un fácil proceso de adsorción/desorción selectiva. La reducción del volumen de la columna necesario para obtener una determinada cantidad de proteína purificada disminuiría notablemente y una vez purificada, la proteína fusionada podría emplearse industrialmente. Si la proteína se requiere para terapéutica es necesario intercalar una determinada secuencia de aminoácidos entre la cola de His y la proteína, dicha cola se eliminaría con proteasas tras la purificación.

Los métodos de purificación convencionales, están basados en la adsorción (no selectiva) de todas las proteínas que muestren afinidad por el soporte, de forma que la proteína de interés pueda ser una proteína minoritaria del extracto. En los protocolos de purificación por adsorción selectiva, la proteína de interés es la que se une de forma selectiva al soporte, pudiéndose cargar toda la columna con ella. De esta forma, para la obtención de una misma cantidad de proteína pura, el tamaño de las columnas se reduce enormemente frente a las purificaciones convencionales. Asimismo, es posible obtener de forma rápida y sencilla la proteína de interés.

3.7.- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CON PROTEÍNA A

Para tratar el problema de Cromatografía de Afinidad de una biomolécula hacia un ligando macromolecular del soporte se ha escogido el sistema Proteína A/anticuerpo. La Proteína A es un receptor Fc que presenta afinidad por diversos tipos de anticuerpos con lo que las columnas de Proteína A son muy empleadas en procesos de purificación de anticuerpos. Dicho receptor presenta cuatro zonas de alta afinidad hacia anticuerpos (macromoléculas) por lo que la disposición espacial de dichas zonas podría ser decisiva a la hora obtener una buena capacidad de unión a nivel molecular Proteína A/anticuerpo. Por este motivo una buena inmovilización orientada de la proteína proporcionaría una mayor capacidad de unión de anticuerpo.

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es la mejora de las excelentes posibilidades de los geles de agarosa como soportes para inmovilización de enzimas y cromatografía de proteínas teniendo en cuenta su morfología interna desde el punto de vista de utilizar sus ventajas adicionales y desde el punto de vista de reducir sus limitaciones. Los geles de agarosa están constituidos por fibras muy gruesas (200 Å de diámetro) que para la mayoría de las enzimas y proteínas semejan superficies planas con las que interaccionan.

De acuerdo con su estructura y su morfología, los geles de agarosa podemos formular cuatro presiones iniciales:

a.- su estructura inerte e hidrofílica y la existencia de hidroxilos primarios fácilmente activables permiten controlar muy bien las interacciones enzima - agarosa mediante el control del grado de activación de los geles sin la existencia de ninguna interacción inespecífica enzima soporte.

b.- la morfología de fibras muy gruesas los puede hacer especialmente útiles cuando queremos forzar el grado de multi-interacción proteína - soporte.

c.- esta morfología puede originar problemas especialmente importantes cuando queramos minimizar las interacciones multipuntuales enzima soporte.

d.- esta morfología puede originar problemas importantes cuando inmovilicemos enzimas y proteínas que deben actuar sobre substratos macromoleculares ya que la proximidad de la superficie del soporte y la zona de reconocimiento proteína-proteína

puede provocar importantes impedimentos estéricos para que esta interacción entre dos proteínas pueda tener lugar.

A partir de este planteamiento podemos establecer la hipótesis inicial en la cual se basa el presente trabajo de Tesis Doctoral:

El desarrollo de nuevos métodos de activación de agarosa y de nuevos protocolos de inmovilización de ligandos y proteínas nos podría permitir explotar al máximo todas las posibilidades de los geles de agarosa como soportes para inmovilización de enzimas y proteínas. Así preparando geles activados con diferentes grupos funcionales, diferente grado de activación y diferentes brazos espaciadores podremos :

- a.- aprovechar las ventajas de su estructura hidrofílica e inerte
- b.- aprovechar todas las ventajas adicionales de la morfología de los geles de agarosa (interacciones multipuntuales enzima-soporte deseadas)
- c.- disminuir o eliminar todos los inconvenientes promovidos por esta morfología (impedimentos estéricos e interacciones multipuntuales indeseadas).

Para evaluar esta hipótesis hemos dividido este objetivo general en diferentes sub-objetivos que constituyen los diferentes capítulos de este trabajo:

- a.- Puesta a punto de métodos mas controlados de activación de agarosa con epíclorhidrina en medio acuoso que nos permitan obtener geles agarosa-epóxido y agarosa aldehído con grados de activación muy controlados. De este modo, no se es preciso secar los geles de agarosa con disolventes anhidros y además el proceso de activación se puede acoplar fácilmente la activación con el proceso ya desarrollado actualmente a nivel industrial de entrecruzamiento con de agarosa con epíclorhidrina para mejorar sus propiedades mecánicas y estructurales (eliminación de sulfatos y carboxilos superficiales). Los soportes agarosa-aldehído con un brazo espaciador muy pequeño podrían ser muy

útiles para la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual a través de residuos amino primario. Los soportes agarosa epóxido podrían ser muy útiles para inmovilizar una gran variedad de ligandos conteniendo grupos amino primario o secundario, grupos hidroxilo y grupos sulfhidrilo.

b.- Optimización de enzimas interacción multipuntual sobre soportes agarosa altamente activados. En este capítulo intentamos explotar al máximo las posibilidades que la morfología interna de los geles de agarosa nos ofrece para lograr intensas interacciones multipuntuales enzima soporte. Estudiaremos la inmovilización covalente de enzimas sobre soportes aldehído-agarosa con objeto de mejorar su estabilidad por inmovilización covalente multipuntual. También estudiaremos la posibilidad de inmovilizar lipasas por adsorción no covalente multipuntual sobre soportes agarosa muy hidrofóbicos. De ese modo pretendemos que las lipasas se adsorban a la superficie de los geles de agarosa como si estos fuesen interfases hidrofóbicas hacia las que estas enzimas tienen una alta afinidad.

c.- Purificación de proteínas de fusión con poli-histidina por adsorción selectiva sobre quelatos metálicos. En este caso las proteínas de fusión pueden tener una adsorción unipuntual muy fuerte sobre soportes de agarosa activados sobre quelatos metálicos. Sin embargo las proteínas nativas también pueden interaccionar sobre estos soportes. En este capítulo pretendemos diseñar activaciones (a partir de geles epóxido-agarosa) y cromatografías "a medida" con objeto de reducir al máximo la interacción de las proteínas nativas sin modificar la adsorción de las proteínas de fusión. También abordamos el estudio de proteínas diméricas de fusión donde la presencia de dos dominios puede promover importantes problemas a la hora de desorber la enzima pura adsorbida sobre quelatos metálicos.

d.- Purificación de Inmunoglobulinas por Cromatografía sobre proteína A-agarosa. En este capítulo abordamos un doble objetivo:

i.- la reducción de impedimentos estéricos promovidos por la superficie de los geles de agarosa que reduzcan la capacidad de la proteína A inmovilizada para adsorber un ligando de peso molecular tan elevado. Para ello utilizamos los geles aldehído agarosa que utilizados en diferentes condiciones pueden promover diferentes orientaciones de la proteína A sobre el soporte. Por otro lado también desarrollamos un nuevo método de activación de agarosa con dextranos con objeto de obtener brazos espaciadores muy largos, inertes e hidrofílicos de modo que los soportes agarosa-dextrano pudiesen ser otra alternativa para reducir los impedimentos estéricos en estas cromatografías tan complejas proteína-proteína.

ii.- provocar inmovilizaciones covalentes multipuntuales controladas de la proteína A para que al mismo tiempo que se establece y conserve su capacidad de adsorción de anticuerpo también sufra ciertas distorsiones y de este modo se reduzca la intensidad de la adsorción proteína A - inmunoglobulinas. De este modo los anticuerpos purificados se puedan desorber de la columna en condiciones experimentales mucho más suaves (p.e. pHs menos ácidos).

**I.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA
CON EPICLORHIDRINA**

INTRODUCCIÓN

1.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES PARA INMOVILIZAR LIGANDOS Y PROTEÍNAS.

Para inmovilizar ligandos o proteínas a soportes, es necesario establecer un paso previo de activación de dicho soporte. En este paso, el soporte inerte que contiene grupos hidroxilo o amino, se hace reaccionar con reactivos químicos capaces de interactuar con proteínas o con ligandos de bajo peso molecular. Dado que las proteínas tienen una gran variedad de grupos funcionales, se podrían, a priori, diseñar numerosos métodos de activación. Pero, desde un punto de vista más aplicado, el problema es más complejo ya que sobretodo en la inmovilización de proteínas se requieren grupos que sean muy reactivos en condiciones suaves y que sean muy estables para permitir la unión covalente multipuntual. Por otro lado, es conveniente, que los enlaces sean suficientemente estables y que la modificación química de la proteína sea mínima.

Un soporte ideal para la inmovilización de proteínas por unión covalente multipuntual, será aquel que posea grupos reactivos:

- Cercanos al soporte, proporcionando una unión proteína-soporte más rígida.
- Numerosos: permitiéndose así la formación de muchos enlaces.
- Suficientemente reactivos en condiciones suaves ya que una proteína no puede exponerse a condiciones muy drásticas.
- Suficientemente estables para permitir tiempos largos de inmovilización, así como el almacenamiento de los soportes.
- Tras la inmovilización deben ser inertes.

Cuando se trata de inmovilización de ligandos, los requerimientos serían en principio los mismos, si bien podrían emplearse también grupos estables pero de reactividad algo más baja. Ya que en este caso se podrían forzar las condiciones de reacción trabajando en exceso de ligando.

1.1.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA: MÉTODOS MUY VARIADOS

A continuación se comentarán algunos de los métodos de activación más empleados.

1.1.1.- ACTIVACIÓN CON BROMURO DE CIANÓGENO (CNBr)

El CNBr reacciona con los grupos hidroxilo de la superficie del soporte para formar el imidocarbonato cíclico. Este grupo es capaz de reaccionar con grupos amino primario para formar isoureas, imidocarbonatos o carbamatos N-sustituídos (Kohn, J. y col. 1981) (Figura 4).

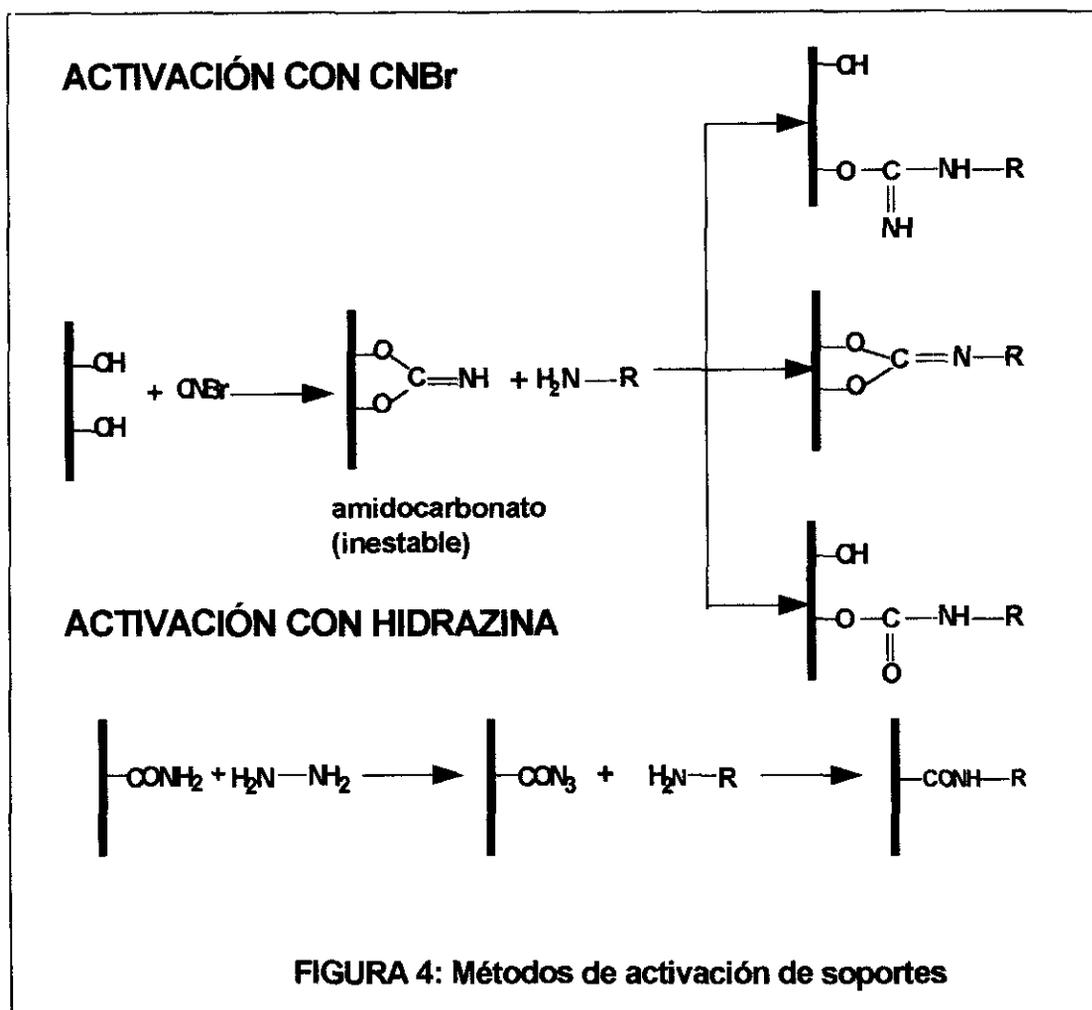
El acoplamiento proteína-soporte activado con CNBr se debe llevar a cabo rápidamente, ya que el grupo activo es inestable. Si bien este soporte es comercialmente disponible y en la actualidad su uso está muy extendido (Weetal, H.H. y col. 1975; Serrano, J. y col. 1987) presenta algunos problemas tales como la toxicidad del reactivo (CNBr) (Kohn, J. y col. 1983) o la posibilidad de adsorciones inespecíficas.

1.1.2.- ACTIVACIÓN CON GLUTARALDEHIDO

Este método se basa en el tratamiento de soportes que contienen grupos amino primarios con glutaraldehido. De manera que el soporte obtenido con grupos aldehido complejos es capaz de reaccionar con grupos amino primario de proteínas (Capítulo II).

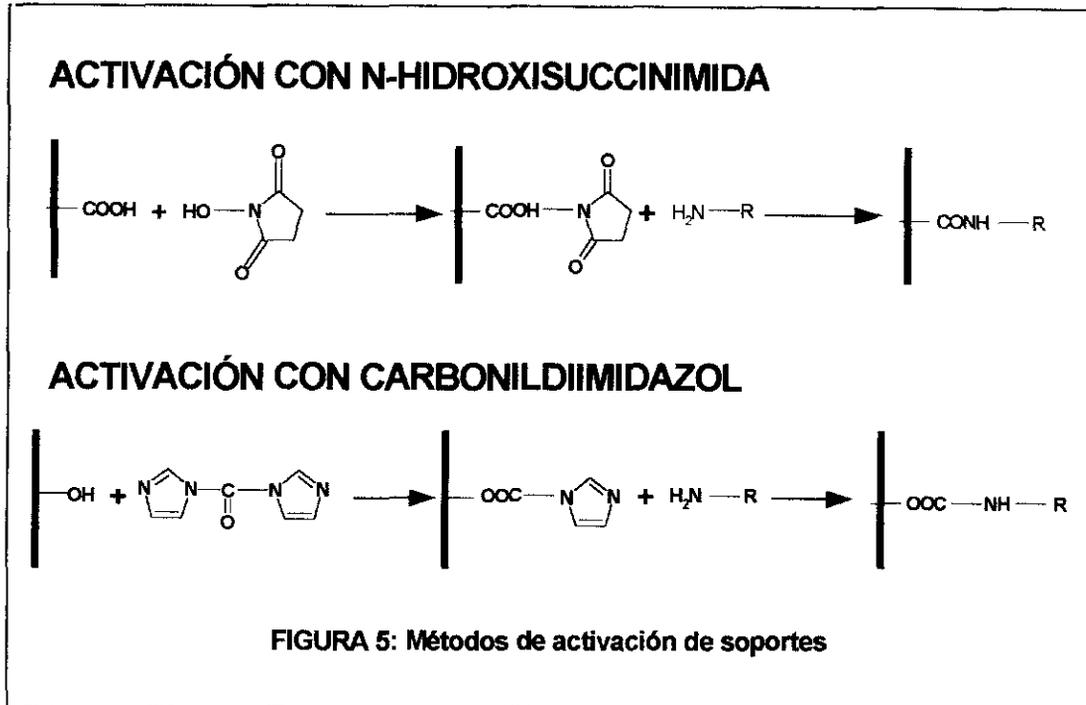
1.1.3.- ACTIVACIÓN CON HIDRAZINAS

Estos soportes son especialmente empleados en procesos de inmovilización dirigida de anticuerpos para purificación o detección de determinados antígenos (Domen, P.L. y col. 1990; Prisyazhnoy, V.S. y col. 1988; Hoffman, W.L. y col. 1988). En este caso, el soporte interacciona con hidroxilos vecinales de azúcares de determinados ligandos, previamente oxidados con periodato (Orthner, C.L. y col. 1991) (Figura 4).



1.1.4.- ACTIVACIÓN CON N-HIDROXISUCCINIMIDA (NHS) Y CARBONILDIIMIDAZOL (CDI).

Ambos son métodos en los que la unión tiene lugar a través de grupos amino primario. NHS es empleado para activar soportes que contienen grupos carboxil, mientras que CDI es usado para activar soportes con grupos hidroxilo (Figura 5).



1.1.5.- ACTIVACIÓN CON DIVINILSULFONA (DVS)

DVS es un reactivo bifuncional empleado como reactivo entrecruzante. El tratamiento de un soporte con grupos hidroxilo con DVS da lugar a un vinilsulfonil etil éter, que reacciona con ligandos que contienen grupos amino, hidroxil o sulfhidril (Lihme, A. y col. 1986).

1.1.6.- ACTIVACIÓN CON CLORURO DE TRESILO

La activación con Cloruro de p-toluensulfonilo (Nilsson, K. y col. 1981; Nilsson, K. y col. 1980) en la actualidad está siendo sustituida por la activación con Cloruro de Tresilo.

Los soportes activados con Cloruro de Tresilo, son capaces de reaccionar con ligandos con grupos amino y sulfhidrido. Sin embargo, estos grupos son bastante inestables.

Estos métodos de activación, en general, proporcionan uniones proteína-soporte rápidas pero inestables, siendo útiles a escala de laboratorio (unión en condiciones suaves). Pero, pueden presentar algunos problemas al ser utilizados en procesos industriales:

- En general, se trata de grupos reactivos muy inestables, esto hace que:
 1. Las interacciones multipuntuales estén desfavorecidas.
 2. Pueda presentar problemas la preparación de derivados muy cargados.
- Además algunos de ellos necesitan modificaciones de la proteína soluble que pueden dar lugar a la inactivación de dicha proteína.

1.1.7.- ACTIVACIÓN CON GLICIDOL

Por activación con glicidol podemos obtener soportes con grupos gliceril que por oxidación con periodato dan lugar a grupos glioxil.

1. Es posible obtener soportes con numerosos grupos glioxil, que a pH 10,0 reaccionarían con los aminos de Lys desprotonados, dando lugar a bases de Schiff.
2. Estos enlaces, son de baja energía, con lo que si la formación de un enlace soporte(glioxil)-proteína(Lys) implica una gran distorsión, no se formará éste enlace. Por este motivo, la distorsión de la proteína provocada por la inmovilización es mínima.
3. La distancia proteína-soporte es muy corta.
4. Son grupos estables, que permiten tiempos largos de inmovilización; pudiendo inmovilizar gran cantidad de proteína por volumen de soporte; así como realizar inmovilizaciones multipuntuales enzima-soporte. La concentración de grupos glioxil de un soporte activado almacenado durante un año a 4°C, permanece constante.
5. La modificación química de la superficie de la enzima es mínima: grupos amino primario que se transforman en secundarios.

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

Por los motivos anteriormente expuestos, los **grupos glioxil** parecen muy adecuados para la inmovilización de proteínas. Esto unido a la buena congruencia geométrica enzima-soporte, en el caso de emplear soportes glioxil-agarosa, haría de estos unos soportes adecuados para la inmovilización de proteínas por unión covalente multipuntual.

1.1.8.- ACTIVACIÓN CON EPIHALOHIDRINAS

Los grupos epóxido generados en esta activación son capaces de reaccionar con aminas, alcoholes y tioles. Pero como se demostrará en el desarrollo de esta tesis, la reactividad de los epóxidos es más baja, necesitando tiempos largos de reacción, grandes excesos de la molécula a unir y condiciones drásticas de unión. Esto podría ser una desventaja a la hora de inmovilizar proteínas a soportes epóxido ya que unas condiciones drásticas en la unión afectarían a la proteína y tampoco sería ventajoso trabajar con excesos de proteína. Sin embargo se podría pensar que los **epóxidos** son adecuados para procesos de **inmovilización de ligandos**, ya que como se ha mencionado, son capaces de reaccionar con distintos grupos y si bien necesitan condiciones drásticas (tiempos largos, excesos de la molécula a unir) esto no presentaría problemas.

2.- ENTRECruzAMIENTO DE GELES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA

El entrecruzamiento es un procedimiento por el cual, mediante la reacción química covalente de las fibras de agarosa con un reactivo bifuncional (a alta temperatura, baja concentración de epiclorhidrina, etc.), se logra obtener soportes con mayor rigidez y resistencia química frente a agentes tales como la urea, guanidina etc., permitiendo así un uso más extendido de los soportes. El reactivo bifuncional empleado es la epiclorhidrina, la cual posee un átomo de cloro y un grupo epóxido, de manera que la interacción de ambos grupos con fibras distintas de la agarosa proporciona un soporte de mayor resistencia mecánica. En la etapa de entrecruzamiento del soporte se generan grupos gliceril (en la agarosa 6BCL son unos 15 $\mu\text{moles/ml}$ gel) resultado de la reacción de la epiclorhidrina por uno solo de sus grupos reactivos.

3.- UTILIZACIÓN DE EPICLORHIDRINA COMO AGENTE ACTIVANTE

En la activación de soportes de agarosa con epiclorhidrina, se da una primera interacción por el átomo de cloro de la epiclorhidrina, dando lugar a soporte agarosa-epóxido. Sin embargo, al estar en un medio básico, se produce, la apertura del epóxido, obteniéndose así grupos gliceril. Es decir, la activación de la agarosa con epiclorhidrina, puede dar lugar a grupos epóxidos (adecuados para inmovilizar ligandos) y gliceril, que tras oxidación con periodato darán grupos glioxil (para la inmovilización de enzimas por unión covalente multipuntual). Ambos grupos son estables y reactivos en un amplio rango de condiciones, por lo que serían muy útiles para tecnología de enzimas y proteínas ya que grupos muy inestables (muy utilizados a escala de laboratorio) son más difíciles de aplicar industrialmente. En cuanto al proceso de activación con epiclorhidrina, es posible realizar una activación sencilla en medio acuoso por lo que resulta un método adecuado para geles de agarosa. El reactivo empleado es el mismo y las condiciones requeridas son similares al proceso de entrecruzamiento (medios acuosos, muy alcalinos, con borohidruro para evitar oxidaciones inespecíficas del soporte) por lo que la activación se podría acoplar al proceso de entrecruzamiento. Así, empleando el mismo reactivo (epiclorhidrina) y por elección de las condiciones más adecuadas del medio, quizás sería posible obtener de forma sencilla y barata geles de agarosa entrecruzados y con grupos activos muy estables (útiles para tecnología enzimática).

OBJETIVOS

Como se ha visto en la introducción, la activación de soportes de agarosa con epiclorhidrina da lugar a la formación de grupos gliceril y grupos epóxidos.

En este capítulo se estudiarán los distintos **parámetros que influyen en la reacción de activación de geles de agarosa con epiclorhidrina para:**

- **La formación de grupos gliceril:** para ello, se deberá trabajar en condiciones en las que el entrecruzamiento sea mínimo con el fin de lograr el máximo recubrimiento unipuntual.
- **La formación de grupos epóxidos:** se intentará detener la activación en la reacción de la epiclorhidrina (por el átomo de cloro). Para evitar la descomposición de la epiclorhidrina y de los epóxidos las condiciones han de ser suaves, pero a la vez, suficientemente enérgicas para lograr altas activaciones.
- **La formación de soportes con activaciones (gliceril-epóxido) intermedias:** el propósito será obtener soportes en los que el grado de activación sea menor. Estos soportes podrían ser útiles en protocolos de adsorciones selectivas.

Una vez optimizada la activación de soportes de agarosa para la preparación del máximo número de grupos epóxido, se estudiará la validez de estos grupos en procesos de inmovilización de ligandos (amino, alcohol, etc.). Además de los epóxidos, en la activación con epiclorhidrina se generan grupos gliceril que previa oxidación dan lugar a grupos glioxil. La validez de los soportes glioxil-agarosa en procesos de inmovilización de proteínas se tratará en el capítulo siguiente.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- REACCIÓN DE ACTIVACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA

Se han preparado soportes con distinto grado de activación, estudiándose la influencia de las variables de la reacción en la formación de grupos gliceril y de epóxidos. Para evitar la complicación de la descripción de los métodos se tratará el proceso general de activación con Epiclorhidrina, quedando en cada caso explícita en la exposición de los resultados, la variación de los parámetros.

- Se preparan 30 ml de una disolución básica, disolviendo el hidróxido sódico necesario para la concentración final requerida. A esta disolución previamente enfriada a 4°C se le adicionan 340 mg de borohidruro sódico.
- Por otra parte, a 10 ml de agarosa 6BCL previamente lavada con agua destilada, se le adicionan 27 ml de agua destilada.
- Se prepara una mezcla con 5,7 ml de Epiclorhidrina y 11,4 ml de agua destilada, enfriándola a 4°C.

Finalmente, añadimos la disolución alcalina a la agarosa y con agitación de palas, se adiciona lentamente la mezcla agua-epiclorhidrina. Una vez ha transcurrido el tiempo de reacción se lava el gel con abundante agua destilada.

Variando las condiciones de reacción (tiempo, temperatura, disolventes, concentración de hidróxido sódico etc.) obtenemos soportes con distinto grado de activación. En algunos casos la mezcla epiclorhidrina + agua se sustituía por epiclorhidrina + disolvente (con la misma relación de volúmenes).

2.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS GLICERIL PROCEDENTES DE LA ACTIVACIÓN

2.1.- HIDRÓLISIS DE LA AGAROSA ACTIVADA CON EPICLORHIDRINA

En primer lugar, se lleva a cabo una hidrólisis ácida del soporte obtenido por activación con Epiclorhidrina.

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

Preparamos una disolución ácida de ácido sulfúrico 0,5N. Resuspendemos 1 ml de agarosa activado 6BCL en 10 ml de dicha disolución y mantenemos la suspensión agitando (agitador de hélices) a 25°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo lavamos con abundante agua destilada. El soporte activado e hidrolizado posee: los grupos gliceril procedentes del entrecruzamiento y los introducidos en el proceso de activación.

2.2.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS GLICERIL POR MEDIDA DEL CONSUMO DE PERIODATO

La cuantificación se realizó oxidando el soporte activado e hidrolizado con un exceso de NaIO_4 , valorando con yoduro, el periodato no consumido por el gel (Guisán, J.M. 1988) obtenemos el periodato necesario para la oxidación de los grupos gliceril a grupos glioxil. La valoración se realiza por el color generado por la reacción del yoduro (presente en la cubeta) y el periodato no consumido por el gel gliceril en la oxidación (muestra tomada del sobrenadante de la oxidación). Para la valoración, se prepara un blanco operando de la misma forma que en el protocolo del gel gliceril, pero en este caso se ha sustituido el gel gliceril por un volumen equivalente de agua. Este blanco contiene la cantidad total de periodato añadido.

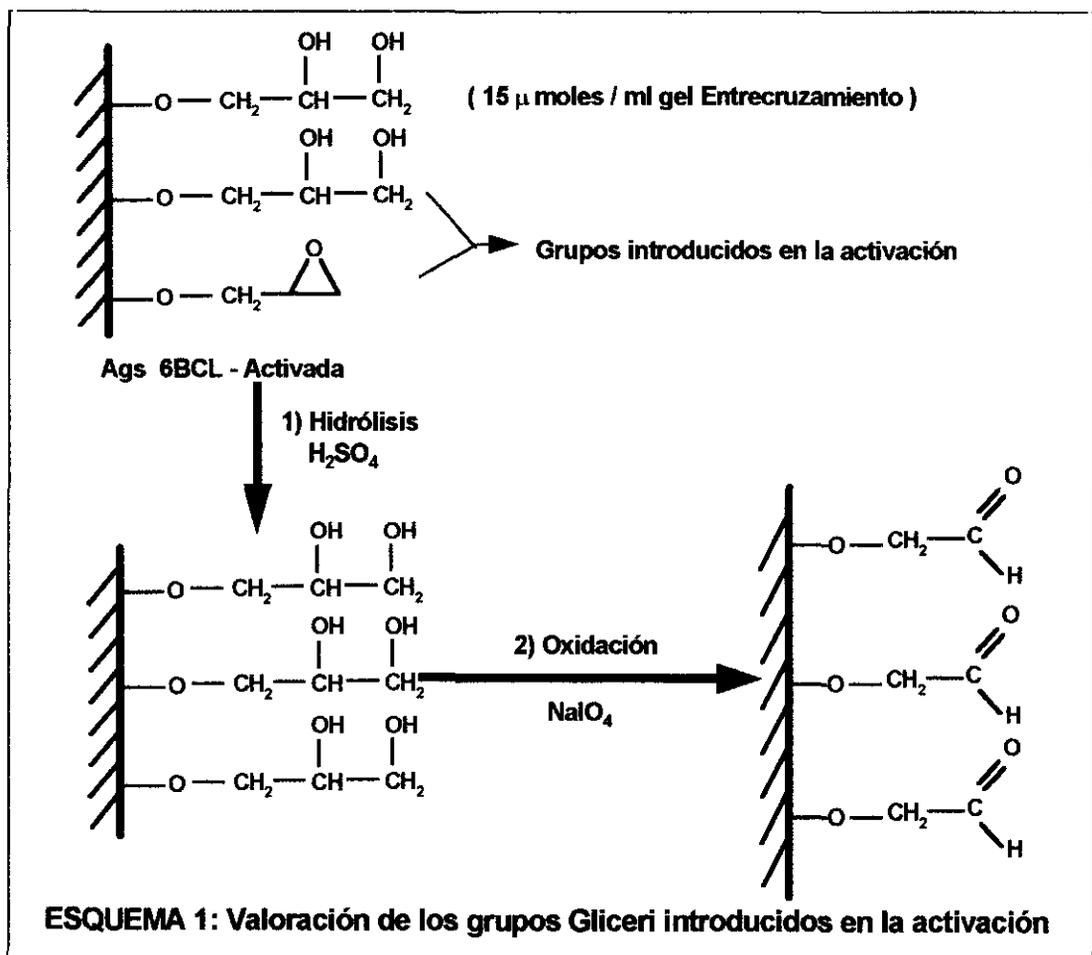
Se prepara una mezcla adicionando 10 ml de yoduro potásico (19% p/v) a 10 ml de bicarbonato sódico saturado.

Para la calibración del espectro: se toman dos cubetas con 2 ml de esta mezcla y a una de las cuales se le adicionan 100 μl del blanco preparado anteriormente, ajustando el espectro a un valor de absorbancia de uno, previa agitación para homogeneizar la solución. La otra cubeta con la mezcla se ajusta a un valor de absorbancia de cero, quedando calibrado el espectro en el rango de absorbancias 0-1.

Para la realización de las medidas: se añaden 2 ml de esta mezcla a cada una de las cubetas en las que se va a cuantificar el consumo de periodato, adicionando a cada una de ellas 100 μl del sobrenadante procedente de la oxidación del soporte (midiendo así el periodato no consumido por el gel en la oxidación). Sabiendo que la reacción de oxidación es estequiométrica obtenemos los μmoles de grupos gliceril/ml gel. Una fracción de estos

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

grupos procede del entrecruzamiento de la agarosa con Epiclorhidrina realizado en Hispanagar S.A. durante su preparación (en la agarosa 6 BCL son unos 15 los μ moles grupos gliceril/ml de gel procedentes del entrecruzamiento). Los grupos reactivos introducidos en el proceso de activación los obtenemos por diferencia entre el consumo de periodato de la agarosa 6 BCL - Activada y los 15 μ moles de NaIO_4 / ml de gel que consume la agarosa 6 BCL (esquema 1).



3.2.- VALORACIÓN DE LOS GRUPOS EPÓXIDO PROCEDENTES DE LA ACTIVACIÓN CON EPICLORHIDRINA

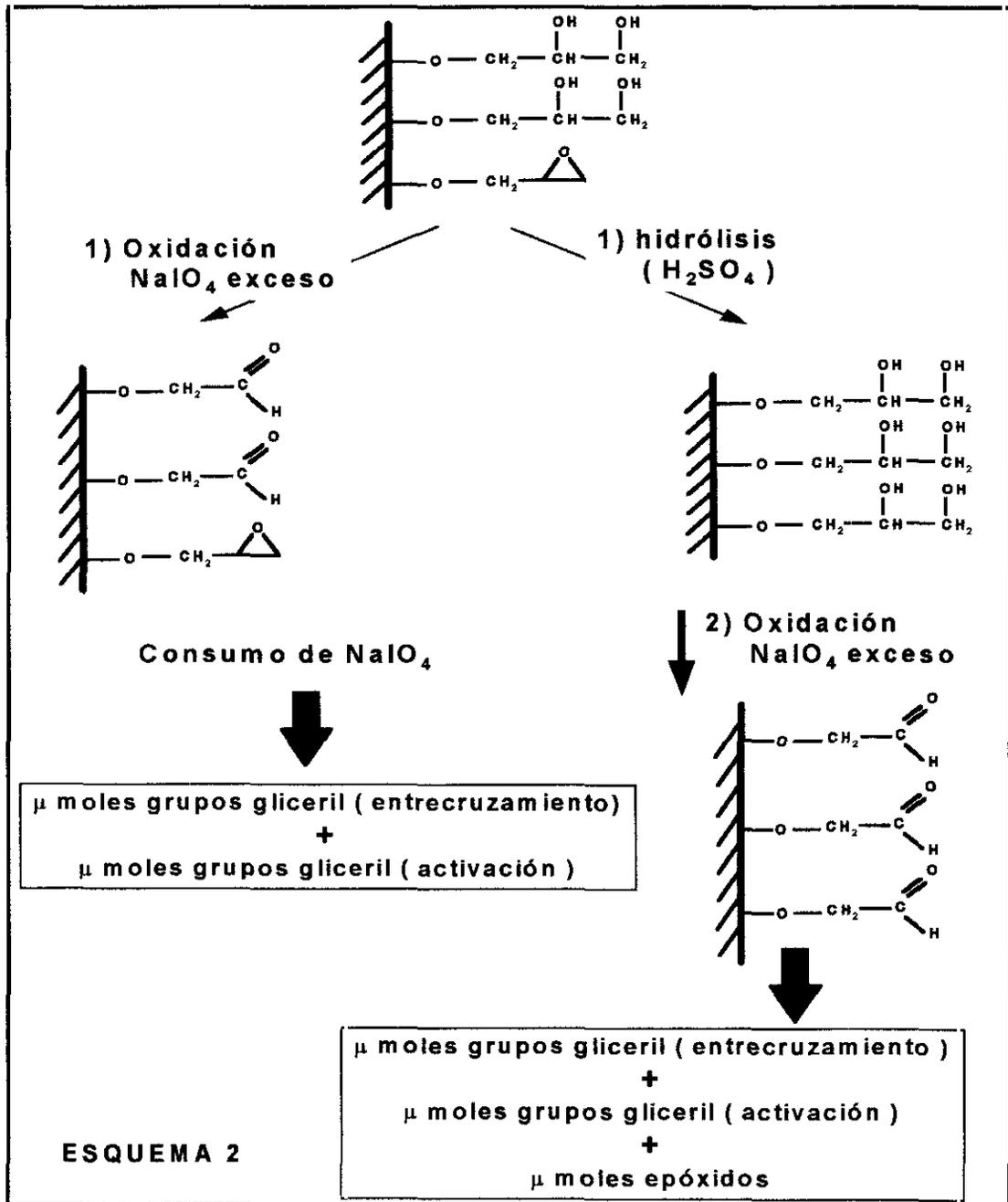
La hidrólisis de la agarosa 6BCL-activada (apartado 2.1.) provoca la apertura de los epóxidos introducidos en el proceso de activación. La medida del consumo de periodato por el soporte de agarosa 6BCL-activado-hidrolizado nos da los μ moles de grupos gliceril/ml gel. Estos grupos gliceril proceden (Esquema 2):

- Grupos gliceril introducidos en la activación de agarosa 6BCL con epiclorhidrina.
- Grupos gliceril generados por la apertura de epóxidos introducidos en la activación.
- Grupos gliceril que posee la agarosa entrecruzada (6BCL) que empleamos en la activación.

La cuantificación de los grupos epóxido introducidos en la activación, vendrá dada por la diferencia entre los μ moles de agente oxidante consumidos por la agarosa 6BCL-activada-hidrolizada y los consumidos por la agarosa 6BCL-ctivada (apartado 3.1.).

4.- ESTABILIDAD DE LOS EPÓXIDOS EN DISTINTAS CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA

Se añaden 33 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 11,0-13,0) a 10 ml de soporte agarosa-epóxido se agita suavemente durante toda la reacción, manteniendo la temperatura (4 ó 25°C) constante a lo largo del proceso. Se van sacando alícuotas de suspensión a distintos tiempos, se filtran y se lavan con agua destilada cuantificando los μ moles de grupos epóxidos/ml gel a distintos tiempos, por el método descrito en el apartado 3.



5.- REACTIVIDAD DE LOS EPÓXIDOS

Se parte de soportes de agarosa obtenidos por activación de Epiclorhidrina en las condiciones de máxima obtención de epóxidos (condiciones optimizadas en el apartado 2 de la exposición de los resultados).

5.1.- REACTIVIDAD CON AMINAS

5.1.1.- AMINAS PRIMARIAS (Etilendiamina)

Se procede del siguiente modo: Se resuspenden 50 ml del soporte de agarosa-epóxido (de 35 μ moles de Epóxidos / ml gel) en 250 ml de una solución de Etilendiamina 2,0 M de pH 10,0, manteniendo esta mezcla con agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se lava, en primer lugar con tampón borato 0,1M , pH 9,0; seguidamente con tampón acetato 0,1M pH 4,0 y finalmente con abundante agua destilada.

* Valoración con picrilsulfónico: Se preparan 4 ml de una disolución de picrilsulfonato sódico 0,2 M en tampón borato 0,1 M a pH 9,0. A esta disolución se añaden 2 ml de soporte agarosa-epóxido (5-20 μ moles de epóxido/ml gel) que previamente ha reaccionado con Etilendiamina, dejando la suspensión con agitación suave durante 1 hora a 25°C. Pasado este tiempo, el soporte coloreado se lava con agua destilada y tampón borato 0,1 M a pH 9,0. Se resuspende finalmente en este tampón para empaquetar el gel en cubetas de 1 mm. de paso de luz y medir la absorbancia a 428 nm.

Se empleó agarosa-amino (5-20 μ moles de amino/ml gel) (preparada según el apartado II.2) empleando como patrón los soportes coloreados obtenidos por reacción con picrilsulfónico.

5.1.2.- AMINAS SECUNDARIAS (Ácido Iminodiacético (IDA))

Se preparan 12,5 ml de una solución 2,0 M de la sal sódica del IDA, se añaden 37,5 ml de tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9-11,0). Se comprueba el pH y se añaden 50 ml de soporte agarosa-epóxido. La suspensión se mantiene a temperatura constante (4-25°C) con agitación suave y una vez transcurrido el tiempo de reacción (2-12 horas) se lava con abundante agua destilada.

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

Los soportes agarosa-IDA obtenidos se en una disolución al 2% de sulfato de cobre pentahidratado, lavándose el gel posteriormente con agua. Los soportes - quelato de cobre obtenidos tras este paso, se resuspendían en agua para ser empaquetados en cubetas de 1 mm. de paso óptico.

La cuantificación del color de los geles coloreados se realizaba en un espectrofotómetro Simadzu UV-V 160, midiendo la Absorbancia $_{735\text{ nm}}$ (utilizando como blanco el mismo soporte pero sin la reacción con la sal de cobre).

* Valoración de geles IDA con pH - stato: Se llevó a cabo en un pHstato modelo TT80 Radiometer, usando como solución valorante NaOH 60 mM. Los experimentos se realizaron en presencia de KCl 4,0 M (para evitar la formación de gradientes de pH en el interior del poro), valorando el consumo de NaOH necesario para la valoración del grupo ácido del soporte IDA de pK más alto (pK 9,89). Se llevó un blanco (sustituyendo el volumen de gel por agua destilada), preparado a la misma concentración salina.

5.2.- REACTIVIDAD DEL SOPORTE AGAROSA EPÓXIDO CON ALCOHOLES

5.2.1.- REACCIÓN DEL SOPORTE AGAROSA-EPÓXIDO CON BUTANOL

Los experimentos se realizaron a dos concentraciones de hidróxido sódico distintas (0,1N y 1,0N), el protocolo seguido fue el mismo en ambos casos:

- En primer lugar, se prepara un blanco (sin butanol): en 80 ml de agua se disuelve el NaOH necesario para obtener la concentración requerida (0,1 N ó 1,0 N). Una vez disuelta, se enfría a 4°C y se le añaden 0,6 g de borohidruro sódico.

Se preparan 11 ml de una suspensión, añadiendo 10 ml de agua destilada a 1 ml de soporte agarosa-epóxido, adicionando a esta suspensión la solución alcalina preparada anteriormente. Se mantiene a 25°C con agitación suave, sacando alícuotas a distintos tiempos. Y por el procedimiento descrito anteriormente, se valoran los grupos gliceril presentes en el gel, de manera que, un aumento de estos grupos con el tiempo nos proporciona la medida de los epóxidos descompuestos en las condiciones dadas (NaOH: 0,1 N ó 1,0 N).

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

- **Reacción Epóxido-butanol:** El método es el mismo que el expuesto para el blanco, pero en este caso una vez añadida la mezcla a la suspensión que contiene el gel, se adicionan 27,8 ml de Butanol. Y siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 3), se valora la desaparición de epóxidos con el tiempo (reaccionados + descompuestos).

5.2.2.- REACCIÓN DEL SOPORTE AGAROSA-EPÓXIDO CON FENOL

Se disuelven 0,21 g de NaOH en 80 ml de agua destilada, se enfría la mezcla a 4°C y se adicionan en primer lugar 2,54 g de fenol y una vez disuelto, se añaden 0,6 g de NaBH₄.

10 ml de agarosa-epóxido se resuspenden en un volumen igual de agua, y se le adiciona la mezcla que contiene el fenol, ajustando el pH a 11,0. La mezcla se mantiene a 25°C con agitación suave sacando alícuotas a distintos La cuantificación de los grupos epóxido introducidos en la activación, vendrá dada por la diferencia entre los μ moles de agente oxidante consumidos por la agarosa 6BCL-activada-hidrolizada y los consumidos por la agarosa 6BCL-ctivada (apartado 3.1.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- ACTIVACIÓN CON EPICLORHIDRINA PARA OBTENER SOPORTES GLICERIL-AGAROSA

A continuación se exponen diversos factores que podrían afectar al grado de activación de los soportes.

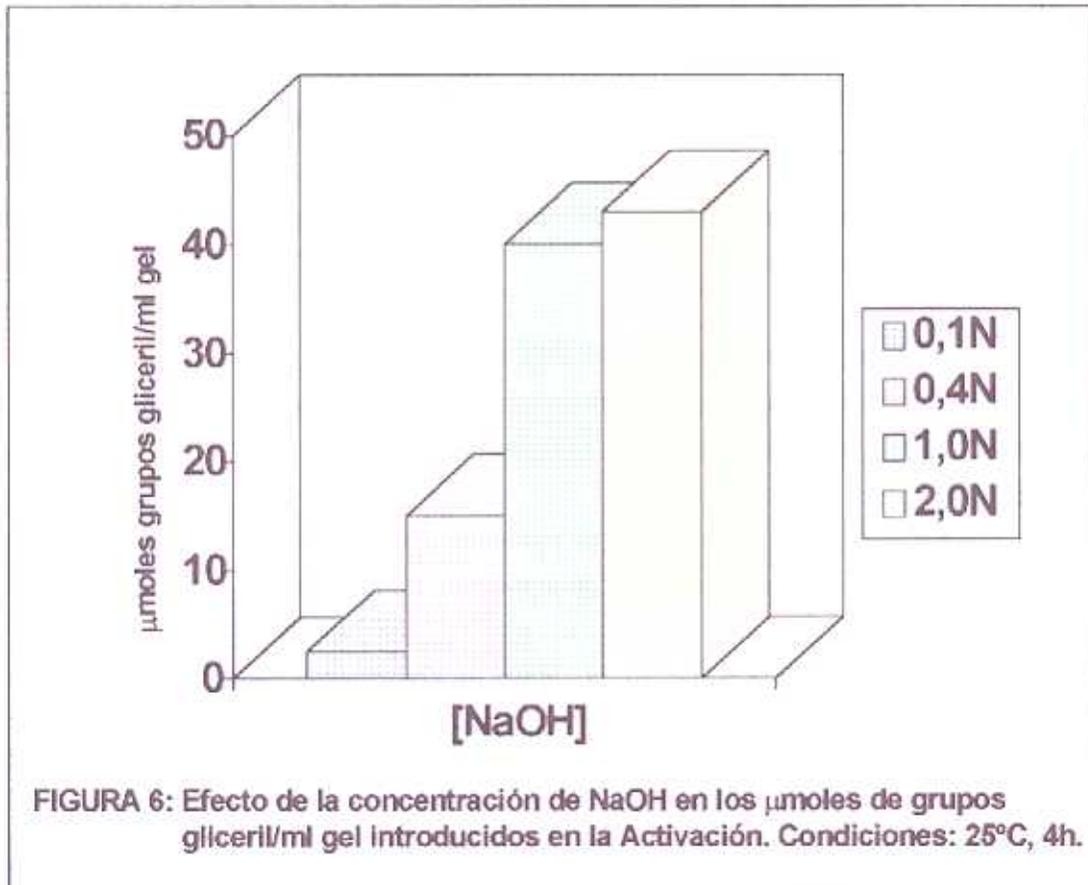
1.1- INFLUENCIA DE LA ALCALINIDAD DEL MEDIO:

En el proceso de activación es necesario trabajar en medio básico para que los hidroxilos primarios de la agarosa se encuentren ionizados y puedan reaccionar con la epiclorhidrina.

Para estudiar la influencia de la concentración de hidróxido sódico se fijaron las siguientes condiciones en el protocolo de activación: 25°C y tiempos cortos de reacción (4 horas).

En la figura 6 se representan los μ moles de grupos gliceril/ml gel procedentes de la activación a distintas concentraciones de hidróxido sódico (0,1 N, 0,4 N, 1,0 N y 2,0 N). Se observa que a medida que aumentamos la alcalinidad del medio, se produce un incremento de los grupos gliceril generados. Este incremento es más notable a concentraciones relativamente bajas, no observándose diferencias significativas entre 1,0 N y 2,0 N.

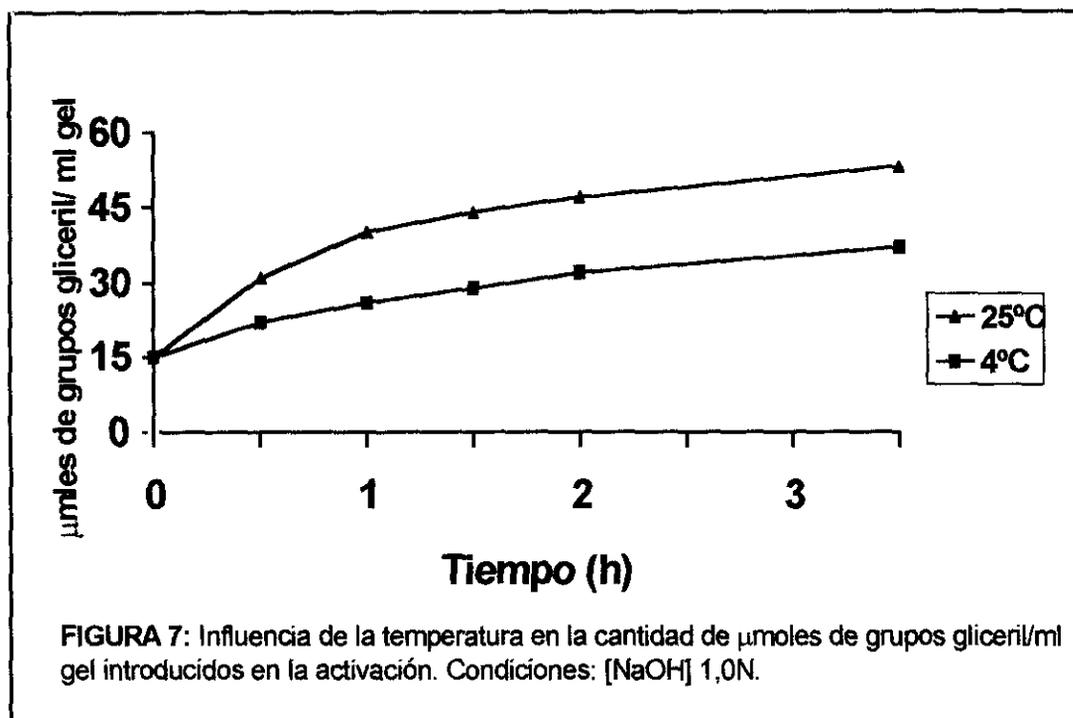
Por este motivo, para el estudio de las demás variables se escogió una concentración de hidróxido sódico de 1,0 N.



1.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA:

Se siguió el curso de la reacción de activación (empleando NaOH 1,0 N) a dos temperaturas distintas (4 y 25°C), valorando los grupos gliceril introducidos a distintos tiempos de reacción.

En la figura 7 se observa que la temperatura influye en la activación, estando favorecida la formación de grupos gliceril a 25°C.



Sin embargo, hay que tener en cuenta que el proceso de entrecruzamiento de la agarosa, realizado en la industria, tiene lugar a altas temperaturas. Por lo que, cuanto mayor es la temperatura en la etapa de activación, el grado de entrecruzamiento aumenta (hay más posibilidad de que la epiclorhidrina reaccione por sus dos grupos funcionales). Con el fin de obtener el máximo recubrimiento unipuntual de la agarosa con epiclorhidrina (activación máxima y entrecruzamiento mínimo) para posteriores experimentos se fijó una temperatura de 25°C.

1.3.- EFECTO DE LA CANTIDAD DE REACTIVO ACTIVANTE (EPICLORHIDRINA) AÑADIDO

Industrialmente, para conseguir entrecruzar soportes de agarosa se trabaja a bajas concentraciones de reactivo, para favorecer la reacción de la epiclorhidrina por sus dos

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

grupos reactivos (epóxido, cloro) frente a la reacción unipuntual por el átomo de cloro. Pero en la etapa de activación, lo que pretendemos es que la agarosa, ya entrecruzada, reaccione con la Epiclorhidrina por uno solo de sus grupos, generando el máximo número de grupos gliceril en el soporte. En este caso una mayor adición de epiclorhidrina favorecería el grado de activación. Por este motivo, se estudió la influencia de la cantidad añadida de epiclorhidrina (5, 10 y 15% del volumen total) en presencia y ausencia de disolvente (acetona). El estudio se ha realizado en las condiciones fijadas anteriormente (25°C, 4 horas, [NaOH] 1,0N) comparando los datos obtenidos en presencia y ausencia de acetona (figura 8):

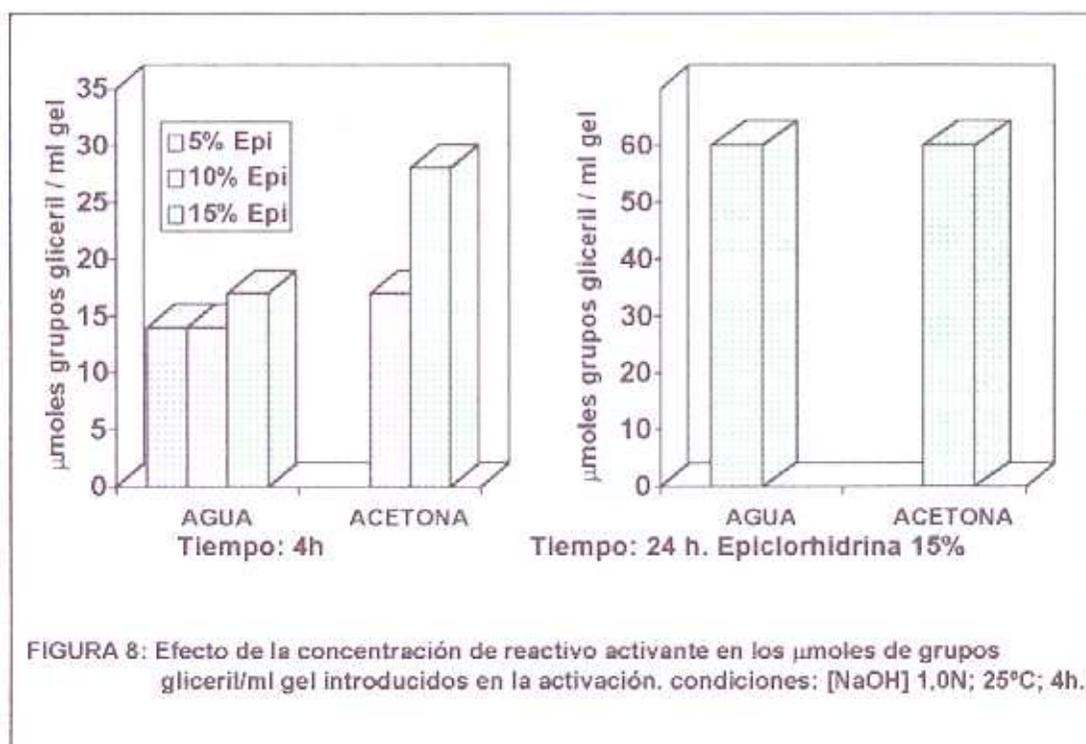
A tiempos cortos de reacción (4h), se observa que:

- Cuando no utilizamos disolvente, se observa la interfase Epiclorhidrina/fase acuosa incluso al añadir Epiclorhidrina 5% (v/v). En este caso, un aumento de la cantidad de epiclorhidrina añadida no se traduce en una mejora notable en la formación de grupos gliceril ya que la concentración efectiva de epiclorhidrina no varía significativamente.
- Sin embargo cuando la epiclorhidrina la añadimos disuelta en acetona, un aumento de la cantidad de epiclorhidrina añadida si se traduce en un incremento significativo en la formación de grupos gliceril introducidos en la activación. En este caso, al adicionar más epiclorhidrina se incrementa la concentración efectiva de dicho reactivo activante. Esto da lugar a activaciones más rápidas (mayor número de grupos gliceril a tiempos cortos).

A tiempos de reacción más largos (24h): las diferencias entre el empleo o no de disolvente (Epiclorhidrina 15% del volumen total) no eran significativas.

- La epiclorhidrina forma un sistema bifásico y se va solubilizando a medida que se va consumiendo. Cuando la epiclorhidrina se añade disuelta en acetona, la concentración efectiva es mayor que si se añade en agua (menor solubilidad), esto da lugar a un aumento de la velocidad de reacción proporcional a la concentración efectiva de epiclorhidrina. Sin embargo, si empleamos tiempos largos de reacción, la cantidad de grupos gliceril introducidos es similar en ausencia y presencia de acetona. Por este motivo, para simplificar, en experimentos posteriores la adición de epiclorhidrina se

realizaba en agua. Y dado que los mejores rendimientos en la formación de grupos gliceril se obtuvieron a concentraciones altas de Epiclorhidrina, por este motivo se fijó una concentración de epiclorhidrina del 15% (v/v), realizando la adición de este reactivo en ausencia de acetona.

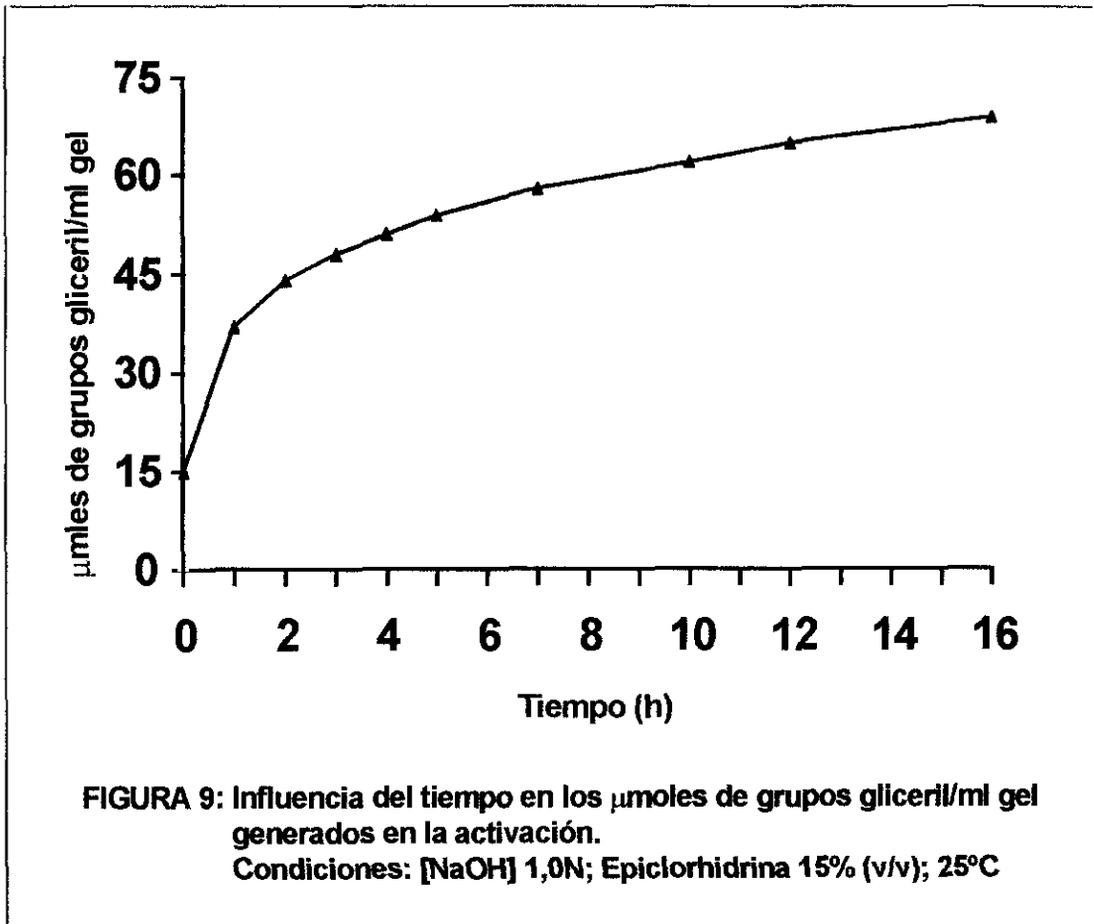


1.4.- EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN:

Partiendo de las condiciones fijadas en los tres puntos anteriores (NaOH 1,0 N, 25°C y 15% (v/v) de Epiclorhidrina) se estudió el efecto del tiempo en la reacción de activación. Para ello, como en los casos anteriores, se valoraron (previa hidrólisis ácida) los grupos gliceril presentes en el soporte. En la figura 9, se observa que el grado de

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

activación aumenta con el tiempo, obteniendo a las 16 horas y en las condiciones fijadas, soportes con 69 μ moles de grupos gliceril/ml gel (frente a los 70-75 que se lograban por activación con glicidol).



A la vista de todos los resultados obtenidos al estudiar la influencia de los diversos factores (disolvente, temperatura etc.), para la preparación de soportes gliceril-agarosa se eligieron las siguientes condiciones:

* [NaOH]: 1,0 N

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

* Epiclorhidrina 15 % (v/v)

* Temperatura 25°C

* Tiempo 16h.

La optimización de las condiciones adecuadas para la activación de soportes de agarosa con epiclorhidrina nos podría permitir, como planteábamos en la introducción, acoplar la etapa de activación al entrecruzamiento. De esta forma, podrían tener lugar ambos en un mismo proceso, con rendimientos comparables a los obtenidos por otros métodos.

- En primer lugar, a alta temperatura, baja concentración de epiclorhidrina, medio poco básico y en presencia de borohidruro, tendría lugar el entrecruzamiento de los geles de agarosa.
- Y seguidamente bajando la temperatura (25°C), adicionando epiclorhidrina (15%) y alcalinizando la reacción (NaOH 1,0 N) tendría lugar el proceso de activación.

2.- SOPORTES AGAROSA - EPÓXIDO

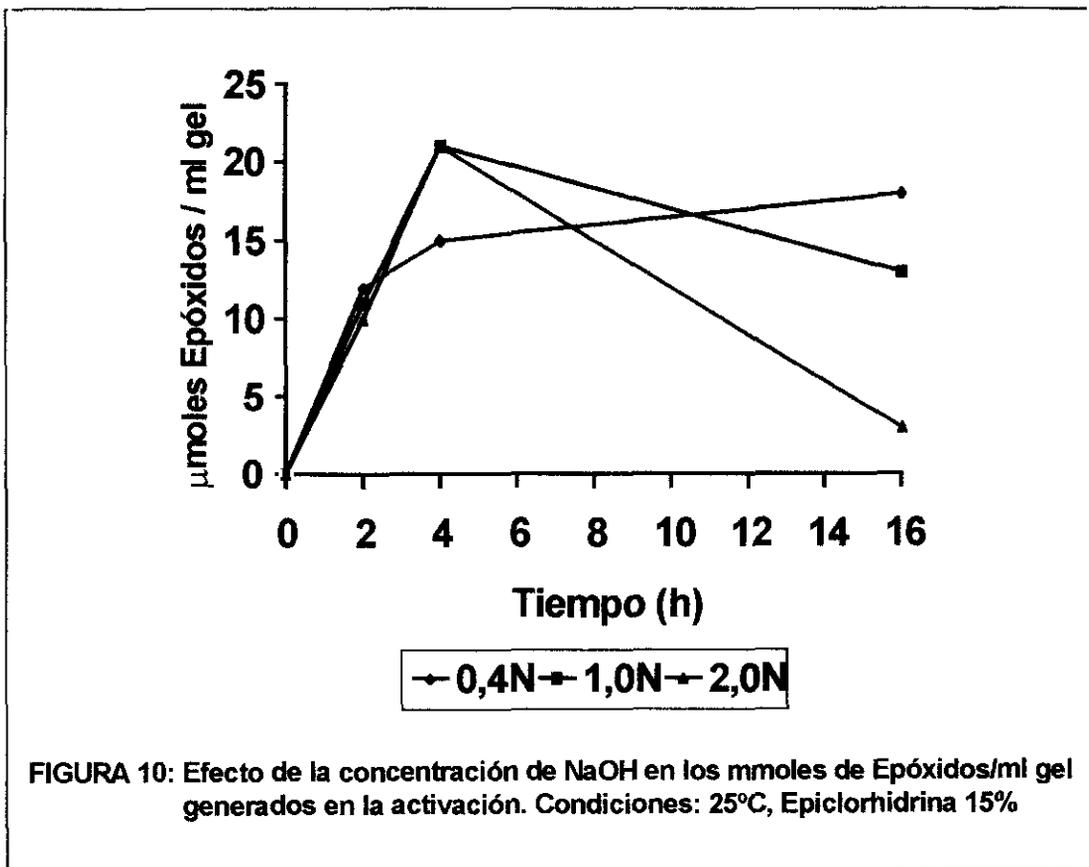
De los 69 μ moles de grupos reactivos/ml gel, la mayoría se obtenían directamente como grupos gliceril (67 μ moles/ml gel) pero existía un pequeño porcentaje de grupos epóxido (2 μ moles/ml gel). Estos resultados nos llevaron a establecer como segundo objetivo la obtención de Agarosa -epóxido por activación con Epiclorhidrina. Para lo cual se estudió la influencia de diversos parámetros en la cantidad de epóxidos del soporte.

2.1.- INFLUENCIA DE LA ALCALINIDAD DEL MEDIO

Un medio básico favorece la reacción de activación con epiclorhidrina, pero el *porcentaje de epóxidos presentes en el soporte puede verse afectado debido a la posible hidrólisis de los epóxidos en medio alcalino*. El efecto de la concentración de hidróxido sódico se estudió realizando la activación a temperatura ambiente y [Epiclorhidrina] al 15% (v/v). Los resultados obtenidos (figura 10) muestran que:

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

- Cuando trabajamos en medios bastante básicos (1,0 , 2,0 N) a las cuatro horas se alcanza un máximo en la cantidad de epóxidos presentes en el soporte, disminuyendo esta posteriormente (más rápidamente cuanto mayor es la basicidad). Esta disminución se debe a la apertura de los epóxidos, provocada por la basicidad del medio.
- Si la activación se hace con NaOH 0,4 N la generación de epóxidos es más lenta, pero los epóxidos formados son estables en este medio.



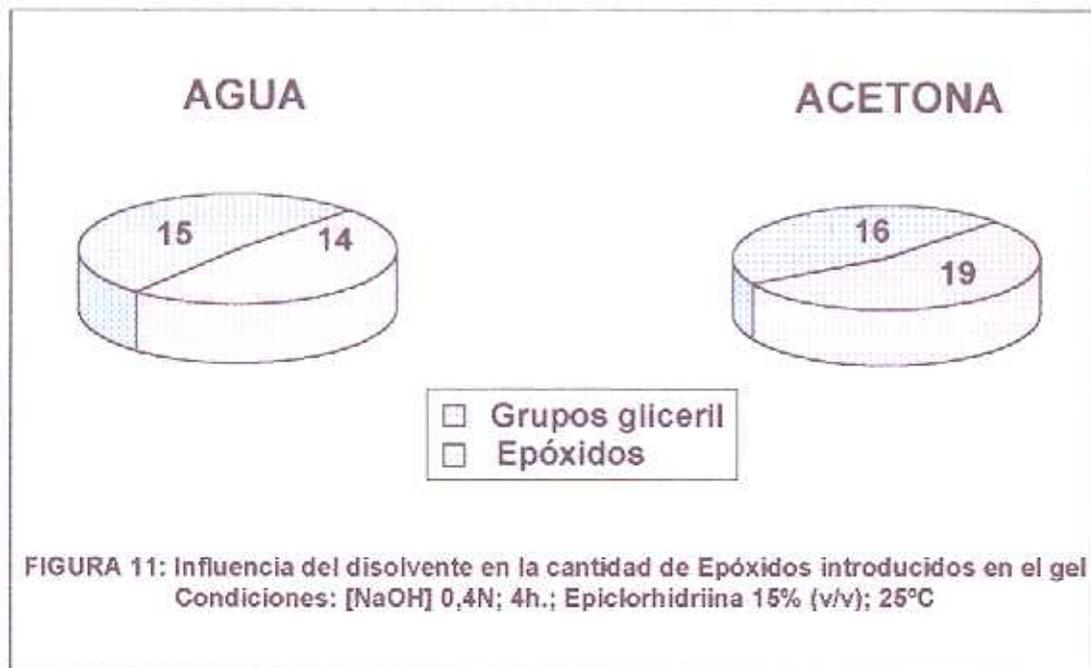
El objetivo es la máxima generación de epóxidos por lo que para el estudio de la influencia de los demás parámetros se empleó NaOH 0,4 N (condiciones en las cuales los

epóxidos son estables). Y la cantidad de epóxidos formados es similar al máximo obtenido a concentración alta de hidróxido sódico.

2.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE DISOLVENTE

Las condiciones fijadas para este experimento fueron: [NaOH] 0,4N, 4h, Epiclorhidrina 15% (v/v), 25°C y en el se compararon los resultados obtenidos en presencia y ausencia de disolvente (acetona). Ya habíamos visto anteriormente que la velocidad de activación aumentaba al añadir la epiclorhidrina en acetona.

En la figura 11 se observa que tanto la cantidad de epóxidos formados como el porcentaje de estos frente a los grupos totales introducidos es mayor cuando la adición de la epiclorhidrina se realiza en presencia de acetona.



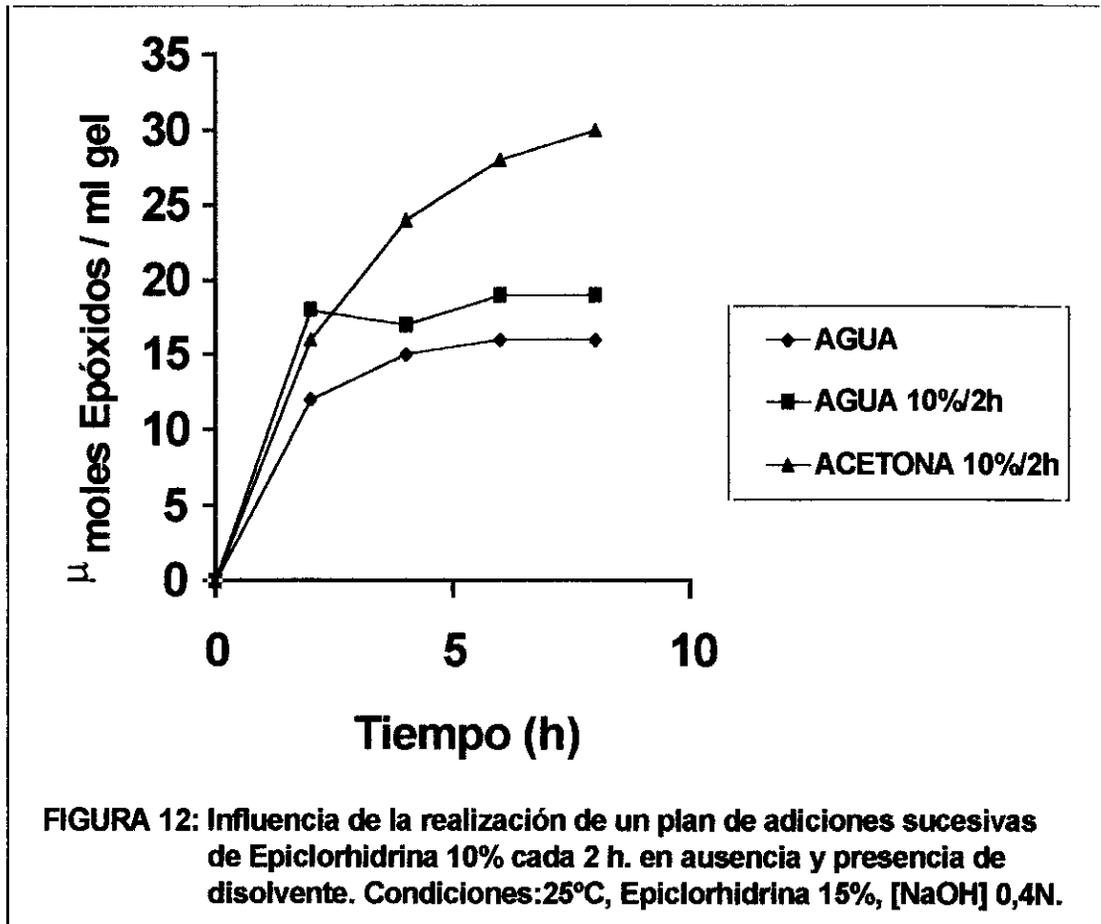
La solubilidad de la epiclorhidrina aumenta, cuando la adición se hace en presencia de acetona, facilitándose la formación de epóxidos.

2.3.- INFLUENCIA DE LA REALIZACIÓN DE ADICIONES SUCESIVAS DE EPICLORHIDRINA

La influencia de la concentración efectiva de reactivo activante está muy ligada a la presencia de disolventes que mejoren su solubilidad ya que en ausencia de disolvente, incluso añadiendo Epiclorhidrina al 5% se ve claramente la interfase. La activación tiene lugar en medio básico, por lo que, podría darse la descomposición de la Epiclorhidrina, pudiendo afectar a la formación de epóxidos. Por este motivo, se estableció un protocolo de dos adiciones de Epiclorhidrina (10% del V_{total}) realizadas cada 2 horas.

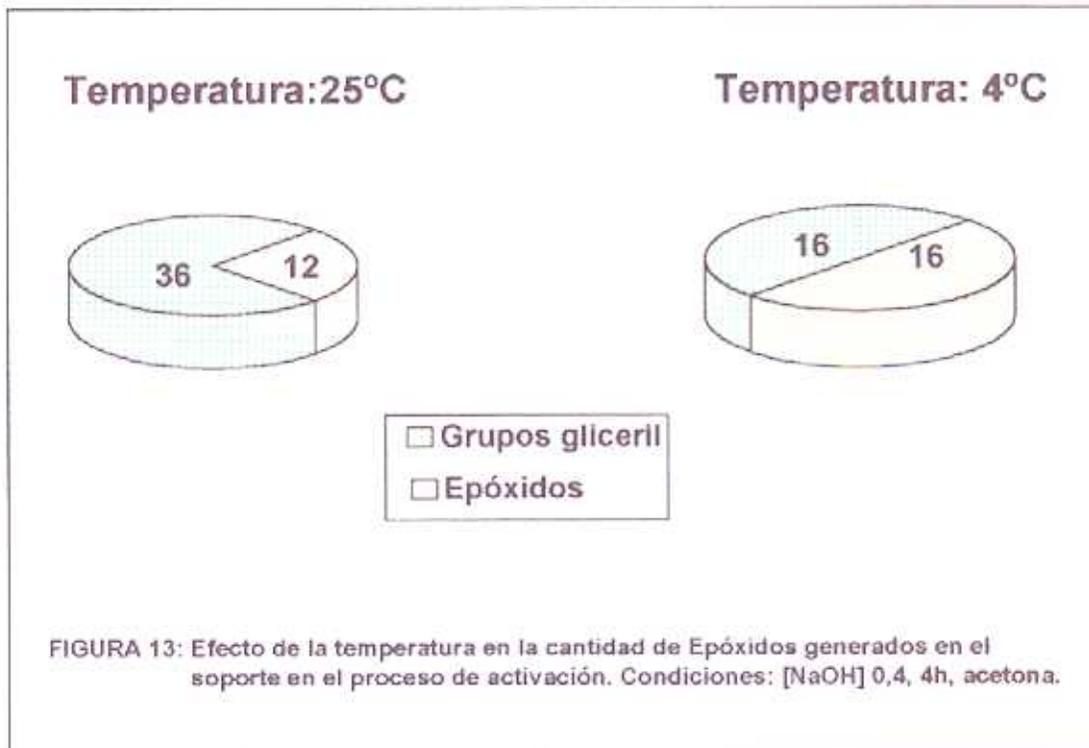
En la figura 12 se representa la influencia de esta adición en presencia y ausencia de acetona.

En esta gráfica se observa: un incremento notable de los μ moles de epóxidos introducidos en la agarosa cuando en el protocolo de activación se realizan adiciones sucesivas de epiclorhidrina en presencia de acetona. Mientras que cuando la reacción tiene lugar en ausencia de disolvente las adiciones sucesivas (de epiclorhidrina) no producían un incremento tan significativo.



2.4.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

Las condiciones empleadas para este estudio fueron las optimizadas en los apartados anteriores (NaOH 0,4 N y acetona) comparando los epóxidos generados a las 4 horas de reacción a 25 y 4°C. Los resultados obtenidos se observan en la figura 13, en la cual podemos ver que en la activación a baja temperatura la cantidad y el porcentaje (respecto a los grupos totales) de epóxidos generados es mayor.



La temperatura favorece la reacción de activación con epiclorhidrina (apartado 1.2) pero esta mejora no corresponde al aumento de epóxidos sino al de grupos gliceril introducidos. Esto es debido a que los epóxidos son menos estables a altas temperaturas.

Teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados, en las condiciones óptimas se obtuvieron soportes con **35 μ moles de epóxidos / ml gel** y **20 μ moles de grupos gliceril / ml gel** cuando la activación tenía lugar:

- * NaOH 0,4 N
- * Acetona
- * Epiclorhidrina 15 % (añadida inicialmente). Y dos adiciones de 10% cada dos horas.
- * 16 horas

* 4°C

3.- ESTABILIDAD DE LOS GRUPOS EPÓXIDOS

Una vez preparados los soportes agarosa-epóxido con 35 μ moles/ml de gel se estudiaron los efectos del pH y temperatura en la estabilidad de estos grupos. En la figura 14 se representa la evolución con el tiempo de los μ moles de epóxidos/ml gel en diferentes condiciones de incubación. A pH 11,0 y 12,0 no se observa desaparición de los epóxidos con el tiempo pero cuando la incubación tiene lugar por encima de estos valores de pH, solo a pH 12,5 y 4°C se conserva el número de epóxidos con el tiempo. En condiciones más drásticas, se observa que los epóxidos son inestables (van disminuyendo con el tiempo), tanto más cuanto mayor es la temperatura y más alcalino es el medio.

Los grupos epóxidos son muy estables en unas condiciones en las que la reactividad de numerosos ligandos es elevada.

4.- REACTIVIDAD DE LOS EPÓXIDOS CON LIGANDOS

Una vez estudiada la estabilidad de los soportes agarosa-epóxido, estamos en condiciones de abordar la reactividad de estos soportes con diversos ligandos.

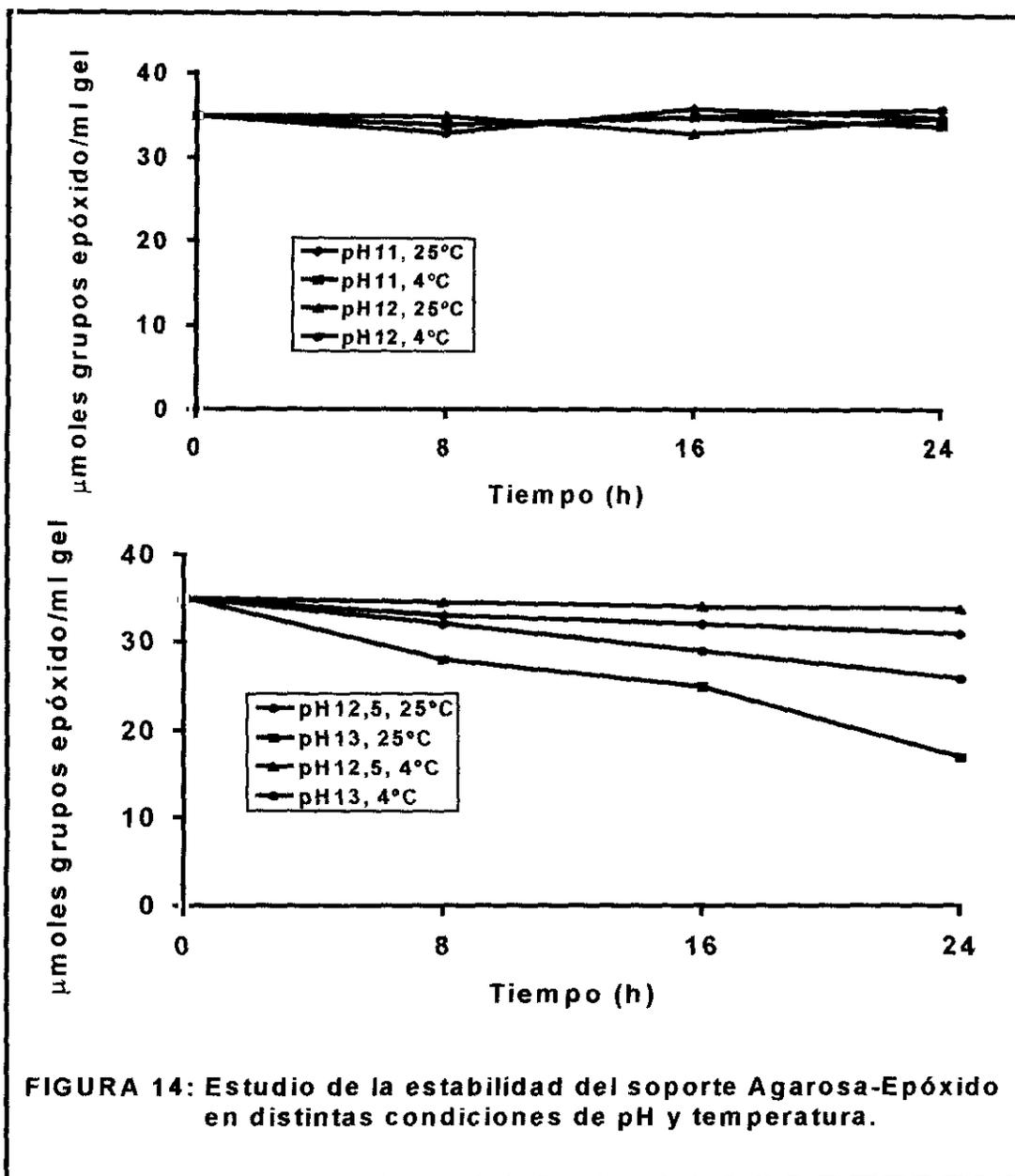
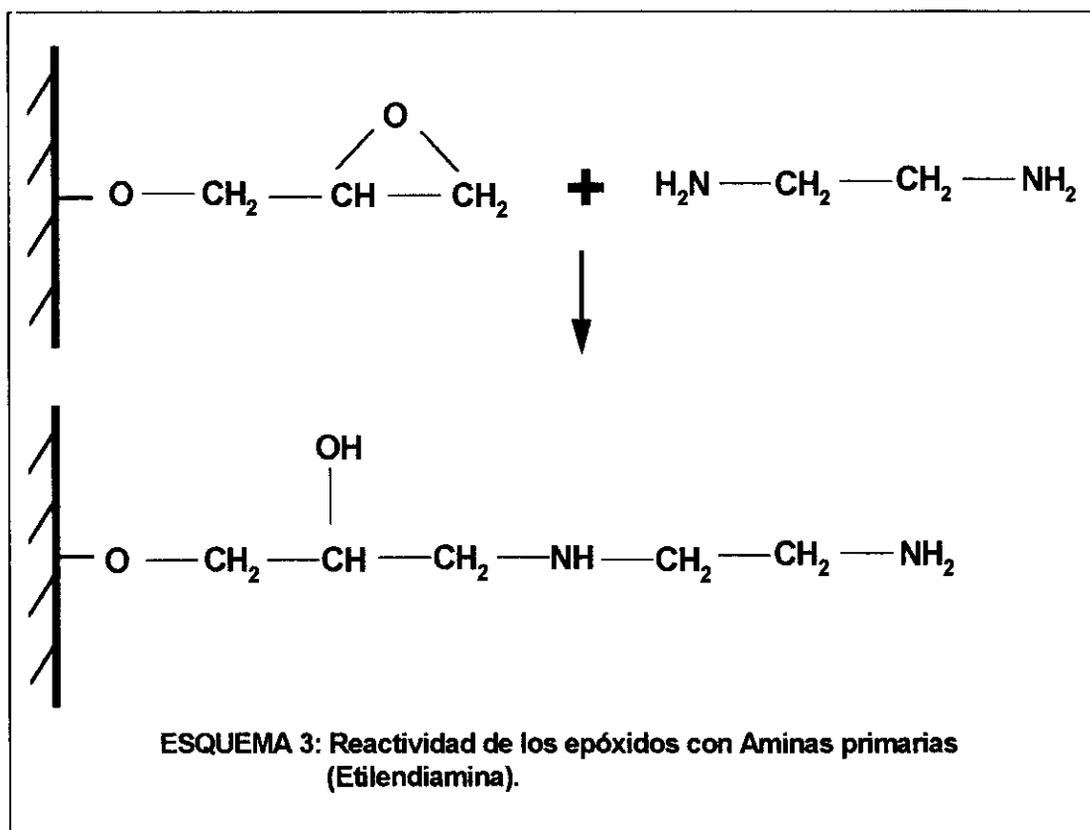


FIGURA 14: Estudio de la estabilidad del soporte Agarosa-Epóxido en distintas condiciones de pH y temperatura.

4.1.- REACTIVIDAD CON AMINAS

4.1.1.- AMINAS PRIMARIAS (Etilendiamina)

Los geles agarosa-epóxido se hicieron reaccionar con Etilendiamina concentrada a pH 10,0 (esquema 3), valorando con picrilsulfónico el grado de reacción epóxido-amina primaria.



- Para comprobar que los epóxidos del soporte habían reaccionado con la Etilendiamina, se realizó un **calibrado patrón** con soporte agarosa-amino (preparado según el apartado II.2). Este soporte se diluyó con agarosa 6BCL hasta obtener soportes con

distinta concentración de grupos amino (5, 10, 15 y 20 μ moles de amino/ml gel) que se hicieron reaccionar con picrilsulfónico (método descrito en el apartado 5.1.1.). El picrilsulfónico reacciona con los grupos amino primario del soporte, dando lugar a la aparición de color. La medida de la Abs_{428nm} de cada uno de los geles, nos permitió obtener una curva de calibrado en la que se representaba la Abs_{428nm} frente a los μ moles de amino/ml gel totalmente proporcional a la concentración de grupos.

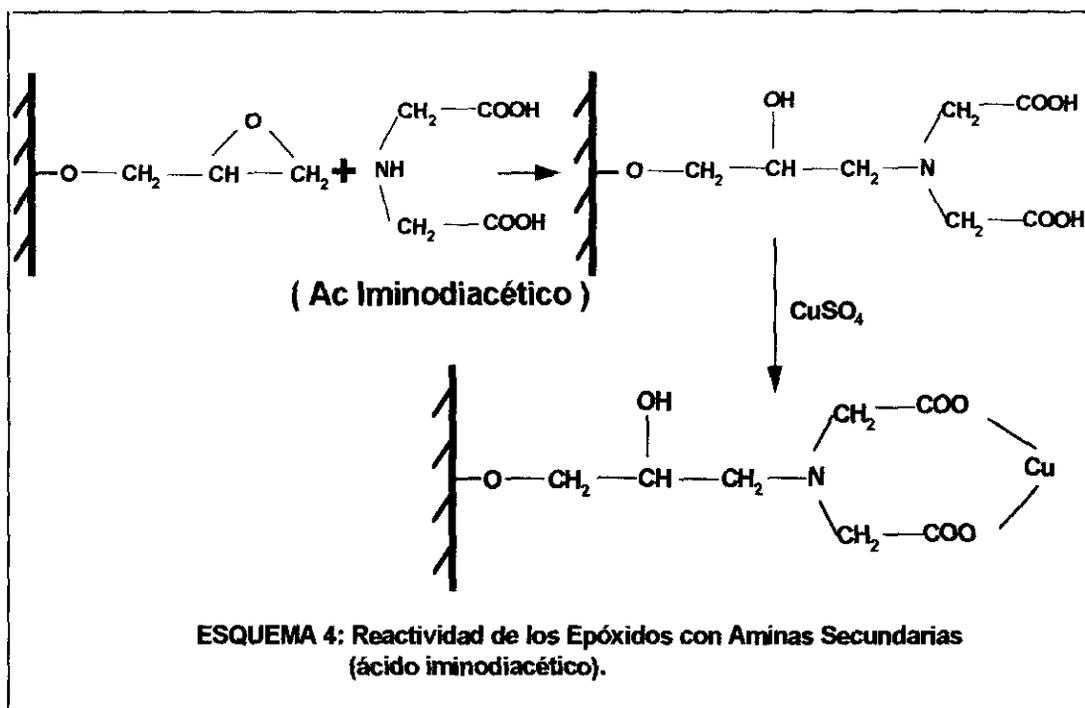
Se prepararon soportes epóxido (5, 10, 15 y 20 μ moles de epóxido/ml gel) y por reacción de estos; primero con etilendiamina y segundo con picrilsulfónico se obtuvieron los correspondientes geles coloreados. La Abs_{428nm} de estos geles era prácticamente igual a la de los patrones de igual concentración por lo que parece que todos los epóxidos del soporte han reaccionado con la etilendiamina.

4.1.2.- AMINAS SECUNDARIAS (Ácido Iminodiacético)

Se estudió la influencia del pH, temperatura y tiempo en la reacción de los epóxidos del soporte con una amina secundaria (ácido Iminodiacético). La reacción se resume en el siguiente esquema (esquema 4).

Como se observa en el esquema, tras la reacción con la amina secundaria, realizada en distintas condiciones, se formaba el quelato de cobre, coloreándose el soporte. Pudiendo así optimizar la primera reacción por la máxima coloración producida en la segunda.

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina



A continuación (tabla 2) se resumen la influencia del tiempo, pH y temperatura.

Tabla 2: Optimización de la reacción de epóxidos con aminas secundarias

pH	Tª (°C)	tiempo (h)	ABSORBANCIA
8	25	12	0,058
9	25	12	0,118
	4	12	0,046
10	25	12	0,160
10,5	25	12	0,187
11	25	2	0,129
		4	0,179
		8	0,191
		12	0,192

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

- **Temperatura:** se puede observar que cuando la reacción Epóxido-amina secundaria (IDA) tiene lugar a 25°C (pH 9,0), la absorbancia del quelato de cobre correspondiente es mayor que si la reacción transcurre a 4°C.
- **pH:** en cuanto al efecto del pH en la reacción Epóxido-IDA (25°C), se observa que a medida que aumenta la basicidad del medio de reacción el quelato de cobre preparado presenta una absorbancia mayor.
- **Tiempo:** en la tabla se observa, que a 25°C, pH 11,0; la reacción Epóxido-IDA es bastante lenta y necesita tiempos largos de reacción.

A 25°C, tiempos largos y pH 11,0 obtenemos el valor más alto de absorbancia por lo que asumimos que tenemos un soporte en el que la reacción epóxido-IDA ha sido mayor. Por lo que para la preparación de soportes quelato (utilizados para la purificación de proteínas en el capítulo 3) se fijaron las siguientes condiciones: 25°C, pH 11,0 y 12 horas de reacción.

La reacción epóxido-amina secundaria (a 25°C, pH 11,0 y 12 horas) se cuantificó por valoración del soporte agarosa-ácido dicarboxílico. Los μ moles de ácido (grupo ácido de pK 9,89)/ml gel (calculados por consumo de hidróxido sódico) coincidían con los μ moles de epóxido/ml gel (calculados por el protocolo descrito en 1.3) por lo que todos los epóxidos del gel parecen haber reaccionado con la amina secundaria.

Los soportes agarosa-epóxido reaccionan con aminas primarias y secundarias siendo necesario emplear tiempos largos y excesos de ligando.

4.2.- REACTIVIDAD CON ALCOHOLES

4.2.1.- REACCIÓN DE LOS EPÓXIDOS CON BUTANOL

Para la reacción es preciso que el butanol se encuentre en su forma ionizada por lo que es necesario trabajar en un medio básico (su pK exacto no se ha encontrado pero su valor debe de estar entorno a 13-14 como en el caso de alcoholes alifáticos tales como Glicerol pK 14,15 ó Glicol 14,22) (HandBook of Chemistry and Physics 1992-93). Pero como ya vimos anteriormente, un medio muy alcalino podría dar lugar a la apertura de los

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

epóxidos del soporte. Partiendo de soportes con 35 μ moles de epóxidos/ml gel y 20 μ moles de grupos gliceril, se estudió la influencia de la alcalinidad del medio en el binomio Epóxidos reaccionados con Butanol/Epóxidos hidrolizados. La tabla 3 nos muestra los μ moles de epóxidos/ml gel reaccionados e hidrolizados trabajando en medios de distinta alcalinidad.

Tabla 3: Relación entre los epóxidos reaccionados y descompuestos en medio básico

TIEMPO (h)	[NaOH]	μ moles de Epóxidos reaccionados /ml gel	μ moles de Epóxidos descompuestos /ml gel
2	0,1 N	5	3
	1,0 N	14	14
8	0,1 N	24	10
	1,0 N	17	17

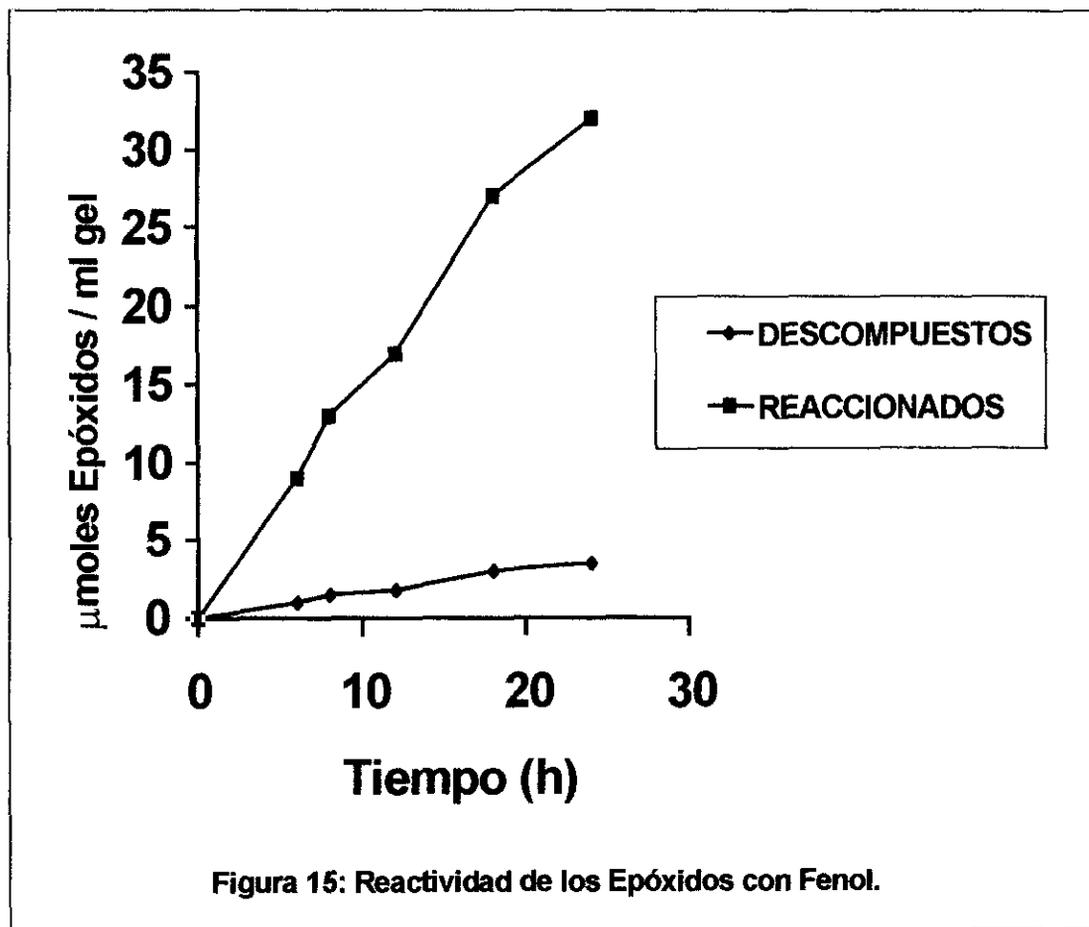
A 1,0 N la reacción epóxido-butanol es más rápida, pero en estas condiciones los epóxidos son inestables y tenemos un alto porcentaje de descomposición de los mismos. Al bajar la concentración de hidróxido sódico, la reacción se ralentiza (el butanol tiene un pK alto) pero los epóxidos del soporte son más estables, con lo que se logran (a tiempos largos) conversiones mayores.

Empleando [NaOH] 0,1 N y 8 horas de reacción, obtenemos soportes con unos 24 μ moles butil / ml gel y unos 30 μ moles de grupos gliceril / ml gel (20 iniciales y unos 10 procedentes de la apertura de los epóxidos en las condiciones de reacción con butanol).

Para la unión hidrofóbica proteína - soporte la cantidad de grupos podría ser baja, pero gracias a que poseen unos 30 μ moles de grupos gliceril / ml gel, podrían ser adecuados para procesos de inmovilización orientada por la región hidrofóbica. En este caso la hidrofobicidad sería suficiente y tras esta interacción se produciría la unión covalente de la proteína por los grupos glioxil (procedentes de la oxidación de los gliceril).

4.2.2.- REACCIÓN DE LOS EPÓXIDOS CON FENOL

A continuación se estudió la reacción de los epóxidos con un alcohol de pK más bajo (pK 9,9). En la figura 15 se representa la reacción del fenol con agarosa-epóxido a pH 11,0. En este caso la descomposición de los epóxidos es mucho menor obteniéndose conversiones de un 90 % de los epóxidos.



En medio básico y ofreciendo exceso de ligando, se observa que los epóxidos del soporte reaccionan bien con alcoholes de bajo pK como el fenol (pK 9,9). Sin embargo,

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

cuando se trata de un alcohol de pK alto como el butanol (alcohol alifático), es necesario emplear medios muy básicos que a la vez que facilitan la reacción epóxido-alcohol, favorecen la descomposición de los epóxidos.

Los epóxidos reaccionan bien con alcoholes de bajo pK.

CONCLUSIONES

1.- Activación de soportes de agarosa con epiclorhidrina:

La activación de soportes de agarosa con epiclorhidrina da lugar a Grupos gliceril y grupos epóxido.

a.- Preparación de soportes Gliceril-agarosa

- Por activación de la agarosa con epiclorhidrina, en condiciones en las que el entrecruzamiento es mínimo, hemos obtenido soportes activados con unos *70 μmoles de grupos gliceril / ml gel*. Comparando estos resultados con los datos obtenidos en el laboratorio de tecnología Enzimática del I.C.P. por activación con glicidol (*70-75 μmoles de grupos gliceril/ml gel*), podemos decir que se ha logrado obtener un buen recubrimiento unipuntual empleando epiclorhidrina como agente activante. De estos grupos gliceril, aproximadamente unos *15 μmoles/ml gel* proceden del entrecruzamiento realizado en Hispanagar, y el resto se han introducido en la etapa de activación con epiclorhidrina.
- A la vista de estos resultados, la etapa de entrecruzamiento de geles de agarosa con epiclorhidrina (temperaturas altas, baja concentración de epiclorhidrina etc.) podría acoplarse a una segunda etapa, la activación, siendo necesario el empleo de altas concentraciones de reactivo, temperaturas moderadas, tiempos largos y NaOH 1 N.

Estos resultados nos permitirían, en un futuro, obtener soportes entrecruzados glioxil - agarosa de una manera fácil (acoplando los dos procesos) y con recubrimientos análogos a los obtenidos por otros métodos.

b.- Preparación de soportes Epóxido-agarosa

- La modificación de las condiciones de activación en sistemas acuosos nos permitió obtener soportes en los que la activación tuviera lugar únicamente hacia la formación de epóxidos (soportes con *70 μmoles de epóxidos /ml gel*).

Activación de soportes de Agarosa con Epiclorhidrina

Esto es debido a que *el empleo de condiciones más drásticas favorecen la activación pero afectan a la estabilidad del epóxido formado.*

1. Un aumento de la concentración de hidróxido sódico favorece la reacción de activación, ya que es preciso que los hidroxilos de la agarosa estén ionizados para que puedan reaccionar con la epiclorhidrina. Pero los epóxidos son inestables en medios fuertemente básicos, con lo que se produce su hidrólisis.
 2. Un aumento de reactivo activante, favorece la reacción de activación pero la solubilidad es un factor limitante y hemos de realizar la activación en presencia de disolventes para que la concentración efectiva de epiclorhidrina aumente. Pero la presencia de disolventes estabiliza la forma no iónica de la agarosa.
 3. Un aumento de la temperatura favorece la activación: pero a temperaturas más altas se produce una mayor descomposición de los epóxidos y aumenta el grado de entrecruzamiento de la agarosa.
- Sin embargo con las condiciones optimizadas se han obtenido soportes con 35 μ moles de epóxidos / ml de gel, que como veremos en capítulos posteriores (Capítulo III) son ya más que suficientes para obtener buenos resultados.

c.- Preparación de soportes de activación intermedia

La optimización de la reacción de activación con epiclorhidrina, nos ha permitido disponer de diversos protocolos de activación para obtener soportes con distinta carga epóxido/gliceril (cuya utilidad se estudiará en el capítulo III).

2.- Soportes para inmovilizar ligandos y proteínas:

a.- Soportes Agarosa-Gliceril

La utilidad de estos soportes (previamente oxidados a grupos glioxil) para inmovilizar proteínas se tratará en posteriores capítulos (II, IV).

b.- Soportes Agarosa-Epóxido

- Los grupos epóxido son capaces de reaccionar con ligandos (aminas, alcoholes, etc.). Esta reacción es bastante lenta y necesita la presencia de ligando en exceso, a la vez que unas condiciones de reacción drásticas. Los epóxidos, reaccionan bien con aminas (primarias y secundarias) y con alcoholes de pK bajo, pero presentan problemas cuando el alcohol presenta un pK más alto.

II.- AGAROSA COMO SOPORTE PARA INTERACCIONES MULTIPUNTUALES

INTRODUCCIÓN

En la introducción general ya se comentaban las posibles ventajas de las adsorciones o inmovilizaciones multipuntuales de proteínas así como la idoneidad de los geles de agarosa como soportes para este tipo de procesos. Las causas de esta idoneidad eran la morfología de fibras anchas y teniendo en cuenta los resultados del capítulo anterior, la gran densidad de grupos activos que se podrían formar sobre ella.

1.- UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL DE ENZIMAS SOBRE SOPORTES ACTIVADOS

La inmovilización irreversible de enzimas por formación de enlaces covalentes (Leckband, D. y col. 1990) con el soporte, supone grandes ventajas a la hora de utilizar catalizadores estables. Si además el proceso permite la formación de numerosos enlaces entre cada molécula de enzima y el soporte con el que se une (multiinteracción), las posibles distorsiones provocadas por el medio se verán limitadas. En el proceso de multiinteracción de enzimas a soportes activados, se formaría un "entramado" enzima-soporte en el que varios residuos pertenecientes a diferentes cadenas de la proteína, deben conservar sus distancias durante cualquier cambio conformacional inducido por cualquier agente. Las posibilidades de estos cambios estarían muy reducidas debido a esta "rigidez relativa" de varios residuos y por tanto las moléculas de enzima así inmovilizadas deben ser mucho más estables que las correspondientes enzimas nativas y que las moléculas inmovilizadas a través de un único enlace covalente. Las moléculas enzimáticas inmovilizadas, "más rígidas" son más resistentes frente a diversas condiciones desnaturizantes que provocan la inactivación por desplegamientos de la estructura proteica. Evidentemente, un óptimo sistema de inmovilización-estabilización será el que posibilite una intensa unión multipuntual enzima-soporte, sin provocar distorsiones graves de la estructura enzimática.

Los grupos Glioxil, son muy estables a la vez que altamente reactivos, permitiendo la inmovilización de una gran cantidad de enzima por unidad de soporte (40 mg de enzima

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

en soportes de agarosa al 6 % y 100 mg si la concentración de la agarosa es de 10 %). En el laboratorio de Tecnología Enzimática del I.C.P. ya se tenían datos (tabla 4) de que la inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil-agarosa altamente activados producía derivados enzimáticos muy estabilizados sin pérdidas muy significativas de actividad: tripsina (Blanco y col. 1989 a y b), penicilina G acilasa (Alvaro y col. 1990; Guisán y col. 1990; Rosell, 1993); β -galactosidasa (Santana, 1991; Penzol, 1996), quimotripsina (Guisán, J.M. y col. 1991), termolisina (Polo, 1994), D-aminoácido oxidasa (Rodríguez, 1995).

Tabla 4: Ejemplos de estabilidad lograda con algunos derivados

Enzima	Actividad (%)	Estabilización
Penicilina G acilasa	65	8000
Quimotripsina	65	100.000
β -Galactosidasa	80	1000
D-amino ácido oxidasa	90	20.000
Termolisina	60	100
Tripsina	60	12.000

Actividad: en referencia a la actividad la enzima soluble. **Estabilización:** en referencia al enzima soluble en condiciones similares (Guisán, J.M. y col. 1997).

En la tabla expuesta, se observa como la inmovilización de enzimas a soportes preexistentes con pequeños grupos aldehído alifáticos (glioxil agarosa) proporciona derivados enzimáticos muy estables. Esta estabilización, era mucho mayor, que cuando inmovilizábamos la enzima sobre otros soportes de diferente morfología (por ejemplo, polímeros sintéticos (Krämer, D.M. y col. 1978, Krämer, D.M. y col. 1979) formados por fibras muy finas e incluso por cadenas unimoleculares) (Rosell, C.M. 1993)(tabla 5).

Tabla 5: Inmovilización de PGA a soportes con distinta morfología.

Derivado	Actividad (%)	Estabilidad
PGA- Glioxil Agarosa	70	2.000
PGA- Glioxil Eupergit	100	6

2.- PROCESOS DE INMOVILIZACIÓN QUE ENVUELVEN UNA UNIÓN MULTIPUNTUAL EN LA PRIMERA ETAPA

La inmovilización multipuntual se puede producir, tanto si la primera unión es unipuntual o si por el contrario la primera unión es a través de enlaces químicos reversibles y solo tiene lugar cuando se produce una primera inmovilización multipuntual. Este segundo tipo de interacciones podría tener ventaja sobre el primero, debido a que:

- a.- Podría generar una nueva orientación de enzima en el soporte ya que probablemente, este se inmovilizará no a través del área donde esté el grupo más reactivo sino donde este la mayor densidad de grupos. Así, la obtención de estas nuevas orientaciones puede ser clave cuando se trabaja con proteínas y enzimas que deben actuar sobre ligandos o sustratos macromoleculares.
- b.- Podría dar lugar a la orientación más adecuada para que posteriormente ocurra una unión covalente multipuntual: la zona más rica en grupos reactivos.

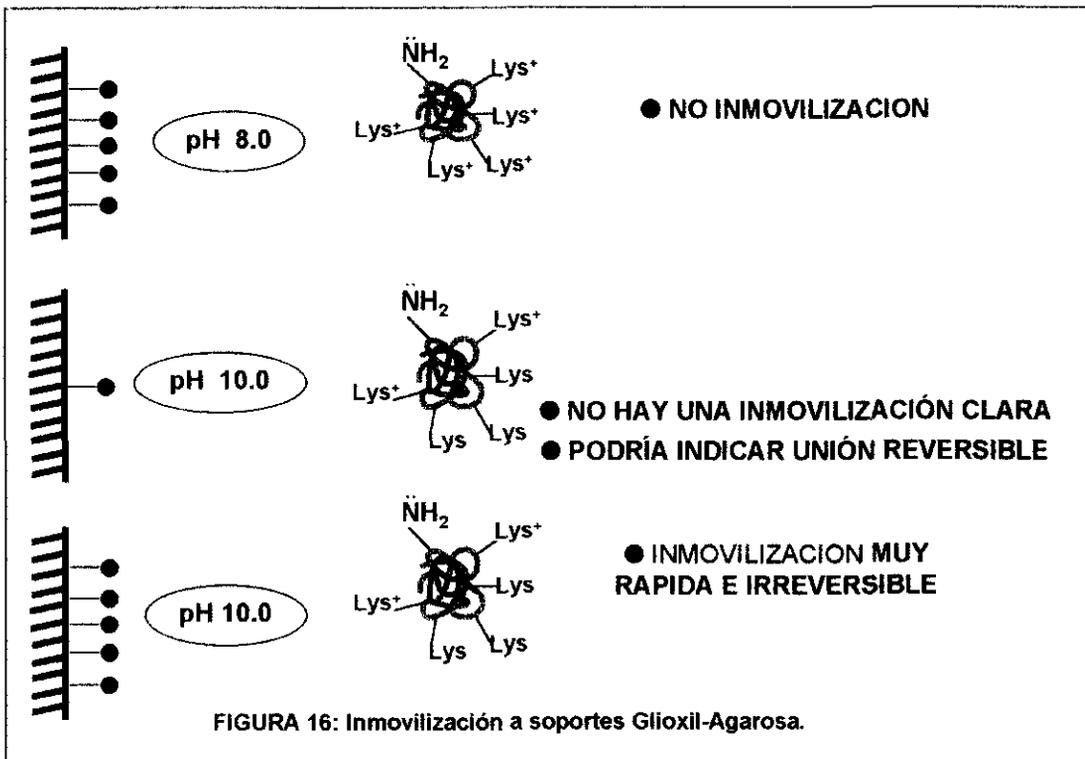
Existían ciertos indicios de que la unión glioxil-agarosa podría ocurrir a través de este tipo de uniones multipuntuales.

Estos indicios eran (Figura 16):

- Cuando se intentaba inmovilizar (pH 8,0) una enzima a soportes Glioxil-Agarosa con un gran número de grupos reactivos en el soporte, no se producía unión. A este pH los grupos amino de las lisinas estarían protonados, de forma que la unión proteína-soporte solo podría darse a través de algún grupo amino de bajo pK.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

- Si se trabajaba a pH 10,0, empleando un soporte con un número muy reducido de grupos reactivos, tampoco se observaba una clara inmovilización de la enzima (a pesar de que a este pH ya habría lisinas no protonadas que pudieran interactuar con los grupos glioxil del soporte).
- Y solo cuando empleábamos un soporte Glioxil (pH 10,0) con alta densidad superficial de grupos reactivos la unión enzima (lisinas)-soporte (glioxil) tenía lugar. Observándose una unión muy rápida e irreversible.



Estos indicios parecían apuntar a una primera unión química reversible soporte (glioxil)-enzima (lisinas), de manera que la inmovilización solo tendría lugar cuando se

produjera una primera unión al menos bipuntual (es muy difícil que ocurra la disociación simultánea de ambos enlaces).

En caso de ser cierto, la agarosa debido a su morfología tipo superficie plana podría ofrecer ventajas para realizar este tipo de inmobilizaciones.

3.- ADSORCIÓN HIDROFÓBICA MULTIPUNTUAL DE LIPASAS A SOPORTES DE AGAROSA

Las lipasas catalizan la hidrólisis/síntesis de un amplio rango de amidas y ésteres solubles e insolubles de ácidos carboxílicos. Las lipasas muestran una importante estereoespecificidad al actuar sobre compuestos quirales y una importante regio y quimo selectividad cuando actúan sobre sustratos polifuncionales. Por esta razón, tienen un gran potencial en química fina (Plou, J.F. y col. 1996; Talon, R. y col. 1993; Wang, Y.J. y col. 1988; Yang, D. y col. 1992; Bloomer, S. y col. 1992; Dandik, L. y col. 1996; Talon, R. y col. 1996; Yamaguchi, S. y col. 1991) y en la obtención de determinados intermedios útiles en la industria farmacéutica (De Zeote, M.C. y col. 1996; Forutani, T. y col. 1996; Santaniello, E. y col. 1993; Wong, C-H y col. 1994; Wu, Y.X. y col. 1996).

Las lipasas se activan en presencia de interfases hidrofóbicas (disolventes orgánicos inmiscibles, fluidos supercríticos, etc.). Esta activación interfacial fue reportada por Sarda y Desnuelle (Sarda, L. y col.; 1958) y hoy en día, los estudios estructurales de un gran número de lipasas empleando rayos X y RMN, confirman esta característica. Mediante técnicas de rayos X y RMN, ha sido posible distinguir (Bornscheuer, U. y col. 1994; Brady, L. y col. 1990; Brzozowski, A.M. y col. 1991; Derewenda, U. y col. 1992; Derewenda, Z.S. y col. 1992 y 1995; Grochulski, P. y col. 1993; Louwrier, A. y col. 1996; Noble, M.E.M. y col. 1993; Winkler, F.K. y col. 1990):

- Lipasa en "forma cerrada": el centro activo de la lipasa está cubierto por una tapadera que posee una región externa hidrofílica y una interna con características hidrofóbicas.
- Lipasa en "forma abierta": la tapadera es desplazada, exponiendo su cara hidrofóbica al medio y facilitando el acceso del sustrato al centro activo.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

En medio acuoso homogéneo, la mayoría de las lipasas muestran una muy baja actividad esterásica y amidásica. La lipasa se encuentra en equilibrio (tapadera abierta/tapadera cerrada), estando el equilibrio muy desplazado hacia la forma cerrada. De manera que la actividad en medio acuoso homogéneo será la que corresponda al porcentaje de moléculas con la tapadera, al menos, parcialmente abierta (Malcata, F.X. y col. 1992; Mingarro, Y. y col. 1995). Sin embargo, si las lipasas se encuentran en presencia de interfases hidrofóbicas pueden tener lugar importantes cambios conformacionales, dando lugar a la "forma abierta". Estos cambios provocan la exposición de la superficie hidrofóbica, que interacciona con la interfase hidrofóbica, ocasionando un incremento de la actividad. Las lipasas parecen adsorberse fuertemente a la interfase a través de varios bolsillos hidrofóbicos situados en la superficie que rodea al centro activo. Esta región hidrofóbica comprende residuos situados en la cara interna de la tapadera y en el entorno del centro activo de la lipasa. De manera que lo que tiene lugar es una interacción multipuntual interfase hidrofóbica-área hidrofóbica de la lipasa (próxima al centro activo), observándose un notable incremento de la actividad (apertura de la tapadera, mayor accesibilidad del sustrato). La hiperactivación de lipasas producida por **interacción multipuntual** con interfases hidrofóbicas, nos llevó a **utilizar soportes sólidos hidrofóbicos, para "simular" estas interfases** (Bastida, A. y col.). En este caso, la morfología de estos sólidos podría ser decisiva ya que la unión tiene lugar a través de una adsorción hidrofóbica multipuntual.

OBJETIVOS

La agarosa está constituida por fibras gruesas que para la mayoría de las proteínas (en función de su tamaño) semeja una superficie plana contra la cual interacciona. *Este tipo de acoplamiento podría presentar **ventajas** a la hora de diseñar **interacciones multipuntuales proteína-soporte**.* En este capítulo intentaremos “aprovechamos” de estas **ventajas** derivadas de la morfología de la agarosa estudiando la validez de la agarosa en procesos de multiinteracción:

- 1.- Unión Covalente multipuntual
- 2.- Adsorción Hidrofóbica multipuntual

1.- Unión Covalente Multipuntual a soportes Glioxil-agarosa

Resultados anteriores obtenidos en el Laboratorio de Tecnología Enzimática del I.C.P. parecen indicar que cuando empleamos soportes de agarosa activados con grupos glioxil, la proteína se une al soporte por unión covalente multipuntual, dando lugar a derivados muy estables.

Si la unión a estos soportes transcurriera a través de una primera unión multipuntual, la morfología del soporte sería clave en la velocidad de inmovilización.

Este primer punto podemos dividirlo en tres partes:

- 1.- **Comprobar** que la unión de proteínas a soportes glioxil tiene lugar a través de una **primera unión que involucre más de un grupo** del soporte.
- 2.- Si lográramos verificar el punto anterior, se compara la influencia de determinadas variables cuando la unión proteína-soporte tiene lugar a través de una primera unión unipuntual o por más de un punto (soportes Glioxil-agarosa).
- 3.- Si lográramos comprobar que la unión proteína-soporte glioxil involucra en la primera unión a más de un grupo del soporte, se tratará de demostrar que para este caso la morfología del soporte es decisiva, mientras que en el caso de uniones a través de una primera interacción unipuntual no.

2.- Adsorción Multipuntual Hidrofóbica de lipasas

Como se ha visto en la introducción, las lipasas en medio acuoso homogéneo se encuentran en equilibrio tapadera abierta/tapadera cerrada; estando el equilibrio desplazado hacia la forma cerrada (baja actividad). La presencia de una interfase hidrofóbica da lugar a la unión multipuntual lipasa-interfase hidrofóbica, observándose un aumento de actividad.

Lo que se intentará es ***simular esta interfase empleando agarosas derivatizadas con grupos hidrofóbicos. De manera que el soporte hidrofóbico actuaría a modo de interfase provocando la unión hidrofóbica multipuntual soporte.*** Esto daría lugar a la apertura de la tapadera, facilitando el acceso del sustrato al centro activo, observándose aumentos de actividad (Bastida, A. y col.).

En este apartado, se estudiará:

- La velocidad de adsorción de las lipasas a soportes:
 1. Con distinto grado de hidrofobicidad: estudiando el efecto del grado de hidrofobicidad en la velocidad de unión.
 2. Con distinta morfología (fibras anchas/fibras finas): Los soportes de agarosa, presentan una gran superficie de unión por lo que podrían tener ventajas en el caso de adsorciones hidrofóbicas multipuntuales.
- La influencia de la morfología del soporte en la forma de unión de la lipasa a dicho soporte.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES GLIOXIL - AGAROSA

1.1.- PREPARACIÓN DE GELES GLICERIL-AGAROSA

Los geles gliceril-agarosa ($\text{Ags-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$) fueron preparados por eterificación de los geles de agarosa comerciales 6BCL con 2,3-epoxi-4-propanol (glicidol).

Sobre 150 ml de gel suspendido en 30 ml de agua destilada se añaden 50 ml de NaOH 1.7N conteniendo 28,5 mg/ml de borohidruro sódico. A continuación se añade glicidol 2 M lentamente y controlando constantemente la temperatura entre 25 - 30°C. Esta suspensión se mantiene en agitación suave durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, el gel se filtra y se lava con abundante agua destilada para eliminar el exceso de reactivos.

La cantidad total de grupos gliceril es la suma de los grupos formados mediante la eterificación con glicidol (70-75 μmoles grupos gliceril/ml gel), más los grupos presentes, obtenidos como productos secundarios, en la reacción de entrecruzamiento de la agarosa (15-20 μmoles grupos gliceril/ml gel).

1.2.- OBTENCIÓN DE SOPORTES GLIOXIL - AGAROSA CON ELEVADA DENSIDAD SUPERFICIAL DE GRUPOS GLIOXIL (75 $\mu\text{moles/ml}$ gel):

Este tipo de geles se obtienen por oxidación estequiométrica con periodato de los geles gliceril-agarosa 6B-CL (Guisán, J.M. 1988).

El gel gliceril-agarosa se suspende en 1.5 l de agua destilada y se le agregan 112,5 ml de una solución de NaIO_4 0,1M, para oxidar estequiométricamente los grupos gliceril a grupos glioxil. Esta reacción se mantiene a 25°C con agitación suave, hasta que ha tenido lugar el consumo del agente oxidante añadido (1,5h). La valoración se realiza con mezcla de IK y NaHCO_3 , de forma que el periodato no consumido reacciona con I^- dando coloración (el consumo total del agente oxidante lo marcará la desaparición de color en el ensayo).

El gel obtenido siguiendo dicho protocolo contiene 75 μmoles glioxil/ml de gel con una densidad superficial de 18 residuos de aldehído/1000 \AA^2 superficie de agarosa.

1.3.- OBTENCIÓN DE GELES DE AGAROSA CON BAJA DENSIDAD SUPERFICIAL DE GRUPOS GLIOXIL (15 μ moles/ml gel)

Estos geles se obtienen por oxidación directa del gel comercial (6BCL) con periodato sódico, sin necesidad de activar el gel previamente con glicidol ya que la agarosa 6BCL contiene grupos gliceril (15-20 μ moles grupos gliceril/ml gel) como subproducto de la reacción de entrecruzamiento realizado previamente en Hispanagar S.A.

Se resuspenden 50 ml de gel en 450 ml de agua destilada y se añaden 750 μ moles de periodato sódico. Se agita suavemente a temperatura ambiente durante 2 horas, tras las cuales se comprueba el consumo total del agente oxidante añadido. Se filtra el soporte lavando con abundante agua destilada.

Este gel contiene 15 μ moles grupos glioxil/ml gel, lo que corresponde a una densidad superficial de 3.6 grupos aldehído/ 1000 Å^2 de superficie de gel (Guisán, J.M. 1988).

2.- PREPARACIÓN DE SOPORTE MANA - AGAROSA

Para la preparación de soportes monoaminoetil-N-aminoetil-agarosa (MANA-Agarosa) se parte de los soportes *glioxil-agarosa* (preparado por el protocolo descrito en los apartados 1.2 y 1.3) con el grado de activación deseado.

Se procede del mismo modo: Se suspenden 50 ml de soporte glioxil - agarosa en 200 ml de una solución de Etilendiamina 2 M pH 10,0; manteniendo la mezcla con agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se agregan 2 g de NaBH_4 continuando la agitación 2 horas más y se procede al lavado del gel en primer lugar con tampón borato 0,1M de pH 9,0; a continuación con tampón acetato 0,1M; y por último, con agua destilada. En estas condiciones todos los grupos glioxil han reaccionado con la etilendiamina obteniéndose soportes con los mismos μ moles de grupos amino/ml de gel que los μ moles de grupos glioxil/ml gel que poseía ya el soporte agarosa de partida (Rodríguez, V. 1995).

3.- PREPARACIÓN DEL SOPORTE GLUTARALDEHIDO - AGAROSA

Para la preparación de este soporte: se resuspenden 50 ml de gel MANA-agarosa en 90 ml tampón fosfato 0,2M a pH 7,0 y agitando suavemente, se le añaden 60 ml de glutaraldehido 25% v/v. Se comprueba el pH y la temperatura (18-20°C) y se deja con agitación suave unas 12-14 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra, lavando con abundante agua destilada, obteniendo así el gel glutaraldehido-agarosa (Penzol, G. 1996).

4.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE RESINA TOYOPEARL. PREPARACIÓN DE SOPORTE GLIOXIL-TOYOPEARL

El proceso de activación con glicidol es idéntico al seguido para el gel de agarosa descrito en el apartado 1). La activación máxima permitida es 100 μ moles de grupos glioxil por ml de soporte húmedo. Si bien, la oxidación se llevó a cabo añadiendo el periodato suficiente para obtener soportes con 75 y 15 μ moles de grupos glioxil/ml de gel respectivamente.

5.- PREPARACIÓN DE SOPORTE GLUTARALDEHIDO TOYOPEARL (15 μ moles/ml gel)

Los soportes glioxil-toyopearl de 15 μ moles de grupos glioxil/ml gel se hicieron reaccionar en primer lugar, con etilendiamina (protocolo descrito en el apartado 2) y finalmente con glutaraldehido (protocolo descrito en el apartado 3). De esta forma se obtuvieron los soportes Toyopearl-Glutaraldehido 15 μ moles/ml gel.

6.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

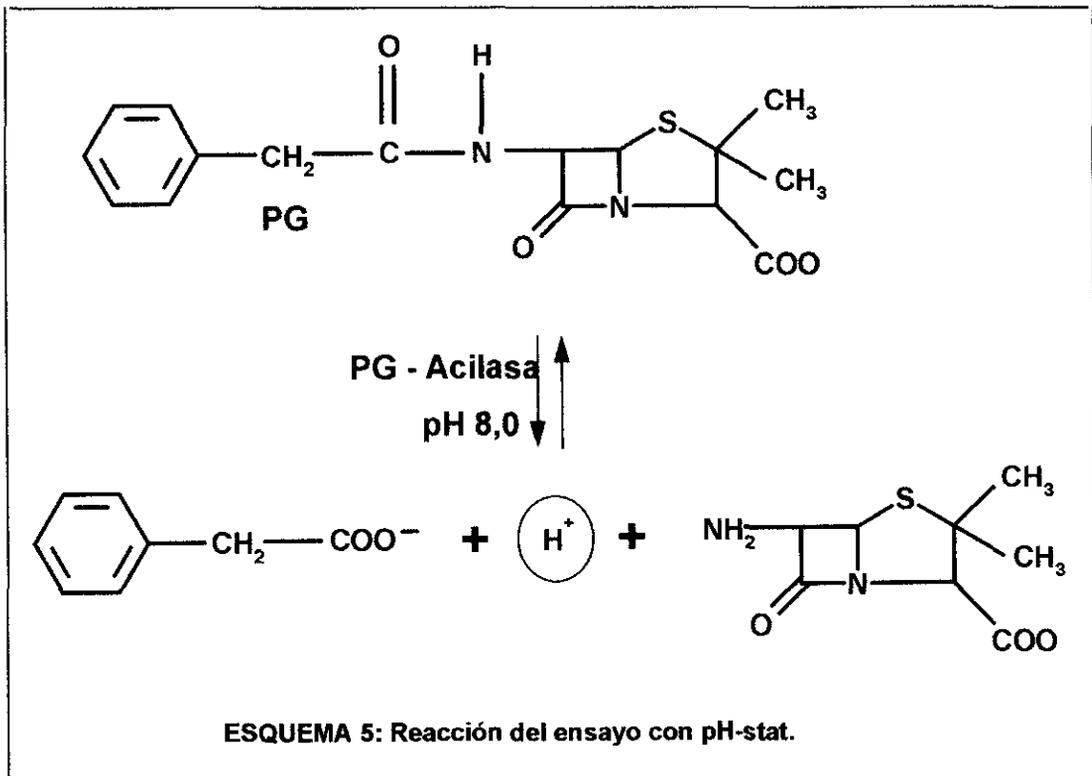
6.1.- ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE PGA

La penicilina acilasa de Boehringer Mannheim (Alemania), utilizada en el desarrollo de esta Tesis Doctoral es de origen bacteriano (*Escherichia coli*).

La actividad hidrolítica se ensayó espectrofotométricamente y con pHstato.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

- **Ensayo espectrofotométrico.** Se midió espectrofotométricamente el incremento de absorbancia que se produce a 405 nm cuando se hidroliza el sustrato sintético, NIPAB (ácido 6-nitro-3-(fenilacetamido)-benzóico), según lo describen Kutzbach y col (1974). Se añaden 100 μ l de muestra de PGA a 200 μ l de NIPAB disuelto en 1,8 ml de tampón fosfato 50 mM pH 8,0, manteniendo la mezcla de reacción con agitación a 25°C mediante un baño termostatzado conectado con el portacubetas.
- **Ensayo con pHstato.** Estos ensayos se realizaron en un pH stato modelo TT80 Radiometer, usando como solución valorante NaOH 50 mM. Los experimentos se realizaron a pH 8,0 y 25°C, usando 60 ml de sustrato penicilina G 10 mM en tampón Fosfato 25 mM (esquema 5).



6.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis*

A una cubeta con 2 ml de solución de sustrato sintético o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 5 mM en tampón fosfato potásico 20 mM de pH 7,0 conteniendo $MgCl_2$ 2 mM y KCl 0,1 M, termostatizada a 25°C y con agitación suave, se le añade una muestra de 25-200 μ l de solución enzimática o de suspensión de derivado. Del registro del incremento de absorbancia a 405 nm producido por la hidrólisis del sustrato sintético, se determina la actividad de los sobrenadantes, suspensiones y blancos. El extracto enzimático comercial, Maxilact LX-5000, procede de Gist-Bocades (Holanda).

7.- INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS A SOPORTES CON DISTINTO TIPO DE ACTIVACIÓN

7.1.- INMOVILIZACIÓN A SOPORTES GLUTARALDEHIDO

El método usado es el siguiente: Se prepararon suspensiones con 0,4 ml de soporte (Glutaraldehido - 75), en 19,55 ml de fosfato 50 mM, NaCl 200 mM pH 6,0 y se añadieron 20 UI de PGA. Esta mezcla de reacción se mantuvo con agitación suave a 25°C. En las mismas condiciones, se incubaba un blanco en el que el volumen de gel glutaraldehido se había sustituido por un volumen igual de gel inerte.

A medida que transcurría la reacción se iban sacando alícuotas a distintos tiempos del sobrenadante y suspensión de la muestra, así como del sobrenadante del blanco. Las medidas se realizaban por el ensayo espectrofotométrico descrito en el apartado 6.1, calculando el porcentaje de PGA unido al soporte a cada tiempo.

- En algunos experimentos, se repitió el protocolo anterior cambiando el tampón mencionado por:

Fosfato 10 mM; 50 mM ; 200 mM ó 300 mM pH 6,0.

Fosfato 50 mM, NaCl 200 mM pH 6,0 ó Fosfato 50 mM, NaCl 400 mM pH 6,0.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

- En el estudio, del efecto de la densidad superficial de grupos reactivos en el soporte: el protocolo es el descrito para glutaraldehido de 75 μ moles/ml gel, pero cuando el experimento se hacía con geles de 15 μ moles/ml gel se adicionaba cinco veces más cantidad de gel.
- En algunos casos la adsorción se realizó a 4°C o a 37°C.
- Cuando la proteína empleada era β -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*: el tampón empleado era Fosfato potásico 20 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 1,0 M pH 7,0. Y a los 0,4 ml de soporte se le adicionaban 2 ml de disolución enzimática que contenía 112 U/ml. Las medidas de actividad se siguieron por el ensayo espectrofotométrico descrito en el apartado 6.2.

7.2.- INMOVILIZACIÓN A SOPORTES GLIOXIL

7.2.1.- INMOVILIZACIÓN DE PGA A SOPORTES GLIOXIL

Para la unión a 25°C: se disuelven 60 mg del Sulfóxido de la Penicilina en 19,55 ml de bicarbonato 50 mM, NaCl 200 mM, pH 10,05. Una vez disuelto, se le adiciona primero el soporte (0,4 ml de gel Glioxil-75 ó 2 ml de Glioxil de 15 μ moles / ml gel) y seguidamente 20 UI de PGA. Esta suspensión se mantiene a 25°C con agitación suave. A parte, se preparaba un blanco en el que el volumen de gel glioxil se había sustituido por el mismo volumen pero de gel inerte, incubándolo también a 25°C. Y a distintos tiempos, se sacaban alícuotas del sobrenadante, y de la suspensión de la muestra, así como del sobrenadante del blanco, midiendo con el ensayo con pH-stato descrito anteriormente.

Para la unión a baja temperatura: (4°C) : El protocolo es el mismo, pero no se añade el sulfóxido de la Penicilina y las medidas se realizaban por el ensayo espectrofotométrico (descrito en el apartado 6.1.).

7.2.2.- UNIÓN DE β -GALACTOSIDASA A SOPORTES GLIOXIL

Se preparan 10 ml de una disolución enzimática que contiene 112 U /ml , empleando como tampón Bicarbonato potásico 40 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 1,0 M pH 10,0. A

esta dilución se le añaden 2 ml de soporte Glioxil-75 μ moles /ml de gel y se mantiene a 25°C con agitación suave, sacando alícuotas a distintos tiempos para medir la actividad enzimática de sobrenadante y suspensión. En este caso también se sigue la actividad de un blanco preparado en idénticas condiciones que la muestra pero sustituyendo el gel glioxil por gel inerte.

8.- UNIÓN DE CEFALEXINA A DISTINTOS SOPORTES

Se prepara una suspensión con 0,4 ml de soporte Glutaraldehido-75 μ moles/ml gel, en 19,24 ml de fosfato 50 mM, NaCl 200 mM pH 6,0 y se añade Cefalexina para obtener una concentración final 0,5 mM.

Esta mezcla, se mantiene con agitación suave a 25°C, sacando alícuotas de sobrenadante a distintos tiempos con objeto de ver la disminución de la absorbancia a 280 nm a medida que la Cefalexina se va uniendo al soporte.

- Cuando se empleaba soporte Glioxil, el tampón utilizado era: bicarbonato 50 mM, NaCl 200 mM, pH 10,05

9.- ADSORCIÓN HIDROFÓBICA MULTIPUNTUAL DE LIPASAS

9.1.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD:

Los ensayos enzimáticos estándar se realizaron por el seguimiento espectrofotométrico del incremento de absorbancia a 348 nm, (ϵ : 5150 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), provocado por la liberación del p-nitrofenol en la hidrólisis del pNPP. A esta longitud de onda, el p-nitrofenol absorbe lo mismo en su forma ionizada o sin ionizar, siendo por lo tanto independiente del pH. Los ensayos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro de UV-Visible, Shimadzu 160 provisto de agitación magnética y termostatación, utilizando cubetas de 1 cm de paso óptico.

El sustrato se preparó añadiendo 80 ml de una disolución de pNPP 200 mM en acetonitrilo a 40 ml de tampón fosfato 25 mM pH 7,0. De esta disolución, se añaden a la cubeta, donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis, 1,9 ml y tras esperar 10 minutos para equilibrar la temperatura se mide la hidrólisis espontánea del pNPP. A continuación, se

añaden 25 - 200 μ l de las alícuotas a medir. Comprobando que en el intervalo de actividades de trabajo, la actividad enzimática detectada es lineal con la cantidad de enzima añadida a la cubeta.

9.2.- PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ENZIMÁTICAS

- Lipasa de *Candida rugosa* (SIGMA): Se añaden 70 mg de extracto a 100 ml de fosfato 25 mM a pH 7,0; agitándose durante dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga 30 minutos a 12.000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante obtenido dializa a 4°C frente al tampón en una relación 1:200 y se almacena congelado.
- Lipasa de *Rhizopus japonicus* (BIOCATALYSTS LTD): Se disuelve 1 g de extracto en 100 ml de fosfato 25 mM a pH 7,0; agitándose a temperatura ambiente hasta disolución. La disolución enzimática obtenida, previa diálisis; se almacena congelada.
- Lipasa de *Rhizopus niveus* (AMANO): Se disuelven 4,4 g de extracto en 100 ml de fosfato 25 mM a pH 7,0; agitándose a temperatura ambiente durante una hora. Después se centrifuga 30 minutos a 4°C a 12.000 r.p.m y dializando previamente la disolución enzimática obtenida se almacena congelada.
- Lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (AMANO): Se disuelven 160 mg de extracto en 100 ml de fosfato 25 mM a pH 7,0; agitándose a temperatura ambiente durante una hora. Después se centrifuga 30 minutos a 4°C a 12.000 r.p.m y la disolución enzimática obtenida dializada se almacena congelada.

Las condiciones empleadas en la diálisis son las mismas en todos los casos.

9.3.- ADSORCIÓN DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS

Los soportes empleados fueron de dos tipos:

- De morfología tipo superficie plana: Octil-Sepharose, Fenil-Sepharose y Butil-Sepharose.
- De morfología tipo fibras finas: Fenil-Toyopearl.

Se añaden 2 ml de soporte hidrofóbico a 18 ml de la disolución enzimática y se mantiene con agitación suave y a temperatura constante (25 ó 4°C). Se prepara un blanco que contiene la misma cantidad de enzima pero el soporte hidrofóbico ha sido sustituido por

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

un volumen equivalente de agua. Las medidas de actividad se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en 8.1. El aumento de actividad (hiperactivación por unión de la lipasa al soporte hidrofóbico), está referido a las medidas de la suspensión frente al blanco; el porcentaje de lipasa adsorbida se calcula teniendo en cuenta el blanco.

- En ocasiones, se añade NaCl 1,0M en la disolución enzimática de partida, así como en su blanco correspondiente.
- Cuando se adsorbía la lipasa de *Pseudomonas Fluorescens*, la dilución lipásica de partida se diluía previamente; añadiendo a 0,2 ml de dicha dilución 17,8ml de tampón.
- En algunos experimentos, una vez adsorbida la lipasa, se lavaron los derivados con fosfato 25 mM pH 7,0, resuspendiéndolos en éste mismo tampón e incubándolos 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se midió el aumento de actividad de la suspensiones respecto al blanco (previamente incubado a 4°C, 24 horas). Esta hiperactivación se midió empleando el procedimiento descrito en 8.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- INTERACCIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL GLIOXIL AGAROSA-ENZIMA

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, por unión covalente multipuntual de enzimas a soportes glioxil-agarosa se han obtenido excelentes resultados, consiguiéndose un importante grado de estabilización, sin pérdidas muy significativas de actividad. Si la inmovilización multipuntual enzima-soporte glioxil tuviera lugar a través de una primera etapa de unión en la que estuvieran involucrados más de un grupo reactivo del soporte la morfología de la agarosa (fibras anchas) desempeñaría un papel decisivo en la velocidad de inmovilización.

1.1.- MECANISMO DE UNIÓN DE ENZIMAS A SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA

Se tenían algunos indicios que nos hacían pensar que la unión covalente multipuntual de enzimas a soportes glioxil-agarosa transcurría a través de enlaces químicos reversibles que solo daban lugar a una unión irreversible cuando tenían lugar varias uniones (reversibles) enzima-soporte.

Para comprobar estos indicios se estudió la influencia de algunos parámetros en la velocidad de unión enzima-soporte.

1.1.1.- INFLUENCIA DE LA DENSIDAD SUPERFICIAL DE GRUPOS REACTIVOS EN EL SOPORTE

Para estudiar el efecto de la densidad superficial de grupos reactivos en el soporte, en la velocidad de unión de las enzimas a los soportes glioxil-agarosa, se escogió la PGA.

Con objeto de comparar solo el efecto de la densidad superficial de grupos reactivos, se emplearon soportes Glioxil-agarosa con 75 y 15 μ moles de grupos glioxil/ml gel, manteniendo la cantidad de grupos constante (para esto añadíamos 5 veces más de soporte Glioxil-agarosa de 15 μ moles/ml gel que de 75).

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

En la tabla 6, se muestran los resultados obtenidos en la unión de PGA a 25°C a soportes glioxil-agarosa con distinta densidad superficial de grupos reactivos, tomando como tiempo aquel en el que se observa que se ha unido el 100% de la PGA al soporte Glioxil 75-agarosa.

Tabla 6: Porcentaje de PGA adsorbida a 25°C a soportes Glioxil-agarosa

SOPORTE	75 μ moles /ml gel	15 μ moles /ml gel
GLIOXIL	100 %	2 %

En esta tabla, se observa que cuando la PGA ofrecida a soportes glioxil con 75 μ moles/ml gel (alta densidad superficial de grupos reactivos en el soporte) se ha inmovilizado completamente, no se observa inmovilización apreciable en el caso de soportes glioxil-15 μ moles/ml gel (baja densidad superficial). Estos resultados parecen indicar que la densidad superficial de grupos en el soporte reactivos (y no la concentración) influye notablemente en la velocidad de inmovilización a soportes glioxil.

1.1.2.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INMOVILIZACIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la unión de PGA a dos temperaturas distintas (25 y 4°C) a soportes glioxil-agarosa con 75 μ moles de grupos glioxil/ml gel. Tomando como tiempo, el que tarda la PGA en unirse a 25°C a soportes Glioxil (unión del 100% de PGA ofrecida), y comparando con el porcentaje de enzima unido si la inmovilización tiene lugar a 4°C (0,5%), se observa que la dependencia de la velocidad de unión con la temperatura es muy grande.

SOPORTE	T ^a : 25°C	T ^a : 4°C
GLIOXIL-75	100%	0,5 %

1.1.3.- UNIÓN DE CEFALEXINA A SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA

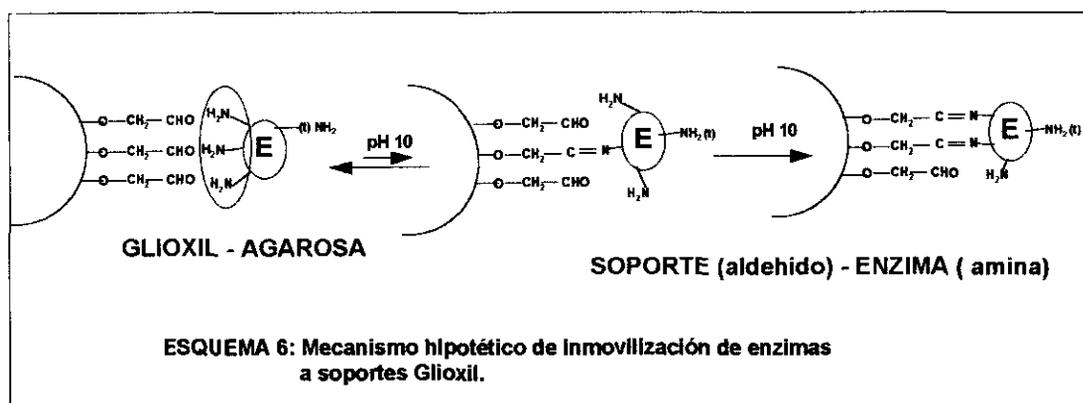
Para poder dilucidar el mecanismo de inmovilización de enzimas a soportes glioxil-agarosa se escogió la molécula de Cefalexina. Esta molécula posee un solo grupo amino de pK similar al amino-terminal de las proteínas. La molécula de Cefalexina no se une a soportes Glioxil-agarosa con 75 μ moles/ml gel. Esto indica que la unión de proteínas a soportes Glioxil por un punto (la Cefalexina solo posee un grupo amino) no es posible.

- Analizando los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de determinados parámetros en la velocidad de inmovilización de PGA a soportes glioxil-agarosa podemos destacar los siguientes puntos:

1. Gran dependencia de la velocidad de inmovilización con la densidad superficial de grupos reactivos en el soporte: para la primera inmovilización de la proteína se necesita una unión simultánea por al menos dos puntos. El que la proteína sea capaz de encontrar varios grupos (soportes con alta densidad superficial de grupos) reactivos sería decisivo en la velocidad de inmovilización de esta al soporte.
2. Gran dependencia con la temperatura: La unión enzima - soporte a pH 10,0 va a tener lugar a través de más de un grupo de la enzima requiriéndose para ello gran vibración. Esto hace que el factor temperatura sea de gran importancia en la velocidad de inmovilización.
3. Muy diferente a la unión de Cefalexina (pK parecido al amino-terminal): Esto es lógico puesto que la reacción tiene lugar por al menos dos grupos amino de las lisinas.

Esto parece indicar que la primera unión proteína -soporte glioxil involucra por lo menos a dos grupos reactivos del soporte (Esquema 6).

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

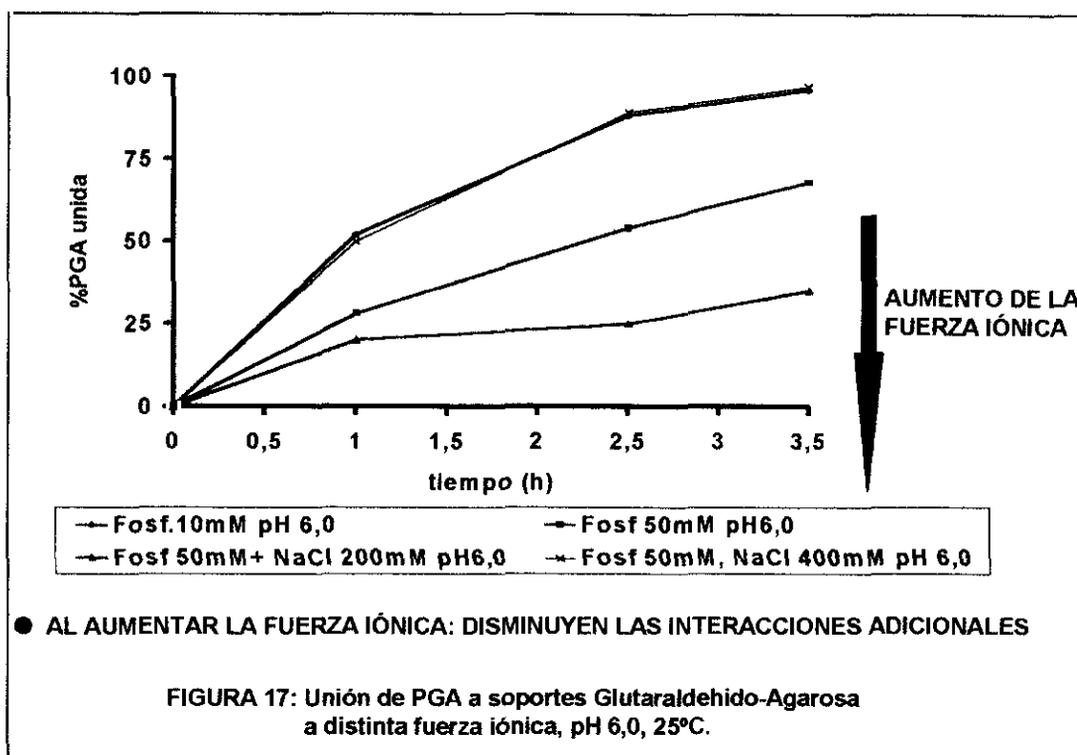


1.2.- COMPARACIÓN CON OTROS TIPOS DE UNIONES PROTEÍNA-SOPORTE: UNIÓN A SOPORTES GLUTARALDEHIDO-AGAROSA

Para estudiar el tipo de unión que tiene lugar al inmovilizar una proteína a soportes agarosa - glutaraldehido, se escogió la PGA. Trabajando a pH 6,0, solo los grupos amino de bajo pK (amino - terminal) podrían reaccionar con el soporte.

Debido a la existencia de grupos amino cargados positivamente en el soporte glutaraldehido-agarosa se estudió la influencia de la fuerza iónica en la velocidad de inmovilización de la PGA. En la figura 17, se representa el curso de inmovilización de la PGA a 25°C a soportes Glutaraldehido-(75 μ moles /ml gel)- Agarosa a distinta fuerza iónica. En ella se representa el porcentaje de enzima inmovilizada en el soporte a pH: 6,0 a distintos tiempos de reacción.

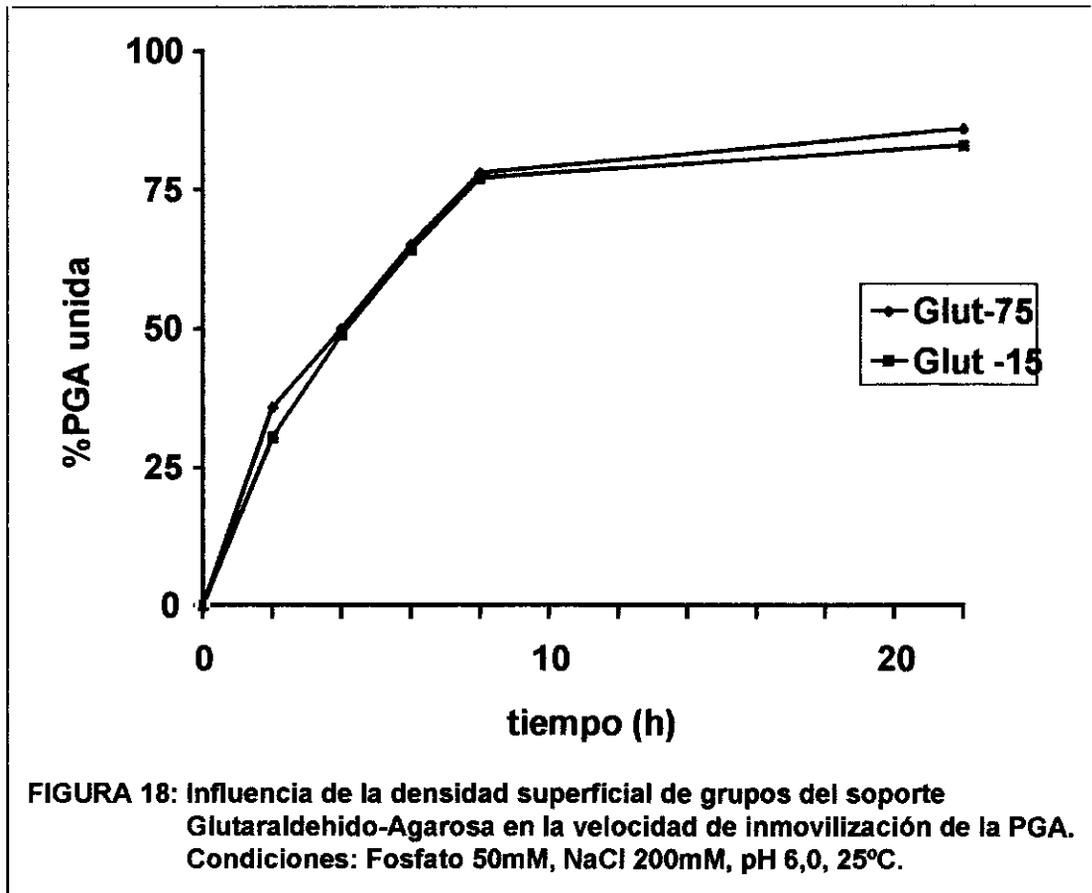
En la gráfica se observa como a medida que aumentamos la fuerza iónica del medio, la inmovilización se ralentiza. Esto indicaría que a baja fuerza iónica: la primera unión enzima - soporte es electrostática (dependiente de la fuerza iónica). Cuando inmovilizábamos en tampón Fosfato 50 mM, NaCl 400 mM pH 6,0 la cinética de unión era igual a la obtenida en tampón Fosfato 50mM, NaCl 200 mM pH 6,0 por lo que este último tampón sería suficiente para eliminar o por lo menos reducir notablemente la interacción electrostática. Por este motivo, para experimentos posteriores se trabajaba en tampón Fosfato 50mM, NaCl 200 mM pH 6,0.



1.2.1.- INFLUENCIA DE LA DENSIDAD SUPERFICIAL DE GRUPOS DEL SOPORTE

En la figura 18, aparecen representadas las cinéticas de unión de PGA a soportes Glutaraldehido de 75 y 15 μ moles de grupos reactivos/ml gel. Para comparar la cinética de unión de proteínas a soportes con distinta densidad de grupos, se mantuvo una concentración de grupos reactivos similar (añadíamos 5 veces más del soporte con 15 μ moles /ml de gel que del de 75 μ moles/ml de gel).

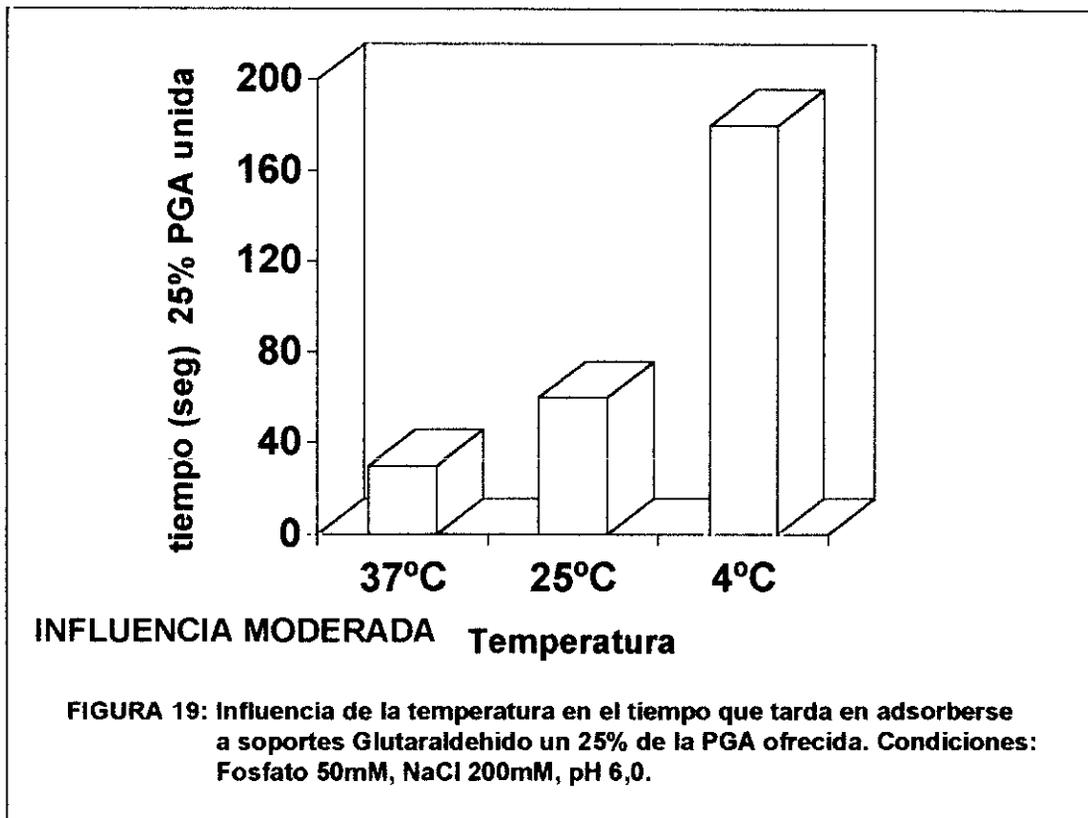
La densidad superficial de grupos reactivos en el soporte no influye en la velocidad de unión de la PGA a soportes glutaraldehido siendo ésta controlada tan solo por la cantidad de grupos reactivos.



1.2.2.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El efecto de la temperatura en la velocidad de inmovilización de la PGA a soportes Glutaraldehido-75 μ moles de grupos reactivos/ml de gel (Fosfato 50 mM, NaCl 200 mM pH 6,0) se refleja en la figura 19.

El aumento de la temperatura se traduce en un incremento en la velocidad de unión enzima-soporte, si bien, este *incremento es moderado* (al bajar la temperatura de 25 a 4°C la velocidad es unas tres veces más lenta).



1.2.3.- UNIÓN DE LA MOLÉCULA DE CEFALEXINA A SOPORTES GLUTARALDEHIDO-AGAROSA:-

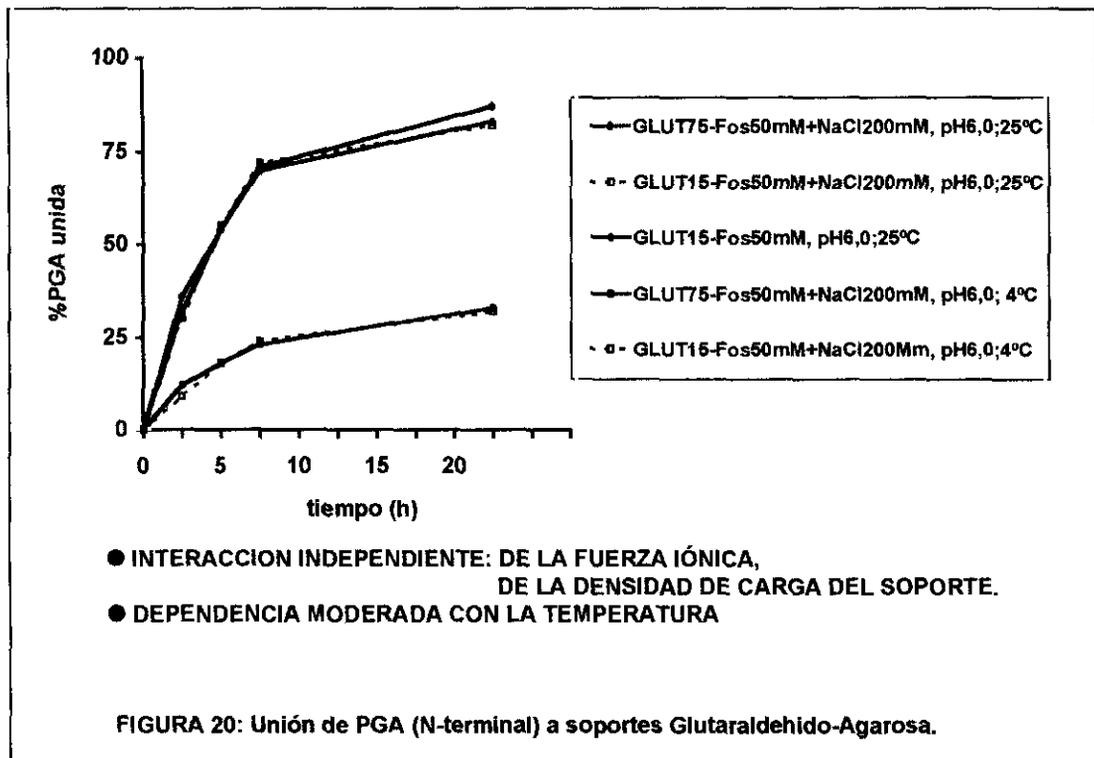
Con el fin de verificar el tipo de unión enzima-soporte Glutaraldehido que tiene lugar: se escogió la molécula de Cefalexina, que posee un solo grupo amino de pK similar al pK del amino-terminal de las proteínas, comparando la velocidad de unión de la Cefalexina con la de otra enzima (PGA) a soportes Glutaraldehido (Tabla 7):

Tabla 7: Comparación del porcentaje adsorbido de PGA y de Cefalexina al cabo de 1,5 h.

SOPORTE	UNIÓN PGA	UNIÓN CEFALEXINA
GLUTARALDEHIDO	50 %	47 %

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

En esta tabla se observa que la velocidad de unión es prácticamente igual en ambos casos lo que indica que la enzima se une al soporte por un solo grupo amino de pK similar al pK del grupo amino de la Cefalexina. Las características de la unión de las proteínas a soportes Glutaraldehido (empleando como proteína modelo la PGA) se pueden resumir en los siguientes puntos (Figura 20):



- 1.- Independencia con la densidad superficial de grupos reactivos del soporte
- 2.- Dependencia moderada con la Temperatura.
- 3.- Unión similar a la de la molécula de Cefalexina.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

De estos resultados podemos confirmar que la unión de enzimas a **soportes glutaraldehído** (a alta fuerza iónica) transcurre a través de una **primera unión unipuntual por un grupo amino de bajo pK** (presumiblemente el amino terminal).

1.3.- IMPORTANCIA DE LA MORFOLOGÍA DEL SOPORTE EN UNIONES UNI Y MULTIPUNTUALES

Como se ha demostrado anteriormente, al inmovilizar las enzimas a soportes glioxil, el mecanismo de unión transcurre a través de una primera etapa que implica a más de un grupo reactivo del soporte, en este caso podría pensarse que la morfología del soporte debe desempeñar un papel decisivo en la velocidad de inmovilización.

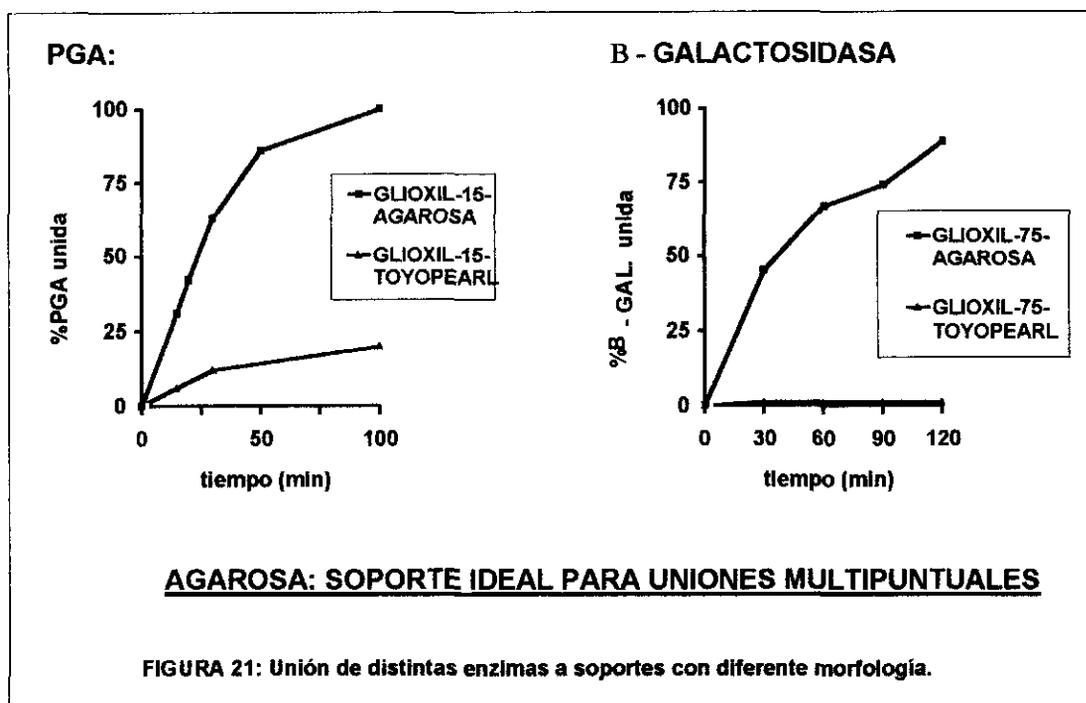
- La **agarosa** esta constituida por fibras gruesas (200 Å de diámetro) que para la mayoría de las proteínas semejan una superficie plana contra la cual interaccionan. La buena congruencia geométrica de las enzimas con estos soportes favorecería la interacción multipuntual enzima-soporte Glioxil agarosa.
- Sin embargo, otro tipo de soportes, como son, soportes Toyopearl por su estructura tipo fibras finas (de diámetro mucho menor) dificultarían la interacción multipuntual (enzima-soporte Glioxil Toyopearl).

Y, si el mecanismo de inmovilización transcurría como primer paso por un sólo punto (proteína-soporte Glutaraldehído), la cinética de unión sería independiente de la morfología del soporte empleado(fibras anchas/fibras finas).

1.3.1.- INFLUENCIA DE LA MORFOLOGÍA DEL SOPORTE (FIBRAS ANCHAS/FIBRAS FINAS) EN LA UNIÓN DE PROTEÍNAS A SOPORTES GLIOXIL.

La primera interacción proteína-soporte glioxil parece involucrar más de un grupo reactivo del soporte. En la figura 21 aparece representada la velocidad de inmovilización de dos proteínas de distinto tamaño (PGA Pm: 88KD, β -Galactosidasa Pm: 200KD) a soportes de diferente morfología. La dependencia con el soporte es notable, tanto más cuanto mayor es el tamaño de la proteína. Ambas enzimas se unen rápidamente a soportes agarosa-

glioxil 75. Sin embargo cuando empleamos soportes toyopearl la unión es mucho más lenta en el caso de la PGA, y la β -galactosidasa no se une.

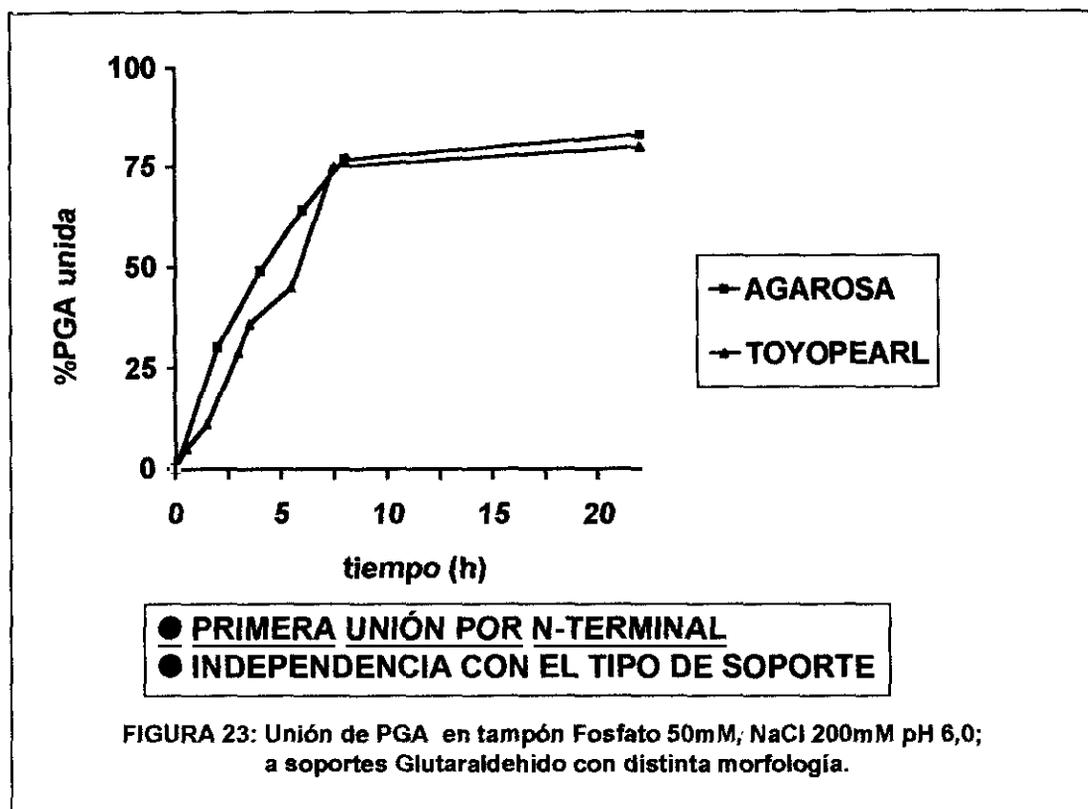


En la figura 22 se esquematiza la explicación más probable: debido al diámetro de las fibras de agarosa, la proteína "confunde" a esta con una superficie plana (gran tamaño de las fibras de agarosa frente al tamaño de la proteína) facilitándose la multiinteracción proteína-soporte por la buena congruencia de este. Este efecto es más significativo cuanto mayor es el tamaño de la proteína a inmovilizar (β -Galactosidasa). Sin embargo al emplear soportes Toyopearl, la congruencia del soporte con la enzima es menor por lo que la unión multipuntual enzima-soporte glioxil está mucho más dificultada y esto se hace notar en la velocidad de inmovilización de las enzimas a estos soportes. La agarosa por su morfología de superficie plana es un soporte ideal para la unión multipuntual de enzimas.



1.3.2.- INFLUENCIA DE LA MORFOLOGÍA DEL SOPORTE EN LA UNIÓN DE ENZIMAS A SOPORTES GLUTARALDEHIDO

Los datos obtenidos anteriormente indican que la interacción proteína-soporte glutaraldehido (a alta fuerza iónica) tiene lugar a través de una primera interacción unipuntual. A pH 6,0 esta interacción transcurre por un grupo amino de bajo pK (seguramente el amino terminal). A continuación, se estudió la influencia de la morfología del soporte en la velocidad de inmovilización de la PGA, representando en la figura 23 los resultados obtenidos. En esta gráfica se observa que la cinética de inmovilización de la PGA a soportes glutaraldehido es independiente de la morfología del soporte empleado.



También se llevó a cabo el mismo experimento pero esta vez con una enzima de mayor tamaño; la β -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Pm 200 KD) (Cavaille, D. y col. 1995). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Velocidad de unión de la β -Galactosidasa a soportes con distinta morfología

TIEMPO	SOPORTE	% β -GAL UNIDA
0	AGAROSA - 15	0%
	TOYOPEARL- 15	0%
30'	AGAROSA - 15	26%
	TOYOPEARL - 15	20%
3 h	AGAROSA -15	38%
	TOYOPEARL - 15	34%

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

En ambos casos, independientemente del tamaño de la proteína escogida, la morfología del soporte no influye en la velocidad de inmovilización a soportes glutaraldehido. La inmovilización de proteínas a soportes Glutaraldehido, tiene lugar a través de una primera unión unipuntual, por un grupo amino de bajo pK, de manera que la morfología del soporte empleado, al ser la primera unión unipuntual, no influye en la velocidad de inmovilización al soporte.

2.- ADSORCIÓN MULTIPUNTUAL DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS

Como se explicaba en la introducción: las lipasas poseen una cadena proteica en α -hélice que actúa a modo de "tapadera" del centro activo. En medio acuoso homogéneo, el enzima se encuentra en equilibrio tapadera abierta/tapadera cerrada, estando éste equilibrio normalmente desplazado hacia la forma cerrada. Cuando las lipasas se encuentran con una interfase lípido-medio acuoso, tiene lugar la unión multipuntual interfase hidrofóbica-lipasa (área hidrofóbica situada alrededor del centro activo). El equilibrio se desplaza hacia la forma abierta (esquema 7), exponiendo el centro activo al medio de reacción (Malacata, F.X. y col. 1992; Mingarro, Y. y col. 1995) y observándose un aumento de actividad respecto a la obtenida en ausencia de interfase (adsorción interfacial). La agarosa es un soporte hidrofílico, al que podemos derivatizar introduciendo grupos hidrofóbicos en su superficie. El soporte hidrofóbico por interacción multipuntual con la tapadera, también hidrofóbica podría actuar a modo de interfase sólida provocando la apertura de la tapadera y posibilitando el acceso del sustrato al centro activo. Al ser la interacción multipuntual el empleo de soportes de morfología tipo fibras anchas, en principio podría facilitar la adsorción interfacial de lipasas.



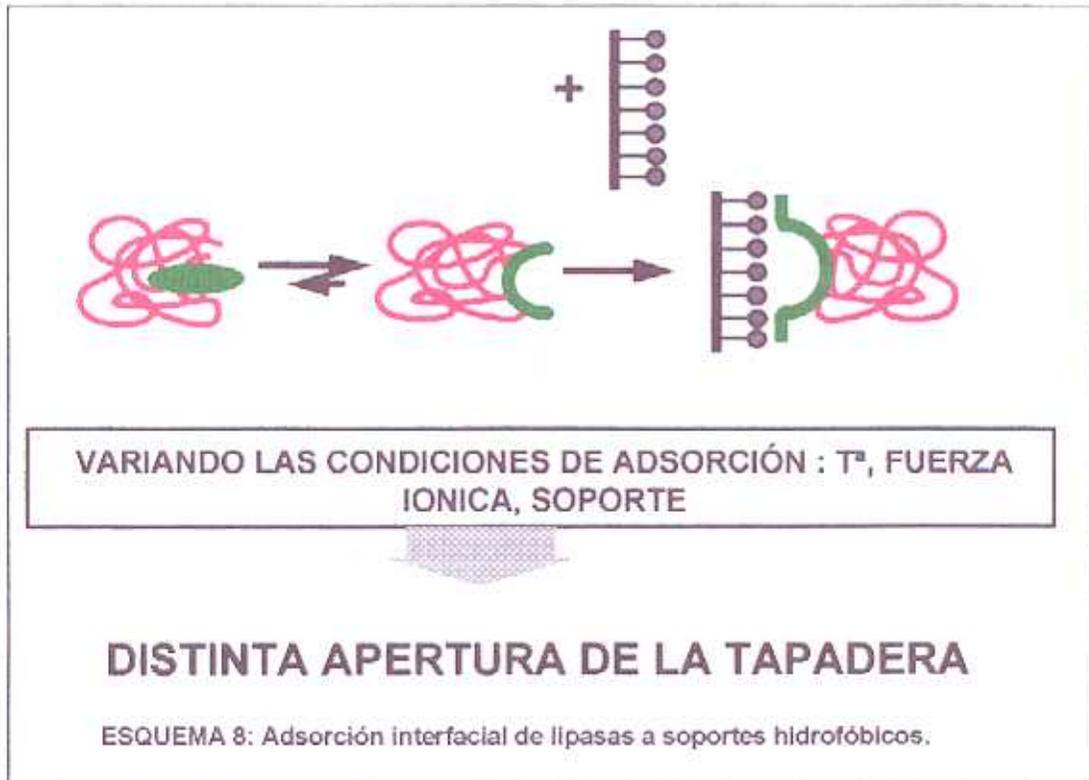
2.1.- EFECTOS DE LA ADSORCIÓN DE LIPASAS A SOPORTES HIDROFÓBICOS

Para estudiar la validez de los soportes hidrofóbicos de agarosa en procesos de adsorción interfacial de lipasas (esquema 8), se han elegido soportes con alto grado de hidrofobicidad (octil). Las lipasas de: *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizopus japonicus* se adsorbieron a soportes muy hidrofóbicos (Octil-Sepharosa) estudiando los efectos de dicha adsorción. La adsorción de las lipasas se realizó en distintas condiciones:

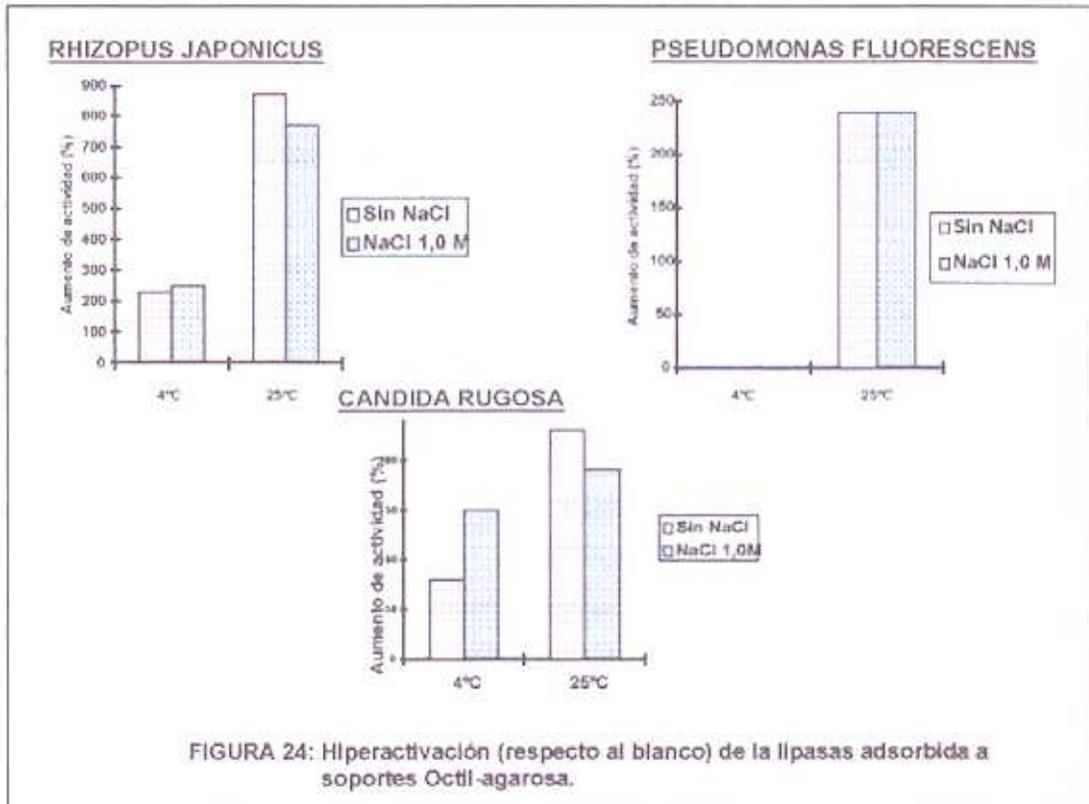
- Adsorción a 25°C: en ausencia y en presencia de NaCl 1,0M.
- Adsorción a 4°C: en ausencia y en presencia de NaCl 1,0 M.

En todos los casos, una vez adsorbida la lipasa, se medía la actividad de la suspensión. En la figura 24, aparece representado el aumento de actividad (%) de la lipasa

adsorbida al soporte hidrofóbico frente a las lipasas solubles incubadas en las mismas condiciones en las que se había realizado la adsorción.



En general, parece que la lipasa en presencia de un soporte hidrofóbico, que simula una interfase lípido-agua, se adsorbe de forma que se provoca un aumento de actividad (respecto al valor obtenido en ausencia de interfase). Este aumento de actividad, varía con la lipasa empleada, así como con las condiciones utilizadas en la adsorción, pudiendo dar aumentos de actividad del 900 % tal y como se observa en la figura para el caso de *Rhizopus japonicus*.



2.2.- ADSORCIÓN A SOPORTES CON DISTINTA MORFOLOGÍA Y DIFERENTE GRADO DE HIDROFOBICIDAD

A continuación se estudió la influencia de la hidrofobicidad del soporte así como de su morfología en la velocidad de unión lipasa-soporte.

2.2.1.- VELOCIDAD DE UNIÓN LIPASA-SOPORTE.

Para ver el efecto del grado de hidrofobicidad del soporte en la velocidad de unión a soportes de agarosa (fibras anchas), se escogieron soportes Octil, Fenil y Butil Agarosa. Asimismo, para poder comparar el efecto de la morfología del soporte, se trabajó también con soportes Fenil-Toyopearl (fibras finas).

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

En la tabla 9, aparecen reflejados los porcentajes de la lipasa de *Rhizopus niveus* adsorbida a 25°C, a cada uno de los soportes:

Tabla 9: Porcentaje de lipasa adsorbido a distintos soportes hidrofóbicos

Tiempo	Soporte	% Ads
2h	AgsOctil	71%
	AgsFenil	55%
	AgsButil	10%
	ToyoFenil	8%

En esta tabla se observa que:

- El porcentaje de lipasa adsorbida al cabo de 2 horas, varía con el grado de hidrofobicidad del soporte (octil, fenil, butil), siendo la adsorción más rápida cuanto mayor es la hidrofobicidad del soporte (octil).
- Si comparamos soportes con la misma hidrofobicidad (fenil) y distinta morfología: la adsorción a soportes de agarosa es más rápida.

Cuando se adsorbe a 4°C la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, se observa un comportamiento muy parecido (tabla 10).

Tabla 10: Porcentaje de lipasa adsorbido a distintos soportes hidrofóbicos

Tiempo	Soporte	%Ads.
1h	AgsOctil	80%
	AgsFenil	50%
	AgsButil	15%
	ToyoFenil	20%

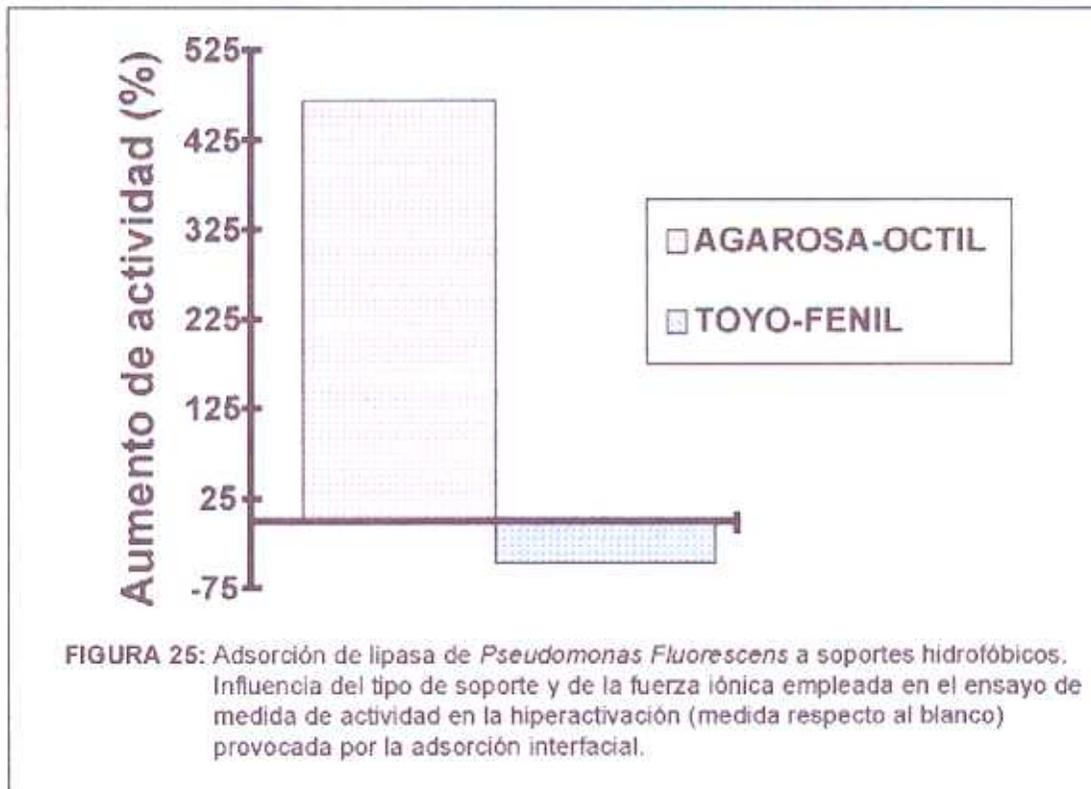
De los datos mostrados en ambas tablas, puede deducirse que:

- **Con soportes de agarosa ("superficie plana"):** En ambos casos se observa que a medida que la hidrofobicidad del soporte aumenta, se incrementa la velocidad de adsorción de la lipasa.

- Comparando **soportes** con el mismo grado de hidrofobicidad pero **distinta morfología** (Agarosa Fenil y Toyopearl Fenil). La velocidad de adsorción de la lipasa depende de la morfología del soporte. Cuando el soporte es tipo "superficie plana" la adsorción es más rápida que cuando la lipasa interacciona con fibras finas.

Al adsorber la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* a 25°C se observaba el mismo comportamiento en la velocidad de adsorción pero podrían existir diferencias en el tipo de interacción que darían lugar a una mayor o menor hiperactivación de la lipasa respecto al blanco. Para saber si la morfología del soporte determinaba este factor, con los derivados obtenidos se estudiaron diferencias en la forma de inmovilización, escogiéndose derivados preparados con soportes de diferente morfología (Octil-Agarosa y Fenil-Toyopearl).

En la Figura 25 se muestran las hiperactivaciones observadas para ambos derivados, previa incubación a 4°C durante 24 h. Cuando se emplean soportes Octil-Agarosa se produce un aumento de la actividad de la lipasa adsorbida frente a la lipasa en ausencia de interfase hidrofóbica (blanco). Sin embargo el empleo de soportes hidrofóbicos Fenil-Toyopearl, permiten la adsorción de la lipasa pero dicha adsorción provoca incluso la disminución de un 50% de la actividad frente al blanco.

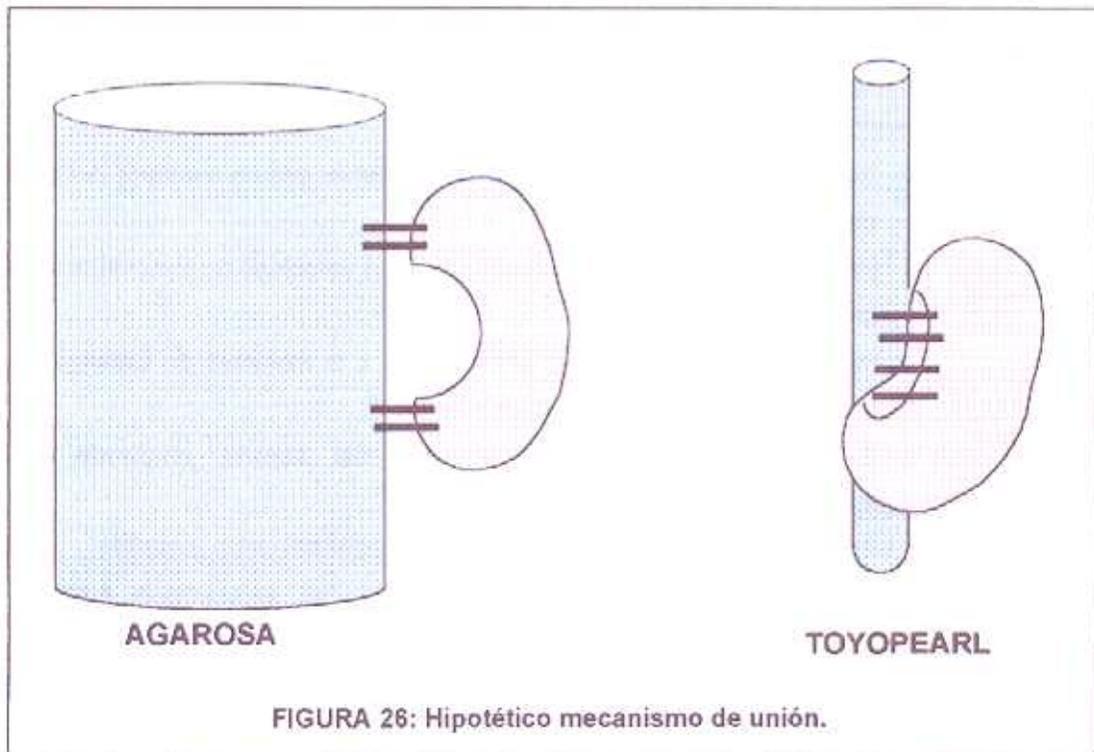


Con los resultados obtenidos se desarrolló la siguiente hipótesis: La morfología del soporte influye no sólo en la fortaleza y velocidad de unión sino en la forma en que la lipasa puede interaccionar con el soporte (figura 26).

- Cuando empleamos soportes de agarosa (fibras anchas): la adsorción multipuntual lipasa-agarosa hidrofóbica produce una apertura de la tapadera que posibilita el acceso del sustrato al centro activo, siendo el grado de apertura modulable por factores tales como la fuerza iónica. La lipasa se uniría al soporte (superficie-plana) por las esquinas de la tapadera, dejando libre el centro activo.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

- En el caso de fenil-toyopearl las fibras (hidrofóbicas) son finas y la lipasa puede acoplarse a ellas cerrando así el centro activo e impidiendo el acceso de sustratos (incluso de pequeño tamaño).



CONCLUSIONES:

1.- Interacción covalente multipuntual agarosa - proteína

El estudio de la influencia de determinados factores en la unión de PGA (proteína utilizada como modelo) a soportes agarosa nos lleva a las siguientes conclusiones. La unión de proteínas a soportes activados con grupos convencionales, ejemplificada en el caso del Glutaraldehido a alta fuerza iónica.

- Es independiente de la densidad superficial de grupos reactivos del soporte empleado.
- Presenta una dependencia moderada de la velocidad de inmovilización con la temperatura.
- Presenta una velocidad de unión similar a la molécula de Cefalexina (pK parecido al amino terminal de la PGA).
- Es independiente de la morfología del soporte empleado en la inmovilización.

Todo esto, indica que a alta fuerza iónica la primera unión proteína - soporte Glutaraldehido tiene lugar por un solo punto (amino de bajo pK, seguramente a través del amino - terminal).

En cambio, cuando se trata de soportes Glioxil, las características observadas fueron las siguientes:

- Gran dependencia con la densidad superficial de grupos reactivos del soporte.
- Gran dependencia con la temperatura.
- Velocidad de unión muy diferente a la de la molécula de Cefalexina.
- Gran dependencia con la morfología del soporte empleado en la inmovilización, siendo esta diferencia más drástica cuando el tamaño de la proteína es mayor.

Agarosa como Soporte para Interacciones Multipuntuales

Estas características indican que *la primera unión proteína-soporte glioxil tiene lugar al menos por dos puntos.*

- Esto da lugar a una nueva orientación (respecto a los métodos convencionales) a través de la región de la proteína más rica en aminoácidos reactivos.

En este caso, la morfología de la agarosa hace de esta un **soporte ideal para la unión multipuntual**.

2.- Adsorción Hidrofóbica Multipuntual de Lipasas

Los soportes hidrofóbicos de agarosa pueden ser empleados para procesos de Cromatografía Interfacial de lipasas. *En general, una mayor hidrofobicidad del soporte facilita la adsorción de la lipasa.* Además la morfología del soporte también influye en la *velocidad de unión* estando, en general, *favorecida en soportes de agarosa* frente a Toyopearl.

La adsorción parece ser diferente al variar la morfología interna del soporte empleado:

- **Agarosa:** Debido a su estructura tipo superficie, la unión parece tener lugar por los extremos de la tapadera hidrofóbica, quedando el centro activo en un bucle que permite el acceso del sustrato.
- **Toyopearl:** en este caso la interacción podría tener lugar por una zona más próxima al centro activo, dificultándose el acceso del sustrato.

La agarosa es un buen soporte para la adsorción interfacial de lipasas sobre superficies sólidas.

La morfología de la agarosa, capacita especialmente a este soporte para procesos de interacción multipuntual proteína-soporte.

III.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A QUELATOS METÁLICOS

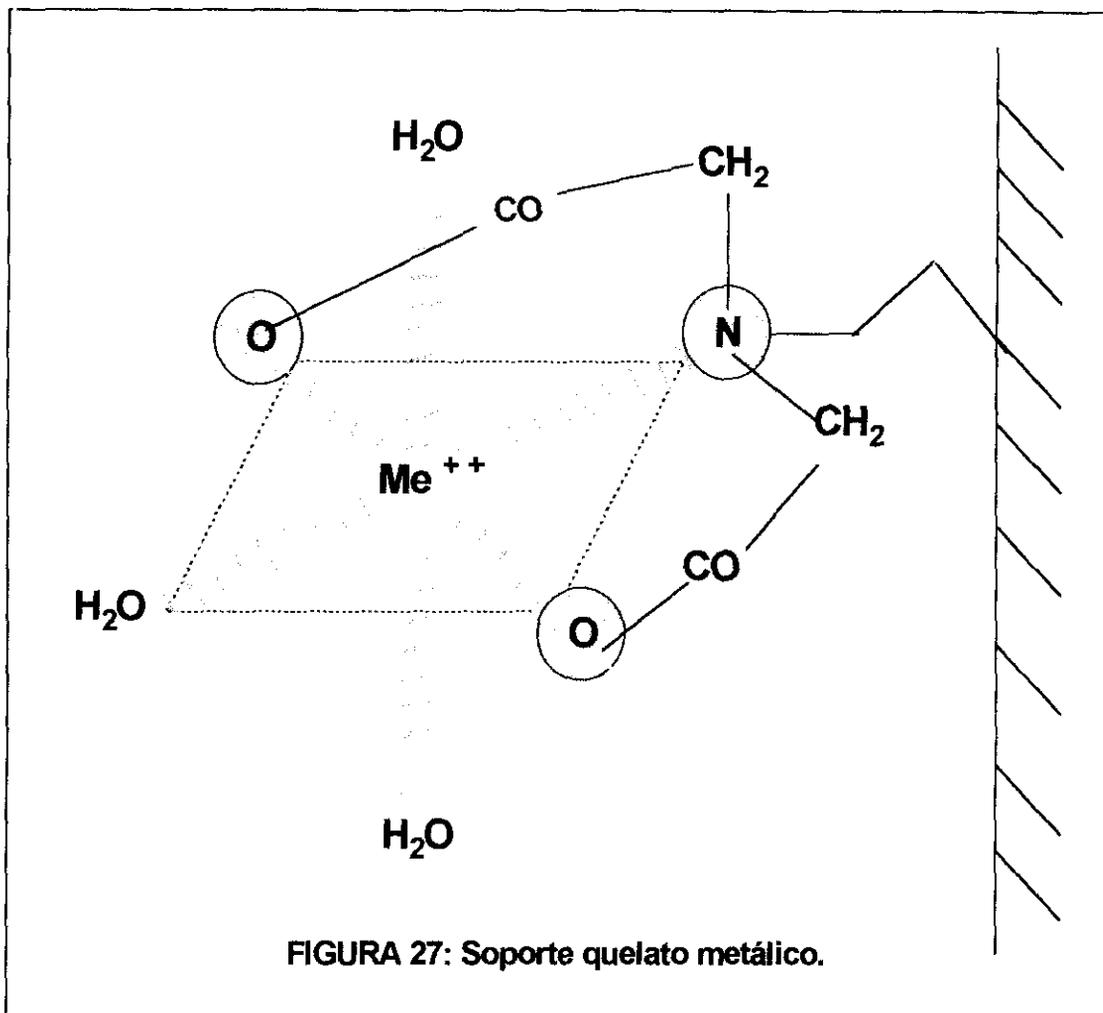
INTRODUCCIÓN

1.- CROMATOGRAFÍA DE PROTEÍNAS NATIVAS SOBRE QUELATOS METÁLICOS

La Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos, desarrollada por Porath en 1975 (Porath, J. 1975), se basa en la interacción entre determinados residuos superficiales de proteínas (Histidinas, Cisteínas y en menor grado Triptófanos) y cationes de metales de transición que se encuentran formando quelatos con ligandos policarboxílicos (Yip, T-T. y col. 1994) (Figura 27).

El ion metálico actúa como aceptor de electrones (ácido de Lewis), pero el centro de la adsorción no implica solo al metal sino que se forma un complejo estable en el que participa el complejo ligando-metal. Antes de la interacción el complejo se encuentra coordinado por moléculas de agua, pero la interacción de las proteínas tiene lugar por la sustitución de estas moléculas de agua por residuos (no contiguos) de His principalmente (Anspach, F.B. 1994; Hemdan, E.S. y col. 1985), que actúan como donadores de electrones (compartidos por toda la estructura) (Porath, J. 1992; Mallia, A.K. y col. 1992). De esta manera, proteínas que tengan en su superficie residuos His con diferente densidad y distribución interaccionarán con diferente intensidad con estos geles y tanto por adsorción selectiva como por desorción controlada con concentraciones crecientes de imidazol podrían separarse las diferentes proteínas (Hochuli, 1985; Kato, Y. y col. 1986; Luong, C.B.H. y col. 1992; Andersson, L. y col. 1985; Figueroa, A. y col. 1986; Woker, R. y col. 1992; Porath, J. y col. 1991). De hecho, en algunos casos se han logrado purificaciones casi totales mediante esta sencilla técnica cromatográfica (Porath, J.. 1988). Esto unido a la continua aparición de nuevos soportes de afinidad (Miron, T. y col. 1981; Hemdan, E.S., y col. 1985; Rassi, Z. y col. 1986; Hochuli, E.. y col. 1987; Anspach, F.B. 1994) hace de la Cromatografía de afinidad sobre quelatos metálicos una buena herramienta para la purificación de proteínas. En la actualidad ha tenido diversas **aplicaciones**: análisis de la composición de aminoácidos de algunos péptidos (Yip, T.T. y col. 1989), separación de péptidos y α -aminoácidos (Rothenbühler, E. y col. 1979), separación de anticuerpos

monoclonales (Belew, M. y col. 1986), evaluación de la estructura de la superficie de algunas proteínas (Hemdan, E.S. y col. 1989).

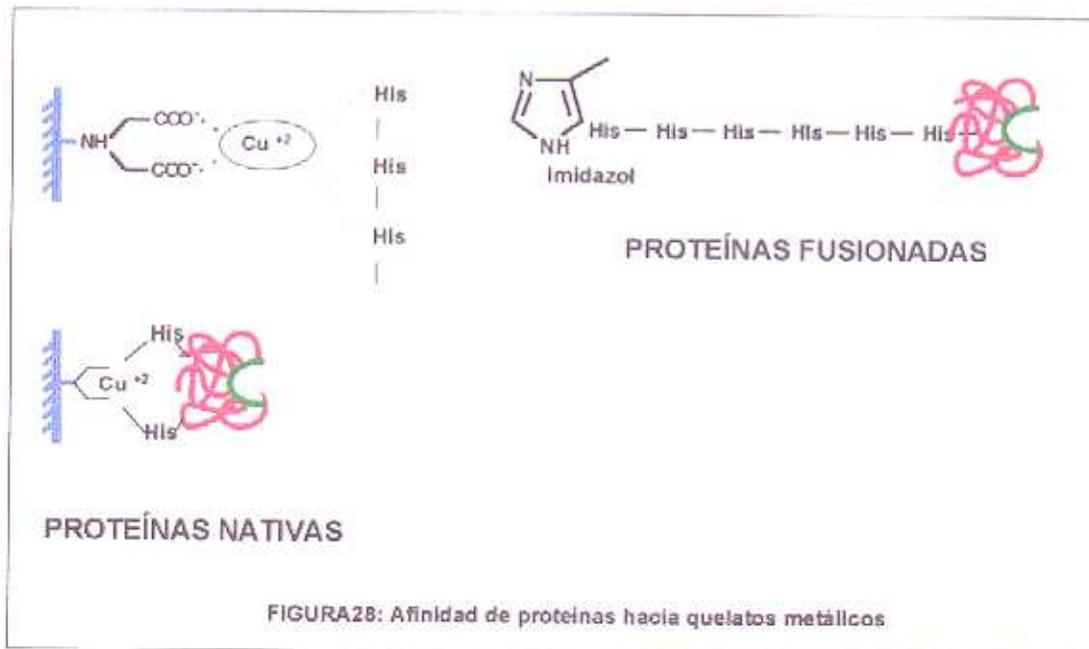


2.- PROTEÍNAS DE FUSIÓN

En los años ochenta ha tenido lugar el desarrollo definitivo de la ingeniería de proteínas pudiéndose preparar proteínas de fusión por unión de genes de dos proteínas, de

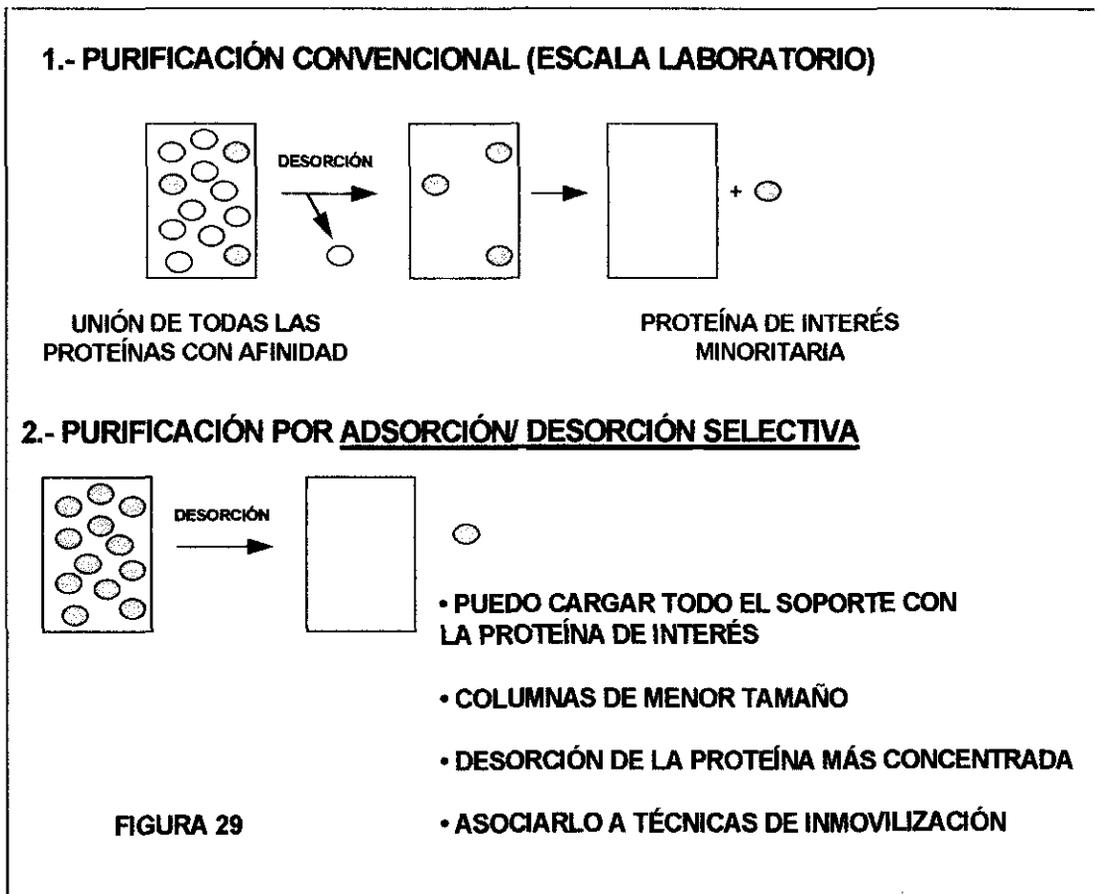
Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

una proteína y un poli-péptido, etc. (Ljungquist, C. 1989.). A partir de estas nuevas técnicas se comprobó que la fusión de proteínas con colas de 4, 6 u 8 histidinas producía unas proteínas quiméricas con una altísima afinidad hacia los quelatos metálicos (figura 28). Esta fusión, apenas provoca cambios en la estructura y función (actividad-estabilidad) de las proteínas de interés y por ello, hoy en día, muchísimas enzimas industriales se producen fusionadas con poli-His y de este modo se pueden purificar fácilmente en un solo paso por Cromatografía de Afinidad sobre quelatos metálicos (Paborsky, L.R. y col. 1996; Piesecki, S. y col. 1993).



A escala laboratorio se suelen adsorber conjuntamente estas proteínas de fusión y las proteínas nativas con mayor afinidad. Posteriormente se diseña una desorción selectiva (con gradientes de imidazol o de pH), donde las proteínas nativas se desorben antes que las proteínas de fusión, desorbiéndose estas últimas finalmente prácticamente puras. A una escala más industrial, la reducción del volumen de la columna cromatográfica adquiere

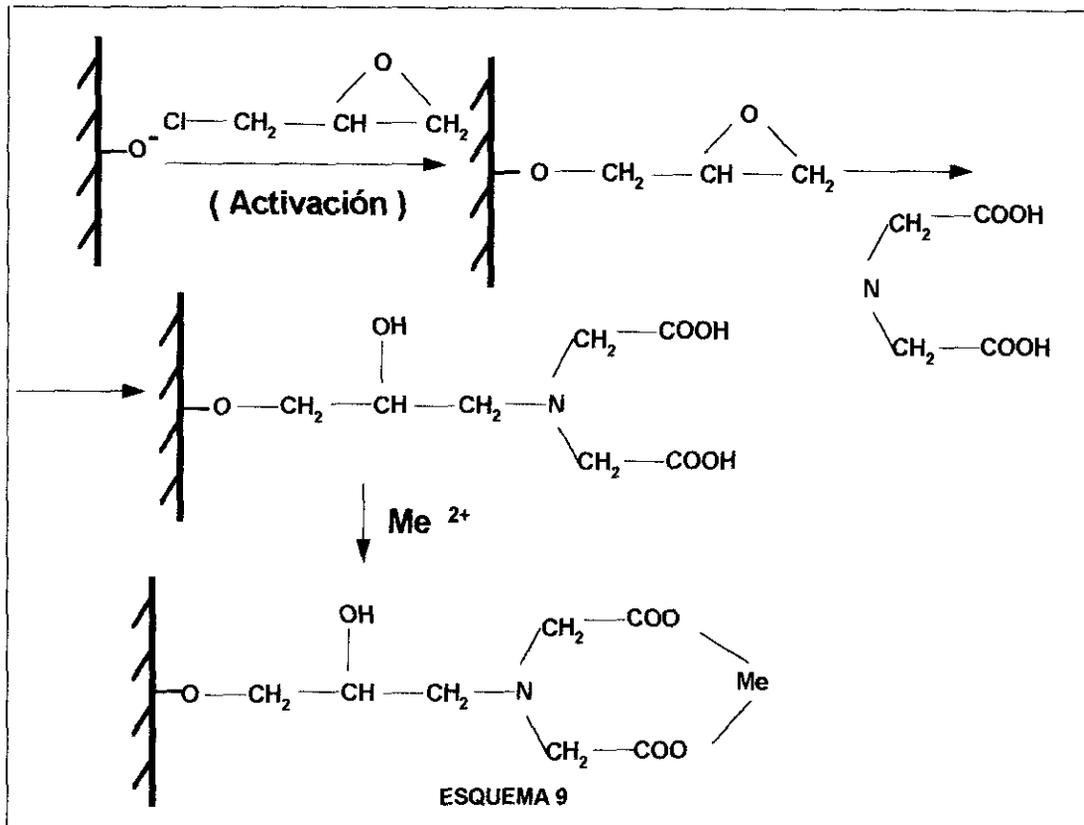
especial relevancia y por ello la posibilidad de adsorber casi únicamente las proteínas de fusión adquiere una importancia considerable pues nos permitiría optimizar la velocidad y el coste del proceso de purificación (figura 29).



3.- GELES DE AGAROSA COMO SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD SOBRE QUELATOS METÁLICOS

La preparación de **soportes** requiere el empleo de matrices adecuadas. Por su carácter extremadamente inerte e hidrofílico los geles de agarosa son soportes casi-ideales para diseñar cromatografía de afinidad de proteínas. Introduciendo los ligandos *correspondientes podremos asegurar que tendremos una interacción pura* entre las proteínas y los ligandos sin ninguna interferencia de interacciones adicionales proteína-soporte. Sin embargo, tal y como indicamos en la Introducción General de esta tesis doctoral, los geles de agarosa están constituidos por fibras gruesas de polisacáridos, las *cuales cuando están muy activadas pueden dar lugar a diferentes interacciones multipuntuales con proteínas que si bien presentan muchas ventajas en procesos de inmovilización multipuntual, pueden dificultar la optimización de los procesos de cromatografía de afinidad.*

La interacción entre la proteína y la matriz no tiene lugar directamente, sino a través de la formación de un quelato metálico, por lo que es preciso la previa derivatización de la matriz hasta la formación del quelato. Para ello, en nuestro caso, realizábamos la activación de agarosa con reactivos bifuncionales (Sundberg, L. y col. 1974; Hemdan, E.S. y col. 1985) de diversa longitud (y con distinto grado de activación) introduciendo grupos epóxido que pueden interaccionar con ligandos quelantes (IDA) obteniendo el soporte agarosa - ácido dicarboxílico que por posterior interacción con un metal de transición nos daría el soporte agarosa-quelato metálico (Esquema 9)



4.- CROMATOGRAFÍA DE PROTEÍNAS NATIVAS, PROTEÍNAS DE FUSIÓN MONOMÉRICAS Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN MULTIMÉRICAS

La interacción de los quelatos metálicos puede tener diferentes requerimientos dependiendo del tipo de proteínas que queramos purificar.

- Las proteínas nativas podrán adsorberse más o menos dependiendo de la densidad de ligandos, de la longitud del brazo espaciador y del catión empleado para la preparación del quelato. Variando estos parámetros quizás podremos optimizar tanto la adsorción como la desorción selectiva de las proteínas nativas y ello nos permitiría diseñar diferentes protocolos de purificación de proteínas.

- Para purificar proteínas monoméricas fusionadas con una única cola de poli-His añadida al amino terminal, podría ser interesante reducir al máximo la adsorción de las proteínas nativas para lograr que el primer proceso de adsorción sea ya lo más selectivo posible.

En este caso se escogió como proteína monomérica fusionada, Glutaril acilasa fusionada con una cola de 6 histidinas. La Glutaril acilasa nativa de *Acinetobacter sp. ATCC53891*, está formada por dos subunidades distintas que están procesadas a partir de una cadena polipeptídica precursora única. Una subunidad α con un peso molecular de 16.000 y la subunidad β de 54.000. Las dos subunidades están unidas por fuerzas hidrofóbicas y de plegamiento (Sudhakaran, V.K. y col. 1992). Como acabamos de mencionar, esta proteína se forma a partir del procesamiento de un monómero por lo que la proteína fusionada, solo posee un único dominio de fusión.

- Para purificar proteínas diméricas con dos dominios de fusión hemos de tener en cuenta que se podrían formar uniones multipuntuales (favorecidas al emplear soportes de agarosa), bien entre las dos colas poli-His y dos quelatos e incluso entre dos colas poli-His y un único quelato. En ambos casos la adsorción selectiva sería incluso más sencilla pero el problema puede ser la desorción en condiciones suaves, ya que probablemente sea preciso bajar mucho más el pH o aumentar la concentración de imidazol para lograr la desorción.

En este caso, como proteína dimérica con dos dominios de fusión se escogió la D-Aminoácido oxidasa fusionada. Esta enzima proviene de la DAO nativa de *Trigonopsis variabilis*, la cual es una enzima citoplasmática formada por dos subunidades. El peso molecular del monómero corresponde a 86.000 D y posee dos moléculas de FAD unidas no covalentemente a cada una de las subunidades (Szwajcer, E. y col. 1985; D'Aniello, A. y col. 1993). Como consecuencia de lo que acabamos de mencionar, la fusión de colas de histidina tiene lugar en ambos dominios. Se tratará de estudiar la posibilidad de la unión al soporte de agarosa por ambos dominios de fusión a través de cada una de las colas de histidinas ya que debido a la morfología de la agarosa, este soporte es ideal para uniones multipuntuales.

OBJETIVOS

- La agarosa, es un soporte bastante inerte e hidrofílico, pero *debido a su morfología, superficie plana, la interacción proteína-soporte está muy favorecida* con lo que en procesos de purificación de proteínas es posible que otras proteínas queden retenidas. Esto dificulta la purificación de proteínas, de manera que, en primer lugar se caracterizaran los soportes, para abordar seguidamente el problema de las adsorciones inespecíficas. El propósito es llevar a cabo adsorciones selectivas de la proteína de interés.
- En este capítulo, también se tratará la posibilidad de inmovilizar proteínas con dos dominios de fusión, por interacción de ambas colas de histidinas con soportes con gran densidad superficial de grupos reactivos.

1.- Caracterización de distintos soportes de agarosa para la purificación por adsorción/desorción selectiva de proteínas fusionadas por Cromatografía de Afinidad sobre Quelatos Metálicos

La adsorción/desorción selectiva presenta algunas ventajas frente a la purificación convencional (adsorción de todas las proteínas con afinidad y desorción gradual hasta la obtención de la proteína de interés):

- Podemos cargar todo el soporte con la proteína de interés: se reduce el tamaño de las columnas para la obtención de una misma cantidad de proteína purificada.
- Podemos obtener la proteína purificada más concentrada.
- Es posible asociar la adsorción selectiva a la inmovilización.

Para lograr abordar la purificación de proteínas fusionadas por adsorción selectiva a los soportes de afinidad, nos centraremos en primer lugar en la caracterización de soportes que nos permitan dicho fin.

a.- Caracterización de soportes

Una buena caracterización de soportes, así como su racional utilización puede llevarnos a establecer métodos de purificación rápidos y sencillos.

- La optimización de la reacción de activación de la agarosa con Epiclorhidrina (estudiada en el capítulo I) nos permite obtener soportes Agarosa-Epóxido con mayor o menor cantidad de grupos reactivos por volumen de soporte. En principio, variando este parámetro será posible obtener soportes agarosa-quelato para adsorciones más o menos selectivas.
- Dada la distinta selectividad que muestran los diversos cationes empleados (Anspach, F.B. 1994), empleando quelatos preparados con distintos metales de *transición la selectividad en la adsorción variará.*
- También se emplearán soportes, en los que la activación se ha realizado con un reactivo de cadena más larga que la epiclorhidrina (1,4-Butanodioldiglicidil éter) estudiando el efecto de la presencia de un "brazo espaciador" en la selectividad de la adsorción.

b.- Purificación de proteínas fusionadas (con uno o dos dominios de fusión)

En todos los casos, el fin será conseguir un soporte muy selectivo para la adsorción de proteínas fusionadas (con uno o dos dominios de fusión) en el que la adsorción de proteínas nativas esté muy restringida. Y trabajando en condiciones de adsorción selectiva (condiciones en las que solo o al menos de forma mayoritaria se unen proteínas con alta afinidad por los soportes) *podríamos llevar a cabo la purificación de proteínas fusionadas (DAO(His)₆ con dos dominios de fusión y Glutaril Acilasa-6His con un dominio de fusión).*

2.- Agarosa como soporte para interacciones multipuntuales: inmovilización bipuntual de proteínas con dos dominios de fusión

La morfología de la agarosa "superficie plana" favorece la unión multipuntual (Capítulo II), de manera que realizando una adsorción selectiva de una proteína con dos dominios de fusión (posibilidad de unión bipuntual), se intentarán diseñar estrategias que combinen la adsorción selectiva con la inmovilización de la proteína al soporte. De esta forma los soportes de agarosa nos permitirían llevar a cabo la purificación-inmovilización y estabilización e proteínas con dos dominios de fusión.

PARTE EXPERIMENTAL:

1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES

1.1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES AGAROSA-QUELATO METÁLICO

La preparación del soporte Agarosa-Epóxido tuvo lugar por activación de agarosa 6 BCL con Epiclorhidrina o 1,4- Butanodiol diglicidil éter. Tras esta etapa se llevó a cabo la reacción del soporte Ags-Epóxido con el Ácido Iminodiacético (IDA) y finalmente por reacción con la sal metálica correspondiente se obtuvo el soporte Agarosa-Quelato metálico.

1.1.1.- PREPARACIÓN DE SOPORTE AGAROSA-EPÓXIDO

Los geles epóxido se obtuvieron por reacción de Agarosa 6 BCL con Epiclorhidrina. Trabajando en distintas condiciones optimizadas en la exposición de resultados del capítulo I, se obtuvieron soportes con distinta carga de Epóxidos (5-30 μ moles /ml de gel), cuantificando dichos grupos por el procedimiento descrito en el apartado Y.3. El protocolo seguido es el mismo que en el apartado I.1, si bien las condiciones empleadas varían según la cantidad de grupos reactivos con los que queramos activar el soporte.

* En la activación con Epiclorhidrina las condiciones para la preparación de los soportes agarosa-epóxido se esquematizan a continuación:

Soportes con 30 μ moles de epóxidos/ml gel: [NaOH] 0,4 N, Acetona; Epiclorhidrina 15 % (v/v) inicialmente y dos adiciones de un 10 % (v/v) cada dos horas; tiempo de reacción 16 horas y temperatura de reacción de 25°C.

Soportes con 10 μ moles de epóxidos/ml gel: [NaOH] 1,0 N, Acetona; Epiclorhidrina 10 % (v/v) inicialmente y una adición de un 10 % (v/v) a las dos horas; tiempo de reacción 4 horas y temperatura de reacción de 4°C.

Soportes con 5 μ moles de epóxidos/ml gel: [NaOH] 0,1 N, disolvente 1,2-Dimetoxi-etano (Monoglime); Epiclorhidrina 10 % (v/v) inicialmente; tiempo de reacción 4 horas y temperatura de reacción de 25°C.

* En la activación con 1-4, Butanodioldiglicidil éter (BDGE):

Soportes con 10 μ moles de epóxidos/ml gel: [NaOH] 0,4 N, BDGE 10 % (v/v) inicialmente y una adición a las dos horas de reacción; tiempo de reacción 4 horas y temperatura de reacción de 25°C.

Soportes con 30 μ moles de epóxidos/ml gel: [NaOH] 0,4 N, Acetona; BDGE 10 % (v/v) inicialmente y dos adiciones de 10% cada dos horas; tiempo de reacción 6 horas y temperatura de reacción de 25°C.

1.1.2.- PREPARACIÓN DE SOPORTE AGAROSA-QUELATO

Por reacción del soporte Ags-Epóxido con el IDA en las condiciones optimizadas en el apartado 1.4.1.2. se obtuvieron soportes Agarosa-IDA. Estos soportes por adición de una sal (CuSO_4 , NiCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2) del catión correspondiente daban lugar al correspondiente soporte Ags-Quelato. Esta última reacción se realizaba resuspendiendo 10 ml soporte Agarosa-IDA en 50 ml de una solución acuosa que contenía 5 mg/ml de la sal correspondiente. En el caso de la formación de quelatos de Níquel y Cobalto la sal metálica se disolvía en tampón fosfato sódico, NaCl 1,0 M pH 6,0 (Herndan, E.S. y col. 1988).

2.- APLICACIÓN DE LOS SOPORTES DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A PROCESOS DE PURIFICACIÓN

2.1.- EXTRACTOS PROTEÍCOS

Se preparó una dilución del extracto proteico en tampón fosfato 10mM , NaCl 0,2M pH 7,0, obteniendo concentraciones de proteína total del orden de 5 mg/ml. La cuantificación de la concentración de proteína presente en el extracto se realizó por el método de Lowry (Lowry O.H. y col. 1951). A los 10 ml de esta dilución se adicionaba 1 ml del soporte quelato manteniendo a 25°C y durante 1 hora una agitación suave. Durante este periodo se iban sacando alícuotas de sobrenadante a distintos tiempos, siguiendo el proceso de adsorción por la disminución de la absorbancia medida a 280 nm con el tiempo. Y transcurrida una hora, cuando ya no se observaba disminución de la absorbancia se apartaba una muestra del sobrenadante para posterior cuantificación por el método de

Lowry. Así por diferencia de las concentraciones obtenidas por obteníamos el porcentaje de proteínas adsorbidas al soporte.

- El extracto de proteínas nativas (*E.coli*) fue donado por José Luis García del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C).
- El extracto de *Kluyveromyces lactis*, fue suministrado por Gist-Brocades (Maxilact LX-5000).
- En algunos casos se adicionó Imidazol en concentración de 7 mM ó 15 mM en el tampón de adsorción.
- Cuando el soporte empleado era Biosynth-Quelato, este se obtenía por reacción del soporte Biosynth de 30 μ moles de grupos epóxido/ml soporte (cuantificados por el procedimiento descrito en I.2) con IDA y la sal metálica correspondiente.

2.2.- PROTEÍNAS FUSIONADAS

Las proteínas fusionadas fueron obtenidas a partir de las cepas nativas crecidas por ANTIBIOTICOS S.A. (Glutaril acilasa de *Acinetobacter sp.* ATCC 53891; DAO de *Trigonopsis variabilis*) y posteriormente clonadas en *E.coli* por José Luis García del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.).

La adsorción a soportes-quelato se realizó en las condiciones de unión para proteínas nativas empleadas en el apartado III. 2.1. añadiendo Imidazol 7 mM en el tampón de adsorción. Cuando la proteína fusionada empleada era la DAO T. se añadían 5 ml de dilución 1:1 del extracto en tampón fosfato 10 mM, NaCl 0,2M pH 7,0 a 1ml de soporte quelato. Para eliminar las proteínas no retenidas en el soporte se lavaba con el tampón de adsorción (sin imidazol). Una vez lavado el soporte se realizaba un proceso de desorción con distintas concentraciones crecientes de imidazol (15-250 mM), lavando el soporte con el tampón Fosfato 10 mM, NaCl 0,2 M después de cada etapa. La desorción se realiza añadiendo en el tampón de adsorción una concentración dada de imidazol. 1 ml del derivado se resuspende en 10 ml del tampón que contiene el imidazol. Esta suspensión se mantiene una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Transcurrido este tiempo se separa una alícuota de sobrenadante (para electroforesis), se lavaba el soporte y se

resuspendía en el tampón de desorción (que contenía una concentración mayor de imidazol). De esta forma se llevaban a cabo desorciones graduales con concentraciones de imidazol crecientes. En algunos experimentos la desorción se hacía resuspendiendo el derivado en tampón citrato 0,1M pH 2,0 y en otros casos el derivado se resuspendía en tampón Fosfato disódico, 0,5 M NaCl, EDTA 0,05 M pH 7,0 manteniendo siempre la misma relación de volúmenes en la suspensión.

- Se emplearon soportes de distinta carga (5-30 μ moles/ml gel)) procedentes tanto de la activación con Epiclorhidrina como con 1,4-Butanodioldiglicidileter. También se probó con soportes Biosynth (30-10 μ moles de epóxidos/ml soporte).

Los soportes Biosynth 10 μ moles de epóxidos / ml soporte se prepararon a partir de los soportes comerciales Biosynth (30 μ moles de epóxidos/ml soporte) por hidrólisis parcial con ácido sulfúrico 0,5 N. Para ello se resuspenden 10 ml de soporte comercial en 90 ml de ácido sulfúrico 0,5N. Y manteniendo agitación suave a 25°C durante 10 minutos, se obtuvieron soportes Biosynth de 10 μ moles de epóxidos/ml soporte.

- Se apartaron muestras de los solubles ofrecidos al soporte y de las proteínas desorbidas con cada concentración de imidazol. El seguimiento de la adsorción y desorción de la Glutaril Acilasa fusionada en los distintos soportes, se ha realizado mediante SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), aplicando las muestras preparadas según el procedimiento descrito en el apartado III.4 en una placa de electroforesis. En el caso de la DAO T fusionada las medidas de actividad se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.

3.- D-AMINOÁCIDO OXIDASA *Trigonopsis variabilis*

3.1.- ENSAYO ENZIMÁTICO

La medida de la actividad de DAO.T se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico utilizando como sustrato la Cefalosporina C. La reacción de desaminación oxidativa del sustrato empleado en el ensayo, produce una cantidad equimolecular de H₂O₂ que en presencia de peroxidasa y el sustrato o- fenilendiamina,

libera un producto coloreado que se sigue espectrofotométricamente por absorción a 420 nm.

La mezcla de reacción de este ensayo consistió en 1,5 ml de una disolución a pH 7,5 de Cefalosporina C 2,5 mg/ml, 0,5 ml de una disolución de o-fenilendiamina de 0,2 mg/ml en agua destilada, 0,1 ml de una disolución de peroxidasa (78 UI/mg) en fosfato potasio 0,1 M pH 7,5 (en el caso de la DAO fusionada, la proteína no lleva el cofactor por lo que el FAD se añadía en la cubeta). A esta mezcla de reacción se adicionaba la enzima soluble o la suspensión de los derivados. Este ensayo nos proporcionaba valores de actividad proporcionales al $\Delta A/\text{min}$ hasta un límite de 0,08 Unidades de $\Delta A/\text{min}$. Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-V 160 provisto de agitación magnética, y utilizando cubetas de 1 cm de paso óptico, termostalizadas a 25°C.

Una unidad de DAO se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de Cefalosporina que produce 1 μmol de H_2O_2 por minuto en las condiciones del ensayo estándar.

3.2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE DETERMINADOS CATIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA DAO Y LA DAO FUSIONADA

Se estudió el efecto de la presencia de sales 0,5 mM (CuSO_4 , NiCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2) en la actividad de DAO y de DAO fusionada.

Al 1 ml del extracto de DAO.T se le adicionaban 8 ml de tampón Fosfato 10 mM, NaCl 0,2M en el que se encontraba disuelta la sal metálica necesaria para tener una concentración final de 0,5 mM.. Esta dilución se mantuvo 2 horas con agitación suave a 4 ó 25°C. A distintos tiempos se tomaban alícuotas para medir la actividad por el ensayo enzimático descrito anteriormente.

- En el caso de la DAO el protocolo que se siguió fue el mismo que para la fusionada, pero en este caso la dilución de partida era 1:2.

4.- ELECTROFORESIS

Las electroforesis se realizaron en geles de acrilamida en presencia de SDS de acuerdo con el método de Laemmli (1976) y modificado posteriormente por Chappmann y col (1979). El porcentaje (p/v) de poliacrilamida utilizado fue del 12%. Las proteínas se han visualizado por tinción con Coomassie o tiñendo con plata (según la concentración de la muestra). Las proteínas que se usaron como patrón fueron las siguientes: α -Lactoalbúmina (14.000), inhibidor de tripsina (20.100), anhidrasa carbónica (30.000), ovalbúmina (43.000), albúmina (67.000) y fosforilasa β (94.000). Tanto las muestras como los marcadores se corrieron a 25°C, 145V y durante 60 minutos en una unidad de electroforesis SE 250-MIGHTY SMALL II de la casa Hoefer, empleando una fuente de alimentación de la casa Pharmacia Biotech. (Electrophoresis Power Supply - EPS 600).

La preparación de muestras se hizo por desnaturalización de las muestras con 1% de SDS, 2,5% de mercaptoetanol y 100°C durante 4-5 minutos. Cuando la muestra es gel (proteínas adsorbidas al soporte), después de la desnaturalización se centrifugaba y como muestras se tomaban los sobrenadantes conteniendo la proteína adsorbida al soporte.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha tratado en la Introducción, los soportes quelato presentan afinidad por algunos aminoácidos superficiales de las proteínas. Estos aminoácidos pueden estar presentes de forma natural (proteínas nativas) o de forma artificial (proteínas fusionadas). De manera que si el objetivo es purificar proteínas fusionadas y el soporte es poco selectivo, ambas (nativas y fusionadas) quedarán retenidas en él. Dada la morfología de la agarosa, las interacciones no deseadas de otras proteínas a soportes de agarosa con alta densidad superficial de grupos reactivos estarían muy favorecidas. Para poder llevar a cabo la purificación por adsorción selectiva de proteínas fusionadas, se llevó a cabo la caracterización de soportes y la búsqueda de condiciones que permitieran restringir al máximo la unión de proteínas nativas.

1.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS POR ADSORCIÓN SELECTIVA

1.1.- OPTIMIZACIÓN DE LOS SOPORTES Y CONDICIONES PARA LA ADSORCIÓN SELECTIVA

Para poder estudiar la influencia de diversos factores en la selectividad de la adsorción se partió de soportes agarosa-quelato poco selectivos. Es decir con 30 μ moles de grupos reactivos/ml gel y como catión quelante el cobre, debido a que este catión presenta baja selectividad en la unión de proteínas (Anspach, F.B. 1994), estudiando el efecto de:

- La adición de ligando competitivo en la adsorción
- La disminución de grupos reactivos en el soporte
- El empleo de soportes-quelato con "brazos espaciadores"
- El uso de soportes quelato con distinto catión metálico

en el porcentaje de proteínas adsorbidas al soporte.

* **Adsorción en presencia de ligando competitivo:** Para limitar la adsorción de proteínas nativas, se estudió la influencia de la presencia de diversas concentraciones de ligando competitivo en la cantidad de proteínas nativas adsorbidas. La interacción proteína-soporte quelato tiene lugar sobretodo a través del imidazol de las histidinas superficiales de las

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

proteínas por este motivo, se eligió el imidazol como ligando competitivo. Los resultados obtenidos con un extracto de *E. coli* se resumen en la tabla 11.

Tabla 11: Porcentaje de proteínas adsorbidas en ausencia o presencia de distintas concentraciones de imidazol

SOPORTE	% PROT. UNIDAS SIN IMIDAZOL	% PROT. UNIDAS CON IMIDAZOL 7 mM	% PROT. UNIDAS CON IMIDAZOL 15 mM
EPI-30-IDA-Cu	70%	33%	32%

En esta tabla se observa que al realizar la adsorción en presencia de 7 mM de Imidazol se reduce notablemente el porcentaje de proteínas adsorbidas al soporte. Sin embargo, incrementando la concentración de Imidazol a 15 mM no se observan diferencias. Para limitar la adsorción de proteínas nativas se fijó una concentración de Imidazol 7 mM en la adsorción.

* **Empleo de soportes de agarosa con menor cantidad de grupos reactivos:** Para lograr adsorciones más selectivas de la proteína de interés (que en éste caso sería una proteína con gran afinidad) se emplearon soportes con menos grupos reactivos. En la tabla 12 se compara el porcentaje de proteínas adsorbidas a quelatos de cobre de agarosa con 30 μ moles de grupos quelato/ml gel con otros en los que se ha disminuido la carga a 10 μ moles de grupos quelato/ml gel.

Tabla 12: Adsorción en presencia de Imidazol 7 mM.

SOPORTE	% PROTEÍNAS UNIDAS	[IMIDAZOL PARA DESORC]
EPI-30-IDA-Cu	33%	30 mM
EPI-10-IDA-Cu	6%	15 mM

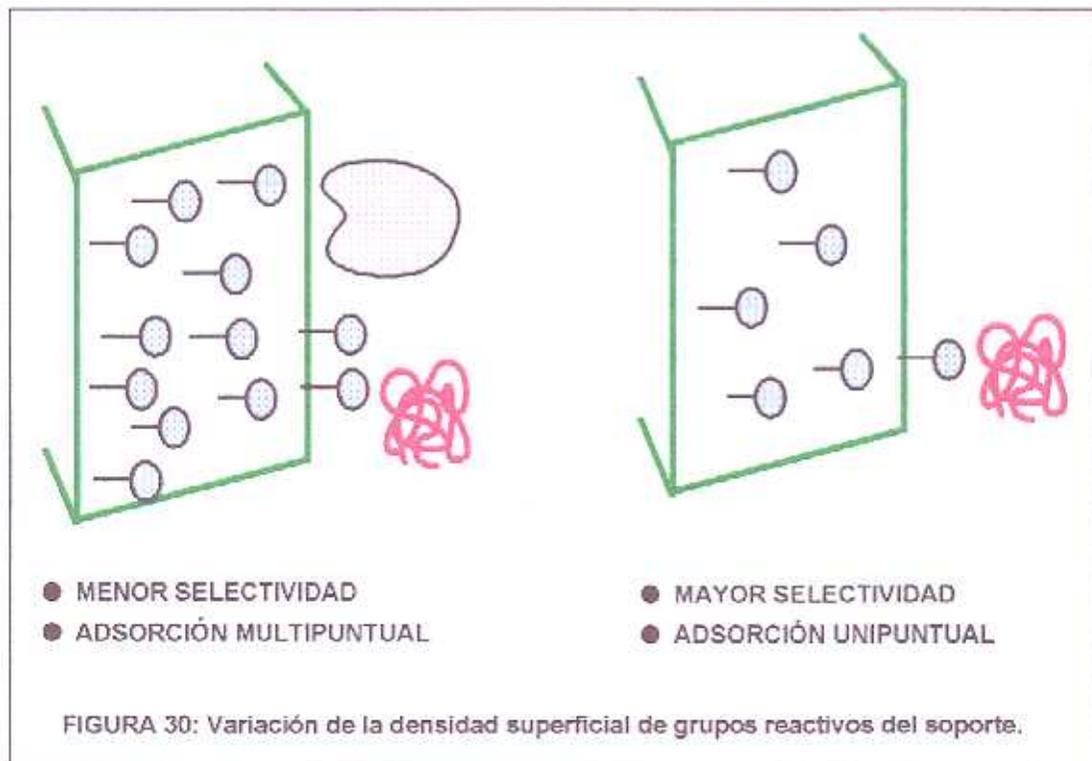
En este caso, combinando:

- La adsorción en presencia de ligando competitivo (7 mM).
- La reducción de grupos del soporte (10 μ moles/ml gel).

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

Se logran adsorciones muy selectivas, quedando solo retenidas en la columna las proteínas que por tener un mayor número de histidinas expuestas presentan una alta afinidad por los soportes quelato.

En la purificación de proteínas fusionadas por adsorción selectiva, nos interesa limitar la unión de proteínas nativas de manera que solo se adsorban al soporte las proteínas fusionadas y a ser posible la adsorción de estas no sea demasiado fuerte. Al reducir la cantidad de grupos reactivos del soporte (soportes con 10 μ moles de quelatos/ml gel) se desfavorece la multiinteracción proteína-soporte (como se observa en la tabla, se necesita una concentración de imidazol menor para la desorción) así como se disminuye la adsorción de proteínas nativas (de menor afinidad por los soportes que las fusionadas) (Figura 30).



* **Empleo de soportes-quelato con "brazos espaciadores"**: Para ver el efecto del empleo de soportes con "brazo espaciador" en el porcentaje de proteínas adsorbidas, se emplearon soportes de agarosa procedentes de la activación con un reactivo bifuncional de cadena más larga, el 1,4- Butanodioldiglicidileter (BDGE) y derivatizados convenientemente hasta la formación del quelato de cobre. Para poder ver el efecto del "brazo espaciador" frente a los soportes procedentes de la activación con Epiclorhidrina (EPI-10-IDA-Cu) se emplearon soportes poco cargados (10 μ moles/ml gel).

Tabla 13: Adsorción a soportes quelato en presencia de Imidazol 7 mM.

SOPORTE	% PROTEÍNAS UNIDAS
EPI-10-IDA-Cu	6%
BDGE-10-IDA-Cu	36%

En esta tabla se observa que el porcentaje de proteínas adsorbidas es mayor cuando se emplean soportes con "brazo espaciador"(soportes BDGE-10-IDA-Cu). En este caso, nos interesa limitar la adsorción de proteínas nativas por lo que, en un principio, los soportes más adecuados serían los obtenidos por activación con Epiclorhidrina. Sin embargo, los soportes de "brazo espaciador" podrían ser adecuados para purificar proteínas glicosiladas o proteínas con aminoácidos reactivos poco expuestos que no se adsorben a soportes procedentes de la activación con epiclorhidrina.

* **Empleo de soportes-quelato con distinto catión quelante**

En los experimentos anteriores, se emplearon quelatos de cobre, por estar descrito en la bibliografía su baja selectividad en la unión, de forma que esto nos permitiera observar el efecto de las demás variables (brazo espaciador, cantidad de grupos reactivos del soporte) en el porcentaje de proteínas retenidas en el soporte. En este apartado se estudia el porcentaje de proteínas retenidas según el catión quelante del soporte empleado. Con un extracto de *Kluyveromyces lactis* se cuantificaron las proteínas retenidas a soportes de agarosa EPI-10-IDA-Metal (Metal: Cu, Ni, Zn, Co). En la tabla 14 se presentan los

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

porcentajes de proteínas retenidas a cada soporte. Dependiendo del catión quelante del soporte, la selectividad en la unión de proteínas varía.

Tabla 14: Unión en ausencia de imidazol a soportes quelato con distintos cationes quelantes

METAL	%PROTEÍNAS UNIDAS
COBRE	87 %
ZINC	30 %
NÍQUEL	30 %
COBALTO	21 %

La selectividad es distinta dependiendo del catión quelante empleado: siendo el quelato de Cobre el menos selectivo (adsorbe un mayor porcentaje de proteínas) y el de cobalto el más.

Uno de los objetivos del presente capítulo era superar una desventaja de la agarosa derivada de su morfología tipo superficie-plana, la posibilidad de adsorciones no deseadas de proteínas en procesos de purificación. Los resultados expuestos parecen indicar que mediante el diseño de un buen soporte y empleando condiciones adecuadas se podría limitar la adsorción de proteínas nativas, estando en condiciones de abordar la purificación de proteínas de fusión por adsorción selectiva.

Los resultados obtenidos, así como la literatura revisada parecen indicar que los quelatos de cobre son los que presentan una peor selectividad, sin embargo a partir de los resultados obtenidos con proteínas nativas abordaremos la purificación de proteínas fusionadas desde dos puntos:

- a.- En primer lugar, se intentará purificar proteínas fusionadas por adsorción selectiva, empleando para ello quelatos de cobre (baja selectividad) y limitando la unión de las proteínas nativas del extracto mediante soportes con pocos grupos reactivos y añadiendo ligando competitivo en la adsorción.
- b.- Como se observa en la tabla 14 la selectividad varía con el catión quelante empleado, por ello se desarrollaran estrategias de adsorción selectiva empleando para ello un catión más selectivo que el cobre.

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

Con esto se pretende proponer diversos métodos para la purificación de proteínas por adsorción selectiva, se intentará superar las adsorciones no deseadas de proteínas nativas facilitadas por la morfología de la agarosa, mediante la caracterización de distintos soportes y su empleo racional. Al proponer diversas estrategias, el campo de aplicación de esta cromatografía aumenta ya que en el caso de que la presencia de un determinado catión inactivase la enzima podríamos disponer de vías alternativas para purificarlo.

El desarrollo de este primer punto, ha permitido condiciones y soportes (gracias al control de la reacción de activación con epíclorhidrina) que podrían ser adecuados para la adsorción más o menos selectiva de proteínas fusionadas. Además, si bien no era el objetivo primordial del desarrollo de este estudio ha permitido obtener soportes y condiciones que en principio podrían ser adecuados para la purificación de proteínas nativas con distintas características.

- El empleo de soportes poco selectivos (con muchos grupos reactivos y cobre como catión quelante) permitiría purificar o semipurificar proteínas nativas que no se adsorben a los soportes quelato. En este aspecto se ha observado que con extractos de *E. coli* y *Kluyveromyces lactis* las proteínas retenidas eran del orden de un 70-90 % de las proteínas totales, por lo que si la proteína a purificar no queda retenida en el soporte, tras ofrecer el extracto a este podríamos obtener la proteína purificada por un factor de 10 en el sobrenadante.
- En el caso de proteínas nativas que poseen un gran número de aminoácidos reactivos expuestos, reduciendo la cantidad de grupos del soporte y empleando Zn ó Ni, se podría realizar la purificación por adsorción más o menos selectiva.
- La gran versatilidad de los soportes obtenidos gracias sobretodo al control de la reacción de activación con epíclorhidrina, posibilitaría la purificación de proteínas con afinidad intermedia por los soportes quelato, pudiéndose incluso desarrollar estrategias de purificación en cascada (Porath, J. col. 1991).
- La disponibilidad de soportes-quelato con "brazo espaciador" podría permitir la purificación de proteínas glicosiladas o con histidinas poco expuestas.

Partiendo de un extracto de *Kluyveromyces lactis* se compararon las proteínas retenidas en soportes quelato de cobre con distinta morfología (agarosa y Biosynth), distinta cantidad de grupos reactivos/ml gel y diferente "brazo espaciador". En la Electroforesis 1 se muestran las proteínas retenidas en cada soporte, observándose diferencias, sobretodo en la adsorción de proteínas de bajo Pm. Esto parece indicar que aunque no era el objetivo del presente capítulo la gran variedad de soportes caracterizados podría permitirnos purificar por adsorción más o menos selectiva casi cualquier proteína nativa. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente lo que se pretendía era obtener condiciones en las que la adsorción de proteínas nativas estuviera muy restringida para poder lograr en estas condiciones la adsorción de proteínas fusionadas.

2.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS:

2.1.- GLUTARIL ACILASA FUSIONADA

La posibilidad de utilizar distintos soportes de afinidad nos llevó a elegir soportes y condiciones adecuados para intentar abordar la adsorción selectiva de proteínas fusionadas con colas de poliHis. De esta forma podríamos purificar en un solo paso, sin necesidad de realizar desorciones graduales la proteína de interés. Los experimentos descritos anteriormente, realizados con extractos de proteínas nativas señalan que el empleo de soportes con muchos grupos reactivos del soporte así como el empleo de brazos espaciadores favorecen la adsorción de proteínas nativas (el porcentaje de proteínas adsorbidas aumentaba). A continuación se pasó a comprobar dichos efectos en la mayor o menor selectividad de la adsorción proteína fusionada-soporte quelato.

Soportes con muchos grupos reactivos: Para ver el efecto del empleo de un soporte con un gran número grupos reactivos, se empleó un soporte activado con 30 μ moles de grupos quelato de Cu/ml gel (Electroforesis 2). Tras la adsorción y lavado se desarrolló un sistema de desorciones con concentraciones crecientes de imidazol (30-90mM) intercalando entre desorciones consecutivas una etapa de lavado del derivado. De esta forma, se pretende estudiar la selectividad de la adsorción así como la concentración de imidazol requerida para la desorción total. En el carril 4, se observa que en la primera desorción junto a la proteína

fusionada aparecen otras bandas que indican que ha habido adsorciones no deseadas de otras proteínas. Además como se observa también en la electroforesis, es necesario emplear imidazol 90 mM para lograr desorciones totales de la proteína de interés (con concentraciones superiores ya no se observaban las bandas correspondientes a la Glutaril fusionada).

- **Soportes con "brazos espaciadores"**: en la Electroforesis 3 se observa que cuando la desorción tiene lugar con imidazol 30mM (carril 4) las bandas de la glutaril acilasa aparecen acompañadas de otras procedentes de proteínas que seguramente por tener los aminoácidos reactivos poco expuestos no se adsorbían a quelatos de "brazo corto" y si son retenidas por soportes con brazos espaciadores.

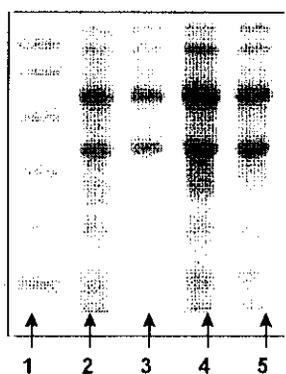
Estos resultados indican que, la purificación de proteínas fusionadas con estos soportes debería incluir protocolos con desorciones graduales a distintas concentraciones de Imidazol (Electroforesis 3) con el fin de separar la proteína de fusión del resto de proteínas adsorbidas. Y sólo en el caso de que los aminoácidos reactivos estuvieran en zonas poco accesibles, el empleo de estos soportes presentaría ventajas para la purificación de dichas proteínas.

*** Purificación de Glutaril acilasa fusionada (un dominio de fusión) por adsorción selectiva a soportes agarosa-quelato de cobre**

Los resultados obtenidos con el extrato que posee Glutaril acilasa fusionada, corroboran los obtenidos anteriormente con extractos de proteínas nativas. Tanto el empleo de brazos espaciadores como el uso de soportes con gran número de quelatos por volumen de gel favorecen la adsorción de proteínas nativas por lo que la purificación de proteínas fusionadas por adsorción selectiva se ve dificultada.

Para la purificación se eligieron soportes y condiciones en las que anteriormente habíamos visto que la unión de proteínas nativas se veía muy dificultada (soportes activados con Epiclorhidrina con pocos grupos reactivos y adsorción en presencia de Imidazol 7 mM) para intentar llevar a cabo la adsorción más o menos selectiva de la proteína fusionada.

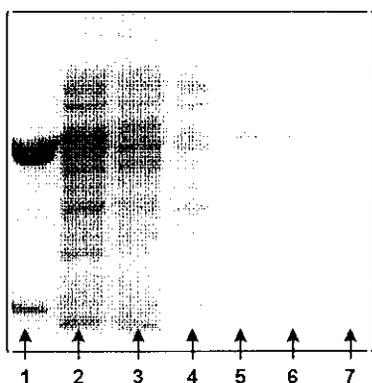
**ADSORCION DE PROTEINAS NATIVAS A
DISTINTOS SOPORTES**



- (1) Marcadores de Pm
- (2) Proteínas adsorbidas a BDGE-10-Cu
- (3) Proteínas adsorbidas a EPI-10-Cu
- (4) Proteínas adsorbidas a EPI-30-Cu
- (5) Proteínas adsorbidas a BIOSYNTH-30-Cu

Electroforesis 1

**SOPORTES CON ALTA DENSIDAD SUPERFICIAL DE
QUELATOS DE Cu**



- (1) Glutaril acilasa patron
- (2) Extracto
- (3) Proteínas no retenidas en el soporte
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 30mM
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 50mM
- (6) Proteínas desorbidas con Imidazol 70mM
- (7) Proteínas desorbidas con Imidazol 90mM

Electroforesis 2

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

La adsorción a soportes EPI-10-IDA-Cu se realizó en batch, tras la adsorción se realizaba una etapa intermedia de lavado con el mismo tampón empleado y se procedía a resuspender el derivado en el tampón en presencia de Imidazol para la desorción. Para estudiar la selectividad de la unión de la Glutaril acilasa fusionada a los soportes se corrieron diversas muestras en un gel de electroforesis. En la Electroforesis 4 se muestra que en los dos últimos carriles (sobrenadantes procedentes de desorciones con 15mM y 30mM de imidazol con una etapa intermedia de lavado) aparece la banda correspondiente a la subunidad de peso molecular mayor de la Glutaril acilasa fusionada. En estas condiciones, limitamos la unión de las proteínas nativas que de forma natural poseen His en su secuencia, quedando solo retenida (adsorción selectiva) la proteína fusionada que tras una desorción en presencia de Imidazol 30 mM logramos obtener con un alto grado de pureza. La cuantificación de la proteína se hizo mediante densitometría de los geles de electroforesis con un densitómetro de "Molecular Dynamics" y por integración de las áreas correspondientes a la banda de la Glutaril acilasa desorbida. La suma de ambas áreas indica que se ha recuperado prácticamente toda la proteína fusionada.

Recordando los resultados obtenidos en la purificación con soportes quelato con 30 μ moles/ml gel, empleando imidazol 90 mM se lograba la desorción total de la glutaril acilasa fusionada y tanto la adsorción como la desorción no eran selectivas sino que la purificación debería englobar una desorción previa controlada de las proteínas nativas que también poseen His superficiales de forma natural.

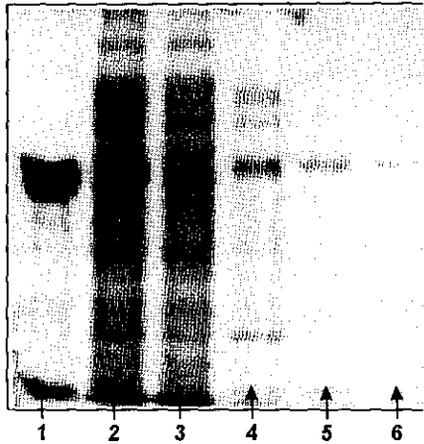
La posibilidad de tener soportes con un número más reducido de grupos ha hecho posible la purificación de una proteína fusionada por adsorción/desorción selectiva, lográndose desorciones con concentraciones de imidazol más bajas (30mM). Esto se debe a que, al aumentar el número de grupos del soporte la selectividad de la unión de la proteína fusionada disminuye, pudiendo tener lugar la adsorción de otras proteínas y estando asimismo favorecidas las interacciones por adsorción multipuntual que hacen que sea preciso utilizar en la desorción concentraciones mayores de imidazol para obtener la proteína fusionada (carriles 5-7). Como se ha tratado anteriormente, la morfología interna de la agarosa favorece la adsorción de proteínas, dificultando la purificación por adsorción selectiva. La caracterización de soportes de afinidad

para la adsorción selectiva de proteínas fusionadas nos ha permitido trabajar con soportes muy selectivos que permiten obtener proteínas fusionadas (con un dominio de fusión) con alto grado de pureza mediante una única etapa de desorción en batch.

*** Purificación de Glutaril acilasa fusionada por adsorción selectiva a soportes agarosa-quelato de otros metales quelantes**

A continuación, se estudió la selectividad de los distintos cationes en la adsorción de Glutaril Acilasa fusionada. En este caso, se quería estudiar sólo el efecto de los distintos cationes quelantes del soporte (Cu, Ni, Zn y Co) en la mayor o menor selectividad de unión de la proteína fusionada a los mismos. La adsorción a soportes EPI-10-IDA-Metal se realizó en ausencia de ligando competitivo para estudiar solo el efecto del metal quelante. Tras la etapa de adsorción a cada uno de los geles se realizaba una etapa de lavado en la que se incluía imidazol 3mM en el tampón para eliminar las proteínas que estaban débilmente adsorbidas. Para estudiar la selectividad de la unión se separaron muestras de los derivados antes y después de la etapa de lavado, tratando dichas muestras con tampón de ruptura para ser corridas posteriormente en una placa de electroforesis. En la Electroforesis 5 se muestran las bandas correspondientes a las proteínas adsorbidas a cada uno de los soportes (carriles 2, 4, 6 y 8), así como las proteínas retenidas tras la etapa de lavado con imidazol 3mM (carriles 3, 5, 7 y 9). Comparándose los carriles 1 y 2, observamos que los soportes EPI-IDA-10-Cu adsorben casi todas las proteínas del extracto por lo que estos soportes no serían los más adecuados para la adsorción selectiva proteínas fusionadas. Sin embargo, un buen control de las condiciones (adsorción en presencia de ligando competitivo) nos ha permitido obtener purificaciones de Glutaril acilasa por adsorción selectiva. Aunque uno de los objetivos de este capítulo era superar los inconvenientes derivados de la morfología de la agarosa, caracterizando soportes y estableciendo protocolos para la purificación por adsorción selectiva de las proteínas fusionadas, los datos obtenidos nos hacen pensar que la baja selectividad de los soportes de cobre permitiría la purificación de casi cualquier proteína nativa, estableciendo protocolos de desorción controlada.

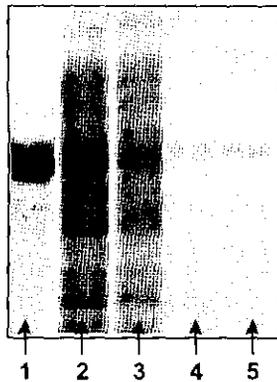
ADSORCION A SOPORTES CON BRAZO ESPACIADOR



- (1) Glutaril acilasa patrón
- (2) Extracto
- (3) Proteínas no retenidas en el soporte
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 30mM
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 50mM
- (6) Proteínas desorbidas con Imidazol 70mM

Electroforesis 3

PURIFICACION DE GLUTARIL ACILASA FUSIONADA



- (1) Glutaril acilasa
- (2) Extracto
- (3) Proteínas no retenidas
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 15mM
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 30mM

Electroforesis 4

En esta electroforesis se observa que empleando soportes poco cargados, y siendo Zinc el metal quelante del soporte, la Glutaril Acilasa fusionada se adsorbe selectivamente al soporte. Esta sería otra vía para la purificación por adsorción selectiva de Glutaril Acilasa fusionada.

La disponibilidad de distintos soportes - quelato metálico de Agarosa:

- Facilita la purificación: ya que con soportes con muchos grupos, el proceso de purificación implicaría distintas etapas de desorción que no son necesarias en procesos de purificación por adsorción selectiva.
- En algunos casos posibilita varios caminos de purificación: de forma que si una proteína, por ejemplo, pierde actividad en presencia de un catión, podría purificarse con otro soporte. Para reducir la unión de proteínas nativas que poseen de forma natural aminoácidos con afinidad por los soportes, los soportes adecuados serían aquellos que poseen pocos grupos quelato por volumen de soporte. En este aspecto se han mostrado dos posibles vías de purificación por adsorción selectiva de Glutaril acilasa fusionada:
 - Empleando soportes con catión poco selectivo (Cu) y aumentando la selectividad por adsorción en presencia de ligando competitivo.
 - Empleando soportes con catión muy selectivo (Zn).

2.2.- PURIFICACIÓN DE DAO FUSIONADA DE *Trigonopsis variabilis*

Los requerimientos necesarios para la purificación por adsorción/desorción selectiva de proteínas con dos dominios de fusión serían en principio los mismos. Pero gracias a que la agarosa es un soporte ideal para establecer uniones multipuntuales enzima-soporte podría pensarse en realizar una estrategia que permitiera realizar la adsorción selectiva-unión bipuntual (por las dos colas de histidina). Para ello se emplearon soportes quelato de zinc ya que los datos obtenidos para la Glutaril acilasa fusionada indicaban que este era un catión con alta selectividad. Pero en vez de emplear soportes con pocos grupos se utilizaron soportes con 30 μ moles/ml gel (EPI-30-IDA-Zn) para posibilitar la unión bipuntual (por ambas colas de His) al soporte. Y como modelo de proteína con dos dominios de fusión se eligió la DAO fusionada de *Trigonopsis variabilis*.

2.2.1.- FORTALEZA DE UNIÓN: INMOVILIZACIÓN

La adsorción de la DAO fusionada se siguió por medida de la actividad. A medida que la DAO fusionada se adsorbía al soporte, se observaba una disminución de actividad de la suspensión. Estos resultados se resumen en la tabla 15.

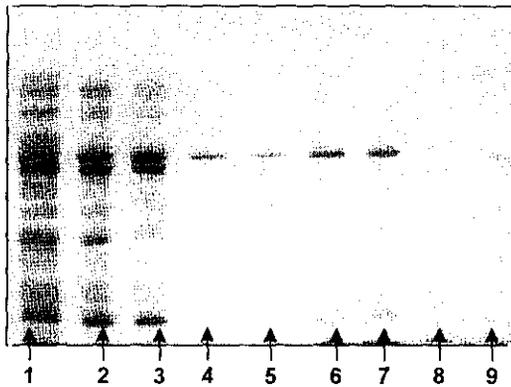
Tabla 15: Adsorción de DAO (His)₆a soportes EPI-30-IDA-Zn.

TIEMPO (h)	% DAO UNIDA	ACTIVIDAD SUSPENSIÓN
0	0 %	100%
0,5	47 %	13 %
1	95 %	9 %

Una vez adsorbida, con el fin de comprobar la posible inmovilización por unión multipuntual, se estudió la fortaleza de dicha unión estableciendo distintos protocolos de desorción. La necesidad de una mayor concentración de Imidazol en la desorción de la proteína implicaría una interacción más fuerte proteína fusionada-soporte. La glutaril acilasa fusionada, posee un solo dominio de fusión (figura 31) con lo que en este caso la interacción proteína (His)-soporte tendría lugar unipuntualmente, es decir la cola de histidinas interaccionaría con un único quelato del soporte. Por este motivo, se estudiaron las condiciones necesarias para la desorción de Glutaril acilasa fusionada de los soportes EPI-IDA-30-Zn. Los resultados obtenidos se muestran en la Electroforesis 6, en la que nos centraremos sobretudo en el proceso de desorción. En los carriles 5-7 se observa que para la desorción de dicha proteína es necesario resuspender el gel en imidazol 50 mM, ya que con concentraciones menores de dicho ligando aunque se observa desorción, esta no era total.

Con objeto de comparar la fortaleza de la unión a soportes de afinidad de ambas proteínas fusionadas, se repitió el mismo experimento con DAO fusionada (dos dominios de fusión) (figura 31).

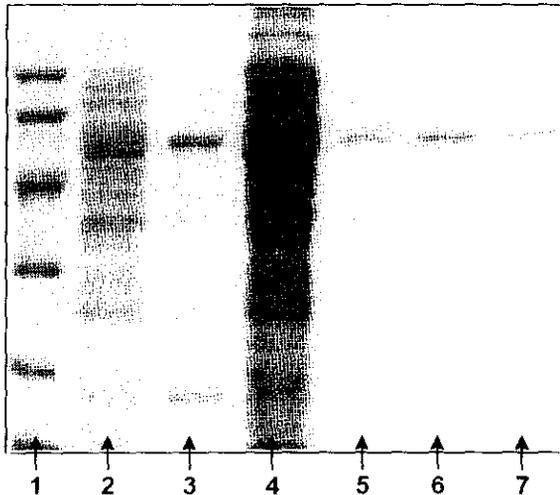
SOPORTES CON DISTINTO CATION QUELANTE



- (1) Extracto
- (2) Proteínas adsorbidas a EPI-10-Cu
- (3) Proteínas retenidas en EPI-10-Cu después de lavado con Imidazol 3mM
- (4) Proteínas adsorbidas a EPI-10-Zn
- (5) Proteínas retenidas en EPI-10-Zn después de lavado con Imidazol 3mM
- (6) Proteínas adsorbidas a EPI-10-Ni
- (7) Proteínas retenidas en EPI-10-Ni después de lavado con Imidazol 3mM
- (8) Proteínas adsorbidas a EPI-10-Co
- (9) Proteínas retenidas en EPI-10-Co después de lavado con Imidazol 3mM

Electroforesis 5

PURIFICACION DE GLUTARIL - ACILASA FUSIONADA



- (1) Marcadores de Pm
- (2) Extracto
- (3) Proteínas retenidas en el soporte EPI 30-Zn
- (4) Proteínas no adsorbidas
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 30mM
- (6) Proteínas desorbidas con Imidazol 40mM
- (7) Proteínas desorbidas con Imidazol 50mM

Electroforesis 6

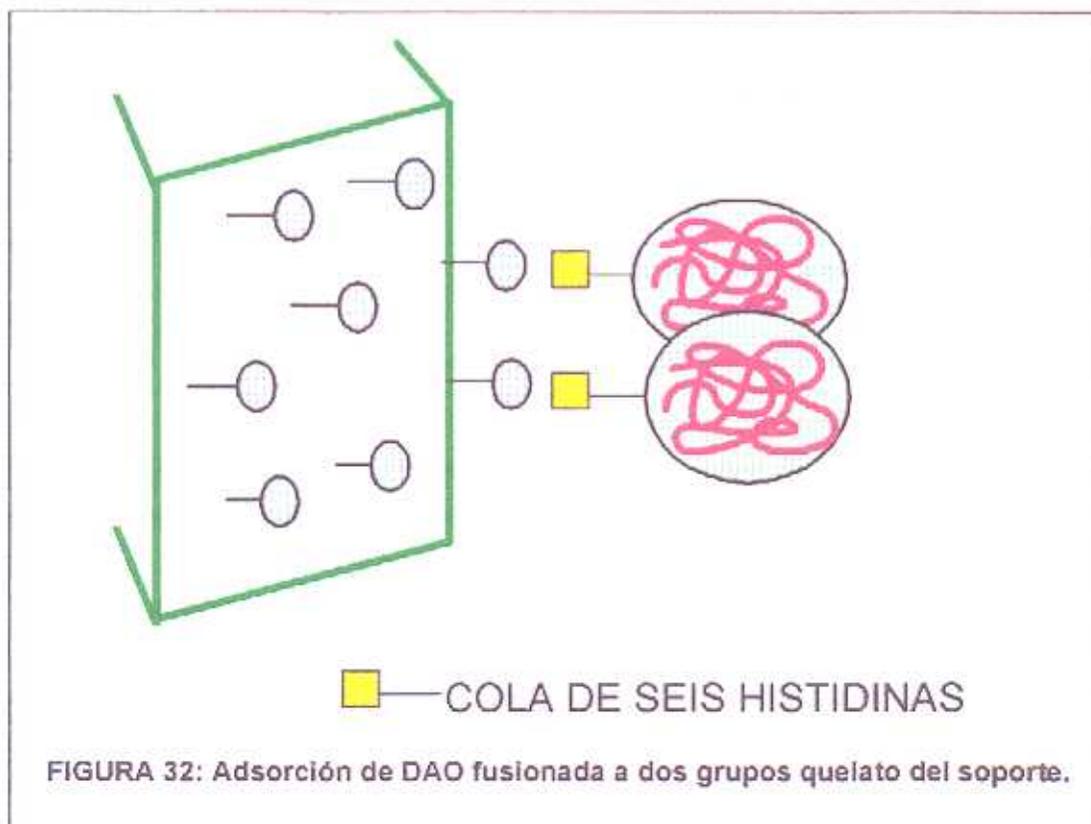


Los resultados se muestran en la Electroforesis 7, en la que se observa que en los carriles en los que se han aplicado los sobrenadantes procedentes de diversos protocolos más o menos suaves de desorción (carriles 4-7) no aparece la banda de la DAO fusionada y solo se observa cuando sometemos al derivado a condiciones muy drásticas (cuando se hierve el derivado en el tampón de ruptura empleado en la preparación de muestras para electroforesis) (carril 8). Estos datos parecen indicar que mediante el empleo de soportes con un catión muy selectivo (Zn) ha sido posible llevar a cabo la adsorción selectiva (purificación) de la DAO fusionada de una forma tan fuerte que podría actuar como un derivado inmovilizado.

La DAO fusionada presenta una interacción proteína-soporte mucho más fuerte que la Glutaril Acilasa fusionada, necesitando unas condiciones de desorción mucho más drásticas. Esto parece indicar que la DAO se une por las dos subunidades (por cada una de las colas de histidina) a los grupos quelato del soporte mientras que la Glutaril solo presenta una cola de histidinas y se une más débilmente.

2.2.2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN A LA FUERZA DE UNIÓN DE LA DAO FUSIONADA

Los experimentos anteriores parecían indicar que el mecanismo de unión podría ser el siguiente (figura 32):

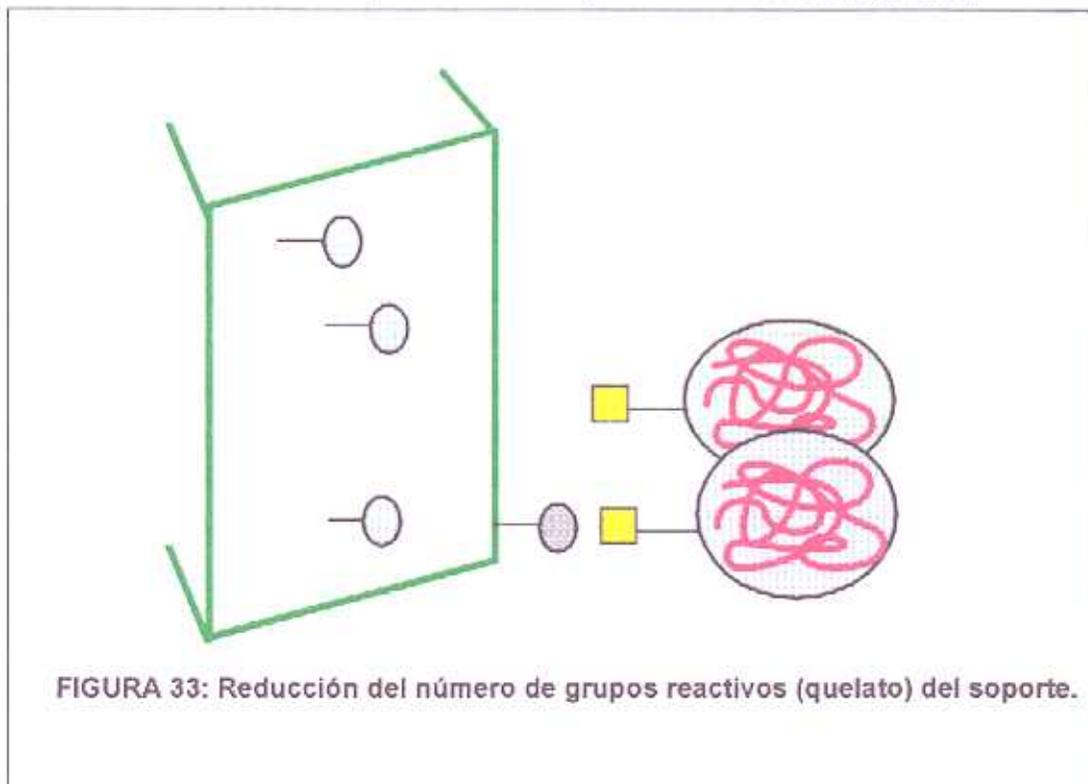


Por lo que, se propusieron distintas estrategias para lograr la unión de la DAO por una sola cola de histidinas. De ésta forma, la interacción proteína-soporte sería más débil (pareciéndose a la Glutaril Acilasa), pudiendo desorber la proteína en condiciones menos drásticas. Si la interacción proteína fusionada-quelato tiene lugar de manera que son dos los

quelatos del soporte los que intervienen, confiriendo una mayor fortaleza, la reducción del número de grupos del soporte dificultaría esta unión bipuntual, debilitándose así la fuerza de unión.

- **Soportes con menor número de grupos reactivos por unidad de volumen**

Para conseguir este propósito se redujo el número de grupos del soporte hasta 5 $\mu\text{moles/ml}$ de gel (EPI-5-IDA-Zn). El mecanismo esperado se muestra en la figura 33:



Sin embargo, al igual que con los soportes EPI-30-IDA-Zn, la DAO se unía fuertemente al soporte, desorbiéndose sólo en condiciones drásticas (a 100°C , con tampón de ruptura).

- **Condiciones muy suaves de unión**

Se emplearon condiciones de adsorción muy suaves: bajas temperaturas (4°C) y tiempos muy cortos, se observa que la unión DAO fusionada-soporte se sigue uniendo fuertemente al soporte. La unión a soportes EPI-5-IDA-Zn durante 5 minutos y a 4°C sigue siendo muy fuerte, requiriéndose hervir con tampón de ruptura para la recuperación del enzima.

- **Adición de Imidazol en la adsorción:**

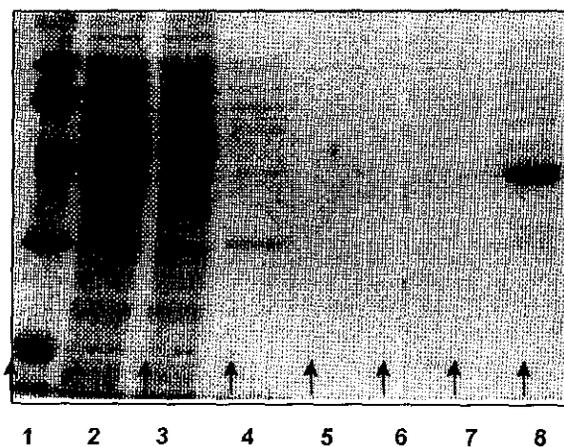
En la Electroforesis 8 se observa que al añadir distintas concentraciones de Imidazol en la adsorción, no varía la fortaleza de unión proteína-soporte, quedando fuertemente retenida en todos los casos y siendo necesario emplear condiciones drásticas para su desorción. En los carriles 3, 6 y 9 correspondientes a las desorciones con altas concentraciones de imidazol no se observa la aparición de la banda de la DAO fusionada, que continúa retenida en el soporte (carriles 4, 7 y 10).

- **Soporte de distinta morfología**

La morfología de la **agarosa** confiere buenas posibilidades para que entre la proteína y el soporte tenga lugar una interacción a través de varios puntos (Figura 34).

En cambio, muchos **polímeros sintéticos** obtenidos por entrecruzamiento químico de cadenas poliméricas aisladas, como las resinas de tipo acrílico o de tipo polivinilo (Biosynth, Toyopearl etc.) presentan una estructura interna porosa similar a un entramado de cadenas moleculares aisladas. En este último caso la congruencia geométrica proteína-soporte es peor, resultando más difícil la multiinteracción (Figura 34).

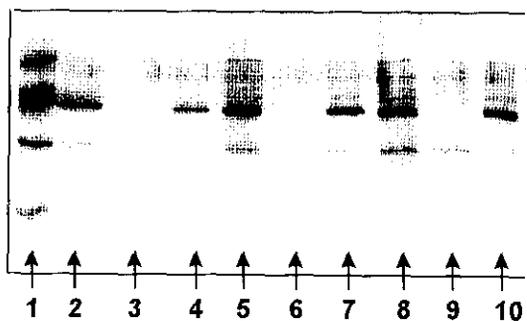
ADSORCION DE DAO FUSIONADA A SOPORTES Epi-30-IDA-Zn



- (1) Marcador de Pm
- (2) Extracto
- (3) Proteínas no adsorbidas
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 30mM
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 250mM
- (6) Proteínas desorbidas con EDTA
- (7) Proteínas desorbidas a pH 2,0
- (8) Proteínas desorbidas a 100°C con tampón de ruptura

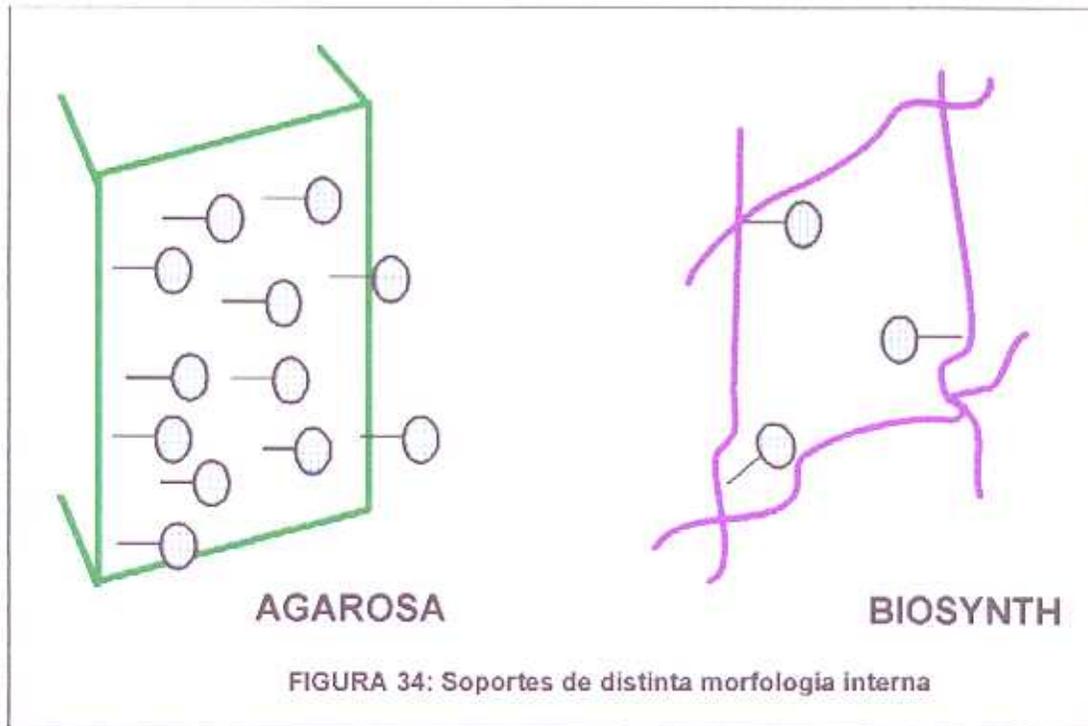
Electroforesis 7

ADSORCION A SOPORTES Epi-5-IDA- Zn A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IMIDAZOL



- (1) Marcadores de Pm
- Adsorción en ausencia de Imidazol:
 - (2) Proteínas adsorbidas
 - (3) Proteínas desorbidas con Imidazol 100mM
 - (4) Proteínas retenidas después de desorción
- Adsorción en presencia de Imidazol 5mM:
 - (5) Proteínas adsorbidas
 - (6) Proteínas desorbidas con Imidazol 100mM
 - (7) Proteínas retenidas después de desorción
- Adsorción en presencia de Imidazol 10mM:
 - (8) Proteínas adsorbidas
 - (9) Proteínas desorbidas con Imidazol 100mM
 - (10) Proteínas retenidas después de desorción

Electroforesis 8



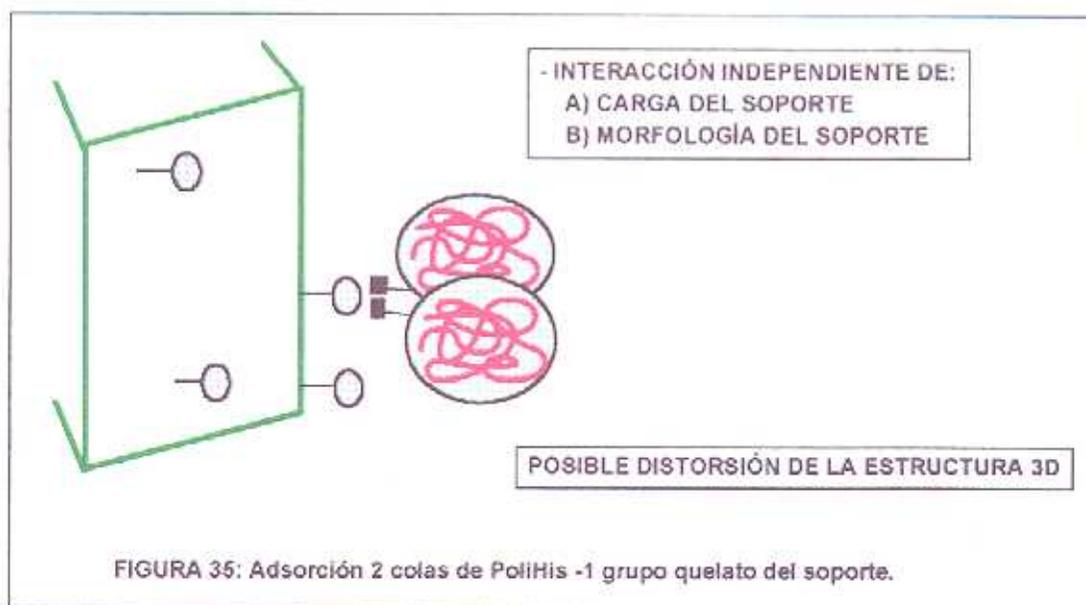
El proceso seguido para la adsorción ha sido el mismo que empleamos con el soporte de agarosa, cuidando al máximo las condiciones de reacción con el fin de reducir las posibilidades de multiinteracción. Se emplearon soportes Biosynth (BIO-10-IDA-Zn), realizándose la adsorción a 4°C, durante 5 minutos. A pesar de trabajar en condiciones tan suaves y con soportes Biosynth (unión multipuntual desfavorecida), en la Electroforesis 9 se observa que la DAO se sigue uniendo fuertemente al soporte, y no se desorbe a concentraciones altas de Imidazol (carriles 4 y 5) quedando retenida en el soporte (carril 6).

Resumiendo los últimos resultados, parece que la interacción proteína-soporte es muy fuerte y no se debilita cuando:

- Se reduce el número de grupos quelato del soporte por volumen de gel.

- Se la adsorción tiene lugar en condiciones muy suaves.
- Se adsorbe en presencia de Imidazol.
- Se emplean soportes en los que no se favorece la unión multipuntual.

Por lo que el mecanismo que nos planteamos en un principio parece que no se sigue. Ya que si la interacción tuviera lugar de la forma indicada en la Figura 32, se hubiera debilitado en los casos ensayados, dificultándose la unión por ambas colas de histidinas a distintos metales. Además, según la Tabla 15, la DAO va perdiendo actividad a medida que se va uniendo a los soportes EPI-30-IDA-Zn, por lo que, los datos anteriores nos inducen a planteamos otro tipo de interacción (Figura 35). Si la interacción fuera de este tipo, las propiedades del catión quelante (tamaño, electronegatividad ...) serían decisivas a la hora de considerar tanto la fortaleza de la unión como la posible distorsión de la estructura 3D que daría lugar a una pérdida de actividad.

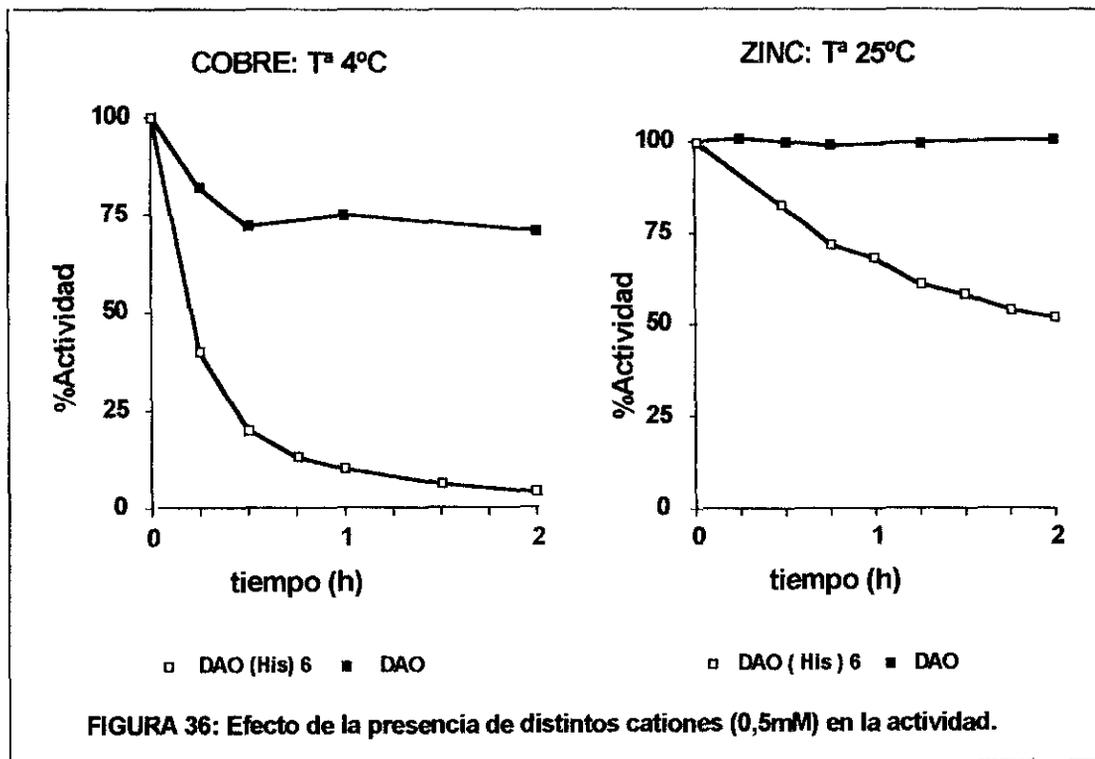


2.2.3.- INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE DISTINTOS CATIONES (0,5 mM) EN LA ACTIVIDAD DE: DAO T SOLUBLE Y DAO FUSIONADA SOLUBLE

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

El estudio de la influencia de distintos cationes (Cu, Zn, Ni y Co) en la actividad de ambas nos permitió observar que:

El efecto de algunos cationes (Cu, Zn) es distinto según la DAO esté o no fusionada. En las dos gráficas correspondientes a la Figura 36, se observa que en el caso de la DAO fusionada la presencia de Cobre y Zinc afecta más notablemente a la actividad que si la proteína no posee ambas colas de histidinas.



Es posible que se pueda dar una interacción de ambas colas por unión a un metal y esto pueda ocasionar cambios en la estructura que den lugar a pérdidas de actividad. De manera que en la adsorción de la DAO fusionada podría tener lugar un mecanismo de interacción que involucrara las dos colas de histidina en la unión a un sólo grupo quelato del soporte.

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

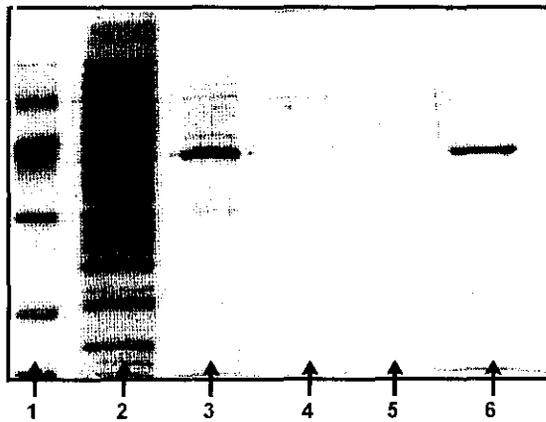
Si fuera así, variando el metal del soporte, la fortaleza de la interacción podría variar y la pérdida de actividad originada por este tipo de unión podría reducirse (tabla 16). Por este motivo se estudió la variación de la actividad de la suspensión con el tiempo a medida que la DAO fusionada se iba adsorbiendo a los quelatos preparados con distinto catión.

Tabla 16: Adsorción de DAO (His)₆ a soportes quelato metálico (5 μ moles /ml gel)

SOPORTE	% DAO ADSOR.	ACT. SUSPENSIÓN
Cobre	100	5
Zinc	90	63
Níquel	90	78
Cobalto	75	100

Empleando quelatos de cobalto, no se observaba pérdida de actividad en la unión y la interacción DAO-soporte de afinidad era más débil. Así, por adsorción selectiva y posterior desorción con 50 mM de Imidazol se obtenía la DAO pura (Electroforesis 10) (carril 4). La gran variedad de soportes ha hecho posible la purificación por adsorción/desorción selectiva de una proteína con dos dominios de fusión que por sus características especiales confería grandes dificultades debido seguramente a la facilidad que presenta para la adsorción vía dos colas de His-un grupo quelato del soporte. Este mecanismo de unión haría indispensable ejercer un gran control de las condiciones para que la unión fuera más débil y no provocara pérdidas de actividad.

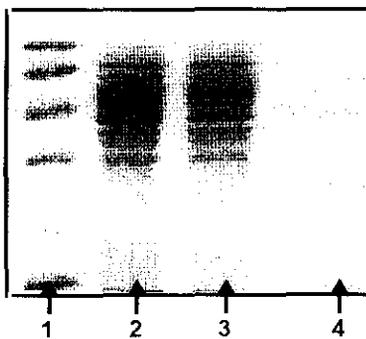
**ADSORCION DE DAO FUSIONADA
A SOPORTES BIOSYNTH**



- (1) Patrones
- (2) Extracto
- (3) Proteínas adsorbidas a BIO-10-Zn
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 20mM
- (5) Proteínas desorbidas con Imidazol 200mM
- (6) Proteínas retenidas en el soporte después de la desorción

Electroforesis 9

PURIFICACION DE DAO FUSIONADA



- (1) Marcadores de Pm
- (2) Extracto
- (3) Proteínas no adsorbidas a EPI-5-Co
- (4) Proteínas desorbidas con Imidazol 50mM

Electroforesis 10

CONCLUSIONES

El trabajo se centraba en la purificación de proteínas fusionadas, pero la gran versatilidad de los soportes de agarosa caracterizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, nos capacita para obtener soportes de afinidad adecuados para el desarrollo de distintas estrategias de purificación por adsorción selectiva de tanto de proteínas fusionadas como de nativas. Esto evita o al menos, *disminuye la adsorción no deseada* de proteínas provocada por la morfología de la agarosa, haciendo posible:

- La purificación de proteínas que se inactiven en presencia de un catión determinado ya que se podrían proponer vías alternativas que por medio de otros quelatos permitieran purificar la proteína de interés.
- Purificación de proteínas que poseen las regiones de afinidad en zonas poco expuestas (empleo de brazos espaciadores).

Mediante el empleo de soportes más selectivos, en los que solo quedara retenida la proteína de interés, o una pequeña fracción de las proteínas restantes, se reducirían las complejas etapas de desorción que han de llevarse a cabo con soportes comerciales.

El desarrollo del trabajo planteado, no solo ha permitido resolver los objetivos propuestos, sino que, además se ha podido estudiar "a *grosso modo*" la posibilidad de purificar proteínas nativas, asignándose los soportes que podrían ser adecuados para cada caso:

- a.- Para proteínas sin afinidad hacia el soporte: mediante un soporte de alta carga (empleado Cu como catión quelante) por una primera etapa de semipurificación en la que las proteínas con afinidad quedarían retenidas en el soporte obtendríamos en el sobrenadante la proteína de interés semipurificada.
- b.- Para proteínas con alta afinidad: se reduciría el número de grupos del soporte, y empleándose determinados cationes quelantes (Zn, Ni), podríamos llevar a cabo la adsorción selectiva de la proteína de interés.

Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos

c.-Para proteínas con afinidad intermedia: la gran disponibilidad de soportes facilitaría su purificación, por adsorción más o menos selectiva o incluso desarrollando métodos de purificación en cascada con diversos soporte.

- Purificación de proteínas fusionadas:

*** Proteínas fusionadas con una cola de 6 Histidinas:**

Una vez obtenidas las condiciones y soportes adecuados para la purificación de proteínas con gran afinidad, se llevó a cabo la purificación de una proteína con un dominio de fusión tomándose como modelo la Glutamil Acilasa-(His)₆.

- Se emplearon soportes de cobre con baja carga y realizándose la adsorción en presencia de ligando competitivo (imidazol) se consiguió purificar la proteína fusionada por adsorción selectiva a los soportes de afinidad. Trabajando con un catión quelante poco selectivo se ha purificar la proteína de fusión por adsorción selectiva, limitando la adsorción de proteínas nativas al emplear soportes con pocos grupos quelato.
- Gracias, a la posibilidad de obtener una gran variedad de soportes; se han desarrollado otros protocolos de purificación empleándose soportes agarosa-quelato de Zn. De esta forma, dada la mayor selectividad de este catión se consigue obtener la proteína de fusión con un alto grado de pureza por un procedimiento rápido y sencillo.

La gran versatilidad de estos soportes, combinada con la posibilidad de utilizar agarosas de distinto tamaño de poro según el tamaño de la proteína a purificar, hace que dispongamos de varias vías de purificación para la adsorción/desorción de proteínas fusionadas con una cola de His.

*** Proteínas fusionadas con dos colas de 6 Histidinas**

En el caso de la DAO fusionada (dos dominios de fusión), la gran disponibilidad de soportes nos ha permitido:

- Establecer un hipotético mecanismo de unión: dos colas de histidina-un grupo quelato.
- Llevar a cabo la purificación mediante el empleo de soportes de baja carga y usando cobalto como catión quelante.

IV.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A PROTEÍNA A

INTRODUCCIÓN

1.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La Cromatografía de Afinidad ocupa un destacado lugar entre las técnicas de purificación de proteínas. Está basada en el reconocimiento específico y reversible de la molécula que va a ser purificada hacia el ligando inmovilizado en el soporte inerte. Los ligandos inmovilizados interactúan selectivamente con alguna proteína generalmente porque son análogos de sustratos, de inhibidores competitivos e incluso de inhibidores alostéricos. Es una cromatografía mucho más selectiva que las convencionales (intercambio iónico, adsorción hidrofóbica, filtración en gel) ya que estas están basadas en propiedades estructurales que son menos específicas y la cromatografía de afinidad está basada en características funcionales muy específicas. En la literatura científica encontramos una gran variedad de ligandos que pueden ser empleados para la purificación de biomoléculas (Angal, S. y col. 1989), a continuación vemos algunos ejemplos:

Ligandos	Biomolécula
<i>Proteína A / Proteína G</i>	<i>Inmunoglobulinas de varias especies</i>
<i>Anticuerpos Monoclonales</i>	<i>Antígenos, proteína A</i>
<i>Antígenos</i>	<i>Anticuerpos Monoclonales /Policlonales</i>
<i>Esteroides</i>	<i>Receptores esteroidicos</i>
<i>Ácidos Grasos</i>	<i>Proteínas de unión a ácidos grasos</i>
<i>Inhibidores de proteasas</i>	<i>Proteasas</i>
<i>Lectinas</i>	<i>Glicoproteínas</i>
<i>Azúcares</i>	<i>Lectinas, Glicosidasas</i>
<i>Ácido fosfórico</i>	<i>Fosfatasas</i>
<i>Heparina</i>	<i>Factores de coagulación, lipasas, proteasas, DNA polimerasas</i>
<i>Calmodulina</i>	<i>Enzimas de unión a Calmodulina</i>

En la mayoría de los casos los ligandos son de pequeño peso molecular y el principal problema reside en algunos impedimentos estéricos para el encaje entre el ligando inmovilizado y el centro activo de la proteína o bien en interacciones no específicas con otras proteínas cuando el soporte de afinidad tiene una elevada densidad de ligandos con características de intercambiadores iónicos, ligandos hidrofóbicos etc.. Es decir, problemas similares a los comentados en el apartado anterior para la cromatografía de afinidad sobre quelatos metálicos. En cuanto a la desorción se puede hacer en condiciones suaves utilizando elevadas concentraciones de ligandos solubles lo que provoca la desorción de las proteínas puras en condiciones suaves. En la Tabla observamos también ejemplos donde los ligandos son también proteínas. En este caso, un diseño adecuado de los sistemas cromatográficos es más complejo ya que los problemas estéricos pueden ser mucho más importantes y la desorción ha de hacerse modificando las condiciones experimentales (por ejemplo, cambio del pH). Estos problemas han recibido poca atención en la literatura científica ya que en la mayoría de los sistemas enzimáticos de interés industrial, las enzimas deben actuar sobre sustratos pequeños.

2.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD PROTEÍNA INMOVILIZADA-PROTEÍNA LIGANDO

La inmovilización de proteínas y enzimas de interés industrial, que una vez en fase sólida deben actuar sobre sustratos o ligandos macromoleculares, supone un problema general tanto para determinadas reacciones industriales como para el desarrollo de técnicas de cromatografía. Este es el caso, de la inmovilización de *nucleasas* para la hidrólisis de ácidos nucleicos, de lectinas para la purificación de glicoproteínas (Angal, S. y col. 1989), de proteasas como la renina (Penzol, G. 1996), de anticuerpos para unión específica de su antígeno, o como en el caso que tomaremos de ejemplo para nuestro estudio, la inmovilización de receptores Fc para la purificación de anticuerpos (150.000 D).

Al tratarse de un ligando macromolecular los problemas estéricos serían de gran importancia. La proximidad del soporte podría enmascarar parcialmente el sitio de reconocimiento para la proteína (ligando macromolecular) e impedir la interacción proteína

inmovilizada-proteína ligando. Además, como se trata de una interacción proteína-proteína la desorción no podría hacerse por adición de proteína ligando sino que debería hacerse por modificación de condiciones tales como el pH pudiendo dicha modificación afectar a alguna de las proteínas. Una ligera distorsión de la proteína inmovilizada puede producir alteraciones en las zonas de reconocimiento para la proteína ligando. Sin embargo, esto se puede utilizar positivamente en el caso de que la afinidad por ambas proteínas sea muy grande ya que un debilitamiento de la interacción proteína-proteína puede simplificar los procesos de desorción.

3.- GELES DE AGAROSA COMO SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA PROTEÍNA-PROTEÍNA

Como se ha comentado en el capítulo anterior los geles de agarosa son ideales para cromatografía debido a que son bastante inertes e hidrofílicos por lo que la interacción proteína-soporte es específica teniendo lugar a través de los grupos del soporte que previamente han sido activados y derivatizados. La agarosa está constituida por fibras de gran diámetro que simulan superficies planas, en el proceso de inmovilización de proteínas esto genera una serie de ventajas e inconvenientes.

- Como se demostró en el capítulo II, la morfología de la agarosa capacita especialmente a este soporte para procesos de inmovilización multipuntual. Así, mediante un control del grado de activación es posible obtener soportes de agarosa con un mayor o menor número de grupos reactivos y esto unido al control de las condiciones empleadas en el proceso de inmovilización podría permitirnos optimizar el grado de multiinteracción. Esta optimización nos capacitaría para obtener derivados estables en los que las zonas de reconocimiento de la proteína inmovilizada se han alterado de manera que siguen reconociendo proteína ligando pero la interacción es más débil, pudiendo realizarse protocolos de desorción de la proteína ligando en condiciones más suaves.
- Por otra parte, el hecho de que la morfología interna del soporte sea de superficies planas, puede tener desventajas cuando la proteína inmovilizada debe de actuar frente a

un sustrato o ligando macromolecular. En este caso, el acceso del ligando puede verse impedido o al menos dificultado por el impedimento estérico del soporte.

A continuación se comentan las *estrategias que se han planteado para superar las desventajas de la agarosa (soporte "superficie-plana") en el acceso de ligandos macromoleculares (anticuerpos) a las zonas de reconocimiento de la proteína inmovilizada* (Guisán, J.M. y col. 1997). En este caso, la agarosa ejerce un impedimento estérico que podría ser subsanado:

1.- Realizando una **Inmovilización orientada** de la proteína de manera que las zonas de reconocimiento para proteína ligando queden lo más expuestas posible. Utilizando soportes glioxil - agarosa y variando las condiciones se desarrollaron dos inmovilizaciones con distinta orientación relativa proteína A/soporte.

a.- Inmovilización de proteínas a través de su área más rica en grupos amino a soportes activados con grupos glioxilo

Los grupos aldehído del soporte, al reaccionar con un grupo amino superficial de la proteína forman bases de Schiff, dando lugar a una inmovilización reversible. Para que la unión proteína-soporte sea estable, en la interacción han de estar involucrados al menos, dos pares amino-aldehído. La reacción bipuntual ha de tener lugar en medio muy alcalino. Y como resultado se obtiene la inmovilización orientada de la proteína por la región que presente mayor densidad de residuos Lys ya que serán los que más fácilmente puedan dar lugar a este tipo de interacciones bipuntuales (Guisán, J.M. 1988; Blanco, R.M. y col. 1989).

b.- Inmovilización de proteínas a través de un grupo amino de bajo pK (amino - terminal) en presencia de Trimetilamino borano (TMAB)

Para la inmovilización de proteínas a través del residuo amino-terminal (Guisán, J.M. y col. 1997), podemos asumir que los ϵ -amino de las lisinas expuestas al medio tendrían un pK próximo al del aminoácido libre (10,5-10,7). Sin embargo el amino-terminal de una proteína tiene un pK menor (7,0-8,0). Así, a pH 8,0 el amino-terminal sería más de 300 veces

Cromatografía de Afinidad a Proteína A

más reactivo que los residuos lisina, y en presencia de TMAB la unión se haría irreversible (Shainoff, J.R. 1980; Miller, A.W. 1983).

2.- Preparando soportes de **agarosa-brazo espaciador**, que separarían a la proteína inmovilizada del soporte, disminuyéndose así los impedimentos estéricos que ejerce éste a la llegada de la proteína ligando. La utilización de brazos espaciadores entre ligandos y soporte se desarrolló principalmente en cromatografía de afinidad para lograr que el ligando en fase sólida pudiese interactuar con el centro de reconocimiento de las proteínas, generalmente situado en una cavidad, más o menos expuesto.

A continuación se resumen algunos de los brazos espaciadores, comercialmente disponibles (Angal, S. y col. 1989).

Casa Comercial	Brazo Espaciador	Matriz
Bio - Rad	3 - aminopropil y aminopropil succinilado	Agarosa
	3 - 3' - diaminopropil y diaminopropilsuccinilado	Agarosa
ICN	1,2 - diaminoetano	Agarosa
	1-diaminohexano	Agarosa
	3,3'-diaminodipropilamina	Agarosa
Pharmacia	1,6 - diaminohexano	Agarosa
	ácido 6-aminohexanoico	Agarosa
Pierce	3-3'-diaminopropilamina	Agarosa

Generalmente, las cadenas alifáticas de 6-9 átomos de carbono suelen ser suficientes para lograr un perfecto acoplamiento entre el ligando inmovilizado y la proteína en solución. Pero en el caso de ligandos macromoleculares, el problema podría ser mucho más complejo ya que un distanciamiento de pocos Å originado por el empleo de "brazos espaciadores alifáticos" podría no ser suficiente cuando la orientación de la proteína en

relación al soporte no sea buena para el acceso del ligando voluminoso (Hou, C.K. y col. 1991). Por este motivo se ha propuesto la utilización de cadenas polialdehídicas obtenidas por oxidación de dextranos como "brazos espaciadores".

La agarosa, en su forma entrecruzada, es un soporte muy empleado debido a sus propiedades (porosidad, estabilidad, fácil activación, hidrofiliidad etc). En nuestro caso se emplearon brazos espaciadores de dextrano ya que los dextranos por estar constituidos por moléculas de glucosa (hidrofílicas) no interaccionarían con las proteínas de forma inespecífica. Y su gran flexibilidad (facilitaría el acceso de los anticuerpos), su posible derivatización (Rogovin, Z.A. 1972), así como la posibilidad de disponer de dextranos de distinto Pm (variación de la longitud del "brazo espaciador") los hacían adecuados para nuestro propósito.

4.- LA PROTEÍNA A. UN RECEPTOR Fc DE ANTICUERPOS

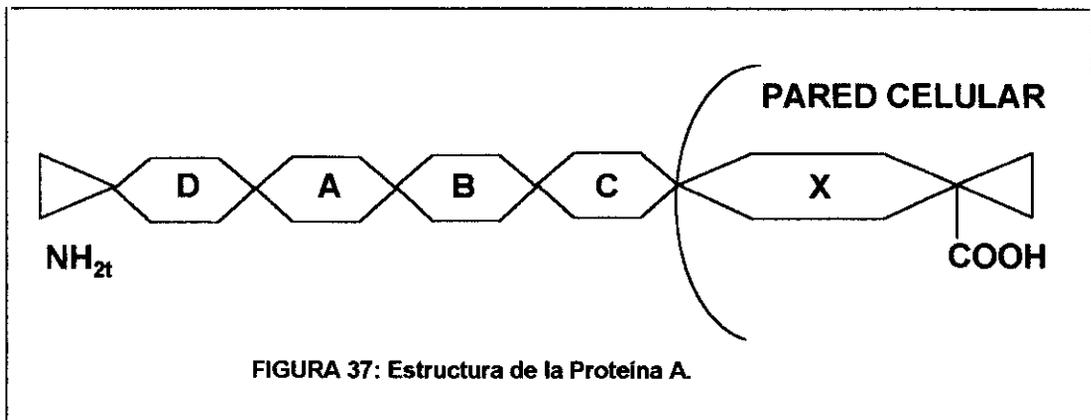
Los receptores Fc han sido encontrados en diversos *streptococcus* y *staphylococcus* y pueden clasificarse en cinco tipos.

Tipo	Procedencia
Tipo I	<i>Staphylococcus aureus</i> (Proteína A)
Tipo II	Grupo A streptococci
Tipo III	<i>Streptococcus equisimilus</i> (grupo C) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (grupo C) <i>Streptococcus humano</i> grupo G
Tipo IV	<i>Streptococcus bovino</i> β -hemolítico grupo G
Tipo V	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> (grupo C)

Se denominan receptores Fc porque la interacción de estos receptores tiene lugar por la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos (Fc), por lo que no afecta al reconocimiento antígeno-anticuerpo (Boyle, M.D.P. y col. 1987). Los más

empleados para la purificación de anticuerpos son: la Proteína G (Åkerström, B. y col. 1985; Janis, L.J. y col 1989; Sun, S. y col. 1992; Eliasson, M. y col. 1989; Guss, B. y col. 1986) y la Proteína A (Hammond, P.M. y col. 1990; Coleman, P.L. y col 1990).

La **Proteína A** (Pm 42 KD) se encuentra covalentemente unida a la pared celular del *Staphylococcus aureus* y es capaz de unir inmunoglobulinas de distintas especies de mamíferos (Goding, J.W., 1978; Kronvall, G. y col. 1970; Lindmark, R. y col 1983; Richman, D.D. 1982). Presenta una forma extendida en la que el amino-terminal se encuentra situado en un extremo (Gouda, H. y col. 1992; Holinski, A. y col. 1994) (Figura 37). En la región N-terminal se encuentran localizados cuatro dominios globulares (D, A, B, C) que presentan alta homología entre sí (Sjödahl, J. 1977 a; Sjödahl, J. 1977 b) y gran afinidad por la región Fc de anticuerpos (Uhlén M. 1984; Deisenhofer, J, 1981; Jendeberg, L. 1996). A pesar de presentar cuatro regiones de alta afinidad, la máxima capacidad de unión de la Proteína A soluble descrita en bibliografía es 1 Proteína A/2 IgG. En el extremo C-terminal se encuentra la región de anclaje a la pared celular del *Staphylococcus aureus* (Región X).



En el desarrollo experimental de este capítulo se utilizó:

- **PROTEÍNA A RECOMBINANTE:** esta proteína tiene entre sus características fundamentales una estructura en hoja beta, con 28 residuos de Lisina en toda su estructura y posee un peso molecular de 32 KD. En esta estructura solo se incluyen: un pequeño fragmento de aminoácidos que vienen de la señal de iniciación de la codificación de la proteína y cuatro de las regiones fundamentales de la proteína A natural (A, B, C y D).

La inmovilización de Proteína A a un soporte sólido (Füglister, P. 1977) ha tenido una gran importancia en procesos de:

- Purificación de IgG: gracias a la alta especificidad de la unión Proteína A - Inmunoglobulina (Coleman, P.L. y col. 1990; Phillips, T.M. y col. 1985; Massom, L.R. y col. 1989; Várady, L. y col 1988; Hou, K. y col. 1991).
- Separación de distintos tipos de Inmunoglobulinas (Leibl, H. 1993; Schuler, G. 1991; Ey, P.L. y col. 1978; Ohlson, S. y col. 1987).
- Purificación de antígenos con columnas de Proteína A- anticuerpo (De Ruiter, G. A. 1992). La unión Proteína A-anticuerpo (región Fc) no impide la unión de antígenos sino que orienta a los anticuerpos de manera que los niveles de unión de antígeno se incrementan.

Como hemos visto anteriormente, la Proteína A (SpA) constituye una poderosa herramienta en diversas técnicas inmunológicas debido a su capacidad para interaccionar con inmunoglobulinas, principalmente IgG, de mamíferos. Una inmovilización adecuada de la proteína A podría proporcionarnos derivados de gran durabilidad. En la actualidad, las columnas más utilizadas son las procedentes de activaciones con BrCN. Estas columnas pueden presentar una alta capacidad de unión de IgG (la máxima unión en el caso de derivados: 1 Proteína A/2 IgG), pero:

- Se caracterizan por una baja constante de unión del ligando acoplado pudiéndose dar pérdidas de proteína A. Esta inestabilidad es debida principalmente a la gran labilidad del enlace isourea formado entre el soporte activado y los grupos amino presentes (Kowal, R. y col. 1980).

- Además, los derivados isourea están cargados positivamente a pH neutro, presentando propiedades de intercambiador aniónico. Pudiendo dar lugar a interacciones inespecíficas de pequeños ligandos, que dificultarían el proceso de purificación.

Nosotros, sin embargo, si logramos unir la proteína A al soporte de forma irreversible y con buena orientación poseeríamos una buena herramienta para abordar la purificación de anticuerpos.

OBJETIVOS

En este capítulo se tratará de evaluar las posibilidades de mejora en el empleo de agarosa como soporte para inmovilizar proteínas que actúan frente a sustratos o ligandos macromoleculares intentando reducir o eliminar sus limitaciones y optimizar sus posibilidades. Como sistema proteína/ligando macromolecular se escogió como modelo la interacción Proteína A/anticuerpo centrandolo el trabajo en lograr:

- La máxima capacidad de unión de anticuerpo por molécula de Proteína A inmovilizada.
- Estabilizar la Proteína A por unión covalente multipuntual, distorsionando ligeramente la proteína inmovilizada para que la proteína ligando se desorba en condiciones más suaves.

Para ello se intentará:

1. **Superar las limitaciones de la agarosa, impedimento estérico en el acceso de ligandos macromoleculares:**

Es lógico pensar que dada la estructura interna de la agarosa ("superficie- plana") y el gran tamaño de las moléculas a purificar (Pm 150.000 D), la orientación de la Proteína A al unirse al soporte va a ser determinante en la mayor o menor exposición de las zonas de reconocimiento para anticuerpo. Se prepararán derivados de Proteína A por unión al soporte a través de grupos amino secundarios (unión muy estable) con distinta **orientación relativa Proteína A-soporte** estudiando el efecto de la orientación en la capacidad de unión a nivel molecular.

Otra estrategia que se ha planteado, es la preparación y empleo de soportes con **brazos espaciadores largos**, flexibles e hidrofílicos que alejaran a la Proteína A del soporte facilitando el acceso de los anticuerpos a las zonas de reconocimiento.

2. **Optimizar la unión multipuntual proteína-soporte intentando aprovechar la facilidad que tiene la agarosa (por su morfología tipo superficie plana) para establecer interacciones multipuntuales proteína-soporte. Una inmovilización estabilizante y ligeramente**

distorsionante de la Proteína A podría provocar una suave distorsión de la misma. De esta forma, la unión multipuntual proteína A-soporte permitiría obtener derivados muy estables a la vez que se podría afectar la fortaleza de la interacción Proteína A/anticuerpo de modo que la elución de los anticuerpos tuviera lugar en condiciones más suaves.

PARTE EXPERIMENTAL:

1.- PREPARACIÓN DE SOPORTES:

1.1.- ACTIVACIÓN DE GELES DE AGAROSA CON GLICIDOL

Los geles glioxil-agarosa fueron preparados por eterificación de los geles de agarosa comerciales 4BCL con glicidol, siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.1.1.

1.2.- OBTENCIÓN DE SOPORTES GLIOXIL-AGAROSA (45 μ moles/ml gel)

Este tipo de geles se obtienen por oxidación estequiométrica de los geles gliceril agarosa 4B-CL con periodato.

Se resuspenden 50 ml de gel en 427,5 ml de agua destilada y se añaden 2250 μ moles de periodato sódico siguiendo el protocolo descrito en II.1.2.

1.3.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE RESINA TOYOPEARL. PREPARACIÓN DE SOPORTE GLIOXIL-TOYOPEARL

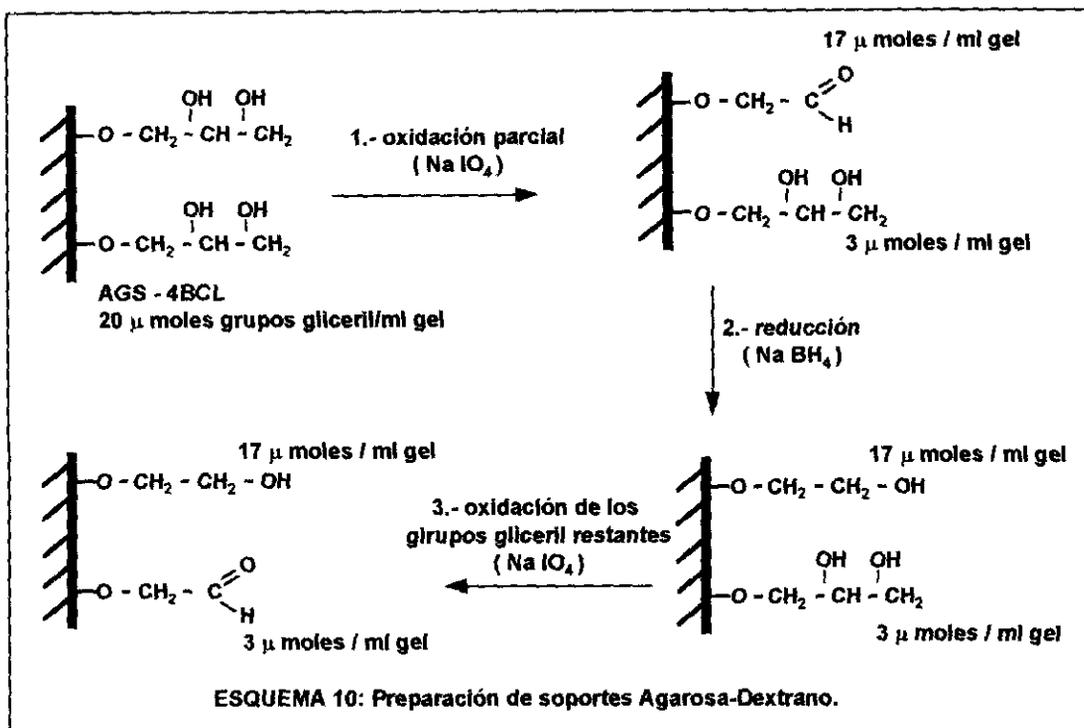
El proceso de activación es idéntico al seguido para el gel de agarosa (Apartado 1.1). Posteriormente, se oxidaba el soporte para obtener 45 μ moles de glioxil/ml gel.

1.4.- PREPARACIÓN DE SOPORTES AGAROSA - DEXTRANO

Para la preparación de este soporte vamos a diseñar un procedimiento en el que los grupos reactivos estén sólo en el dextrano, quedando la agarosa lo más inerte posible.

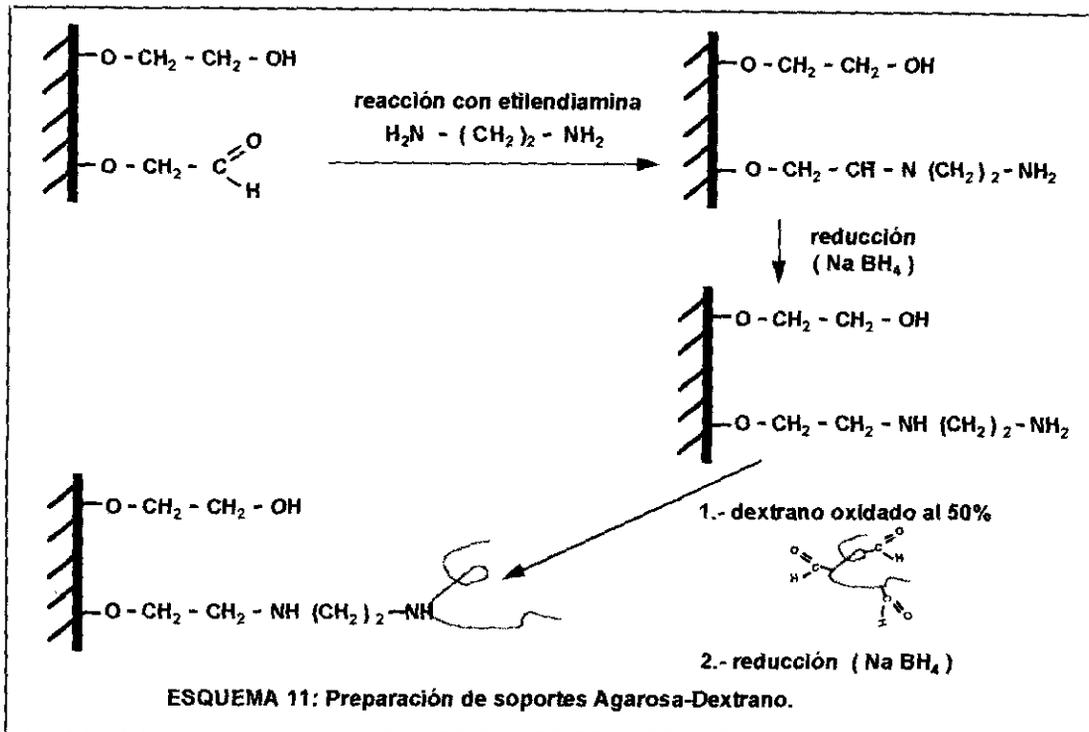
En la preparación del soporte es preciso llevar a cabo diversas etapas, que veremos a continuación.

- 1.- Oxidación parcial de los grupos gliceril presentes en la agarosa 4 BCL (sin necesidad de activación previa).
- 2.- Reducción de los grupos anteriormente oxidados, para la formación de alcoholes primarios.
- 3.- Oxidación de los grupos gliceril no oxidados en el paso (1) (Esquema 10).



- 4.- Reacción de los grupos glioxil del soporte con Etilendiamina y posterior reducción de las Bases de Schiff con borohidruro sódico.
- 5.- Reacción del soporte de agarosa-amino con dextranos parcialmente oxidados, reduciendo el doble enlace formado con borohidruro sódico.
- 6.- Oxidación del soporte agarosa-dextrano (Esquema 11).

En el proceso de entrecruzamiento de la agarosa se utiliza la Epiclorhidrina como reactivo bifuncional. Como subproducto de esta reacción, la agarosa entrecruzada contiene grupos gliceril. La agarosa 4BCL contiene 15-20 μ moles de grupos gliceril/ml gel.



1.- Oxidación parcial de los grupos gliceril presentes en la agarosa 4 BCL (sin necesidad de activación previa).

Se resuspenden 50 ml de agarosa 4BCL en agua añadiendo 850 μmoles de periodato y siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la oxidación de geles gliceril.

2. - Reducción de los grupos anteriormente oxidados, para la formación de alcoholes primarios.

50 ml del soporte obtenido en (1) se resuspenden en 450 ml de tampón bicarbonato 0,1 M ajustado a pH 10,0. Una vez preparada esta suspensión y manteniendo a 25°C con agitación suave se añaden 0,5 g de NaBH_4 . Transcurrida media hora en estas condiciones se lava el soporte con abundante agua.

3.- Oxidación de los grupos gliceril no oxidados en el paso (1)

A partir del soporte obtenido en (2), y operando en las mismas condiciones que en (1) se lleva a cabo una segunda oxidación. Esta vez el periodato añadido debe oxidar los grupos que no se oxidaron en (1) (3 μ moles / ml gel). Esta oxidación se realizó con un pequeño exceso de periodato, añadiendo al gel 500 μ moles de periodato.

4.- Reacción de los aldehidos del soporte con Etilendiamina y posterior reducción de las Bases de Schiff con borohidruro sódico.

Se resuspenden 50 ml de soporte glioxil-agarosa con 3 μ moles de grupos glioxil/ml gel (obtenido en el apartado anterior) en 200 ml de una solución de Etilendiamina 2,0 M de pH 10,0. La mezcla se mantiene con agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se agregan 2 g de NaBH₄ continuando la agitación 2 horas más, y lavando finalmente el gel, en primer lugar con tampón borato 0,1M de pH 9,0, a continuación con tampón acetato 0,1 M de pH 4,0 y, por último, con agua. De esta forma se obtiene el gel con 3 μ moles de grupos amino / ml gel.

5.- Reacción del soporte de agarosa-amino (3 μ moles/ml gel) con dextranos parcialmente oxidados, reduciendo el doble enlace formado con borohidruro sódico

- Oxidación parcial (50%) del dextrano:

Se preparan 50 ml de una disolución de dextrano 33,33 mg /ml en agua, tratando esta disolución con 4,36 g de periodato sódico. Se mantiene durante 2 horas la incubación a temperatura ambiente con agitación suave y posteriormente se dializa frente a agua, lográndose de esta forma oxidar el dextrano al 50%.

Se prepararon soportes con dextranos de dos tamaños distintos (20.000 y 6.000). En ambos casos el protocolo seguido para la oxidación es el descrito en el párrafo anterior.

Se disuelve el TMAB para una concentración final de 150 mM en 50 ml de tampón fosfato 100 mM de pH 7,0 y se le añaden 50 ml de la solución de dextrano oxidado. A la solución resultante se le incorporan 50 ml de gel MANA-agarosa-3 μ moles de grupos amino/ml gel y se deja con agitación suave a 25°C.

Transcurridas 2 horas se procede a la reducción de los enlaces formados que no se hayan reducido durante la incubación con TMAB. Para ello, se ajusta la suspensión a pH 10,0 y se agregan 0,75g de NaBH₄ agitando la suspensión a 4°C durante una hora. Finalmente se procede al lavado del soporte, realizando un primer lavado con tampón fosfato de pH 7,0 y luego con agua destilada.

6.- Oxidación del soporte agarosa-dextrano

Para poder tener grupos reactivos en el soporte (para reaccionar con la proteína) hay que realizar una segunda oxidación del dextrano previamente unido al soporte. Para ello, a los 50 ml de soporte agarosa-dextrano se añaden 500 μmoles de periodato sódico.

2.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE PROTEÍNA A

La Proteína A recombinante, empleada fue donada por Lorenzo Rodés del Centro de Genética y Biotecnología de la Habana. Obtenida por delección de un fragmento N-Terminal no implicado en el reconocimiento de anticuerpos.

2.1.- UNIÓN DE PROTEÍNA A DIRECTAMENTE AL SOPORTE

Los soportes de agarosa empleados son los preparados siguiendo el método descrito en el apartado IV.1. Estos soportes poseen 45 μmoles de grupos glioxil/ml de gel. Trabajando en distintas condiciones, preparamos derivados de proteína A con diferente orientación.

2.1.1.- DERIVADOS ORIENTADOS POR N-TERMINAL

Se preparan 2,8 ml de una disolución de MTAB en tampón Carbonato sódico 0,1 M a pH 8,0, disolviendo la cantidad necesaria de MTAB para obtener una concentración final de 125 mM. Se agregan a esta solución 2 mg de Proteína A, separándose una pequeña fracción (60 ml) para posterior cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford (muestra 1). Se sigue el proceso de inmovilización de la proteína A al soporte. Este seguimiento se realiza por medida de la absorbancia a 280 nm. Las medidas se realizan ajustando a Abs₂₈₀ = 0, previamente la solución de MTAB en el tampón y llevando

un blanco en el que se ha sustituido el volumen de gel por un volumen equivalente de agua. La disminución de la absorbancia del sobrenadante nos da la unión de dicha proteína al soporte.

Cuando se tienen derivados con 1,2-2mg Proteína A/ml de gel (calculados por medidas de absorbancia), se separa una alícuota de sobrenadante para posterior cuantificación por el procedimiento de Bradford (muestra 2). Y una vez separada esta porción se lleva a cabo la reducción del derivado. Para la reducción se añaden 6,2 ml de agua destilada se ajusta a pH 10,0. Se añaden 10 mg de borohidruro sódico dejando la suspensión durante 0,5 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalmente se lava, primero con tampón fosfato a pH 7,0 y posteriormente con agua.

Las alícuotas separadas se cuantifican por Bradford y por diferencia entre los mg/ml de las muestras 1 y 2 se obtienen los mg de Proteína A/ml de gel.

2.1.2.- DERIVADOS ORIENTADOS POR LA ZONA MÁS RICA EN LISINAS

Se disuelven 2 mg de Proteína A en 2,8 ml de tampón Bicarbonato 0,1 M a pH 10,0. Se añade 1 ml del soporte de agarosa y operando de la misma forma que en la unión por amino-terminal (medidas de absorbancia y cuantificación por el método de Bradford) se lleva a cabo la inmovilización y cuantificación de la Proteína inmovilizada.

Nota: Las condiciones de inmovilización (tiempo y temperatura) varían en cada experimento. Por lo que para evitar la complicación de la descripción de los métodos dichas condiciones quedaran explícitas en la exposición de los resultados.

2.2.- UNIÓN DE LA PROTEÍNA A A TRAVÉS DE “BRAZOS ESPACIADORES”

Los soportes de agarosa empleados son los preparados por el procedimiento descrito en el apartado 1.4. El protocolo para la preparación de derivados es el mismo que el descrito en (2.1).

3.- UNIÓN DE IgG_H A DERIVADOS DE PROTEÍNA A

A 1 ml de derivado de Proteína A se le agregan 10 ml de la solución de IgG_H (2,1 mg/ml disuelta en tampón fosfato 50 mM, NaCl 0,25 M pH 7,5). Se mantiene la suspensión con agitación suave a 25°C. Se realizan medidas de absorbancia a 280 nm de alícuotas del sobrenadante cogidas a distintos tiempos y cuando no se observa disminución de la absorbancia con el tiempo se lava el derivado con tampón Fosfato 50 mM, NaCl 0,25 M pH 7,5. Por diferencia entre la medida de la absorbancia de la disolución de partida de anticuerpos y el último sobrenadante recogido se obtienen los mg de IgG unidos/ml de soporte.

Los mg IgG/mg de Proteína A se calculan por el cociente entre: los mg IgG unidos/ml gel (obtenidos por medida de absorbancia a 280 nm) y los mg Proteína A/ml gel.

Los anticuerpos (IgG humana) utilizados fueron cedidos y purificados por Lorenzo Rodés del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana.

4.- INFLUENCIA DE LA ORIENTACIÓN/DISTORSIÓN DE LOS DISTINTOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A EN LA ELUCIÓN DE ANTICUERPOS

A.- Unión de IgG a los derivados de Proteína A

Se toma el volumen necesario de derivado de Proteína A capaz de unir 15 mg de IgG. Se prepara una columna con el derivado equilibrado a pH 7,5 en tampón Fosfato 50 mM, NaCl 0,25 M. Y diluyendo con el tampón de aplicación se preparan 2 ml de IgG_H 7,5 mg / ml.

En un equipo de la casa Pharmacia LKB compuesto por un detector (Control Unit UV-1), un registro (REC-1), una bomba (Pump P1) y un colector de fracciones (Redifrac) se fijan las siguientes condiciones de trabajo:

- * Sensibilidad: 0,2.
- * v_{papel} : 0,2 mm. / min.
- * Colector de Fracciones programado para recoger fracciones cada 30 minutos.
- * 100 mV.
- * Flujo: 2,5 ml / h.

Y al flujo indicado, se procede a la aplicación de los 2 ml de la muestra de IgG_H.

Una vez aplicada la muestra, se lava la columna con el tampón utilizado en la aplicación (las condiciones de la aplicación se mantuvieron en el lavado) hasta que el registro se sitúa en la línea base.

B.- Elución de IgG_H

En esta etapa se fijaron las siguientes condiciones de trabajo.

* Sensibilidad: 0,02.

* v_{papel} : 2 mm. / min.

* Colector de fracciones programado para recoger alícuotas cada 3 minutos (desde la puesta en marcha de la bomba).

* Flujo: 50 ml / h.

* $V_{\text{total de gradiente}}$: 72 ml.

- **Gradiente Lineal:** El gradiente se preparó aplicando la teoría de vasos comunicantes. Para ello se emplearon los siguientes tampones: Tampón Na₂HPO₄ 50 mM / Ácido cítrico 50 mM 1) pH 7,5; y 2) pH 2,6. Pasando finalmente tampón pH 2,6 hasta volver a alcanzar la línea base. Cada una de las alícuotas se iba recogiendo en tubos de 2,5 ml midiendo el pH (para representar posteriormente el gradiente).

5.- DERIVADOS DE PROTEÍNA A ORIENTADOS POR LA ZONA MÁS RICA EN LISINAS: INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE UREA EN LA ELUCIÓN DE IgG

La unión de IgG_H y lavado de la columna se realizó de la misma forma que en el apartado 3. En la elución el protocolo seguido es también el mismo, pero esta vez en los tampones del gradiente se incluía una determinada concentración de urea (0,5 M, 0,75 M, 1,0 M, 2,0 M, 3,0 M y 4,0 M).

6.- DERIVADOS DE PROTEÍNA A ORIENTADOS POR N- TERMINAL: EFECTO DE LA PRESENCIA DE UREA EN EL PROCESO DE ELUCIÓN

El procedimiento seguido en la unión y lavado es el descrito con anterioridad. La elución con distintas concentraciones de urea se siguió conforme lo expuesto, si bien, en

este caso se aplicó un gradiente cóncavo de pH. Empleando un FPLC de la casa Pharmacia (modelo LCC-500-CI) formado por una unidad de control UV-1, acoplada a un sistema de bombas P-500 con un detector UV-1 con filtro de 280 nm y un colector FRAC-100.

7.- PREPARACIÓN DE DERIVADO DE PROTEÍNA A UNIDA A SOPORTES DE AGAROSA (comerciales) ACTIVADOS CON CNBr

En primer lugar, se hidrata el soporte resuspendiéndolo en una solución de HCl 1mM. La suspensión se mantiene con agitación suave durante unos diez minutos, transcurridos los cuales, se filtra lavando con abundante agua destilada.

Se disuelven 2 mg de Proteína A en 2,8 ml de tampón Bicarbonato 0,1 M, NaCl 0,5 M a pH 8,3 y a continuación se añade 1 ml del soporte (previamente hidratado). La cuantificación de la proteína unida al soporte se lleva a cabo de la misma forma que en los derivados anteriormente preparados (medidas de absorbancia y cuantificación por el método de Bradford).

8.- ESTABILIDAD QUÍMICA LOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A

En este apartado se compararon las estabilidades químicas de los derivados de proteína A preparados con distintas orientaciones, con la estabilidad de los derivados de proteína A unida a soportes activados con CNBr. Para estudiar la estabilidad química de los derivados, se aplicaban las muestras de los tres derivados (amino-terminal, orientado por lisinas y derivado ciano) en una placa de electroforesis preparada al 12%. La preparación de muestras se realizó por el procedimiento seguido en el apartado III.4, incluyendo etanolamina 1M en cada una de las muestras. La cuantificación de la proteína se hizo mediante densitometría de los geles de electroforesis con un densitómetro de "Molecular Dynamics" y por integración de las áreas obtenidas de cada banda, comparando la banda obtenida por desorción en presencia de tampón de ruptura y Etanolamina con un patrón de proteína A soluble de concentración conocida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha tratado en la introducción, la Proteína A es un componente de la pared celular del *Staphylococcus aureus*, y presenta cuatro zonas con alta afinidad por determinados anticuerpos (Lindmark, R. y col. 1983). Estas cuatro zonas pueden interaccionar con anticuerpos, si previamente se ha procedido a una digestión con diversas enzimas. Sin embargo, la Proteína A en solución, sólo es capaz de unir 2 moléculas de anticuerpo (ligando macromolecular) por cada molécula de Proteína A (Coleman, P.L. y col. 1990; Uhlén, M. 1984). Por otra parte la inmovilización de la Proteína A en un soporte puede, según las características de éste dificultar el acceso de ligandos macromoleculares (anticuerpos, Pm: 150 KD). En este capítulo se planteó un estudio a nivel molecular del número de moléculas de anticuerpo por molécula de Proteína A que son capaces de unir derivados preparados con diferentes orientaciones. Para ello, se eligieron dos tipos de inmovilización orientada de Proteína A.

1.- MODULACIÓN DE LA ORIENTACIÓN RELATIVA DE LA PROTEÍNA SOBRE EL SOPORTE:

La primera estrategia fue: conseguir derivados de Proteína A en los cuales, la molécula de proteína mostrase diferente disposición espacial en relación al soporte. Para ello, se han variado las condiciones de unión de proteína al soporte de forma que los grupos reactivos que interaccionen con el soporte fueran distintos en cada caso:

- a.- Interacción de los grupos glioxil del soporte con los ϵ -amino de las lisinas: de esta forma la Proteína A se uniría al soporte por la región más rica en lisinas.
- b.- Interacción de los grupos glioxil del soporte con el amino terminal de la proteína.

En ambos casos: Los derivados fueron inmovilizados por unión directa a soportes de agarosa con 45 μ moles de glioxil/ml gel. Se emplearon derivados poco cargados (1,2-2mg Proteína A/ml de gel) debido al alto coste de la proteína. La unión de proteína A al

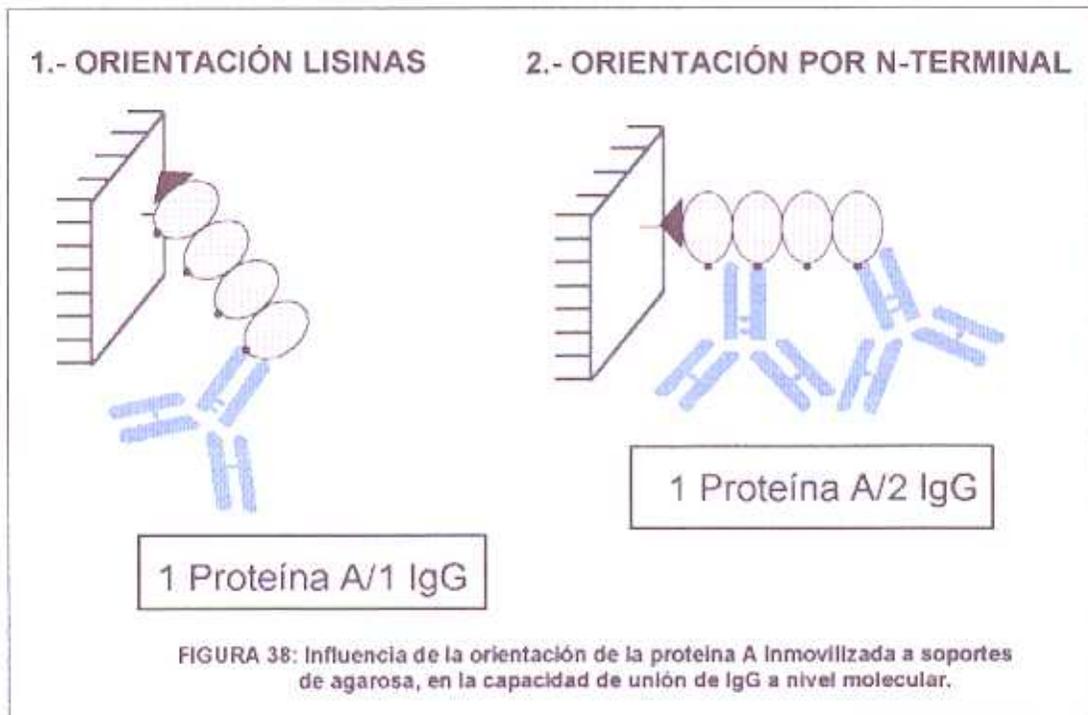
soporte se realizó en condiciones suaves ya que el objetivo era sólo ver el efecto de las distintas orientaciones de la proteína A en la unión de IgG. En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos con ambos derivados.

Tabla 17: Capacidad a nivel molecular de derivados de Proteína A preparados con distinta orientación

ORIENTACIÓN	CONDICIONES de unión de Proteína A	mg IgG/mg Prot A unida	Relación
N-LYS	4°C, 3h	5,6	1PA/1IgG
N-TERM.	25°C, 3h	12,9	1PA/2IgG

Cuando el derivado de Proteína A está orientado por la región más rica en Lisinas se observa que una molécula de Proteína A es capaz de unir tan solo una molécula de anticuerpo. Sin embargo, cuando la Proteína se une al soporte por el amino terminal una molécula de Proteína A es capaz de unir dos de anticuerpo. Como se observa, *la inmovilización orientada a soportes de agarosa nos permite modular la accesibilidad de ligandos macromoleculares (anticuerpos) a las zonas de reconocimiento.*

En este caso dada la forma extendida de la Proteína A, y la posición del Amino-terminal (Sjödahl, J. 1977), parece que la inmovilización por el amino terminal facilita el acceso de dos moléculas de anticuerpo. Mientras que en la orientación por lisinas existe una mayor impedimento estérico por la proximidad con el soporte y la unión de IgG se ve dificultada (Figura 38).



2.- IMPEDIMENTOS ESTÉRICOS OCASIONADOS POR LA MORFOLOGÍA DE LA AGAROSA

La morfología interna del soporte constituye un punto esencial cuando se pretende lograr la estabilización de enzimas. El acoplamiento proteína-soporte dependerá de la morfología del soporte, pudiendo ser un acoplamiento proteína-cadena molecular, proteína-superficie plana, etc.

Los gels de agarosa y el vidrio poroso posibilitan un acoplamiento proteína-superficie plana (Esquema 9), mientras que con el eupergit y el toyopearl, la interacción es proteína-cadena molecular (si bien, por datos experimentales parece que, sobre todo, en el caso del toyopearl, podrían ser fibras de pequeño diámetro). Esto unido a que es un soporte hidrofílico, hace que la agarosa sea un soporte ideal para uniones multipuntuales proteína-soporte. Sin embargo, su morfología "superficie-plana", puede ocasionar problemas

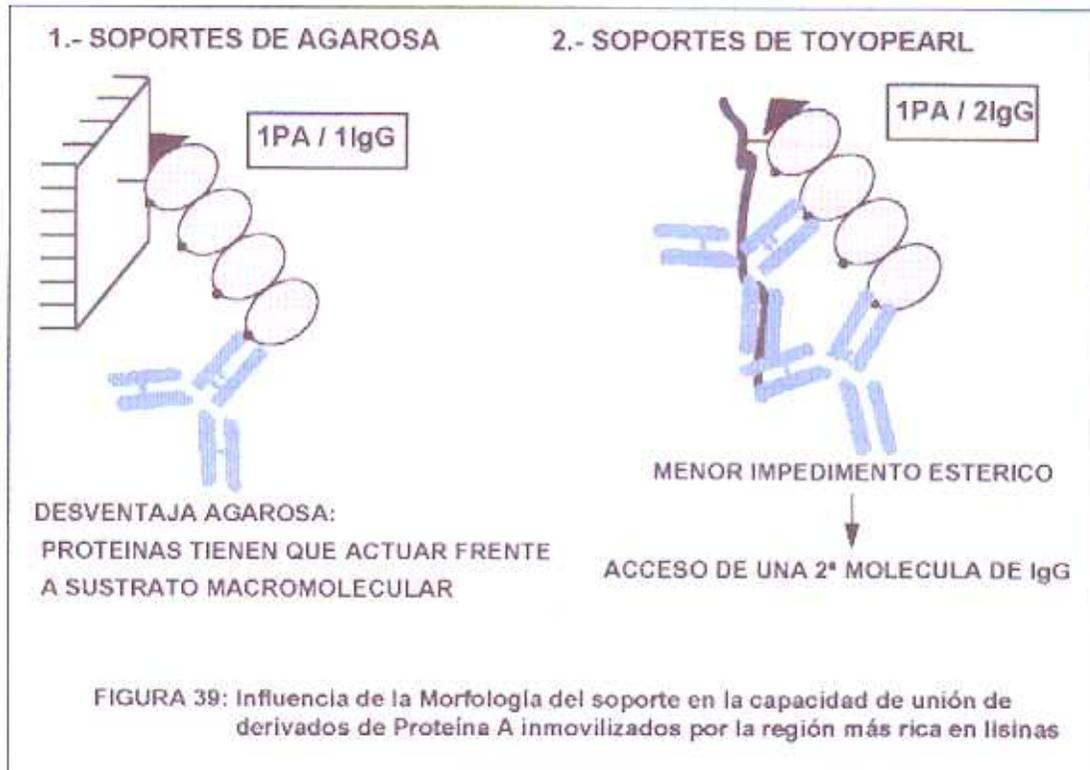
(impedimentos estéricos) a la hora de trabajar con proteínas o enzimas inmovilizadas que tienen que actuar frente a substratos o ligandos macromoleculares. En este caso la orientación de la Proteína A inmovilizada a soportes de agarosa, sería un factor decisivo en la accesibilidad de los anticuerpos a las zonas de reconocimiento. Así una buena orientación (amino- terminal) reduciría el problema del impedimento estérico del soporte.

Los datos que se acaban de presentar podrían ser debidos a los motivos que acabamos de exponer. Para comprobar este razonamiento, se escogió un soporte tipo "malla" (Toyopearl) en el que se reduciría notablemente el impedimento estérico. Y orientando la proteína A por la región rica en lisinas (1 Proteína A/1 IgG) se comparó el efecto del soporte en la unión a nivel molecular Proteína A/Anticuerpo (Figura 39). Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 18: Capacidad a nivel molecular de derivados de Proteína A preparados con soportes de distinta morfología interna.

ORIENTACIÓN	SOPORTE	mg IgG/mg Prot A	Relación
N-LYS	AGAROSA	5,6	1 PA / 1 IgG
	TOYOPEARL	12	1 PA / 2 IgG

Se ha elegido la orientación por la región más rica en lisinas para estudiar el efecto del soporte. En la tabla se observa que cuando el soporte empleado es agarosa la relación molecular es 1/1, en cambio cuando el derivado se prepara inmovilizando sobre toyopearl es posible el acceso de una segunda molécula de anticuerpo por molécula de Proteína A.



A la vista de estos resultados, podemos verificar la teoría anteriormente expuesta. El soporte tipo superficie plana puede ejercer impedimentos estéricos en el caso de proteínas que actúan frente a ligandos macromoleculares, siendo en este caso decisiva la disposición espacial proteína-superficie plana.

Como segunda herramienta para superar la limitación del empleo de agarosa para inmovilizar proteínas que deben actuar frente a ligandos macromoleculares se propuso la utilización de soportes de agarosa con "brazos espaciadores" que separaran la Proteína A del soporte con morfología interna tipo superficie plana. De esta forma se eliminaría el impedimento estérico del soporte, facilitando el acceso de los anticuerpos a las regiones de afinidad de la Proteína A. Para la preparación de soportes con "brazos espaciadores", se emplearon dextranos de distinto peso molecular. Los dextranos están constituidos por

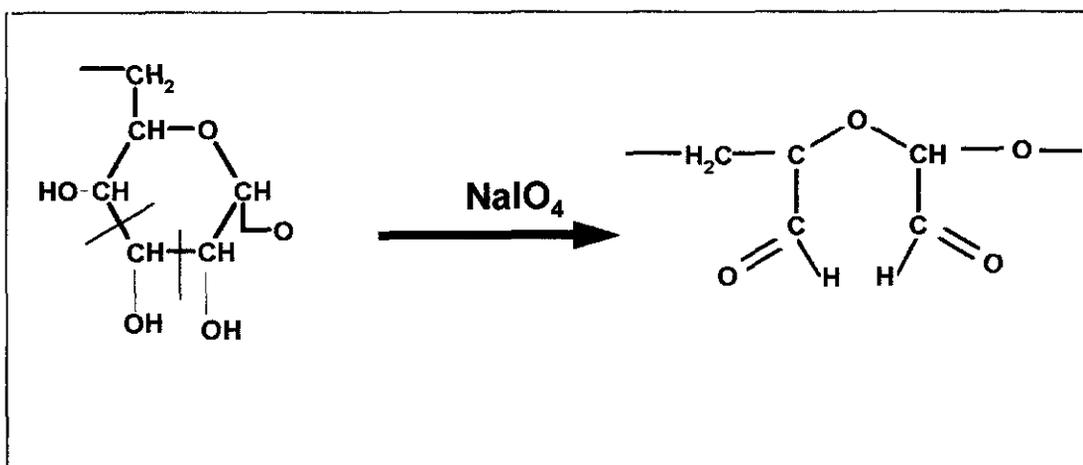
moléculas de glucosa, que oxidando parcialmente con periodato dan lugar a grupos aldehído para la unión de proteínas. Los dextranos son hidrofílicos y muestran gran flexibilidad lo que les hace idóneos para nuestro objetivo.

3.- UTILIZACIÓN DE DEXTRANO COMO AGENTE ESPACIADOR

- Preparación de soportes agarosa-dextrano:

El tratamiento de disoluciones de dextrano con NaIO_4 como agente oxidante en condiciones suaves, provoca la ruptura de los anillos monosacáridos dando lugar a dos grupos aldehído por anillo y liberando CH_2O (Schacht, E.H. 1987; Drobchenko, S.N. y col. 1993). El resultado es la transformación de la cadena polisacárida en una cadena polialdehídica (Figura 40).

La cadena polialdehídica resultante es estable en medios neutros lo cual ha permitido el diseño de un método para la activación del soporte MANA-agarosa, en el que se utilizó como agente complejante el trimetil-amino-borano (TMAB) que actúa haciendo irreversible la unión (Georghean, K.F. y col. 1981) (Billman, J.H. y col. 1961).



- Capacidad de los derivados Agarosa-dextrano:

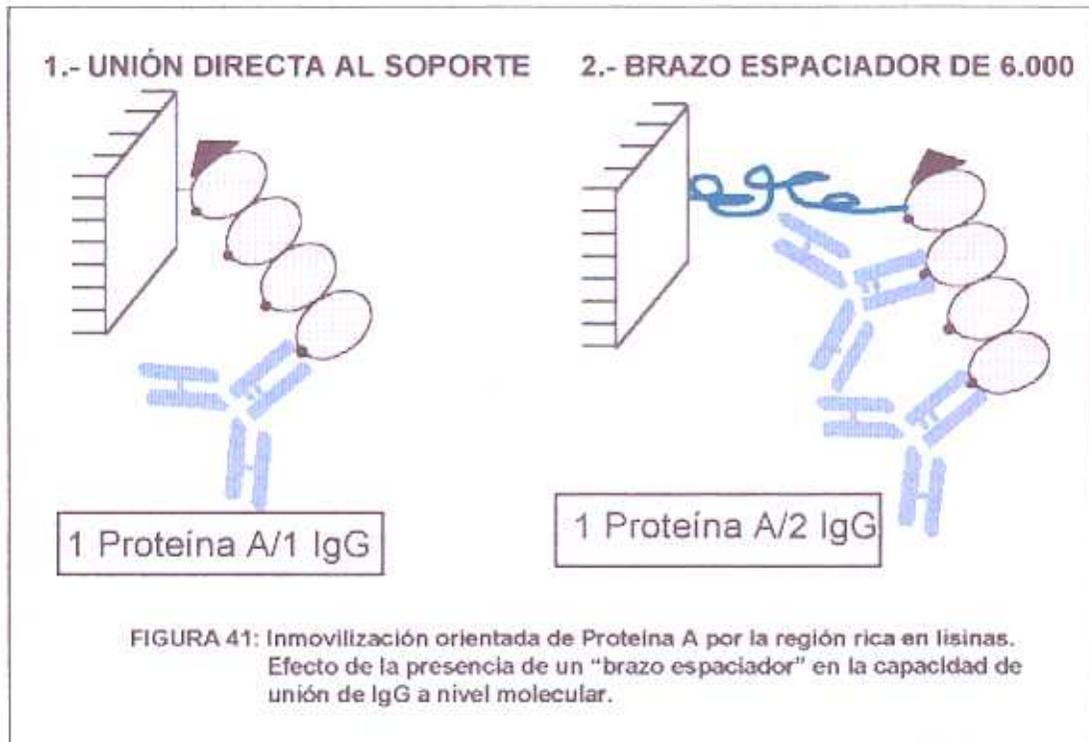
Se prepararon derivados de proteína A empleando soportes Agarosa- dextrano, de distintos pesos moleculares (20.000 y 6.000). La capacidad de unión a nivel molecular de los derivados se expone a continuación.

Tabla 19: Influencia del empleo y tamaño de "brazos espaciadores" en la unión de IgG

ORIENTACIÓN	DEXTRANO	mg IgG/mg Proteína A
N-LYS	-	5,6
	6.000	11,3
	20.000	7

Como se observa en la tabla la capacidad de unión de anticuerpo por la Proteína A inmovilizada aumenta cuando se emplean brazos espaciadores de dextranos. El aumento observado varía con el tamaño del dextrano utilizado, siendo los mejores resultados los obtenidos con dextranos de 6.000, en los que se logra el acceso de una segunda molécula de ligando (IgG) por molécula de Proteína A.

El empleo de dextranos disminuye el impedimento estérico del soporte, alejando la proteína inmovilizada y facilitando el acceso de ligandos macromoleculares a las zonas de reconocimiento de la proteína. Pero, el tamaño del dextrano es importante, ya que debe de ser suficiente para actuar como brazo espaciador (Pm 6.000), pero si tiene un peso molecular elevado (Pm 20.000) dada la gran flexibilidad del brazo, podría "envolver" la proteína dificultando el acceso de los anticuerpos (observándose en la tabla una capacidad de unión peor que con un brazo menor).



4.- INFLUENCIA DE LA DISTORSIÓN DE LA PROTEÍNA A EN LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE ANTICUERPOS.

4.1.- INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA A ORIENTADA POR LOS GRUPOS ϵ -AMINO SUPERFICIALES (Lys).

En la unión covalente de proteínas a soportes glioxil-agarosa el diseño del proceso de inmovilización permite el control de la inmovilización. Así, mediante la modificación de parámetros como la duración de la interacción previa a la reducción de los enlaces formados o la temperatura a la cual tiene lugar el proceso, el grado de unión soporte-proteína varía.

Como se observa (Tabla 20) en derivados de Proteína A orientados por la región rica en lisinas, en los que el proceso de unión de proteína-soporte ha tenido lugar en

distintas condiciones no unen la misma cantidad de anticuerpo. Se observa que a medida que preparamos derivados en condiciones menos suaves, éstos unen menos mg IgG/mg de Proteína A. Parece que si la interacción proteína A-soporte es muy intensa, es posible que exista una distorsión de las zonas de reconocimiento, afectando a la afinidad por los anticuerpos.

4.2.- INMOVILIZACIÓN A TRAVÉS DE GRUPOS AMINO DE BAJO pK (N- TERMINAL)

Esta estrategia, está dirigida a la participación en la reacción con el soporte de aquellos grupos amino de pK bajo de la proteína, como es el caso del amino terminal o algún otro residuo que, por efectos de inducción de grupos próximos, pudieran haber modificado su pK. Sin embargo: a tiempos largos, es posible que tras haberse realizado una primera unión por aminos de bajo pK, la concentración efectiva de grupos soporte-agarosa aumenta pudiendo originarse otras interacciones adicionales que pueden dar lugar a fenómenos de distorsión.

Cuando se preparaban derivados en los que el grado de interacción proteína-soporte variaba se observó el mismo efecto (Tabla 20).

Tabla 20: Influencia de la distorsión y orientación de los derivados de Proteína A en la unión de IgG.

ORIENTACIÓN	SOPORTE	DERIVADO	CONDICIONES DE UNIÓN Prot.A	mg IgG/mg PA
N-LYS	45 CHO	MUY DISTOR	25°C, 4h	3
		DISTOR.	15°C, 0,5h	4,5
		POCO DISTOR.	4°C, 3h	5,6
N-TERM	45 CHO	MUY DIST.	25°C, 72h	4,9
		POCO DIST.	25°C, 3h	12,9

- Parece, que independientemente de la orientación, la posible distorsión motivada por el mayor grado de interacción proteína-soporte da lugar a un peor reconocimiento de los anticuerpos, reduciéndose la capacidad de unión de la Proteína A.

5.- DISTORSIÓN DE LA PROTEÍNA A POR UNIÓN MULTIPUNTUAL AL SOPORTE: INFLUENCIA EN LA FORTALEZA DE UNIÓN PROTEÍNA A-IgG

Se estudio el efecto que podría tener la orientación/distorsión de la Proteína A inmovilizada, en la fortaleza de unión de los anticuerpos. Lo que se pretendía es escoger dos tipos de derivados y estudiar la influencia de una ligera distorsión causada por unión multipuntual controlada Proteína A-soporte, en las condiciones necesarias para la elución de los anticuerpos.

Como ya se estudió en el capítulo II:

- La primera unión de la proteína por la región rica en Lisinas es ya una unión multipuntual y como ya se ha mencionado en numerosas ocasiones la morfología del soporte es decisiva en este tipo de interacción.
- La unión por amino-terminal es unipuntual, de manera que en condiciones suaves de unión la proteína no se distorsionaría en su unión al soporte.

Se prepararon derivados de Proteína A con ambas orientaciones y tras la unión de IgG_H y posterior lavado de la columna, se llevó a cabo una elución con gradiente lineal de pH (figura 42). Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Tabla 21: Parámetros cromatográficos obtenidos en la elución de IgG con gradiente de pH.

ORIENTACIÓN	PICO	TIEMPO	V(ml)	pH
LISINAS	A	57'	44,6	4,5
	B	70,5'	55,2	3,7
N - TERMINAL	A	59,5'	46,6	4,3
	B	87'	68,1	2,9
	C	90'	70,5	2,7

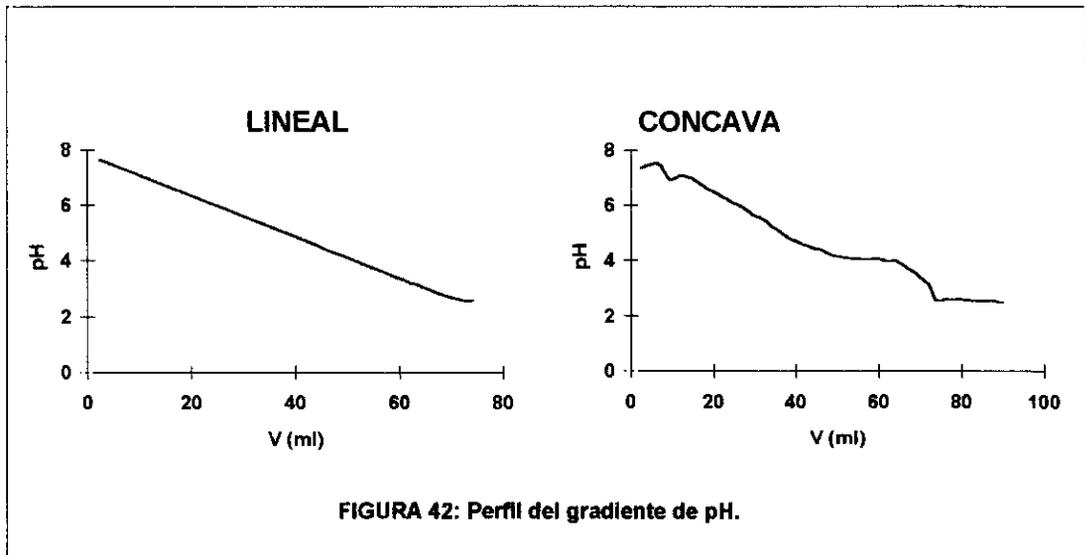


FIGURA 42: Perfil del gradiente de pH.

Existen cuatro tipos diferentes de inmunoglobulina G humana (IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 y IgG_4). La proteína A presenta afinidad por tres de ellos, siendo el tipo IgG_3 el que no quedaría retenido en la columna (Deisenhofer, J. 1981; Shimizu, A. y col. 1983).

* En el derivado unido al soporte por N-terminal, es necesario bajar más el pH para la elución total de IgG. La Proteína A inmovilizada unipuntualmente (no distorsionada) es capaz de unir fuertemente anticuerpos y al no estar alteradas las zonas de reconocimiento es posible fraccionar distintos tipos de inmunoglobulinas (aparecen tres picos en lugar de dos).

* Al inmovilizar la Proteína A por la región más rica en lisinas, se observa que para la elución total de anticuerpo no es necesario bajar tanto el pH. Parece que la unión Proteína A-IgG es más débil debido a que en este caso gracias a la unión multipuntual de la proteína con la agarosa (superficie plana) se ha conseguido una distorsión suave de la misma. Asimismo, esta pequeña distorsión podría afectar a la posibilidad de fraccionamiento de los diversos tipos de IgG (dificultando la separación de los mismos).

Cromatografía de Afinidad a Proteína A

En el caso de derivados de proteína A, unida al soporte por la región rica en lisinas, se estudió el efecto de la presencia de diversas concentraciones de urea (en los tampones de elución) en los parámetros cromatográficos. Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Tabla 22: Orientación Lisinas-Influencia de la presencia de Urea en la elución

[UREA]	PICO	t _{ret}	V _{eluc.} (ml)	pH
0	A	57'	44,6	4,5
	B	70,5'	55,2	3,7
0,5M	A	50'	39,1	4,85
	B	67,5'	52,9	3,75
0,75M	A	47,5'	37,2	4,7
	B	59,2'	46,4	3,7
2M	A	9'	7,1	7,3
	B	46'	36	4,95
	C	56,5'	44	4,3
3M	A	8,5'	6,6	7,2
	B	36,5'	28,6	5,2
	C	49,5'	38,8	4,2
4M	A	6,75'	5,2	7,35
	B	34'	26,6	5,3
	C	46,5'	36,4	4,3

La urea influye en el proceso de elución, pudiendo emplearse para obtener eluciones a pHs más altos. Parece que no afecta por igual a todas las fracciones de inmunoglobulina. A concentraciones altas de urea es posible distinguir tres picos en la elución (las fracciones de IgG con afinidad hacia la proteína A son tres). Los derivados de proteína A orientados por la región rica en Lys parecen adecuados para la purificación de

anticuerpos monoclonales, lográndose eluciones a pH no muy bajos (incluso en determinados casos podría pensarse en utilizar urea para provocar el adelantamiento de la elución). Los resultados obtenidos en la tabla 21, parecían indicar que los derivados orientados por amino-terminal eran adecuados a la hora de pensar en el fraccionamiento de los determinados tipos de anticuerpos con afinidad por la proteína A. En este caso se emplearon gradientes cóncavos que facilitarían la separación de IgG₁, IgG₂ e IgG₄ (figura 42). Además, habíamos visto que la influencia de la concentración de urea en el proceso de elución era distinta en cada tipo de IgG. Por ello combinando ambos factores (gradiente cóncavo de pHs y elución en presencia de determinadas concentraciones de urea) se obtuvieron los resultados de la tabla 23.

Tabla 23: Parámetros cromatográficos obtenidos en la elución de IgG en ausencia y presencia de urea.

[UREA]	PICO	t _{RET}	V _{eluc} (ml)	pH
0	A	35' 5'	27,8	4,95
	B	80'	62,6	3,8
	C	86' 5'	67,7	2,6
1,25 M	A	48'	37,4	5,15
	B	56'	45	4,6
	C	89'	69	3,9
2,0 M	A	33'	26	5,4
	B	35'	27,4	5,3
	C	85'	66,6	3,6

El estudio de los cromatogramas obtenidos en las tres eluciones, permitió diseñar un método de fraccionamiento de los distintos tipos de IgG. Este método se basaba en el distinto comportamiento de los tres tipos de inmunoglobulina G humana con afinidad por la proteína A. Y se basaba en el acoplamiento de dos cromatografías de afinidad en

condiciones distintas de elución. El método diseñado para el fraccionamiento de inmunoglobulina G humana se realizaba siguiendo los pasos:

- 1.- Se montaba una columna con el derivado de proteína A unido al soporte por el amino - terminal (en condiciones suaves). Se aplicaba la muestra de IgG_{total} a la columna, quedando retenidas en ella las fracciones con afinidad (IgG_1 , IgG_2 e IgG_4) (separando la fracción IgG_3 por no presentar afinidad).
- 2.- Elución con gradiente cóncavo (figura) y en presencia de urea 2,0 M en cada tampón de los empleados en el gradiente. El cromatograma obtenido refleja la separación de un pico y el solapamiento de otros dos (A + B) (cromatograma 1). Los parámetros cromatográficos se encuentran en la tabla 23.
- 3.- Aplicación del volumen de muestra correspondiente a los picos (A + B) a la misma columna.
- 4.- Elución con el mismo gradiente cóncavo y en ausencia de urea. En estas condiciones se observa la separación de los picos A y B. (cromatograma 2).

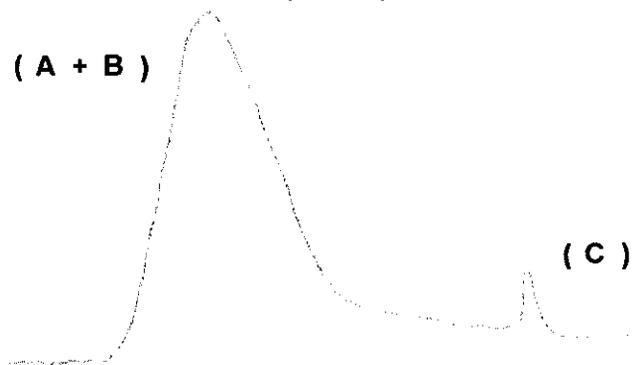
Por combinación de cromatografías de afinidad a proteína A, se ha logrado el fraccionamiento de inmunoglobulina G humana. Para ello hemos empleado el derivado de proteína A unido al soporte por el amino-terminal. Este derivado ha sido preparado en condiciones suaves por lo que la proteína A no se ha distorsionado de manera apreciable y es capaz de fraccionar los distintos tipos de IgG empleando condiciones adecuadas para el propósito.

La asignación se realizó por integración de los picos obtenidos en los distintos cromatogramas y comparación con los datos bibliográficos (Lindmark, R. y col. 1983) sobre el contenido de cada tipo de IgG en sangre (la corroboración de esta asignación se espera realizar posteriormente). Según estos datos el llamado pico A podría corresponder a la IgG_1 , el B a la IgG_2 y el C a la IgG_4 .

**DERIVADO PROTEINA A (N- TERMINAL):
FRACCIONAMIENTO DE ANTICUERPOS**

CROMATOGRAMA 1

● Eluccion con urea (2,0M)



CROMATOGRAMA 2

● Eluccion en ausencia de urea



6.- ESTABILIDAD QUÍMICA DE LOS DERIVADOS DE PROTEÍNA A

Para el estudio de la estabilidad química se escogieron tres derivados:

a) *Derivado de Proteína A preparado por unión a soportes comerciales de agarosa activada con Bromuro de Cianógeno.*

Este soporte es muy utilizado en la purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad. Para comparar la estabilidad de nuestros derivados con los soportes más empleados, se estudió la estabilidad de derivados de proteína A inmovilizados en presencia de Etanolamina.

b) *Derivado de Proteína A orientado por la región rica en Lisinas al soporte agarosa-45 μ moles de aldehído / ml gel.*

c) *Derivado unido al soporte agarosa - 45 μ moles de glioxil / ml gel por amino de bajo pK (seguramente amino-terminal).*

Como se mencionó con anterioridad, las columnas de Proteína A unidas a soportes activados BrCN son inestables frente al ataque de moléculas tales como aminoácidos. Esta inestabilidad está en función de la carga del soporte empleado en la inmovilización (datos proporcionados por el Doctor Lorenzo Rodés). Cuando el soporte está poco cargado la unión proteína-soporte tiene lugar por el amino-terminal (o amino de bajo pK). En este caso, 1 molécula de Proteína A une 2 moléculas de IgG, pero el derivado es poco estable (unión unipuntual) y la Proteína A se va soltando del soporte al romperse la unión. Cuando el soporte (activado con BrCN) posee alta carga, el derivado está unido multipuntualmente al soporte, confiriendo la unión una mayor estabilidad química.

Para estudiar la estabilidad se escogieron derivados de proteína A preparados por unión a soportes comerciales (muy activados). Estos derivados, eran capaces de unir 5,1 mg IgG/mg Proteína A (1 Proteína A/1 IgG), esto parece indicar que en el derivado existe una cierta interacción multipuntual. Esta interacción multipuntual confiere a los derivados una mayor estabilidad química. Sin embargo al incubar los derivados de proteína A en Etanolamina concentrada, se soltaba un 51% de la proteína A unida al soporte. Los derivados ciano de proteína son inestables incluso en el caso de uniones multipuntuales proteína-soporte.

Para comparar nuestros derivados (b y c) con los anteriores, se llevó a cabo la incubación de los mismos en Etanolamina, obteniendo que ambos son químicamente estables (la Proteína A no se soltaba del soporte). Al aplicar en la electroforesis muestras de los sobrenadantes obtenidos hirviendo cada uno de los derivados en presencia de Etanolamina y tampón de ruptura, solo se observaba pérdida de proteína A en los derivados ciano.

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado se resume en los siguientes puntos:

1.- Posibles impedimentos de la superficie interna del soporte: Inmovilización orientada y empleo de Brazo espaciador.

a.- Inmovilización orientada: Mediante el estudio detallado e integral de distintas estrategias de inmovilización orientada, hemos obtenido derivados de proteína A con dos orientaciones distintas:

- 1.- Por una zona rica en lisinas.
- 2.- Por un grupo amino de bajo pK (amino - terminal).

En el primer caso, una molécula de Proteína A une una sola molécula de anticuerpo, sin embargo, si la orientación tiene lugar por el amino-terminal la unión es de dos moléculas de IgG por molécula de proteína A. Estamos uniendo a soportes de agarosa, que por su morfología interna ("superficie-plana") dan lugar a impedimentos estéricos dificultando la entrada de sustratos macromoleculares. Hemos visto la importancia de la **inmovilización orientada** en el acceso de sustratos macromoleculares, obteniendo que con orientación por amino - terminal (dada su localización en la proteína) la proteína A puede unir la mayor cantidad de IgG (a nivel molecular) vista en bibliografía.

b.- Brazo espaciador: La agarosa es un soporte hidrofílico, por lo que para desarrollar una estrategia que nos permitiera eliminar o reducir los impedimentos estéricos del soporte, se pensó en el uso de dextranos (también hidrofílicos) como **brazos espaciadores**. El empleo de agarosa-dextrano (Pm 6.000) eliminaba los impedimentos estéricos del soporte, obteniéndose una relación 1 Proteína A / 2 IgG cuando la inmovilización tenía lugar a través de la zona más rica en lisinas.

2.- La inmovilización multipuntual distorsiona algo la proteína A disminuyendo la fuerza de unión proteína-proteína (facilitando la desorción en condiciones más suaves).

La unión por lisinas, como se vio en el capítulo II, tiene lugar por más de un punto, esto da

lugar a una mayor estabilidad, pero puede ejercer pequeñas modificaciones. Estas, si bien no alteran la purificación, ocasionan una disminución de la fortaleza de unión de los anticuerpos, lo que facilita la etapa de desorción. Así, los anticuerpos retenidos en la columna de afinidad pueden ser eluidos en condiciones más suaves, aumentando la vida media de las columnas. Estas columnas son adecuadas para la purificación de anticuerpos monoclonales por Cromatografía de Afinidad a Proteína A.

3.- Posible fraccionamiento de anticuerpos por combinación de cromatografías. La orientación por amino - terminal (interacción unipuntual), no alteraría las zonas de reconocimiento y podríamos fraccionar los distintos tipos de anticuerpos. Estos, presentan rangos de pH de elución muy próximos e incluso solapados, lo que dificulta su fraccionamiento. Para ello se ha diseñado una estrategia basada en el diferente comportamiento cromatográfico de los anticuerpos en la Cromatografía de Afinidad a proteína A.

4.- Comparación con los derivados comerciales. En la tabla 24 se resumen las características de algunas de las columnas utilizadas para la purificación de anticuerpos por Cromatografía de Afinidad a Proteína A.

Los derivados más utilizados están preparados: por unión de la Proteína A a soportes previamente activados con Bromuro de cianógeno. Estos derivados, son inestables químicamente frente al ataque de determinados grupos. Mediante las dos estrategias de inmovilización, hemos obtenido derivados químicamente estables, con lo que serían mucho más ventajosos que los comerciales.

Cromatografía de Afinidad a Proteína A

Tabla 24: Capacidad de unión de algunas de las columnas de Proteína A.

NOMBRE	mg Proteína A/ml gel	mg IgG/mg Proteína A
<u>BIORAD</u>		
• AFFI-GEL Proteína A	2	5
<u>PIERCE</u>		
• ImmunoPure A	2	3-4
• Immuno Protein A Immobilized	2	6-7,5
<u>PHARMACIA IKB</u>		
• Protein A Superose HR 10/2	2	6
• HiTrap Protein A	3	6,7
• Protein A-Sepharose 4 Fast-Flow	6	6
• Protein A-Sepharose CL-4B	3	6,6
<u>SIGMA</u>		
• Protein A-Sepharose CL-4B	2	10
• Protein A-Sepharose 6BCL	1	6
• Protein A-Agarose	2	10
<u>DERIVADOS TESIS</u>		
• Orientada por N-Terminal		12,9
• Orientada por Lys		5,6
• Orientada por Lys con Brazo de 6.000		11,3

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

A modo de resumen quisiéramos resaltar las principales conclusiones de este trabajo de Tesis Doctoral:

I.- ACTIVACIÓN DE SOPORTES DE AGAROSA CON EPICLORHIDRINA

a.- Entrecruzamiento-Activación con Epiclorhidrina:

- El reactivo empleado en la activación es el mismo que el utilizado en el paso previo de entrecruzamiento (realizado en Hispanagar S.A.). Sería posible, modificando alguna de las condiciones, acoplar la etapa de activación al entrecruzamiento de la agarosa, obteniendo soportes de agarosa entrecruzados y activados (70 μ moles grupos glioxil/ml gel).
- El estudio detallado de las condiciones de activación de agarosa con Epiclorhidrina nos ha permitido establecer una serie de condiciones óptimas que nos permiten obtener soportes activados que poseen una cantidad de grupos reactivos similar a la obtenida por otros métodos.

b.- Preparación de soportes con el máximo número de grupos epóxido

- Si bien no hemos podido obtener soportes en los que la activación transcurra solo hacia la formación de epóxidos. El control de la activación con epiclorhidrina ha permitido obtener soportes con 35 μ moles de Epóxido/ml gel que como se ha visto en el desarrollo de esta Tesis Doctoral (purificaciones por adsorción selectiva) son ya más que suficientes para obtener buenos resultados.

c.- Es posible obtener soportes mixtos Epóxido/Glioxil

- Los soportes mixtos (previa derivatización de los epóxidos con grupos hidrofóbicos) podrían ser aplicados en estrategias de inmovilización orientada. Actualmente estos soportes se están aplicando en colaboración con el Dr. Rodés para la inmovilización orientada de anticuerpos, a través de la región Fc (hidrofóbica).

- Podemos obtener soportes con baja carga de grupos reactivos /ml gel. Siendo, esto muy útil a la hora de procesos de purificación por adsorción más o menos selectiva de la proteína de interés.

II.- VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA AGAROSA DERIVADAS DE SU MORFOLOGÍA TIPO SUPERFICIE PLANA

1.- La morfología de la agarosa hace de esta un soporte ideal para interacciones multipuntuales proteína-soporte.

a.- La unión de proteínas a soportes glioxil tiene lugar a través de una primera, interacción, al menos, bipuntual. La inmovilización de proteínas por unión covalente multipuntual está muy favorecida en el caso de soportes glioxil-agarosa, frente a otros soportes de morfología diferente. Siendo la unión más rápida y más intensa.

b.- La interacción hidrofóbica multipuntual de lipasas a soportes de agarosa hidrofóbicos:

- Es más rápida, que la adsorción hidrofóbica a soportes de morfología tipo fibras (fibras de diámetro menor que la agarosa).
- Y transcurre de forma que se produce hiperactivación de la lipasa adsorbida al soporte (frente a la lipasa soluble).

c.- Es posible, inmovilizar (por unión bipuntual) proteínas a las que artificialmente se les han introducido dos péptidos de alta afinidad hacia el soporte.

d.- La unión multipuntual controlada, facilitada por la morfología de la agarosa, permite una suave distorsión de la proteína unida al soporte. De forma que si la proteína debe actuar frente a ligandos o sustratos, la distorsión permita una elución más suave del ligando. En este caso, nos hemos centrado en la Cromatografía de afinidad a proteína A, observando como la distorsión provocada por la interacción multipuntual (Proteína A-

soporte) da lugar a una elución anticipada de los anticuerpos unidos por afinidad a la proteína A.

2.- Resolver problemas derivados de la morfología de la agarosa (superficie plana)

a.- Purificación de proteínas por adsorción selectiva: La morfología de la agarosa, facilita la interacción proteína-soporte. Esto es una gran ventaja en procesos de inmovilización pero complica los procesos de purificación de proteínas. La agarosa facilita la adsorción de proteínas inespecíficas, con lo que es necesario establecer protocolos de desorción para obtener la proteína a purificar.

- Mediante un uso racional de soportes de afinidad previamente caracterizados, se han diseñados estrategias de purificación (Cromatografía de Afinidad a Quelatos Metálicos) que permiten la adsorción selectiva de la proteína de interés. Pudiendo obtener soportes adecuados para la purificación (adsorción más o menos selectiva) de proteínas con distinto grado de afinidad.

b.- Impedimentos estéricos en Cromatografía de Afinidad: Mediante la caracterización de nuevos soportes, es posible obtener soportes que facilitan la purificación de proteínas glicosiladas o proteínas que poseen grupos de afinidad hacia el soporte en regiones poco expuestas. Así, el empleo de soportes con "brazos espaciadores" posibilitaría la unión que se vería muy impedida debido a la morfología tipo pared de la agarosa.

c.- En el caso de proteínas/enzimas que tienen que actuar frente a ligandos/sustratos macromoleculares.

La morfología de la agarosa (superficie plana) dificulta el acceso del ligando o sustrato macromolecular (anticuerpo) a las zonas de reconocimiento.

- Mediante estrategias de inmovilización orientada, es posible preparar derivados de Proteína A en los que el impedimento estérico del soporte sea el mínimo posible. Preparando derivados de Proteína A orientados por N-Terminal, se reduce el

impedimento del soporte al acceso de anticuerpo pudiendo unir 1 molécula de Proteína A/ 2 moléculas de IgG (capacidad máxima observada en bibliografía).

- El empleo de "brazos espaciadores" (dextranos) que separen la proteína A del soporte también nos permite diseñar estrategias que permitan obtener una buena capacidad de unión proteína A-anticuerpo (1 Proteína A/2 IgG).

En los tres últimos capítulos hemos podido dejar patente la utilidad de soportes de agarosa para procesos de inmovilización, al mismo tiempo que proponíamos estrategias que nos han permitido superar los problemas derivados de la morfología interna de la agarosa.

Por último y a modo de resumen quisiéramos resaltar las principales conclusiones de este trabajo:

1.- Hemos sido capaces de desarrollar métodos para preparar geles aldehído-agarosa con un grado de activación controlado desde 5 a 70 μ moles por mL de gel por activación de agarosa con epíclorhidrina en medio acuoso. Por este mismo método, pero variando las condiciones experimentales, también hemos preparado geles epóxido-agarosa desde 5 a 35 μ moles por mL. Los geles aldehído resultaron muy útiles para diseñar estrategias de inmovilización de enzimas con diferentes orientaciones y con diferente grado de unión multipuntual y los geles epóxido resultaron muy útiles para diseñar columnas cromatográficas con densidades superficiales de ligandos muy controladas.

2.- Hemos demostrado que la inmovilización de enzimas a geles aldehído-agarosa en condiciones básicas ocurre por un nuevo mecanismo de inmovilización multipuntual y esta nueva orientación de enzimas resulta muy interesante para estudiar la inmovilización de enzimas que actúan sobre sustratos macromoleculares y para aumentar la intensidad global de la unión multipuntual enzima soporte.

Conclusiones Generales

3.- Hemos diseñado protocolos de preparación de geles de agarosa con baja densidad en quelatos metálicos de Zn que resultaron muy adecuados para adsorber muy selectivamente proteínas fusionadas con un dominio de poli-histidina sin apenas interferencia de las proteínas nativas de los extractos celulares.

4.- También hemos diseñado protocolos de adsorción selectiva de proteínas multiméricas con dos dominios de poli-histidina y hemos encontrado métodos de adsorción muy fuerte que podrían ser útiles para desarrollar estrategias simultáneas de purificación, inmovilización y estabilización de la estructura cuaternaria de estas enzimas. También hemos desarrollado métodos de adsorción mucho más débil que nos permitían la desorción de la enzima soluble pura en condiciones experimentales suaves.

5.- Hemos logrado preparar derivados proteína A-agarosa con capaces de adsorber hasta dos moléculas de inmunoglobulina por molécula de proteína A. Esta interesante reducción de impedimentos estéricos ocasionados por la superficie de los geles de agarosa se logró gracias a dos estrategias diferentes: a.- una adecuada orientación de la enzima sobre el soporte (inmovilizándola a geles aldehído a través del residuo amino terminal) y b.- al diseño de nuevos soportes agarosa-dextranos en los cuales la proteína A se inmovilizaba lejos de la superficie de agarosa con un brazo espaciador largo, flexible e inerte.

6.- Hemos preparado derivados de proteína A por unión multipuntual a agarosa aldehído que parecían promover distorsiones en la estructura de la proteína A y de hecho nos permitían eluir los anticuerpos adsorbidos en unas condiciones experimentales más suaves (p.e. pH 3,7 en vez de pH 2,7).

PRODUCTOS COMERCIALES

• **SOPORTES**

Geles Agarosa -CL	Hispanagar S.A.
Resina TOYOPEARL® (HW-65F)	TOSOHAAS
Resina BIOSYNTH® (Polymerträger VA-Epoxy)	RIEDEL-DE-HAEN
Butil Sepharosa® (4B)	PHARMACIA BIOTECH.
Fenil Sepharosa® (4 BCL)	PHARMACIA BIOTECH.
Octil Sepharosa® (4 BCL)	PHARMACIA BIOTECH.
Fenil Toyopearl®	TOSOHAAS
Soporte activado con CNBr® (4B)	PHARMACIA BIOTECH.

• **SUSTRATOS**

NIPAB	SIGMA
Cefalosporina C	Antibióticos S.A.
Peroxidasa	SIGMA
FAD	SIGMA
o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido	SIGMA
Sulfóxido de Penicilina G	Antibióticos S.A.
o-fenilendiamina	SIGMA

• **REACTIVOS**

Ácidos y bases	PANREAC
Sales	PANREAC
Cloruro de Niquel	SIGMA
Cloruro de Zinc	SIGMA
Cloruro de Cobalto	SIGMA
Sal disódica del ácido iminodiacético (IDA)	FLUKA
Tampones	MERCK (Alemania)
Periodato sódico	MERCK (Alemania)
Borohidruro sódico	MERCK (Alemania)
2,3- Epoxipropanol (glicidol)	SIGMA
Glutaraldehido 25%	SIGMA
Epiclorhidrina	MERCK
1,4-butanodiol-diglicidil-éter 95%	SIGMA
Etilendiamina	MERCK (Alemania)
Etanolamina	MERCK (Alemania)
Trimetilamino borano	ALDRICH

Productos Comerciales

Acetona	PANREAC
Monoglime	FLUKA
Acetonitrilo	MERCK
Butanol	FLUKA
Fenol	FLUKA
EDTA	SIGMA
Urea	PANREAC
Imidazol	MERCK
Dextranos	FLUKA
Cefalexina	SIGMA
Glicerina 87%	MERCK
Productos de Electroforesis	SIGMA
Patrones: calibración de bajo peso molecular	PHARMACIA
Reactivos ensayo Coomassie Protein	PIERCE

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Åkerström, B.; Brodin, T.; Reis, K. y Björck, L. (1985). "Protein G: A Powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies". *The Journal of Immunology*. Vol. 135, No. 4, 2589-2592.

Alvaro, G.; Fernández-Lafuente, R.; Blanco, R.M.; Guisán, J.M. (1990). "Immobilization-Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 26, 181-195.

Amsterdam, A.; Er-El, Z.; Shaltiel, S. (1975). "Ultrastructure of beaded agarose". *Archives of Biochemistry and Biophysic*. 171, 673-677.

Andersson, L. y Porath, J. (1986). "Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe^{3+}) Affinity Chromatography". *Analytical Biochemistry*, 154, 250-254.

Angal, S. and Dean, P.D.G. (1989). "Purification by exploitation of activity". En: "*Protein purification methods a practical approach*, Chapter 5, (Harris, E.L.V. and Angal, S. de.). IRL Press, Oxford University Press.

Anspach, F.B.(1994). "Silica-based metal chelate affinity sorbents. I. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques". *Journal of Chromatography, A*, 672, 35-49.

Araki, C. (1956). "Structure of the agarosa constituent of agar-agar". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*; 29:43-44.

Armisen, R. (1991). "Agar and agarose biotechnological applications". *Hidrobiología*. 221, 157-166.

Armisen, R. (1992). "Productos derivados del Gelidium: producción, estructura y aplicaciones". En: *Gelidium: de los recursos a las aplicaciones*. Editores: J.A. Juanes y S. González. Diputación General de Cantabria.

Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J. y Guisán, J.M."A single step purification, immobilization of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports". Manuscrito en preparación.

Belew, M.; Yip, T.T.; Andersson, L. y Ehrnström, R. (1987). "High-Performance Analytical Applications of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". *Analytical Biochemistry*, **164**, 457-465.

Billman, J.H. y McDowell, J.W. (1961). Reduction of Schiff Bases. III. Reduction with dimethylamine borane. *Journal Org. Chem.* **26**, 1437-1440.

Blanco, R.M.; Calvete, J.J.; Guisán, J.M. (1989a)."Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment". *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 353-359.

Blanco, R.M.; Guisán, J.M. (1989b)."Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohidride reduction of trypsin-agarose derivatives". *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 360-366.

Bloomer, S., Aldercreutz, P., Mattiasson, B. (1992). "Facile synthesis of fatty acid esters in high yield". *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 546-552.

Boyle, M.D.P. y Reis, K.J. (1987) "Bacterial Fc Receptors". *Bio/Technology* Vol. **5**, 697-703.

Bornscheuer, U., Reif, O-W., Lausch, R., Freitag, R. Scheper, Kolisis, F.N., Menge, U. (1994). "Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization". *Biochim. Biophys. Acta* **1201**: 55-60.

Brady, L., Brozozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J-P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U.(1990)."A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature*. **343**: 767-770.

Bullock, C. (1989). "Immobilized enzymes". *Education in Chemistry*. Nov., 179-182.

Cavaille, D. y Combes, D. (1995). "Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Applied Biochemistry*, **22**, 55-64.

Coleman, P.L.; Walker, M.M.; Milbrath, D.S. y Stauffer, D.M. (1990). "Immobilization of Protein A at high density on azlactone-funtional polymeric beads and their use in affinity chromatography". *Journal of Chromatography*, **512**, 345-363.

Chibata, Y.; Tosa, T. y Sato, T. (1991). "Industrial Applications of Immobilized Proteins". En: *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*. ed: Taylor, R.F. Dekker.

Dandik, L., Aksoy, H.A. (1996). Applications of *Nigella sativa* seed lipase in oleo-chemical reactions". *Enzyme Microb. Technol.* **19**:277-281.

D'Aniello, A.; D'Onofrio, G.; Pischelota, M.; D'Aniello, G. (1993). "Biological role of D-aminoacid oxidase and D- aspartate oxidase". *The Journal of Biological Chemistry*, **268** / 36, 26941-26949.

Derewenda, U., Brozowski, A.M., Lawson, D.M., Derewenda, Z.S.(1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase". *Biochemistry*. **31**: 1532-1541.

Derewenda, Z.S., Derewenda, U. (1992). "The crystal and molecular structure of the *Rizomucor miehi* tryacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution". *J. Mol. Biol.* **227**:818-839.

Derewenda, Z.S. (1995). "A twist in the tale of lipolytic enzymes". *Structural biology* **2**: 347-349.

De Rooter, G.A.; Smid, P.; Schols, H.A.; Van Boom, J.H. y Rombouts, F.M.. (1992). "Detection of fungal carbohydrate antigens by high-performance immunoaffinity chromatography using a protein A column with covalently linked immunoglobulin G". *Journal of Chromatography*, **584**, 69-75.

De Zeote, M.C.; Kock-van Dalen, A.C., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.(1996). "Lipase catalysed ammoniolysis of lipids. A facile synthesis of fatty acid amine". *Journal Mol. Cat. B* **1**, 109-113.

Domen, P.L.; Nevens, J.R.; Mallia, A.K.; Hermanson, G.T. y Klenk, D.C. (1990). "Site-directed immobilization of proteins". *Journal of Chromatography*, **510**, 293-302.

Drobchenko, S.N.; Isaeva-Ivanova, L.S.; Kleiner, A.R.; Lomanki, A.V.; Kolker, A.R. y Noskin, V.A. (1993). "An investigation of the structure of periodate-oxidized dextran". *Carbohydr. Res.* **241**, 189-199.

Duckwort, M. y Yaphe, W. (1971). " The structure of the agar - agar. Y. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides". *Carbohydr. Res.*; **16**, 189-197.

Edwards, V.H. (1972). "Future directions in enzyme engineering". *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 3, 343-353.

Eisenstein, E.; Schachman, H.K. (1989). "Determining the roles of subunits". En: *Protein function. A practical approach*. Ed. T.E. Creighton.

Elisasson, M.; Andersson, R.; Olsson, A.; Wigzell, H. y Uhlén, M.. (1989). "Differential IgG-Binding Characteristics of Staphylococcal Protein A, Streptococcal Protein G, and Chimeric Protein AG". *The Journal of Immunology*. Vol. 142, No. 2, 575-581.

Ey, P.L.; Prowse, S.J. y Jenkin, C.R. (1978). "Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, e IgG_{2b} Immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose". *Immunochemistry*, Vol. 15, 429-436.

Fernández - Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Rodríguez, V.; Santana, M.C.; Soler, G.; Bastida, A. y Guisán, J.M.(1993). "Preparation of activated support containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxil coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 546-550.

Figueroa, A.; Corradini, C.; Feibush, B. y Karger, B.L. (1986). "High- Performance Immobilized-Metal Affinity Chromatography of proteins on Iminodiacetic acid silica-based boded phases". *Journal of Chromatography*, 371, 335-352

Forutani, T., Masakatsu, F.; Ooshima, H.; Kato, J. (1996). "N-acylation of amino alcohol by acyl migrations following enzyme catalyzed esterification". *Enzyme Microb. Technol.* 19: 578-584.

Füglister, P. (1989). "Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices". *Journal of Immunological Methods*, **124**, 171-177.

Georghean, K.F.; Cabacungan, J.C.; Dixon, H.B.F. y Feeney, R.E. (1981). "Alternative reducing agents for reductive methylation of amino groups in proteins". *Int. J. Pept. Prot. Res.* **17**, 345-352.

Goding, J.W.. (1978). "Use of Staphylococcal Protein A as an immunological reagent". *Journal of Immunological Methods*, **20**, 241-253.

Gouda, H.; Torigoe, H.; Saito, A.; Sato, M.; y col. (1992). "Three-Dimensional Solution Structure of the B Domain of Staphylococcal Protein A: Comparisons of the Solution and Crystal Structures". *Biochemistry*, **31**, 9665-9672.

Grochulski, P., Li, Y., Schragm, J.D., Bouthilier, F., Smith, P., Haminson, D., Rubin, B., Cyler, M. (1993). "Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase". *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847.

Guisán, J.M.; (1983). "Caracterización de geles de agarosa para la inmovilización y modificación de proteínas". *Resúmenes del III congreso Luso-Español de Bioquímica*.

Guisán, J.M. (1988). "Aldehyde - agarose gels as activated supports for immobilization - stabilization of enzymes". *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 375-382.

Guisán, J.M.; Alvaro, G.; Fernández-Lafuente, R. (1990). "Immobilization-stabilization of penicillin G acylase. An integrated approach". *Annals of the New York Academy of Sciences* **613**, 552-559.

Guisán, J.M.; Bastida, A.; Cuesta, C.; Fernandez-Lafuente, R. y Rosell, C.M. (1991) "Immobilization-Stabilization of α -Chymotrypsin by Covalent Attachment to Aldehyde-Agarose Gels". *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1144-1152.

Guisán, J.M.; Alvaro, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; García, J.L. y Tagliatti, A. (1993). "Stabilization of Heterodimeric Enzyme by Multipoint Covalent Immobilization: Penicillin G Acylase from *Kluyvera citrophila*". *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 1-7.

Guisán, J.M.; Bastida, A.; Blanco, R.M.; Fernández-Lafuente, R. (1997). "Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose: Strategies for Enzyme Stabilization by Multipoint Attachment". En: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Ed: Gordon F. Bickerstaff. Humana Press, **31**, 277-287.

Guisán, J.M.; Bastida, A.; Blanco, R.M.; Fernández-Lafuente, R. y García-Junceda, E. (1997). "Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose". En: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Ed: Bickerstaff, G.F. . Humana Press. 277-287.

Guisán, J.M.; Penzol, G.; Armisén, P.; Bastida, A.; Blanco, R.M.; Fernández-Lafuente, R. y García-Junceda, E. (1997). "Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates". En: *Methods in Biotechnology*, Vol. 1: *Immobilization of Enzymes and Cells*. Ed: G.F. Bickerstaff Humana Press Inc.261-275.

Guss, B.; Eliasson, M.; Olsson, A. y col. (1986). "Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G". *The EMBO Journal*. Vol. **5**, no. 7, 1567-1575.

Hammond, P.M.; Philip, K.A.; Hinton, R.J. y Jack, G.W. (1990). "Recombinant Protein A from *Escherichia coli* JM83". *Annals of the New York Academy of Sciences*. **613**, 863-867.

HandBook of Chemistry and Physics. David R. Lide. Editor in Chief **73RD**, Edition 1992-93, CRC. PRESS.

Hemdan, E.S. y Porath, J.. (1985). "Development of Immobilized Metal Affinity Chromatography". II. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, **323**, 255-264.

Hemdan, E.S.; Zhao, Y-J; Sulkowski, E. y Porath, J. (1989). "Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **Vol 86**, 1811-1815.

Hirase, S.; Araki, C. y Arai, K. (1968). "The synthesis of agarobiose". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* ; **41**, 626-628.

Hochuli, (1985). "Purification of interferon by Metal Chelate Chromatography". *United States Patent*, **4,551,271**.

Hochuli, E.; Döbeli, H. y Schacher, A.. (1987). "New Metal Chelate Adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues". *Journal of Chromatography*, **411**, 177-184.

Hoffman, W.L. y O'Shannessy, D.J. (1988). "Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports". *Journal of Immunological Methods*, **112**, 113-120.

Hou, K.C.; Zaniewski, R.; y Roy, S. (1991). "Protein A Immobilized Affinity Cartridge for Immunoglobulin Purification". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **13**, 257-268.

Jendeberg, L. ; Tashiro, M.; Tejero, R.; y col. (1996). "The Mechanism of Binding Staphylococcal protein A to Immunoglobulin G Does Not Involve Helix Unwinding". *Biochemistry*, **35**, 22-31.

Kato, Y.; Nakamura, K. y Hashimoto, T. (1986). "High - performance metal chelate affinity chromatography of proteins". *Journal of Chromatography*, **354**, 511-517.

Kohn, J. y Wilchek, M. (1981). "Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromida". *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 161-163.

Kohn, J.; Lenger, R. y Wilchek, M. (1983) "p-Nitrophenylcyanate-An Efficient, Convenient, and Nonhazardous Substitute for Cyanogen Bromide as an Activating Agent for Sepharose". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **8**, 227-235.

Kolinski, A y Skolnick, J. (1994). "Monte Carlo Simulations of Protein Folding. II. Application to Protein A, ROP, and Crambin". *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **18**:353-266.

Kowal, R. y Parsons, R.G. (1980). "Stabilization of Proteins Immobilized on Sepharose from Leakage by Glutaraldehyde Crosslinking". *Analytical Biochemistry*, **102**, 72-76.

Krämer, D.M.; Lehmann, K.; Pennewiss, H. y Plainer, H. (1978). "Oxirane Acrylic beads, preparation 2878-C". *Enzyme Engineering*, **4**, 153-154.

Krämer, D.M.; Lehmann, K.; Pennewiss, H. y Plainer, H. (1979). "Oxirane Acrylic beads (prep. 2878 C) for protein immobilization: a novel matrix for biocatalysis and biospecific adsorption". *The XXVI International IUPAC-Symposium on Macromolecules, Mainz*, 2-3.

Kronvall, G., Grey, H.M. y Williams R.C. (1970). "Protein A reactivity with mouse immunoglobulins". *The Journal of Immunology*. **105**, No.5, 1116-1123.

Kutzbach, C.; Rauenbusch, E.. (1974). "Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemistry* **354**, 45-53.

Lahaye, M. y Rochas, C. (1991). "Chemical structure and physical chemical properties of agar. *Hidrobiología*, **221**, 137-148.

Leckband, D. y Langer, R. (1990). "An Approach for the Stable Immobilization of Proteins". *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 227-237.

Leibl, H.; Erber, W.; Eibl, M.M.; Mannhalter, J.W. (1993), "Separation of polysaccharide - specific human immunoglobulin G subclass using a Protein A Superose column with a pH gradient elution system". *Journal of Chromatography*, **639**, 51-56.

Lihme, A.; Schafer-Nielsen, C.; Larsen, K.P.; Müller, K.G. y Bog-Hansen, T.C.. (1986). "Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins". *Journal of Chromatography*, **376**, 299-305.

Lindmark, R.; Thorén-Tolling, K. y Sjöquist, J.. (1983). "Binding of Immunoglobulins to a Protein A and Immunoglobulin levels in Mammalian Sera". *Journal of Immunological Methods*, **62**, 1-13.(review).

Ljungquist, C.; Breitholtz, A.; Brink- Nilsson, H.; Moks, T.; Uhlén, M.; y Nilsson B. "Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using peptide fusions". (1989). *Eur. J. Biochem.* **186**, 563-569.

Louwrier, A., Drtina, G.J., Klibanov, A.M. (1996). "On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media". *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 1-5.

Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.C., Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Luong, C.B.H.; Browner, M.F. y Fletterick, R.J. (1992). "Purification of glycogen phosphorylase isozymes by metal-affinity chromatography". *Journal of Chromatography*, **548**, 77-84.

Malacata, F.X, Reyes, H.R.; García, H.S.; Hill, C.G. Jr. ; Amundson, C.H. (1992). "Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases". *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 426-446.

Massom, L.R.; Ulbright, C.; Snodgrass, P. y Jarrett, W. (1989), "Protein A -Silica: Purification of Antibodies and Antigen / Antibody Complexes by High Pressure Affinity Chromatography". *BioChromatography* , Vol. 4, No. 3; 144-146.

Medin, A.S. (1995). "Studies on Structure and Properties of Agarose". *Tesis Doctoral. Uppsala University*.

Miller, A.W.; Robyt, J.F. (1983). "Sodium Cyanoborohidride in the Immobilization of Proteins to Glutaraldehyde - Activated Aminoalkyl Silica". *Biotechnology and Bioengineering*, Vol XXV, 2795-2800.

Mingarro, Y.; Abad, C.; Braco, L. (1995). "Interfacial activation based molecular bioimprintimp of lipolytic enzymes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3308-3312.

Miron, T.; Wilchek, M.(1981). "Polyacrylhydrazido-agarosa: Preparation via periodate oxidation and use for enzyme immobilization and Affinity Chromatography". *Journal of Chromatography*, **215**, 55-63.

Nilsson, K. and Mosbach, K. (1980). "*p*-Toluenesulfonyl Chloride as an Activating Agent of Agarose for the Preparation of Immobilized Affinity Ligands and Proteins". *Eur. J. Biochem.*, **112**, 397-402.

Nilsson, K.; Norrlöw, O. y Mosbach, K. (1981). "*p*-Toluenesulfonyl Chloride as an Activating Agent of Agarose for the Preparation of Immobilized Affinity Ligands and Proteins. Optimization of Immobilized Affinity Ligands and Proteins. Optimization of Conditions for Activation and Coupling". *Acta Chem. Scand. B* **35**, No. 1, 19-27.

Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmod, M.R., Frenken, L.G.J. (1993). "The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate". *FEBS Lett.* **331**: 1265-1269.

Ohlson, S.; Wieslander, J. (1987). "High - Performance Liquid Affinity Chromatographic separation of mouse monoclonal antibodies with Protein A silica". *Journal of Chromatography*, **397**, 207-212.

Orthner, C.L.; Highsmith, F.A. y Tharakan, J. (1991). "Comparison of the performance of immunoabsorbents prepared by site-directed or random coupling of monoclonal antibodies". *Journal of Chromatography*, **558**, 55-70.

Paborsky, L.R.; Dunn, K.E.; C.S. Gibbs y Dougherty, J.P. (1996). "A Nickel Chelate Microtiter Plate Assay for Six-Histidine - Containing Proteins". *Analytical Biochemistry*, **234**, 60-65.

Penzol, G. (1996). "Diseño de herramientas Bioquímicas para la Ingeniería Molecular de derivados inmovilizados de Renina y β -Galactosidasa". *Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.*

Phillips, T.M.; Queen, W.D.; More, N.S. y Thompson, A.M. (1985). "Universal support medium for High-Performance Immunoaffinity Chromatography". *Journal of Chromatography*, 372, 213-219.

Phillips, D.J.; Bell-Alden, B.; Cava, M.; Grover, E.R. y Mandeville, W.H. (1991). "Purification of proteins on an epoxy-activated support by high-performance affinity chromatography". *Journal of Chromatography*, 536, 95-106.

Piesecki, S.; Teng, W-Y; y Hochuli, E.. (1993). "Immobilization of β - Galactosidase for Application in Organic Chemistry Using a Chelating Peptide". *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42, 178-184.

Plou, J.F.; Barandiaran, M. Calvo; M.V. Ballesteros, A. Pastor, E. (1996). "High yield production of mono and diolelyglycerol by lipase catalyzed hydrolysis of triolein". *Enzyme Microb. Technol.* 18: 66-71.

Polo, E. (1994). "Diseño de biocatalizadores de termolisina para la síntesis de aspartamo en medios orgánicos". *Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de C. Químicas.*

Porath, J.; (1988). "High-Performance Immobilized-Metal-Ion Affinity Chromatography of peptides and proteins". *Journal of Chromatography*, 443, 3-11.

Porath, J.; y Hansen, P. (1991). "Cascade-mode multi-affinity chromatography. Fraction of human serum protein". *Journal of Chromatography*, **550**, 751-764.

Porath, J.(1992) "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". *Protein Expression and Purification*, **3**, 263-281.

Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, Y. y Belfrage, G.(1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation". *Nature*, Vol. **258**, 598-599.

Porter, J.E.; Sarikaya, A.; Herrmann, K.M.; Ladisch, M.R. (1992). "Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean β -galactosidase". *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 609-613.

Prisyazhnoy, V.S.; Fusek, M.; Alakhov, Y.B. (1988). "Synthesis of high-capacity immunoaffinity sorbents with oriented immobilized immunoglobulins or their F_{ab} fragments for isolation of proteins". *Journal of Chromatography*, **424**, 243-253.

Rassi Z.E. y Horváth, C. (1986). "Metal Chelate - Interaction Chromatography of proteins with Iminodiacetic Acid - bonded stationary phases on Silica support". *Journal of Chromatography*, **359**, 241-253.

Richman, D.D.; Cleveland, P.H.; Oxman, M.N. y Johnson, K.M. (1982). "The Binding of Staphylococcal Protein A by the sera of different animal species". *The Journal of Immunology*, **128**, 2300-2305.

Rodriguez, V. (1995). "Estabilización de enzimas de estructura compleja: biotransformación enzimática de antibióticos β -Lactámicos". *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.*

Rogovin, Z.A.; Virnik, A.D.; Khomiakov, K.P.; Laletina, O.P. y Penenzhik, M.A. (1971). "Study of Synthesis of Dextran Derivatives". *J. Macromol. SCI.-CHEM.* **A6 (3)**, 569-593.

Rosell, C.M. (1993). "reacciones de química fina catalizadas por derivados estabilizados de penicilina G acilasa". *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.*

Rothenbühler, E.; Waibel, W. y Solms, J. (1979). "An Improved Method for Separation of Peptides and α - Amino Acids on Copper-Sephadex". *Analytical Biochemistry*, **97**, 367-375.

Royer, G.P. (1980). "Immobilized enzyme catalysis. Reviews, 1978". *Catal. Rev. Sci. Eng.* **22/1**, 29-73.

Santana, M.C. (1991). "Diseño de nuevas estrategias de inmovilización y estabilización de glicoproteínas. Aplicación a la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*". *Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.*

Santaniello, E.; Ferrabochi, P.; Grisenti, P. (1993). "Lipase catalysed transesterifications in organic solvents: application to the preparation of enantiomerically pure compounds." *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 367-382.

Sarda, L.; Desnuelle, P. (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion". *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521.

Schacht, E.H. (1987). "Modification of dextran and application in prodrug design", en *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure /Property Relations and Applications*. Yalpani, M. (ed). Elsevier Sc. Publ. B.V. Amsterdam.

Schuler, G. y Reinacher, M. (1991) "Development and optimization of a single-step procedure using protein A affinity chromatography to isolate murine IgG₁ monoclonal antibodies from hybridoma supernatants". *Chromosymposium* **2370**, 61-70.

Serrano, J. y Ballesteros, A. (1987). "Cyanogen Bromide Activation and Deactivation of Agarose". En: Enzyme Engineering 8. ed: Lankin, A.I.; Mosbach, K.. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **501**, 420-425.

Shainoff, J.R..(1980). "Zonal Immobilization of proteins". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **Vol 95**, No. 2, 690-695.

Shimizu, A.; Honzawa, M.; Ito, S.; Miyazaki, T.; Matsumoto, H.; Nakamura, H.; Michaelsen, T.E. y Arata, Y. (1983). "¹H NMR studies of the Fc region of human IgG₁ and IgG₃ Immunoglobulins: assignment of histidine resonances in the C_H-3 domain and identification of the IgG₃ protein carrying G3_{m(st)} allotypes". *Molecular Immunology*, **20**, No. 2, 141-148.

Sjödahl, J. (1977) a. "Structural Studies on the Four Repetitive Fc - Binding Regions in Protein A from *Staphylococcus aureus*". *Eur. J. Biochem.*, **78**, 471-490.

Sjödahl, J. (1977) b. "Repetitive Sequences in Protein A from from *Staphylococcus aureus*". *Eur. J. Biochem.*, **73**, 343-351.

Sudhakaran, V.K.; Deshpande, B.S.; Ambedkar, S.S.; Shewale, J.G. (1992). "Molecular aspects of Penicillin and Cephalosporin Acylases". *Process Biochemistry*. **27**, 131-143.

Sun, Shuhua, y Lew, A.M..(1992) "Chimaeric protein A / protein G and protein G / alkaline phosphatase as reporter molecules". *Journal of Immunological Methods*, **152**, 43-48.

Sundberg, L. y Porath, J. (1974). "Preparation of adsorbents for biospecific Affinity Chromatography". Y.- Attachment of group -containing ligands to insoluble polymers by means of Bifunctional Oxiranes". *Journal of Chromatography*, **90**, 87-98.

Szwajcer, E.; Mosbach, K.. 1985. "Isolation and partial characterization of D- amino acid oxidase active against Cephalosporin C from the yeast *Trigonopsis variabilis*". *Biotechnology Letters*. **7/1**, 1-7.

Talon, R., Montel, M-C., Gandemer, G., Viau, M. Cantonnet, M. (1993). "Lypolysis of pork fat by *Staphylococcus warneri*, *S. saprophyticus* and *Micrococcus varians*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 606-609.

Talon, R., Montel, M-C., Berdague (1996). "Production of flavour ester by lipases of *Staphylococcus warneri* and *S. xilosus*". *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 620-622.

Uhlén, M. (1984). "The gene for Staphylococcal Protein A and its use in Biotechnology". *Tesis Doctoral. Stockolm*.

Várady, L. ; Kalghatgi, K. y Horváth, C. (1988). "Rapid High-Performance Affinity Chromatography on micropellicular sorbents". *Journal of Chromatography*, **458**, 207-215.

Wang, Y.J., Shu, J.Y., Wang, F.F., Shaw, J.F. (1988). "Lipase catalysed oil hydrolysis in the adsence of added emulsifier". *Biotechnol. Bioeng.* **31**:628-633.

Weetal, H.H. y Detar, C.C. (1975). "Covalent Attachment of Proteins to Inorganic Supports Directly by Activation with Cyanogen Bromide". *Biotechnology and Bioengineering*, **XVII**, 295-297.

White, C.A. y Kennedy, J.F. (1980). "Popular matrices for enzyme and other immobilizations". *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 82-90.

Woker, R.; Champluvier, B. y Kula, M.-R.. (1992). "Purification of S- oxynitrilase from *Sorghum bicolor* by immobilized metal ion affinity chromatography on different carrier materials". *Journal of Chromatography*, **584**, 85-92.

Wong, C.H. (1989). "Enzymatic catalyst in organic synthesis". *Science*.**244**, 1145-1152.

Wong, C.H; Whitesides, G.M. (1994). "Enzymes in synthetic organics chemistry." *Tetrahedron organics chemistry series. Baldwin, J.E.; FRS & Magnus, FRS (eds) Pergamon* **12**: 41-130.

Wu, Y.X.; Jaaskelainen, S.; Linko, Y-Y (1996). "An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification and transesterification". *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 226-23.

Yamaguchi, S., Mase, T. (1991). "High yield synthesis of monoglyceride by mono and diacyl glycerol lipase from *Penicillium camembertii* U-150". *J. Ferment. Bioeng.* **72**:162-167.

Yang, D., Rhee, S.S., (1992). "Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent". *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 748-752.

Yip, T.T.; Nakagawa, Y.; y Porath, J. (1989). "Evaluation of the interaction of peptides with Cu (II), Ni (II), y Zn (II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography". *Analytical Biochemistry*, **183**, 159-171.

Yip, T-T.; y Hutchens, W. (1994). "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". *Molecular Biotechnology*, **Vol. 1**; 151-164.

Ziegler, M.M.; Goldberg, M.E.; Chaffottes, A.F.; Baldwin, T.O. (1993). "Refolding of Luciferase subunits from urea and assembly of the active heterodimer". *The Journal of Biological Chemistry*, **268/15**, 10760-10765.