

PROTEÍNAS PURAS

Proteínas puras

Entre el laboratorio y la industria

Mariano Grasselli
(director)

Colaboradores:

María Laura Carbajal

Oswaldo Cascone

Marina Etcheverrigaray

Marcelo Fernández Lahore

Guillermina Forno

Ricardo Kratje

Guillermo Picó

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Rector
Mario E. Lozano

Vicerrector
Alejandro Villar



Bernal, 2015

Colección Nuevos enfoques en ciencia y tecnología
Dirigida por Diego Golombek

Proteínas puras. Entre el laboratorio y la industria / Mariano Grasselli ... [et. al.]; dirigido por Mariano Grasselli. - 1a ed. - Bernal : Universidad Nacional de Quilmes, 2015.
280 p.; 22x15 cm. - (Nuevos enfoques en ciencia y tecnología / Diego Golombek)

ISBN 978-987-558-330-6

1. Proteínas. I. Grasselli, Mariano II. Grasselli, Mariano, dir.
CDD 547.75

© Mariano Grasselli. 2015

© Universidad Nacional de Quilmes. 2015

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352
(B1876BXD) Bernal, Provincia de Buenos Aires
República Argentina

editorial.unq.edu.ar
editorial@unq.edu.ar

ISBN: 978-987-558-330-6

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723
Impreso en Argentina

ÍNDICE

Los autores	9
Agradecimientos	11
Introducción	
<i>Mariano Grasselli</i>	13
Capítulo 1. Purificar un producto proteico. Para qué y cómo planificarlo	15
<i>Mariano Grasselli</i>	
Capítulo 2. Ruptura celular	37
<i>María Laura Carbajal y Mariano Grasselli</i>	
Capítulo 3. Procesos de separación sólido-líquido. Centrifugación	63
<i>Mariano Grasselli</i>	
Capítulo 4. Procesos de separación sólido-líquido. Filtración	83
<i>Mariano Grasselli</i>	
Capítulo 5. Extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos	111
<i>Guillermo Picó</i>	
Capítulo 6. Procesos de precipitación de proteínas	133
<i>Mariano Grasselli y Guillermo Picó</i>	
Capítulo 7. Procesos adsortivos: cromatografía	161
<i>Mariano Grasselli y Marcelo Fernández Lahore</i>	
Capítulo 8. Matrices cromatográficas y principios adsortivos (primera parte) ..	183
<i>Mariano Grasselli</i>	

Capítulo 9. Matrices cromatográficas y principios adsorptivos (segunda parte).....	213
<i>Mariano Grasselli</i>	
Capítulo 10. Cromatografía de exclusión molecular	227
<i>Mariano Grasselli y Osvaldo Cascone</i>	
Capítulo 11. Control de calidad de proteínas terapéuticas.	249
<i>Marina Etcheverrigaray, Guillermina Forno y Ricardo Kratje</i>	

LOS AUTORES

Director

Mariano Grasselli, Universidad Nacional de Quilmes, Conicet-Imbice, área Tecnología.

Colaboradores

María Laura Carbajal, Universidad Nacional de Quilmes, Conicet-Imbice, área tecnología.

Osvaldo Cascone, Universidad de Buenos Aires, Conicet.

Marina Etcheverrigaray, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Litoral, Conicet.

Marcelo Fernández Lahore, Universidad Jacobs (Alemania), Instituto Tecnológico de Monterrey (México), Conicet.

Guillermina Forno, Universidad Nacional del Litoral, Zelltek S.A.

Ricardo Kratje, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Conicet, Zelltek S.A.

Guillermo Picó, Universidad Nacional de Rosario, Conicet.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al profesor doctor O. Cascone por ser quien me transmitió su entusiasmo por esta rama de la tecnología. El doctor Cascone fue uno de los primeros académicos en la Argentina que abordaron la problemática del escalado en la producción de proteínas con una visión industrial, a principios de la década de 1990. Hago extensivo este agradecimiento al profesor doctor B. Anspach, quien me introdujo en la síntesis de materiales para cromatografía de afinidad en su laboratorio del German Research Centre of Biotechnology en Braunschweig, Alemania.

También quiero agradecer a los colegas que han colaborado desinteresadamente para escribir este libro, con quienes compartimos el mismo enfoque hacia la producción industrial de productos biológicos. Todos ellos son investigadores científicos y especialistas en diferentes ramas de los bioprocesos.

Dedico este libro a mis amores, Helena y Celeste, y a mis padres, Guigue e Inés.

Mariano Grasselli
Febrero de 2014

INTRODUCCIÓN

MARIANO GRASSELLI

Los grandes descubrimientos ocurridos en las ciencias biológicas durante el siglo XX, tales como la descripción de la estructura del ADN y las proteínas permitieron comprender íntimamente los procesos biológicos. Sobre estas bases el desarrollo de la tecnología, con la ingeniería genética como herramienta fundamental, permitió manipular genes y con ello producir prácticamente cualquier proteína en otro organismo. Nacen los bioprocesos como la producción industrial de productos biológicos.

La mayor complejidad y diversidad de los productos biológicos resultan en procesos de producción de muy baja eficiencia o rendimiento. La gran variabilidad estructural y de propiedades fisicoquímicas de las proteínas imposibilita tener un procedimiento único de obtención. Adicionalmente, las técnicas de purificación desarrolladas en los laboratorios de investigación, donde se obtienen cantidades muy pequeñas de estas moléculas, no siempre pueden ser aplicadas a la escala industrial. Existen limitantes tanto de tipo técnico como de costos de producción o seguridad biológica del producto (libre de contaminantes nocivos).

La idea de este libro es brindar conocimientos que permitan simplificar la interfaz entre el laboratorio de investigación y la producción industrial de un producto biológico, en especial las proteínas. En general, en el laboratorio de investigación se dispone de una multiplicidad de técnicas para obtener un producto, sin embargo la proyección de su producción industrial no es directa. Es por ello que se pretende dar una visión general de cuáles son las limitantes y puntos críticos de las etapas que se necesitan para purificar un producto biológico.

El libro está orientado a alumnos de pregrado de licenciaturas en biotecnología y carreras afines, así como también a graduados de dichas carreras. Es mi interés que este conjunto de textos pueda contribuir a facilitar la interacción de los profesionales que trabajan en el ámbito

de la investigación y desarrollo con los ingenieros químicos e industriales dedicados a la producción. Por eso se hace hincapié en los tópicos importantes a tener en cuenta durante el desarrollo de un proceso a escala laboratorio a través de la descripción de las variables que serán importantes en el momento de la producción.

Este libro no pretende suplantar los textos de ingeniería química de bioprocesos, donde se encuentran rigurosamente detalladas las ecuaciones matemáticas que describen los fenómenos físicos involucrados, sino más bien complementar y facilitar la comprensión de los mismos, con información de orden fisicoquímica y biológica.

CAPÍTULO 1

Purificar un producto proteico. Para qué y cómo planificarlo

MARIANO GRASSELLI

¿QUÉ SON LAS PROTEÍNAS?

Las proteínas son uno de los cuatro tipos principales de macromoléculas de origen biológico, además de los ácidos nucleicos, los lípidos y los carbohidratos. Se pueden clasificar en dos grandes grupos: fibrosas, insolubles y con funciones del tipo estructural, y globulares, solubles en soluciones acuosas y con propiedades funcionales. En este libro se estudiará principalmente cómo recuperar y purificar estas últimas.

Las proteínas están constituidas esencialmente por aminoácidos como unidades fundamentales. Los veinte tipos diferentes de los mismos que existen en los organismos vivos están ensamblados a través de uniones peptídicas para formar una cadena lineal, denominada estructura primaria de la proteína, cuya información está codificada en los ácidos nucleicos.

Esta secuencia lineal puede generar estructuras tridimensionales simples, como hélices y hojas planas, lo que se conoce como la estructura secundaria de la proteína. Sin embargo, la estructura final de la misma corresponde a un ensamble tridimensional muy ajustado y reproducible de esta cadena, lo que se denomina estructura terciaria. Por último, existen proteínas con más de una cadena de aminoácidos y el ensamble de estas diferentes subunidades constituye la estructura cuaternaria.

Adicionalmente las proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales en su estructura primaria, como son la glicosilación, fosforilación, prenilación, entre otras.