

Cromatografía en Lecho Fijo

Purificación de Proteínas

Tipo de Cromatografía	Propiedad Físicoquímica o Bioquímica	Características
NO ADSORCION		
Filtración por Geles (GF) o Exclusión por Tamaño	Peso Molecular	Resolución: Moderada Capacidad: Baja Velocidad: Baja
ADSORCION		
Afinidad (AC)	Afinidad Biológica	Resolución: Excelente Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Intercambio Iónico (IEC) (Aniónico Catiónico)	Carga a diferentes pH	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Cromatofocusing	Punto Isoeléctrico	Resolución: Muy Alta Capacidad: Muy Alta Velocidad: Alta
Interacción Hidrofóbica (HIC)	Hidrofobicidad Superficial	Resolución: Alta Capacidad: Alta Velocidad: Alta
Fase Reversa (RPC)	Interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas	Resolución: Excelente Capacidad: Intermedia Velocidad : Alta

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (IEC)

CROMATOFOCUSING

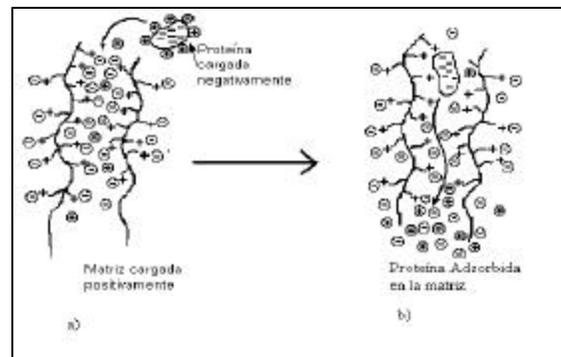
CARGA

Cromatografía de Intercambio iónico

Teoría

Se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados del adsorbente.

En el caso de una proteína globular típica, ésta tiene alrededor de un 55% de residuos cargados en la superficie.



Etapas

1. La proteína que contiene en mayor porcentaje cargas negativas, se ve rodeada por iones positivos. Esta proteína interaccionará con una matriz que posea cargas positivas.
2. Se producen interacciones electroestáticas entre la proteína y la matriz, por lo cual se desplazan los iones positivos y negativos que se encontraban interaccionando tanto con la proteína como con la matriz.
3. Una vez que la proteína es adsorbida en la matriz se lava la columna con un buffer que permita eliminar los contaminantes que no están adsorbido.

4. Posteriormente se eluyen la proteínas adsorbida en forma diferencial mediante cambios(Gradiente o en forma isocrática):

- De fuerza iónica
- pH de la solución eluyente

5. Finalmente se reacondiciona la matriz para iniciar un nuevo ciclo. Dependiendo del material se pueden realizar hasta 100 ciclos.

Tipos de Cromatografía de Intercambio Iónico

Características de las proteínas

A pH ácidos, las proteínas se encuentran cargadas positivamente, debido a la protonación de los residuos amino;

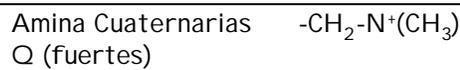
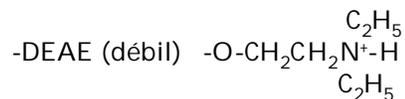
A pH básicos, las proteínas se encuentran cargadas negativamente, debido a la disociación de los grupos carboxilo de los aminoácidos que las componen.

Basando en esta característica la cromatografía de intercambio iónico puede ser de dos tipos:

- **Intercambio Aniónico**
 - (pH > pI, proteína cargada en forma negativa)
- **Intercambio Catiónico**
 - (pH < pI, proteína cargada en forma positiva)

Intercambio Aniónico

Resinas Catiónicas



Intercambio Catiónico

Resinas Aniónicas



Ventajas

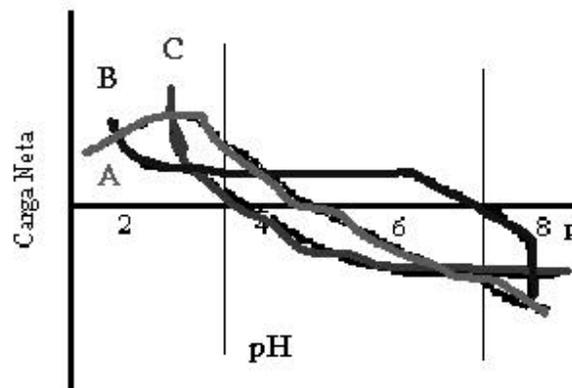
Con una misma columna se puede utilizar a diferentes pH y obtener diversos perfiles de elución

Desventajas

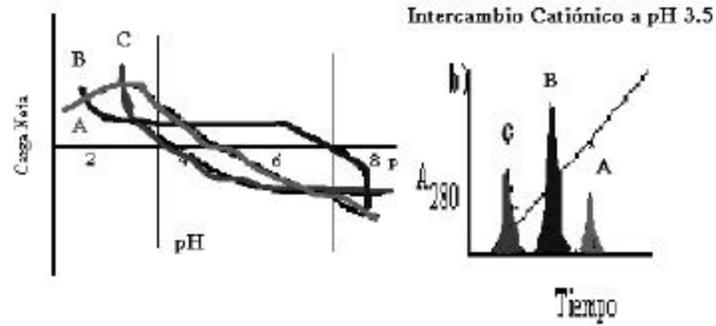
Las muestras deben estar desalinizadas antes de ser aplicadas a este tipo de cromatografía.

Curvas de Titulación (carga Neta Versus pH)

Diagrama de curvas de titulación y su aplicación en la selección de estrategias de purificación

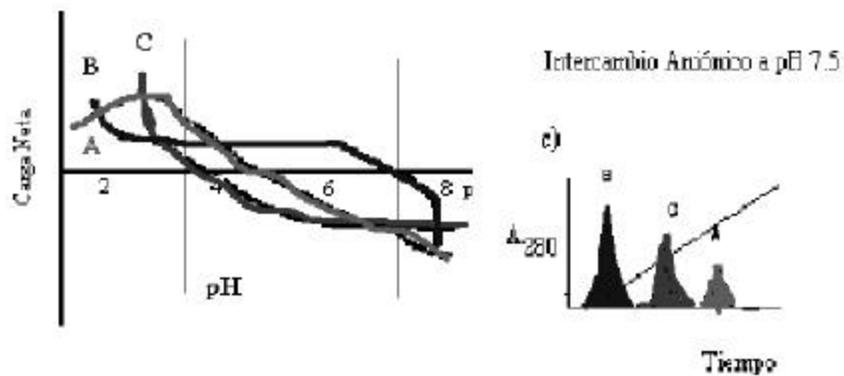


Curvas de Titulación (carga Neta Versus pH)



Perfiles de elución de la mezcla de proteínas bajo condiciones de una cromatografía de intercambio catiónico a pH 3.5.

Curvas de Titulación (carga Neta Versus pH)



Perfiles de elución de la mezcla de proteínas bajo condiciones de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 7.5

Reglas

- Las proteínas quedarán retenidas sólo si tienen carga opuesta a la matriz.
- Si se tienen proteínas retenidas, su tiempo de retención será mayor a mayor carga.
- Existen correlaciones que permiten predecir los tiempos de retención en función de la densidad de carga de las proteínas.

Formas de elución

El objetivo es disminuir la interacción entre las proteínas cargadas y el adsorbente, para ello se pueden utilizar:

Cambio pH en un gradiente decreciente.

Al variar el pH de la fase móvil varía la carga superficial de la proteína, siguiendo su curva de titulación. Esta variación puede llegar a neutralizar la carga de la proteína retenida, lo que produce la desorción de la proteína. Esta metodología debe ser llevada a cabo cuidadosamente debido a que se puede producir desnaturalización de las proteínas.

Cambios de pH se llevan a cabo mediante cambios graduales, por medio de la mezcla de 2 buffer a diferente pH.

-

Formas de elución

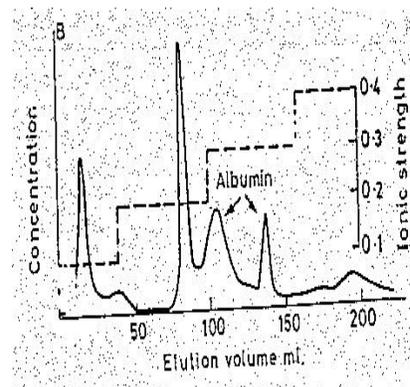
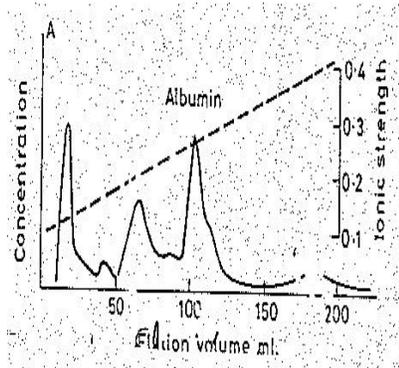
Cambio de fuerza iónica con Gradiente creciente.

En este caso se produce una competencia entre las zonas cargadas de la proteína, que se encuentran unidas a la matriz, y los iones libres que se adicionan en la fase móvil. Cuando la concentración de los iones libres es baja, la proteína continúa unida a la columna, pero a medida que aumenta su concentración se inicia la desorción de las proteínas, neutralizándose las interacciones entre la carga de la proteína y la matriz.

Las formas de elución pueden ser:

- Isocrático
- Gradiente Lineal
- Gradiente escalonado

En el ejemplo se ven diferentes modos para la misma matriz. Generalmente el gradiente se realiza adicionando una sal como NaCl, donde Na^+ o Cl^- , son los iones que interactúan con la matriz.



CROMATOFOCUSING

CROMATOFOCUSING

Este tipo de cromatografía es una extensión de las operaciones de Isoelectroenfoque a cromatografía, es decir:

1.- En una columna cromatográfica se genera un gradiente de pH, mediante "polybuffers" y,

2.- Debido a que la proteína presenta diferente carga a diferentes pH, ésta dejará de migrar (dentro de la columna) en la zona en la cual el pH es igual a su pI .

Condiciones de operación

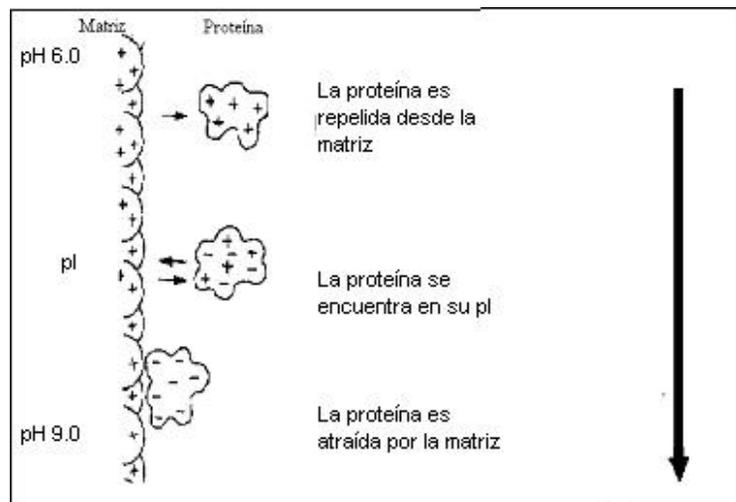
Las matrices son de cromatografía de intercambio aniónicas.

Inicialmente la columna se ambienta a pH alto (pH 9), por lo cual casi todas las proteínas quedan retenidas.

Posteriormente, se adiciona un polybuffer (ajustado a un pH bajo, pH 6.0) que alteran las condiciones de la fase móvil, se genera un gradiente pH en la matriz y las proteínas eluirán en orden a su pI .

Con esto se obtiene:

- Alta resolución, se pueden separar proteínas de 0.1 unidades de pH.
- Muestras muy concentradas.

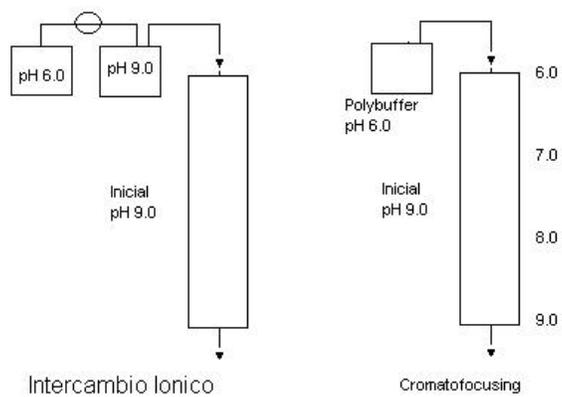


Desventajas

Para aplicar Cromatofocusing a escala industrial, la principal desventaja resulta ser la presencia de los "polybuffers" , los cuales :

- Son muy caros
- No se pueden utilizar en productos de uso humano.

Comparación entre Intercambio iónico con elución por pH y Cromatofocusing



CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD (AC)

Cromatografía de Afinidad

Se basa en una afinidad específica que presenta la proteína por algún compuesto.

Es la técnica cromatográfica más poderosa y específica.
Permite altos niveles de Concentración y Purificación.



Principales tipos de ligantes utilizados en Cromatografía de Afinidad

Ligante	Características de las Proteínas	Tipos de Proteínas que se purifican
Quelatos Metálicos Inmovilizados (IMAC)	La proteína presenta afinidad por iones metálicos. Los principales iones son: •Cu ⁺² -Zn ⁺²	Proteínas con Residuos Superficiales de: •Histidina -Cisteína -Tryptofano
Colorantes	Las proteínas presentan afinidad a compuestos de estructura similar a NAD ⁺ , NADP ⁺ . Los siguientes colorantes presentan dicha similitud: -Cibacron Blue™ -Procion Red™	Proteínas del tipo: -Quitinasas -Deshidrogenasas -Fosfatasa
Lecitinas	Las proteínas deben presentar tendencia a interactuar con azúcares	Proteínas del tipo: •Glicoproteínas -Polisacáridos •Proteína de Membrana
Inhibidores Sustratos	Las proteínas presentan afinidad especial a este tipo de compuestos	
Proteína A Proteína G	Proteínas con regiones específicas que interactúan con inmunoglobulinas	-Anticuerpos

Elementos Fundamentales en una Cromatografía de Afinidad

Soporte:

- No debe reaccionar con la proteína
- Debe ser resistente a la degradación química y microbiana
- Debe poseer poros amplios

Ligante

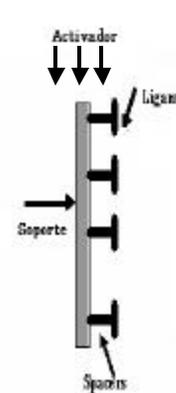
- Debe ser lo suficientemente específico
- Debe generar uniones estables
- Debe atraparse en la matriz

Spacers

- Debe mantener al ligante en la superficie
- Posee, generalmente, grupos metileno
- Son hidrofílicos

Activadores

- Compuestos químicos que se adicionan
- Cada ligante tiene asociado un activador y método de activación determinado

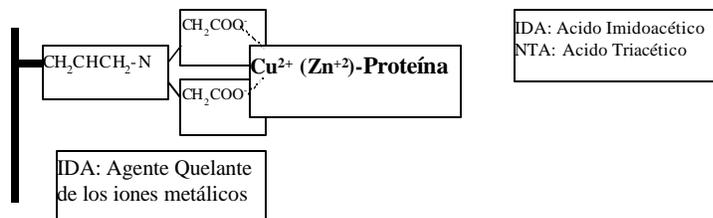


Modo de Operación

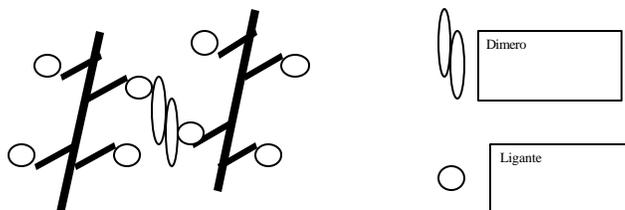
1. Se tiene solo el soporte.
2. Se adicionan los "spacers" que se localiza en la superficie de la matriz.
3. Se adiciona el ligante específico.
4. Se activan los ligantes mediante "activadores", agentes químicos
5. Se inyecta la muestra y se adsorben aquellos componentes que presentan afinidad con el ligante.
6. Se modifican las condiciones para permitir la desorción del producto de interés. Sólo por medio de estudios empíricos se puede determinar las condiciones de elución. Ejemplo
 - Cambios de pH
 - Cambios de fuerza Iónica
 - Adición de detergentes, agentes como EDTA, Imidazole
 - Sólo hay que tener cuidado con las posibles desactivaciones.

Tipos de Interacciones

1.- IMAC (Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados)



2.- Dímeros

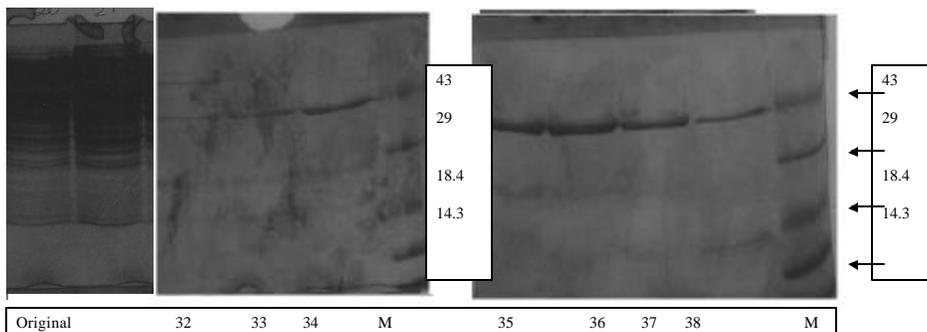


Tipos de Interacciones

3.- Diferentes Zonas de Afinidad)



Ejemplos



Geles de SDS-PAGE, con tinción de Coomassie- La fracción "Original" muestra el estado inicial de la muestra antes de inyectar a la columna IMAC. Se muestran las fracciones colectadas que presentaban actividad de b-1,3-glucanasa (Fracciones 32-38)

Ejemplo

Se presenta la siguiente mezcla de proteínas

Proteína	Peso Molecular (Da)	Punto Isoeléctrico	Hidrofobicidad
Tripsina	34.000	8.0	Media
Pepsina	35.500	2.75-3.0	Media
Gelatinas	100.000	4.8-4.85	Baja
Insulina	40.900	5.30-5.35	Media

Con la información que cuenta:

Prediga (dibujando) los perfiles de elución bajo las siguientes operaciones cromatográficas

Intercambio Aniónico a pH 6.0

Intercambio Catiónico a pH 6.0

Interacción hidrofóbica

Filtración por geles

b) Plantee 2 procesos óptimos para purificar insulina de la mezcla antes señalada

(Indique tipo de columna y el pH de trabajo en el caso de ser necesario).

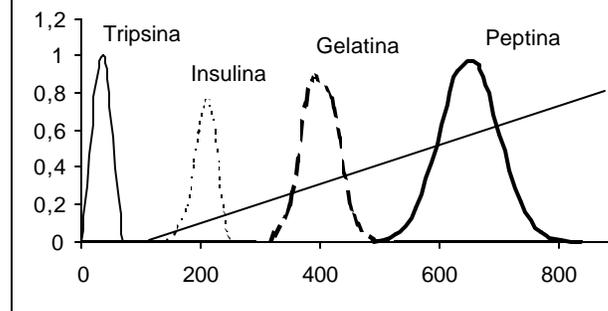
Indique en cada paso que contaminante(s) se estaría eliminando. Considere:

- i) el siguiente ranking de eficiencias
Afinidad > Intercambio Iónico, HIC > Filtración por gel
- ii) Adicionalmente considerando que cuenta con las siguientes matrices
Q-sefarosa
SP-sefarosa
Fenil-sefarosa
Sephadex G-100
Proteína M (Específica para Insulina)

Respuesta

Intercambio Aniónico a pH 6.0

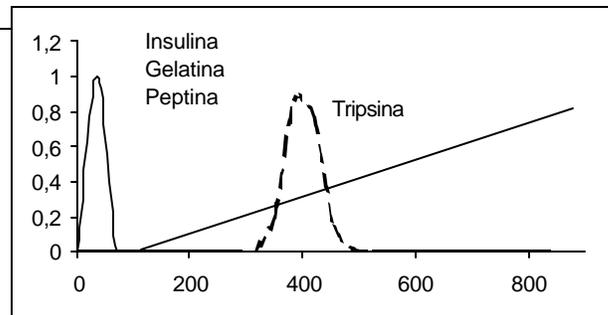
La tripsina tiene un pI de 8.0 por lo cual se encuentra cargado positivamente a pH 6.0 y no será retenido en la matriz. El resto de las proteínas si lo serán en diferente intensidad dependiendo de su pI. Aquella que tiene menor pI deberá quedar retenida por mayor tiempo. Los perfiles resultantes serían del tipo:



Respuesta

Intercambio Catiónico a pH 6.0

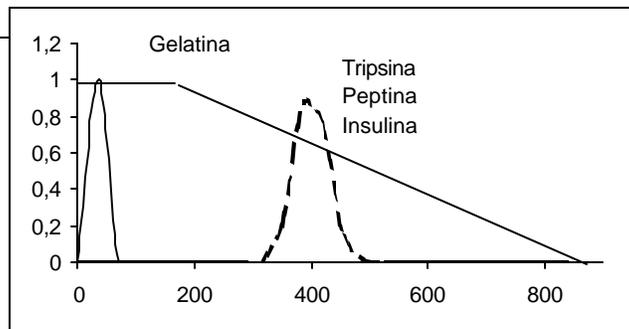
En este caso a pH 6.0 sólo la Tripsina tiene carga positiva, por lo cual sólo ella quedará retenida en la matriz catiónica no así las otras proteínas que pasarán sin ser retenidas. Sería un método adecuado para purificar Tripsina. Los perfiles serían:



Respuesta

Interacción Hidrofóbica

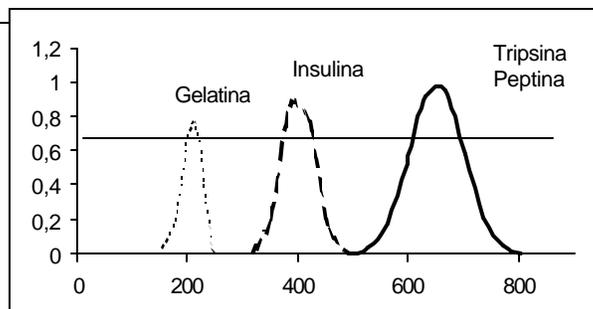
Dado que la gelatina presenta una baja hidrofobicidad no quedará retenida por mucho tiempo, mientras que las otras lo harán medianamente. Razón por la cual es una opción adecuada para purificar gelatinas. Los perfiles serían:



Respuesta

Filtración por Geles

La gelatina es la que tiene mayor peso molecular luego es la primera en eluir, tripsina y peptina no tienen caso de diferencia en peso molecular motivo por el cual eluyen juntas. Los perfiles serían:



Respuesta

Procesos óptimos

Las alternativas son muy variadas. Una puede ser:

1 Etapa: Cromatografía de Intercambio catiónico pH 5.0 (SP-sefarosa). Sólo quedan retenidas Tripsina e Insulina, peptina y gelatinas pasan de largo.

2 Etapa Cromatografía de Intercambio aniónico pH 6.0 (Q-sefarosa) Sólo queda retenida Insulina.

Cromatografía Líquida de Alto Desempeño

Cromatografía Líquida de Alta Presión

(HPLC)

HPLC son la abreviación de "High Performance Liquid Chromatography" o "High Pressure Liquid Chromatography".

Antecedentes

HPLC surgió debido a las limitaciones que presentaban las cromatografías tradicionales, principalmente, debido a Fenómenos Difusivos.

Como solución a estos problemas se establecieron procesos más rápidos que mejoraban la resolución.

Se debía trabajar con Flujos más rápidos, esto involucraba partículas de adsorbente más pequeñas.

Las partículas más pequeñas provocaban altas presiones

Fue necesario diseñar:

- Bombas
- Matrices que soportan altas presiones (2000 psia)
- Resinas más rígidas
- Tamaños de poros pequeños

Surge el High Pressure Liquid Chromatography (HPLC clásico).

Inicialmente sólo se aplicó a Cromatografía de Fase Reversa, utilizando solventes orgánicos.

Posteriormente se crean nuevas resinas:

Con alta resistencia (alta presión)

Poros suficientes para permitir el paso y adsorción de grandes moléculas como las proteínas

Existen columnas HPLC para:

- Intercambio Iónico
- Interacción Hidrofóbica
- Filtración por Geles

Pero es esencialmente analítica.