

CROMATOGRAFÍA CON PÉPTIDOS CORTOS INMOVILIZADOS APLICADA A LA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS

Gabriela R. BARREDO^{1,2}, Silvana L. GIUDICESSI^{1, 2}, Soledad L. SAAVEDRA^{1, 2}, María C. MARTÍNEZ-CERON^{1,2}, Osvaldo CASCONE^{1,2} & Silvia A. CAMPERI^{1,2*}

1 Cátedra de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

2 Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: scamperi@ffyb.uba.ar

RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	6
1. Búsqueda de ligandos peptídicos con afinidad por anticuerpos a través del screening de bibliotecas peptídicas	8
1.1. Síntesis simultánea de múltiples péptidos	9
1.1.1. Método Multipin	9
1.1.2. Método de síntesis en puntos (spots)	9
1.2. Síntesis de bibliotecas combinatorias de péptidos	9
1.2.1. Bibliotecas de fagos que exhiben péptidos en su superficie (Phage Display)	10
1.2.2. Bibliotecas sintéticas construidas por el método Dividir-Acoplar-Recombinar (DAR)	11
2. Síntesis y evaluación de soportes de afinidad con ligandos peptídicos inmovilizados	12
3. Aplicaciones de las matrices de afinidad con péptidos inmovilizados a la purificación de anticuerpos	14
CONCLUSIONES	15
Referencias bibliográficas	15
Agradecimientos	18

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) tienen un enorme y creciente interés en la industria farmacéutica. Actualmente hay más de 70 mAbs terapéuticos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Su proceso de producción industrial consiste en una etapa de crecimiento de las células productoras del mAb en un biorreactor y en una etapa de recuperación y purificación del mAb a partir del caldo de cultivo celular. La cromatografía de afinidad (AC) con proteína A inmovilizada es el método de elección para su purificación. Ésta se basa en un reconocimiento molecular entre el anticuerpo y la proteína A inmovilizada sobre un soporte. Sin embargo, las matrices con proteína A inmovilizada son costosas, de baja capacidad, lábiles y de corta vida útil. Las desventajas de la proteína A han incentivado el desarrollo de métodos de purificación alternativos con péptidos cortos sintéticos (entre 5 y 12 aminoácidos) como ligandos de afinidad.

Éstos son ideales para separaciones industriales por afinidad, ya que pueden ser producidos a un costo muy inferior a los ligandos proteicos y en forma aséptica bajo normas GMP. A su vez, son mucho más estables porque no requieren de una estructura terciaria específica para mantener su actividad biológica y las interacciones entre los péptidos y las proteínas son generalmente moderadas, lo que resulta en condiciones suaves de elución. La presente revisión describe: el desarrollo de ligandos peptídicos con afinidad por anticuerpos, la síntesis y evaluación de soportes de afinidad con ligandos peptídicos inmovilizados y las aplicaciones de las matrices de afinidad con péptidos inmovilizados en la purificación de anticuerpos.

Palabras clave: biofármacos, ligandos de afinidad, síntesis de péptidos en fase sólida.

SUMMARY

IMMOBILIZED SHORT PEPTIDES CHROMATOGRAPHY APPLIED TO THERAPEUTIC ANTIBODIES PURIFICATION

Monoclonal antibodies (mAbs) have an enormous and growing interest in the pharmaceutical industry. Currently, there are more than 70 therapeutic mAbs approved by the Food and Drug Administration (FDA). Its industrial production process consists of a first step of growing the mAb-producing cells in a bioreactor and a step of recovering and purifying the mAb from the cell culture broth. Affinity chromatography (AC) with immobilized protein A is the method of choice for their purification. It is based on a molecular recognition between the antibody and protein A immobilized on a support. However, matrices with immobilized protein A are expensive, with low capacity, labile and of short half-life. The disadvantages of protein A have encouraged the development of alternative purification methods with synthetic short peptides (from 5 to 12 amino acids) as affinity ligands. Peptides are ideal for affinity industrial separations since they can be synthesized at lower cost than proteins and in an aseptic way under GMP standards. Furthermore, they are much more stable because they do not require a specific tertiary structure to maintain their biological activity. Also, interactions between peptides and proteins are generally moderate, resulting in mild elution conditions. The present review describes the development of peptide ligands with affinity for antibodies, the synthesis and evaluation of affinity supports with immobilized peptide ligands and the applications of affinity matrices with immobilized peptides to antibodies purification.

Key words: affinity ligands, biopharmaceuticals, solid phase peptide synthesis.

INTRODUCCIÓN

Desde su desarrollo por Köhler & Milstein (1975), los anticuerpos monoclonales (mAbs) han tenido un enorme y creciente interés en la industria farmacéutica. El primer mAb con aplicaciones terapéuticas (Orthoclone, OKT3) fue aprobado en 1986. La Fig. 1 detalla el número de mAbs aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) en cada año y el crecimiento del total de mAbs aprobados en los últimos treinta años. En el año 2017 se aprobaron 10 nuevos mAbs, sumando un total de 74 mAbs terapéuticos al mes de diciembre de 2017. A su vez hay 550 en fase clínica. Los mAbs oncológicos y los aplicados a enfermedades inflamatorias y autoinmunes predominan en el mercado. El mercado mundial en 2016 representó ganancias del orden de los 89 mil millones de dólares (Carter & Lazar, 2017; Hedrich *et al.*, 2017; Elvin *et al.*, 2013).

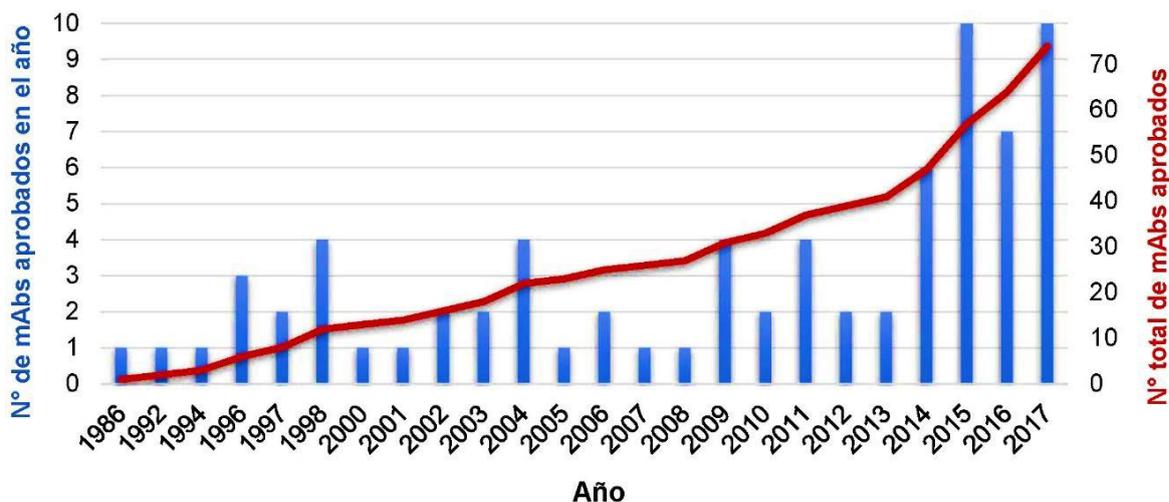


Figura 1. Número de anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA). Las barras azules indican el número de mAbs aprobados en el año. La línea roja indica el total de mAbs aprobados en función del tiempo. La FDA aprobó en el período 1986-2017 un total de 74 mAbs con aplicaciones terapéuticas.

La expresión de mAbs en células de mamífero ha alcanzado valores superiores a g/L. Sin embargo, los métodos de purificación actuales no admiten un escalado que satisfaga estos altos niveles de producción (Gagnon, 2012). Al igual que otros biofármacos, la etapa de recuperación y purificación de los mAbs terapéuticos representa un cuello de botella en el proceso global de producción debido al alto grado de pureza necesaria para su administración parenteral, representando hasta un 80% del costo total del proceso (Fields et al., 2016).

Existen esquemas de purificación de mAbs basados en una secuencia de etapas cromatográficas donde en cada una se selecciona una población de moléculas en base a sus características fisicoquímicas como tamaño molecular, carga o hidrofobicidad (Follman & Fahrner, 2004). Sin embargo, en cada etapa hay una pérdida de producto asociada, con la consecuente disminución de rendimiento y aumento del costo. La cromatografía de afinidad (AC), que se basa en un reconocimiento molecular entre la proteína de interés y un ligando inmovilizado sobre un soporte, es el método de elección para la purificación de mAbs. Con ligandos de alta selectividad, se puede purificar el mAb presente en mezclas complejas con alta pureza y rendimiento en un único paso (Ayyar et al., 2012). La proteína A es el ligando más utilizado para purificar mAbs a escala industrial debido a que logra un alto grado de purificación en un único paso (Bolton & Mehta, 2016). No obstante, las matrices con proteína A inmovilizada son costosas, de baja capacidad, lábiles y de corta vida útil. El desprendimiento de la proteína A de la matriz contamina el producto. Su baja estabilidad genera dificultades para cumplir con las condiciones de sanitización de las columnas. El alto tamaño molecular de la proteína A requiere matrices cromatográficas de bajo grado de entrecruzamiento, las cuales por su baja resistencia mecánica, dificultan el escalado a nivel industrial. A su vez, la elución de los mAb de estas matrices requiere condiciones extremadamente ácidas, favoreciendo la formación de productos de degradación tanto del mAb como de ligando, que luego necesitan ser separados del mAb intacto (Wang et al., 2013).

Las desventajas de la proteína A han incentivado el desarrollo de métodos de purificación alternativos con ligandos sintéticos más económicos y más estables: ligandos tiofílicos (Porath *et al.*, 1985), ligandos de adsorción de modo mixto (4-mercapto-etil-piridina-MEP-, ácido mercapto-benzimidazol-sulfónico -MBS-) (Bengio & Spencer, 2003), entre otros. Sin embargo, con ninguno de estos ligandos se ha alcanzado la selectividad de la proteína A.

Los péptidos cortos (entre 5 y 12 aminoácidos) se han aplicado con éxito en numerosos procesos de purificación, ya que son ligandos ideales para separaciones industriales por afinidad debido a que pueden ser sintetizados a un costo muy inferior a los ligandos proteicos y en forma aséptica bajo normas GMP, son mucho más estables porque no requieren de una estructura terciaria específica para mantener su actividad biológica y las interacciones entre los péptidos y las proteínas son generalmente moderadas, lo que resulta en condiciones suaves de elución (Huang & Carbonell, 1995).

En el desarrollo de procesos de afinidad es esencial la identificación de una estructura peptídica con suficiente afinidad y selectividad. El *screening* de bibliotecas peptídicas facilita enormemente el descubrimiento de ligandos adecuados para cualquier proteína de interés (Camperi *et al.*, 2010 y 2014).

La presente revisión describe tres aspectos: 1) la búsqueda de ligandos peptídicos con afinidad por anticuerpos (Ab), 2) la síntesis y evaluación de soportes de afinidad con ligandos peptídicos inmovilizados y 3) las aplicaciones de las matrices de afinidad con péptidos inmovilizados en la purificación de anticuerpos.

1. BÚSQUEDA DE LIGANDOS PEPTÍDICOS CON AFINIDAD POR ANTICUERPOS A TRAVÉS DEL SCREENING DE BIBLIOTECAS PEPTÍDICAS

Las bibliotecas de péptidos permiten hallar ligandos con afinidad por biomoléculas para su uso en AC. Éstas se pueden construir por métodos biológicos o sintéticos. Éstos últimos son adaptaciones de la síntesis en fase sólida descrita por Merrifield (1963) que se resume en la Fig. 2. Las bibliotecas se pueden construir por medio de la síntesis simultánea de múltiples péptidos o la síntesis combinatoria de péptidos.

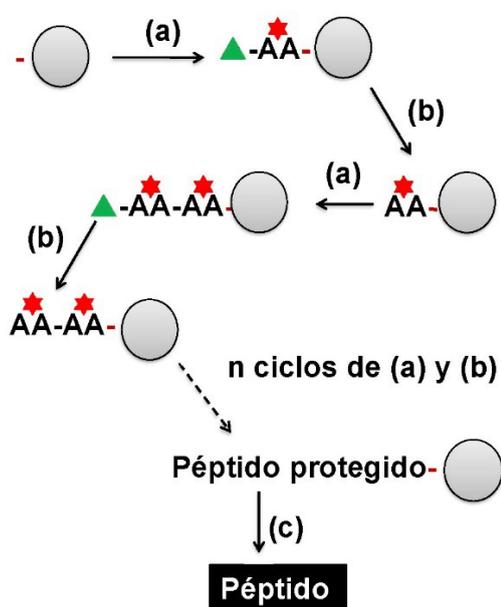


Figura 2. Síntesis de péptidos en fase sólida. (a) Acople del aminoácido protegido en su extremo amino y en su cadena lateral. (b) Desprotección del amino terminal. (c) Eliminación de los grupos protectores de cadenas laterales y separación del péptido del soporte sólido. ▲: Grupo protector del amino terminal. ★: Grupo protector de cadena lateral, -: ancla (reactivo bifuncional), ●: soporte sólido.

1.1. Síntesis simultánea de múltiples péptidos

Existen diversas metodologías para sintetizar simultáneamente entre 50 a 100 péptidos en forma sencilla. Se requiere un conocimiento previo de algunas características de la proteína de manera de poder diseñar péptidos candidatos con afinidad por la misma. Los péptidos se sintetizan en fase sólida en arreglos espaciales de manera de poder luego localizar por su posición cada secuencia sintetizada.

1.1.1. Método Multipin

El método *Multipin* fue descrito por Geysen *et al.* (1984). Consiste en la síntesis simultánea de numerosos péptidos utilizando como fase sólida pequeñas varillas de polietileno denominadas “pins”. Los pins son montados en un bloque en un arreglo similar al de las placas de ELISA comerciales (12 columnas y 8 filas) de manera de poder utilizarlas para analizar la afinidad de los péptidos sintetizados sobre las varillas. En la síntesis se pueden utilizar tanto los 20 aminoácidos naturales como así también aminoácidos no naturales.

1.1.2. Método de síntesis en puntos (spots)

Frank *et al.* (1991) diseñaron el método de síntesis en puntos “*Spot-Synthesis Method*” el cual consiste en la síntesis simultánea de una gran cantidad de secuencias peptídicas diferentes sobre una membrana plana de celulosa. Se aplican sobre la misma pequeñas gotas de solución de reactivos que se extienden sobre un área restringida (punto o *spot*), lo que permite sintetizar simultáneamente unos 50 péptidos diferentes utilizando tanto aminoácidos naturales como sintéticos. Luego se evalúa la afinidad de los diferentes péptidos por el Ab de manera similar a un análisis de *dot-blot* (Kurien & Scofield, 2015) utilizando Ab marcado con biotina y luego revelando el Ab adsorbido con el conjugado streptavidina-peroxidasa (Frank, 2002).

1.2. Síntesis de bibliotecas combinatorias de péptidos

Las bibliotecas combinatorias de péptidos son colecciones de miles a millones de péptidos que consisten en todas las posibles combinaciones de los “m” bloques de construcción utilizados (tanto aminoácidos naturales como sintéticos) para la obtención de un péptido de “n” aminoácidos, siendo el número de secuencias diferentes obtenidas igual a:

$$\text{Número de péptidos en la biblioteca combinatoria} = m^n$$

Por ejemplo, una biblioteca de tetrapéptidos en la que se utilicen los 20 aminoácidos naturales tendrá 160.000 (20^4) tetrapéptidos diferentes.

Los métodos más utilizados para la construcción de bibliotecas combinatorias peptídicas son el método biológico basado en bibliotecas de fagos que exhiben péptidos en su superficie (*Phage Display*) y el método sintético denominado Dividir-Acoplar-Recombinar. La estrategia de química combinatoria permite aumentar la diversidad lográndose sintetizar bibliotecas de una mayor población de péptidos. Sin embargo, es necesario luego del *screening* identificar los péptidos que hayan interactuado con la proteína blanco mediante un método analítico de secuenciación.

1.2.1. Bibliotecas de fagos que exhiben péptidos en su superficie (Phage Display)

Las bibliotecas de péptidos expuestos en la superficie de bacteriófagos (*Phage Display*) fueron diseñadas por Smith (1985). Se basan en la construcción de bibliotecas de bacteriófagos filamentosos, de la familia M13, en las que péptidos cortos de 5 a 15 aminoácidos, fusionados a una de las proteínas de la cápside viral, son expuestos sobre la superficie de los fagos. Estas bibliotecas pueden estar formadas por más de 10^9 péptidos dispuestos en diferentes fagos, lo que facilita la búsqueda de ligandos peptídicos con afinidad por cualquier proteína de interés. Para su construcción se utilizan oligonucleótidos comerciales sintéticos que contienen el codón degenerado $(NNK)^n$ (n = número de aminoácidos deseado), flanqueados por sitios de restricción. El inserto, luego de ser convertido en ADN doble cadena y digerido con la enzima de restricción adecuada, es ligado a un vector de expresión utilizado para transformar células de *Escherichia coli*, donde la población de fagos se amplifica. Posteriormente, los fagos se aíslan a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Smith & Scott, 1993). Para realizar el *screening* se inmoviliza el Ab en placas de ELISA de 96 pocillos, se incuba con la biblioteca de fagos, se lavan los pocillos para eliminar los fagos que no se hayan adsorbido y se recuperan los fagos ligados a las proteínas inmovilizadas. Los fagos seleccionados son amplificados en *E. coli* y luego de sucesivas rondas de amplificación y *screening* en condiciones cada vez más astringentes, la región de ADN que contiene el inserto que expresa el péptido expuesto en la superficie del fago se amplifica por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y se identifica por secuenciación del ADN (Fig.3). En este tipo de bibliotecas sólo se utilizan aminoácidos naturales.

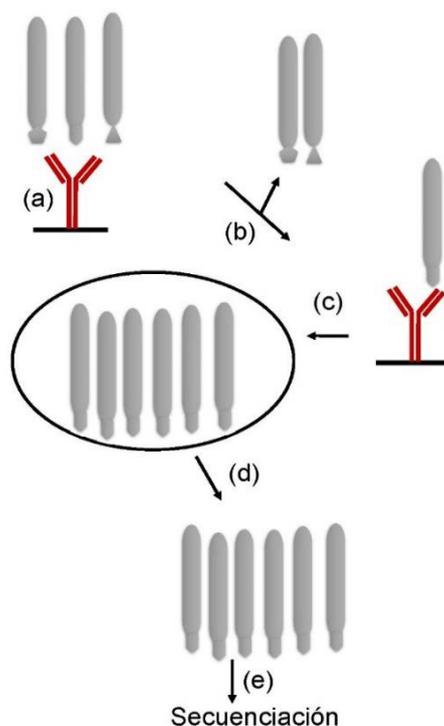


Figura 3. Esquema del uso de la biblioteca de fagos para la búsqueda de ligandos peptídicos con afinidad por el anticuerpo. (a) Se incuban los bacteriófagos, con los péptidos expuestos en su superficie, con el anticuerpo inmovilizado. (b) Se eliminan los fagos que no interactúan mediante lavados. (c) Los fagos adsorbidos se eluyen y amplifican en *E. coli*. (d) Se extraen y purifican los fagos amplificados. (e) Finalmente, la región de ADN que contiene el inserto que expresa el péptido se amplifica por PCR y se secuencian.

1.2.2. Bibliotecas sintéticas construidas por el método Dividir-Acoplar-Recombinar (DAR)

El método Dividir-Acoplar-Recombinar (*Divide-Couple-Recombine*) también llamado Dividir y Mezclar (*Split and Mix*) (Furka *et al.*, 1991; Houghten *et al.*, 1991; Lam *et al.*, 1991) es una variante de la síntesis de péptidos en fase sólida desarrollada por Merrifield (1963), que consiste en reiterados ciclos de tres pasos: (1) “Dividir”: se divide la resina (fase sólida) en tantas porciones como aminoácidos a variar en esa posición; (2) “Acoplar”: se acopla un aminoácido protegido diferente a cada porción de resina; (3) “Recombinar”: se mezclan todas las porciones y se elimina el grupo protector del amino terminal. Los pasos se repiten hasta alcanzar el largo deseado de los péptidos y finalmente se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales sin separar los péptidos de las bolillas de resina (Fig. 4). Este método permite la obtención de bibliotecas con cantidades equimoleculares de todos sus componentes, en las cuales cada bolilla de resina está cubierta en su superficie por un único tipo de péptido (una-bolilla-un-péptido). La metodología DAR permite el uso de aminoácidos naturales o sintéticos y se pueden sintetizar tanto bibliotecas lineales como cíclicas (Camperi *et al.*, 2014 y 2016; Martínez-Ceron *et al.*, 2016).

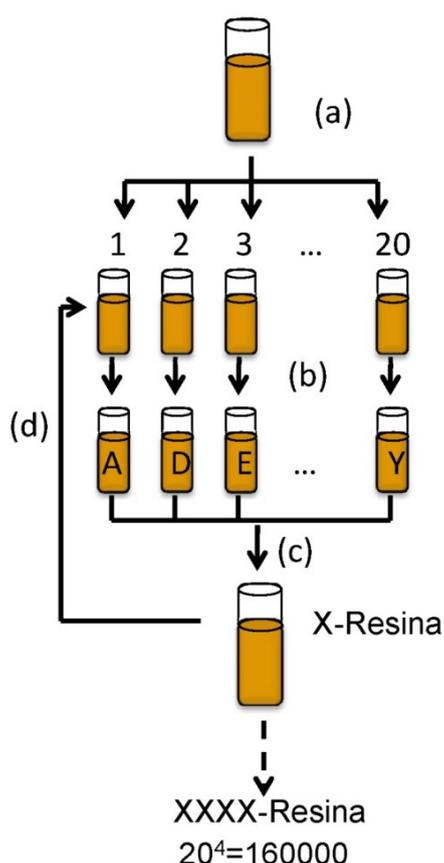


Figura 4. Esquema de síntesis de bibliotecas combinatorias peptídicas por el método DAR. (a) Se divide la resina en tantas porciones como bloques de construcción (aminoácidos) se utilicen. (b) Se acopla en cada porción un aminoácido diferente. (c) Se recombinan las porciones. (d) Se repite el ciclo hasta alcanzar el largo de los péptidos deseado.

Para hallar nuevos ligandos, la biblioteca se pone en contacto con el Ab de interés marcado con un colorante fluorescente o con biotina. Las bolillas que interactúan con el Ab se identifican por su fluorescencia o revelando con el conjugado streptavidina-peroxidasa respectivamente y se aíslan para identificar al péptido inmovilizado. Para evitar la selección de falsos positivos, se realiza un proceso de *screening* en dos pasos, sometiendo a las bolillas seleccionadas en un primer *screening* a un proceso de selección alternativo (Martínez-Ceron *et al.*, 2015). Para acelerar el proceso, se puede remplazar el aislamiento manual de las bolillas por uno automático utilizando un citómetro de flujo especializado para separar partículas del tamaño de las bolillas de resina (Complex Object Parametric Analyzer and Sorter, COPAS™, BIO-BEAD flow sorting equipment Union Biometrica) que selecciona las bolillas en base a la intensidad de su fluorescencia (Marani *et al.*, 2009; Martínez-Ceron *et al.*, 2015). Posteriormente, se secuencian los péptidos inmovilizados en cada bolilla de resina aislada. El método de elección es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) utilizando métodos de ionización suaves como la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) o la ionización por electrospray (ESI). Previo a su análisis, el péptido debe ser separado de las bolillas de resina. Se han diseñado numerosos métodos de síntesis de bibliotecas combinatorias péptidicas, del tipo una bolilla-un péptido, basados en el uso de un sitio de clivaje, ubicado entre la bolilla de resina y el péptido, resistente a todo el proceso de síntesis y de selección (Fitzgerald *et al.*, 1996; Pastor *et al.*, 2002; Camperi *et al.*, 2005; Martínez-Ceron *et al.*, 2010).

2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE SOPORTES DE AFINIDAD CON LIGANDOS PEPTÍDICOS INMOVILIZADOS

Luego del *screening*, las secuencias péptidicas con afinidad por el Ab se sintetizan en mayores cantidades por métodos de síntesis en fase sólida convencionales (Fig. 2) (Chan & White, 2009) de manera de poder analizar su comportamiento como ligandos de afinidad. En general, se sintetiza el péptido con su extremo carboxilo como amida y se acetila el amino terminal para evitar la polimerización del péptido en la reacción de acople a la matriz cromatográfica. A su vez, en el C-terminal se acopla una Lys que permite inmovilizar el péptido a través del grupo amino de su cadena lateral. Si la Lys está presente en la secuencia seleccionada, en el extremo C se incorpora una Cys, cuyo sulfhidrilo es más reactivo y, por lo tanto, compite con el grupo amino. Así se direcciona la inmovilización y se evita que el péptido se incorpore por múltiples posiciones. En general, las bibliotecas combinatorias péptidicas se sintetizan sin Cys para evitar la formación de ciclos indeseados, por lo que el único sulfhidrilo presente en el péptido es el del extremo C. A su vez, se suele agregar un brazo espaciador entre la Cys o la Lys y la secuencia péptidica que consiste en varias Gly y/o Ala o el ácido 6-amino caproico. Esto mejora la interacción del Ab con el péptido inmovilizado al evitar impedimentos estéricos. Si bien existen numerosos métodos descriptos para activar las matrices cromatográficas (Wilchek & Miron, 1999; Hermanson, 2013), hoy en día se puede adquirir la matriz ya activada para poder así inmovilizar los péptidos a través del grupo amino de la Lys o del grupo sulfhidrilo de la Cys.

La evaluación de los parámetros de adsorción del Ab a la matriz cromatográfica de afinidad se realiza por medio de la isoterma de adsorción en el equilibrio y las curvas de *breakthrough* (Chase, 1984).

Para realizar las isotermas de adsorción se adiciona a una serie de microtubos cónicos (*Eppendorf*) el mismo volumen de matriz cromatográfica y el mismo volumen de soluciones con concentraciones crecientes del Ab. Las suspensiones se agitan durante 18 h a una temperatura fija de manera de lograr que el sistema alcance el equilibrio. Finalmente, se centrifugan los tubos y se mide la concentración de Ab libre en el sobrenadante (c^* : concentración de Ab libre en el equilibrio). La masa de Ab adsorbida por volumen de matriz cro-

matográfica (q^*) se calcula como la cantidad de Ab en la solución original menos la cantidad de Ab libre en el equilibrio (c^*). En general, la capacidad máxima de la matriz cromatográfica (q_m) y la constante de disociación (K_d) se calculan por regresión no lineal utilizando el modelo de Langmuir descrito por Chase (1984), en el cual la adsorción describe una hipérbola (Fig.5):

$$q^* = (q_m \times c^*) / (K_d + c^*)$$

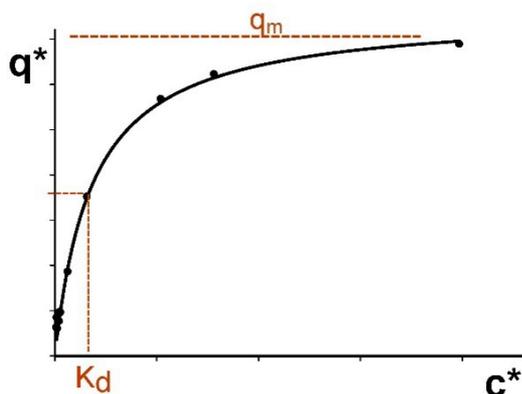


Figura 5. Isotherma de adsorción típica de la interacción de un anticuerpo con un ligando de afinidad inmovilizado. En general la adsorción describe una isoterma de Langmuir. c^* : concentración de anticuerpo libre en el equilibrio; q^* : masa de anticuerpo adsorbida por volumen de matriz cromatográfica; q_m : capacidad máxima de la matriz cromatográfica; K_d constante de disociación ligando-anticuerpo.

Por otra parte, para calcular la capacidad dinámica de la proteína durante el proceso cromatográfico, se realizan las curvas de saturación o *breakthrough*. Para ello se bombea la muestra compleja, que contiene el Ab a purificar en forma continua, a través de la columna cromatográfica a un flujo determinado y se registra a la salida de la columna la concentración de Ab de manera de determinar qué masa de Ab satura la columna (Fig. 6) (Camperi *et al.*, 2014).

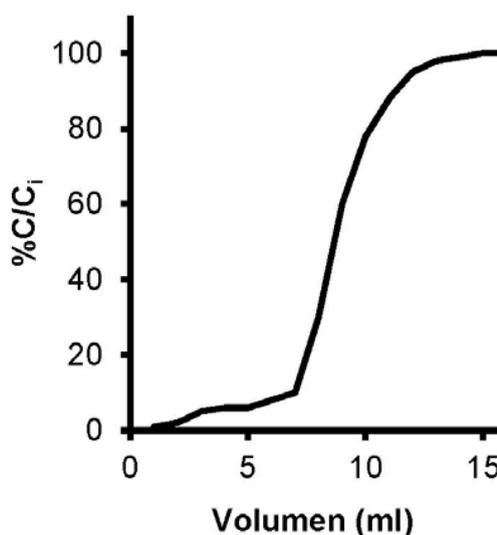


Figura 6. Curva de saturación o *breakthrough*. Se construye sembrando continuamente la muestra de interés a la columna y midiendo a su salida la concentración de anticuerpo no adsorbido. C : concentración de anticuerpo a la salida de la columna. C_i = concentración de anticuerpo en la muestra.

También se puede estudiar la estabilidad del ligando peptídico inmovilizado para estimar la vida media de la matriz cromatográfica. Las muestras crudas generalmente presentan proteasas y peptidasas que pueden digerir el ligando peptídico inmovilizado, por lo que, a veces, es necesario realizar pequeñas modificaciones químicas sobre el ligando para aumentar su estabilidad. Recientemente, Giudicessi *et al.* (2017) describieron una estrategia simple para evaluar la estabilidad de las matrices cromatográficas basada en la incubación del ligando peptídico inmovilizado con muestra cruda y el posterior análisis por MS de la secuencia de interés luego del tratamiento. En caso de no ocurrir una degradación, se observará la secuencia del ligando peptídico inmovilizado completa o, en caso contrario, se observarán los fragmentos inmovilizados como productos de la digestión.

3. APLICACIONES DE LAS MATRICES DE AFINIDAD CON PÉPTIDOS INMOVILIZADOS A LA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

En la Tabla 1 se resumen los ligandos peptídicos diseñados con afinidad por anticuerpos. Tribbick *et al.* (1991), usando una biblioteca *Multipin*, diseñaron un fraccionamiento sistemático de los Ab del suero humano utilizando péptidos homólogos a antígenos como ligandos de afinidad con el objetivo de hallar epítopes secuenciales y así aumentar la selectividad del suero policlonal. Fassina *et al.* (1996), usando bibliotecas construidas por el método DAR, desarrollaron el péptido PAM (*Protein A mimetic*) que, al igual que la proteína A, presenta afinidad por la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Posteriormente, el mismo grupo desarrolló el ligando TG19318 diseñado a partir de bibliotecas de fagos (Fassina *et al.*, 1998). El péptido TG19318 fue capaz de purificar inmunoglobulinas de la clase G, M, E y A (Fassina *et al.*, 2001) así como IgY de yema de huevo (Verdoliva *et al.*, 2001). A su vez, para aumentar su estabilidad frente a proteasas comúnmente encontradas en los extractos crudos, Verdoliva *et al.* (2002) sintetizaron el D-PAM utilizando D-aminoácidos para su síntesis. Ehrlich *et al.* (2000) utilizando bibliotecas de fagos, hallaron el péptido Glu-Pro-Ile-His-Arg-Ser-Thr-Leu-Thr-Ala-Leu-Leu, también con afinidad por la región Fc de la IgG.

Proteína	Péptido	Biblioteca peptídica	Referencia
Ab séricos	SGNEDAGK, SGKEKEGD, SGKEKEGD,	<i>Multipin</i>	Tribbick <i>et al.</i> , 1991
IgG Fc	PAM*	Una bolilla-un péptido	Fassina <i>et al.</i> , 1996
IgG Fc	TG19318*	<i>Phage display</i>	Fassina <i>et al.</i> , 1998
IgG Fc	EPIHRSTLTALL	<i>Phage display</i>	Ehrlich <i>et al.</i> , 2000
IgG Fc	D-PAM*	Una bolilla-un péptido	Verdoliva <i>et al.</i> , 2002
antiGM-CSF mAb*	APAR	Una bolilla-un péptido	Camperi <i>et al.</i> , 2003
IgG Fc	HWRGWV, HYFKFD, HFRRHL	Una bolilla-un péptido	Yang <i>et al.</i> , 2005
IgG Fc	D ₂ AAG and DAAG*	Una bolilla-un péptido	Johannsen <i>et al.</i> , 2006
IgG Fc	FC-BP*	<i>Phage display</i>	Dias <i>et al.</i> , 2006
IgA	Opt-3	<i>Phage display</i>	Hatanaka <i>et al.</i> , 2012
IgG Fc	<i>Double Cyclic Peptide Ligand</i>	<i>Phage display</i>	Gong <i>et al.</i> , 2016
IgY	GVKCTWSSIVDWVCVDM, GTRCDWSAAYGWLCYDY, RSVCVWTAVTGWDCRND	<i>Phage display</i>	Khan <i>et al.</i> , 2016

Tabla 1. Péptidos diseñados por medio de bibliotecas peptídicas para purificar anticuerpos.

*Ab: anticuerpo. PAM: Protein A mimetic. GM-CSF: factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos. FC-BP: Fc binding particles.

Camperi *et al.* (2003) seleccionaron el péptido Ala-Pro-Ala-Arg con alta afinidad por un mAb anti factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), utilizando una biblioteca de tetrapéptidos del tipo una bolilla-un péptido construida por el método DAR. Se inmovilizó el ligando Ala-Pro-Ala-Arg en agarosa y la matriz cromatográfica diseñada permitió purificar el mAb a partir de líquido ascítico en un único paso cromatográfico. A diferencia de reportes previos, el ligando fue diseñado con afinidad por la región variable del mAb, lo que permite la purificación de fragmentos de Ab sin la región Fc.

Yang *et al.* (2005) diseñaron los hexapéptidos His-Trp-Arg-Gly-Trp-Val, His-Tyr-Phe-Lys-Phe-Asp y His-Phe-Arg-Arg-His-Leu con afinidad por la región Fc de la IgG, que luego inmovilizaron en matrices cromatográficas. Éstas permitieron purificar IgG humana con alta selectividad a partir de cultivos de células de mamífero. El grupo de Johannsen *et al.* (2006) diseñó dos ligandos peptídicos denominados D2AAG y DAAG utilizando bibliotecas del tipo una bolilla-un péptido y realizando modificaciones químicas de los péptidos seleccionados. Ambos ligandos contienen los aminoácidos naturales Arg y Gly junto con el ácido aromático sintético 2,6-di-*t*-butil-4-hidroxibenzil acrilato (DBHBA) (Lund *et al.*, 2012). Dias *et al.* (2006) a partir de una biblioteca combinatoria de fagos y posterior síntesis química de peptidomiméticos, diseñados a partir de los péptidos seleccionados, describieron los ligandos llamados *FC binding particles* (FC-BP) para su aplicación en la purificación de mAbs terapéuticos (Kang *et al.*, 2016). Recientemente, Gong *et al.* (2016), por medio del *screening* de una biblioteca de fagos desarrollaron un ligando cíclico tanto para la detección de Ab como para su purificación. Khan *et al.* (2017), también utilizando bibliotecas de fagos, desarrollaron los ligandos ciclo-(4,14)-Gly-Val-Lys-Cys-Thr-Trp-Ser-Ser-Ile-Val-Asp-Trp-Val-Cys-Val-Asp-Met, ciclo-(4,14)-Gly-Thr-Arg-Cys-Asp-Trp-Ser-Ala-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Cys-Tyr-Asp-Tyr y ciclo-(4,14)-Arg-Ser-Val-Cys-Val-Trp-Thr-Ala-Val-Thr-Gly-Trp-Asp-Cys-Arg-Asn-Asp que se aplicaron a la purificación de IgY.

CONCLUSIONES

El creciente interés en el desarrollo métodos alternativos a la AC con proteína A para la purificación de mAbs terapéuticos incentiva el desarrollo de ligandos peptídicos cortos por medio de bibliotecas combinatorias. Si bien hoy en día se continúa utilizando la proteína A como ligando de afinidad a nivel industrial, los péptidos cortos permitirán diseñar sistemas de purificación de mAbs a menores costos, mejorando así la competitividad del proceso global.

AGRADECIMIENTOS

M.C.M.C., S.L.G., O.C. y S.A.C. son investigadores del CONICET. Los trabajos de investigación y desarrollo del grupo son financiados por la Universidad de Buenos Aires (20020130100060BA), el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (ANPCyT) (PICT-2014-1508) y el CONICET (PIP 11220130100119CO).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayyar, B.V., S. Arora, C. Murphy & R. O'Kennedy (2012) Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* **56**: 116-29.
- Bengio, S. & J. Spencer (2003) Validated Alternatives to Protein A Sorbents for Antibody Production. CIPHERGEN, BioSeptra® Process Division. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/HCIC/BIOSEPR_A_MBI_HyperCell.pdf. Consultada el 8 de marzo de 2018.

- Bolton, G.R. & K.K. Mehta (2016) The role of more than 40 years of improvement in protein A chromatography in the growth of the therapeutic antibody industry. *Biotechnol. Prog.* **32**:1193-202.
- Camperi, S.A., M.C. Martínez-Ceron, S.L. Giudicessi, M.M. Marani, F. Albericio & O. Cascone (2014). "Peptide affinity chromatography based on combinatorial strategies for protein purification", in: "Methods in Molecular Biology: Protein Downstream Processing" (N. Labrou, ed.), Humana Press Inc. Springer, New York, pp. 277-302.
- Camperi, S.A., M.M. Marani, M.C. Martínez-Ceron, F. Albericio & O. Cascone (2010) Protein purification by affinity chromatography with peptide ligands selected from the screening of combinatorial libraries. *Trends Chromatogr.* **5**: 11-22.
- Camperi, S.A., M.M. Marani, N.B. Iannucci, S. Côté, F. Albericio & O. Cascone (2005) An efficient strategy for the preparation of one-bead-one-peptide libraries on a new biocompatible solid support. *Tetrahedron Lett.* **46**: 1561-4.
- Camperi, S.A., N.B. Iannucci, G.J. Albanesi, M. Oggero Eberhardt, M. Etcheverrigaray, A. Messeguer, *et al.* (2003) Monoclonal antibody purification by affinity chromatography with ligands derived from the screening of peptide combinatory libraries. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1545-8.
- Camperi, S.A., S.L. Giudicessi, M.C. Martínez-Ceron, J.M. Gurevich-Messina, S.L. Saavedra, G. Acosta *et al.* (2016) Combinatorial library screening coupled to mass spectrometry to identify valuable cyclic peptides. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **8**: 109-30.
- Carter, P.J. & G.A. Lazar (2018) Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**: 197-223.
- Chan, W.C. & P.D. White (2009) "Basic procedures", in "Fmoc solid phase peptide synthesis: A Practical Approach" (W.C. Chan & P.D. White, eds.), Oxford University Press, New York, pp. 41-76.
- Chase, H.A. (1984) Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *J. Chromatogr.* **297**:179-202.
- Dias, R.L., R. Fasan, K. Moehle, A. Renard, D. Obrecht & J.Á. Robinson (2006) Protein ligand design: from phage display to synthetic protein epitope mimetics in human antibody Fc-binding peptidomimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 2726-32.
- Ehrlich, G.K., P. Bailon & W. Berthold (2000) Phage display technology. Identification of peptides as model ligands for affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.* **147**: 209-20.
- Elvin, J.G., R.G. Couston & C.F. van der Walle (2013) Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int. J. Pharm.* **440**: 83-98.
- Fassina, G., A. Verdoliva, G. Palombo, M. Ruvo & G. Cassani (1998) Immunoglobulin specificity of TG19318: a novel synthetic ligand for antibody affinity purification. *J. Mol. Recognit.* **11**: 128-33.
- Fassina, G., A. Verdoliva, M.R. Odierna, M. Ruvo & G.J. Cassini (1996) Protein A mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies. *J. Mol. Recognit.* **9**: 564-9.
- Fassina, G., R. Menotti, G. Palombo, A. Verdoliva & M. Marino (2001) Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *J. Biochem. Biophys Methods* **49**: 481-90.
- Fields, C., P. Li, J.J. O'Mahony & G.U. Lee (2016) Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials for biomagnetic separation. *Biotechnol. Bioeng.* **113**: 11-25.
- Fitzgerald, M.C., K. Harris, C.G. Shevlin & G. Siuzdak (1996) Direct characterization of solid phase resin-bound molecules by mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**: 979-82.
- Follman, D.K. & R.L. Fahrner (2014) Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A. *J. Chromatogr. A* **1024**: 79-85.
- Frank, R., S. Güler, S. Krause & W. Lindenmaier (1991) "Facile and rapid 'spot synthesis' of large numbers of peptides on membrane sheets", in: "Peptides 1990, Proc. 21st Eur. Peptide Symp." (E. Giralt & D. Andreu, eds.), ESCOM, Leiden, pp. 151.
- Frank, R.J. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports. Principles and applications. *J. Immunol. Methods.* **267**: 13-26.
- Furka, Á, F. Sebestyén, M. Asgedom & G. Dibó (1991) General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Pep. Protein Res.* **37**: 487-93.
- Gagnon, P. (2012) Technology trends in antibody purification. *J. Chromatogr. A* **1221**: 57-70.
- Geysen, H.M., R.H. Meloen & S.J. Barteling (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**: 3998-4002.

- Giudicessi, S.L., M.L. Salum, S.L. Saavedra, M.C. Martínez-Ceron, O. Cascone, R. Erra-Balsells, *et al.* (2017) Simple method to assess stability of immobilized peptide ligands against proteases. *J. Pept. Sci.* **23**: 685-92.
- Gong, Y., L. Zhang, J. Li, S. Feng & H. Deng (2016) Development of the double cyclic peptide ligand for antibody purification and protein detection. *Bioconjug. Chem.* **27**: 1569-73.
- Hedrich, W.D., T.E. Fandy, H.M. Ashour, H. Wang & H.E. Hassan (2017) Antibody-Drug Conjugates: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling, Preclinical Characterization, Clinical Studies, and Lessons Learned. *Clin. Pharmacokinet.* doi: 10.1007/s40262-017-0619-0. [Epub ahead of print].
- Hermanson, G.T. (2013) "Bioconjugate Techniques" 3rd Edition. Academic Press. New York.
- Houghten, R.A., C. Pinilla, S.E. Blondelle, I.R. Appel, C.T. Dooley & J.H. Cuervo (1991) Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **354**: 84-6.
- Huang, P.Y. & R.G. Carbonell (1995) Affinity purification of proteins using ligands derived from peptide libraries. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 288-97.
- Johannsen, I., M.R. Gallego, R. Michael, D. Ambrosius & A. Jacobi (2006) Antibody binding affinity ligands. Patent WO 2006/066598.
- Kang, H.J., W. Choe, J.K. Min, Y.M. Lee, B.M. Kim & S.J. Chung (2016) Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin. *J. Chromatogr. A.* **1466**: 105-12.
- Khan, K.H., A. Himeno, S. Kosugi, Y. Nakashima, A. Rafique, A. Imamura *et al.* (2017) IgY-binding peptide screened from a random peptide library as a ligand for IgY purification. *J. PeptideSci.* **23**: 790-7.
- Köhler, G. & C. Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-7.
- Kurien, B.T. & R.H. Scofield (2015) Western blotting: an introduction. *Methods Mol. Biol.* **1312**: 17-30.
- Lam, K.S., S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski & R.J. Knapp (1991) A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **354**: 82-4.
- Lund, L.N., P.E. Gustavsson, R. Michael, J. Lindgren, L. Nørskov-Lauritsen, M. Lund, *et al.* (2012) Novel peptide ligand with high binding capacity for antibody purification. *J. Chromatogr. A.* **1225**: 158-67.
- Marani, M.M., M.C. Martínez Ceron, S.L. Giudicessi, E. Oliveira, S. Côté, R. Erra-Balsells *et al.* (2009) Screening of one-bead-one-peptide combinatorial library using red fluorescent dyes. Presence of positive and false positive beads. *J. Comb. Chem.* **11**: 146-50.
- Martínez-Ceron, M.C., S.L. Giudicessi, J.N. Kruszyn, M.M. Marani, F. Albericio, O. Cascone *et al.* (2015) Two-stage screening of combinatorial peptide libraries. Application to bovine serum albumin ligand selection. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* **46**: 76-86.
- Martínez-Ceron, M.C., S.L. Giudicessi, M.M. Marani, F. Albericio, O. Cascone, R. Erra-Balsells, *et al.* (2010) Sample preparation for sequencing hits from one-bead-one-peptide combinatorial libraries by MALDI-TOF/TOF MS. *Anal. Biochem.* **400**: 295-7.
- Martínez-Ceron, M.C., S.L. Giudicessi, S.L. Saavedra, J.M. Gurevich-Messina, R. Erra-Balsells, F. Albericio, *et al.* (2016) Latest advances in OBOC peptide libraries. Improvements in screening strategies and enlarging the family from linear to cyclic libraries. *Curr. Pharm. Biotech.* **17**: 1-9.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-54.
- Pastor, J.J., I. Fernández, F. Rabanal & E. Giralt (2002) A new method for the preparation of unprotected peptides on biocompatible resins with application in combinatorial chemistry. *Org. Lett.* **4**: 3831-3.
- Porath, J., F. Maisano & M. Belew (1985) Thiophilic adsorption-a new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* **185**: 306-10.
- Smith, G.P. & J.K. Scott (1993) Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217**: 228-57.
- Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-7.
- Tribbick, G., B. Triantafyllou, R. Lauricella, S.J. Rodda, T.J. Mason & H.M. Geysen (1991) Systematic fractionation of serum antibodies using multiple antigen homologous peptides as affinity ligands. *J. Immunol. Methods.* **139**: 155-66.
- Verdoliva, A., F. Pannone, M. Rossi, S. Catello & V. Manfredi (2002) Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *J. Immunol. Methods.* **271**: 77-88.

- Verdoliva, A., G. Basile & G. Fassina (2001) Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **749**: 233-42.
- Wang, R.Z., D.Q. Lin, H.F. Tong, H.L. Lu & S.J. Yao (2013) Evaluation of mixed-mode chromatographic resins for separating IgG from serum albumin containing feedstock. *J. Chromatogr. B Analyt, Technol. Biomed. Life Sci.* **936**: 33-41.
- Wilchek, M. & T. Miron (1999) Thirty years of affinity chromatography. *React. Funct. Polym.* **41**: 263-8.
- Yang, H., P.V. Gurgel & R.G. Carbonell (2005) Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. *J. Peptide Res.* **66**: 120-37.