



## COMPARACIÓN DE DOS ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA EN CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD CELULAR DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE rHuG-CSF

Joseph Thiemann<sup>1</sup>, Mauricio A. Trujillo-Roldán<sup>1</sup>, Leticia Hernández<sup>1</sup>, Alfredo Montes<sup>1</sup>, Violeta Quiroz<sup>1</sup>, Norberto Cruz-García<sup>1</sup>, Octavio Tonatiuh Ramírez<sup>2</sup>, Jaime Uribe Wiechers<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PROBIOMED S.A. de C.V., Planta Tenancingo. Cruce de Carret. Acatzingo-Zumpahuacan SN, C.P. 52400, Tenancingo Edo. de México. Tel 0155-11662279. mauricio.trujillo@probiomed.com.mx

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor. 62250, México.

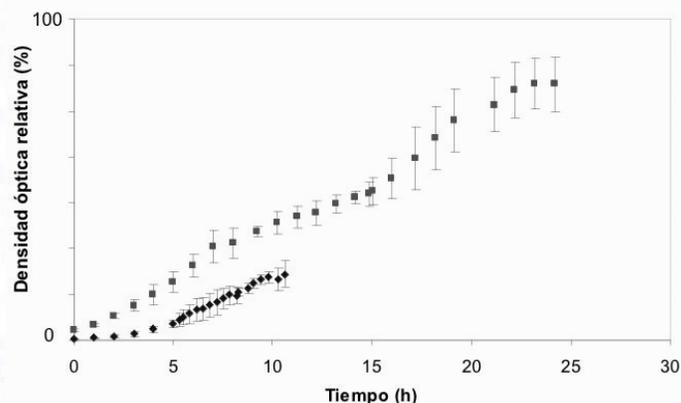
*Palabras clave:* cultivos alimentados, filgrastim, proteína recombinante, biogénicos

**Introducción.** El factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante o Filgrastim (rHuG-CSF) es una proteína de bajo peso molecular (aprox. 18.8 KDa) y es producido industrialmente por *E. coli*. El rHuG-CSF presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la proteína humana, con la excepción de que se añadió una metionina en el extremo amino-terminal, y a diferencia de la proteína natural, el Filgrastim no está glicosilado (1). Este trabajo presenta los resultados de la comparación de dos procesos productivos de rHuG-CSF, donde las diferencias más relevantes están basadas en la forma de controlar y alimentar la fuente de carbono en cultivo de alta densidad celular.

**Metodología.** Se uso la cepa de *E. coli*, conteniendo un plásmido derivado de pSC-101 codificante de rHuG-CSF. Los cultivos se llevaron a cabo en biorreactores Bioflo-110 (New Brunswick Scientific Co, NJ), a una tensión de oxígeno disuelto (TOD) de 30 % (con control de la velocidad de agitación, de 200 a 1000 rpm y posterior enriquecimiento con oxígeno de la corriente de entrada de los gases), pH cercano a la neutralidad y la temperatura constante durante todo el cultivo. En el momento de la inducción de la proteína, la temperatura se elevó a un valor entre 38 y 42°C. La primera estrategia de alimentación consistió en controlar la concentración de glucosa entre 4 y 10 g/L y la segunda en controlar la adición de la glucosa por medio del control de pH (pH-*stat*). La figura 1 presenta el crecimiento celular en escala lineal de los promedios y las desviaciones estándar de al menos cuatro cultivos para cada estrategia. La concentración de biomasa se midió por espectrofotometría (600 nm), la glucosa se evaluó en un analizador Bioquímico (YSI Corp. Yellow Springs, OH). La concentración de rHuG-CSF de la pasta celular y los cuerpos de inclusión (C.I.), se cuantificó por densitometría de geles de SDS-PAGE. La estabilidad del plásmido se midió en cultivos diferenciales con y sin antibiótico en medio TSA. La identidad de la proteína se realizó por mapeo peptídico usando la enzima tripsina de Sigma.

**Resultados y discusión.** La principal diferencia entre las formas de cultivo consiste en la forma de alimentar la fuente de carbono y el control sobre su concentración en el medio de cultivo. Mientras que en la primera estrategia, el control de la concentración de glucosa admitía concentraciones de 4 a 10 g/l y se realiza fuera de línea, en la estrategia pH-*stat* la alimentación de glucosa se da por medio del control del pH y esto resulta en que en el medio de cultivo la concentración no sea mayor a 1.0 g/l. Valores bajos de glucosa durante la fase

alimentada limita la producción de subproductos (como acetato) que pueden inhibir el crecimiento (2). La figura 1 presenta la cinética de crecimiento celular de ambas procesos, donde la concentración máxima de biomasa en aquellos cultivos controlados como pH-*stat* es 420% mayor al compararse con aquellos controlados fuera de línea. En los cultivos pH-*stat* se logró obtener > 25% de rHuG-CSF con respecto a las proteínas totales, mientras que aquellos cultivos llevados a cabo con la estrategia fuera de línea se alcanzaron valores máximos de >15 %. En todos los cultivos la estabilidad del plásmido fue 100% y la proporción de rHuG-CSF en los C.I. obtenidos tras ruptura y lavado alcanzaron 70% de pureza por HPLC, en ambas estrategias de cultivo. El proceso de purificación de la proteína recombinante alcanzó purezas superiores a 99.0%. La identidad de proteína fue corroborada por mapeo peptídico y comparada con el producto de referencia Nepogen®.



**Figura 1.** Cinética de crecimiento bacteriano en cultivos alimentados usando control off-line de glucosa (rombos) y pH-*stat* (cuadros). Las barras de error representan la desviación estándar entre los cultivos.

**Conclusiones.** Al modificar la estrategia de alimentación de la fuente de carbono en cultivos productores de rHuG-CSF se incrementa sustancialmente la concentración final de biomasa y proteína recombinante, sin modificar las características del producto final.

### Bibliografía

- 1.- Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G (1996) Filgrastim (r-met-HuG-CSF): The first 10 years. *Blood* 88:1907-1929
- 2.- Han K, Lim HC, Hong Y (1992) Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 663-671