



EL CONTROL DE LA TENSION DE OXIGENO DISUELTO COMO PARÁMETRO DE ESCALAMIENTO EN CULTIVOS ALIMENTADOS DE *Escherichia coli* RECOMBINANTES PRODUCTORES DE rHuG-CSF

Mauricio A. Trujillo-Roldán¹, Leticia Hernández¹, Violeta Quiroz¹, Octavio Tonatiuh Ramírez², Jaime Uribe¹

¹ 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

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

Palabras clave: escalamiento, filgrastim, proteína recombinante

Introducción. El factor estimulante de colonias de granulocitos humano o Filgrastim (HuG-CSF) es producido en forma recombinante por *E. coli*. El Filgrastim recombinante (rHuG-CSF) tiene un peso molecular de 18,800 Da, siendo idéntico a la proteína humana con la excepción de presentar una metionina en el extremo amino-terminal (1) y a diferencia de la proteína natural, el rHuG-CSF no está glicosilado. La literatura reporta al menos 20 parámetros de cultivo, coeficientes y números adimensionales recomendados para escalar un proceso (2). Sin embargo, solo cuatro son los más usados industrialmente (3). El control sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD) es usado en casi el 20% de los procesos de escalamiento (3). En este trabajo, se llevó a cabo el escalamiento ascendente de laboratorio a planta piloto, en cultivo alimentado, manteniendo constante la TOD.

Metodología. Se usó la cepa de *E. coli* conteniendo un plásmido derivado de pSC-101 codificante de rHuG-CSF. Se llevaron a cabo cuatro cultivos en escala de laboratorio en biorreactores Bioflo-110 (volumen de trabajo 5.0 L) y tres en planta piloto en un Bioflo-5000 (volumen de trabajo 60.0 L) (New Brunswick Scientific Co, NJ). La concentración de biomasa se midió por espectrofotometría (600 nm) y la glucosa del medio de cultivo en un analizador Bioquímico (YSI Corp. Yellow Springs OH). Se alimentó glucosa en una solución al 50% para mantener la concentración del medio de cultivo entre 4 y 10 g/L. La concentración de rHuG-CSF, en la pasta celular y en 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.

Resultados y discusión. Se llevó a cabo el escalamiento ascendente de la producción de rHuG-CSF por *E. coli*, de escala de laboratorio a planta piloto manteniendo constante la TOD con control de la velocidad de agitación (de 200 a 1000 rpm en los Bioflo-110 y de 150 a 550 rpm en el Bioflo-5000) y posterior enriquecimiento con oxígeno de la corriente de entrada de los gases. El pH se controló cerca de la neutralidad y la temperatura se mantuvo constante hasta el momento de inducción de la proteína cuando se elevó a 38-42°C. La figura 1 presenta la cinéticas de crecimiento celular de ambos

reactores, donde se aprecia un comportamiento similar. La velocidad específica de crecimiento similar entre cultivos. La cantidad máxima de rHuG-CSF, por densitometría de geles de SDS-PAGE, fue, en ambos casos mayor a 25% con respecto a la proteína total. Al finalizar la inducción, la estabilidad del plásmido fue 100% en ambas escalas. La concentración de rHuG-CSF, en los C.I. obtenidos tras ruptura y posteriores lavados fue superior al 70%.

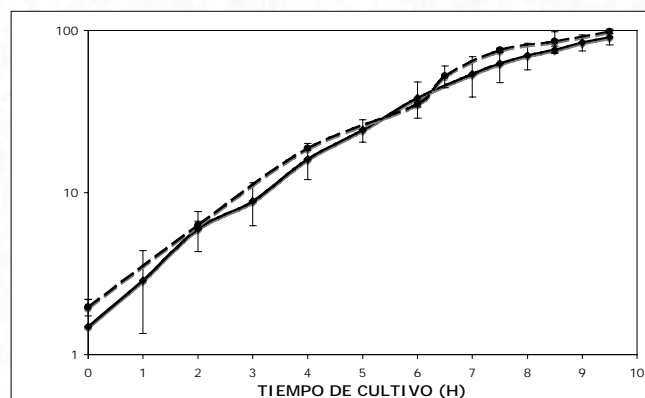


Figura 1. Cinética de crecimiento bacteriano en cultivos en escala de laboratorio (punteado) y planta piloto (continuo). Las barras de error representan la desviación estándar entre los cultivos.

Conclusiones. Usando como parámetro de escalamiento la tensión de oxígeno disuelto, se lograron cinéticas de crecimiento bacteriano y producción de rHuG-CSF similares, entre la escala de laboratorio y la de planta piloto.

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.- Schmidt FR (2005) Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:425-435
- 3.- Margaritas A, Zajic JE (1978) Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol Bioeng* 20: 939-1001