

PROCESO DE PURIFICACION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSION PRODUCIDOS POR *E. coli*.

Angélica Meneses-Acosta^{2,3}, Vanessa Hernández¹ Juan M. Salazar¹, Francisco Bolívar¹, O. Tonatiuh Ramírez¹. UNAM¹ Apartado postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271. Fax 01777 3138811. Facultad de Farmacia, UAEM², UPIBI-IPN³. tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *cuerpos de inclusión, hormona de crecimiento, purificación.*

Introducción. El aumento en la demanda de la hormona de crecimiento humana en los últimos años ha llevado a la necesidad de generar nuevas estrategias de producción y al diseño de procesos integrales que conlleven a una alta productividad. En México, este producto no se fabrica debido a la falta de tecnologías adecuadas para su producción, las cuales sean competitivas en el mercado. Por ello, como objetivo de este trabajo se planteó el desarrollo de diferentes estrategias de purificación que permitieran obtener un producto con alta pureza y con alto rendimiento a partir de los cuerpos de inclusión generados en fermentaciones de *E.coli* recombinante. Asimismo, se analizaron diferentes metodologías de purificación con la finalidad de generar un paquete tecnológico factible tanto técnica como económicamente.

Metodología. Se establecieron diferentes estrategias de purificación a partir de cuerpos de inclusión prepurificados y a partir del caldo de cultivo obtenido en fermentaciones de *E. coli*. Además, de que se utilizaron diferentes estrategias de purificación considerando el plegamiento de la proteína en las primeras etapas del proceso (método nativo) o el plegamiento en las etapas cromatográficas (método desnaturalizante). Las operaciones unitarias usadas fueron disolución, naturalización o plegamiento, microfiltración, precipitación, ultracentrifugación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel y de interacción hidrofóbica.

Para el análisis y cuantificación de rHGH se utilizó SDS-PAGE y densitometría mediante el software del NIH Image® y la medición de proteína total por el método de Bradford. Se utilizaron técnicas de Dot Blot y Western Blot para identificación de la proteína. Se estableció la metodología para cuantificar rHGH por HPLC (C4) establecida por la farmacopea europea, por medio de espectrofotofluorimetría y por fotometría (260nm). El plegamiento de la proteína se analizó por medio de HPLC (C18), por espectrofluorometría y dicroísmo circular.

Resultados y discusión. No se encontraron diferencias en los cuerpos de inclusión provenientes de diversas condiciones de fermentación. Se observó que uno de los puntos críticos es la disolución del cuerpo de inclusión por lo que se probaron diferentes condiciones utilizando como agente caotrópico la urea y como agente reductor el 2 mercaptoetanol. Se obtuvo una pureza del 25% en esta etapa.

El plegamiento de la proteína y su correspondiente oxidación se correlacionó con el potencial redox del sistema. La naturalización de la proteína se realizó por el método de dilución y por la adición de agentes reductores tales como glutatión. El rendimiento promedio obtenido en esta etapa fue del 95%.

Se realizaron cinéticas de precipitación con sulfato de amonio aumentando la pureza de la rHGH hasta 65% en el mejor de los casos.

En las etapas finales de cromatografía se obtuvo un rendimiento del 98% y una concentración de 0.177 g/L.

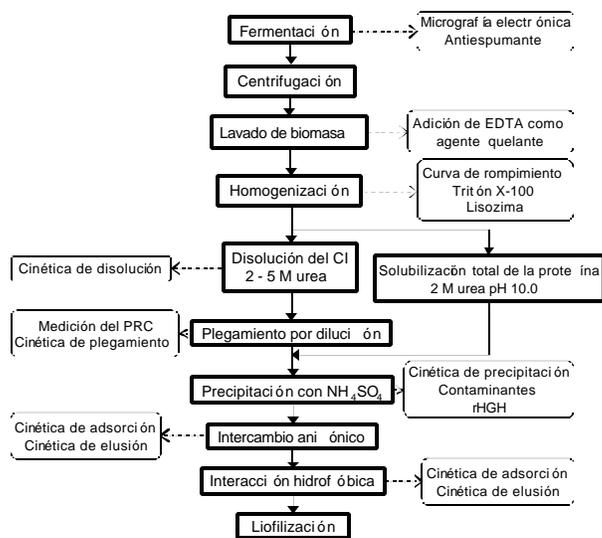


Fig.1. Proceso de purificación de rHGH.

Conclusiones. Se estableció el siguiente esquema general de purificación de la rHGH. Además, se establecieron los Procedimientos Normalizados de Operación en cada una de las etapas obtenidas por dos diferentes métodos obteniéndose un producto con 95% pureza con alto rendimiento.

Agradecimiento. Proyecto CONACYT NC-230.

Bibliografía.

Patra, A., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Prot. Exp. and Pur.* vol (18):182-192.