

# OBTENCION DE INTERLEUCINA-2 HUMANA RECOMBINANTE EN *Escherichia coli* EN UN CULTIVO INCREMENTADO

O. Ruiz\*, M. Pérez, L. Varas y V. Lugo

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), P.O.Box 6162, Cubanacán, Playa, Habana, Cuba.

Telefax: (53-7) 218070 / 336008. E.Mail: odalys.ruiz@cigb.edu.cu.

**Palabras claves:** Recombinante, *E.coli*, Cultivo incrementado.

**Introducción:** La Interleucina es una glicoproteína producida por los linfocitos T que desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune, su uso terapéutico ha tenido un notable aumento en los últimos años en el tratamiento contra el cáncer. Se expresa en *E.coli* en forma de agregados insolubles, a partir de los cuales es posible purificarla y recuperarla en su forma activa, su utilización ha sido posible con el desarrollo de variantes tecnológicas a escala productiva que garantizan su disponibilidad de cantidades suficientes.

En el trabajo se realiza el diseño de un cultivo incrementado capaz de alcanzar 50 g/L de peso húmedo, el cual se escaló hasta 50L de volumen efectivo y por último se realizó un análisis económico comparativo entre la fermentación batch y la fed batch.

**Metodología:** La cepa empleada fue la JM 101, transformada con el plásmido pIL-2mA12, que es portador del gen Interleucina-2 Humana, bajo el control del promotor triptofano y del gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina como marcador de selección. El medio inóculo empleado fue LB con 100  $\mu$ g/mL Ampicilina y el medio de los fermentadores fue: 2.22 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.375 g/L NaCl, 6.63 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/L YE, 10 g/L Triptona, 10 g/L HC, 100 mL/L Sales trazas 10X, 0.109 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.50% Glucosa, 3.70mM  $\text{CaCl}_2$ , 3.08mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu$ g/mL Ampicilina, 20  $\mu$ g/mL Tiamina, 100  $\mu$ g/mL Triptofano. El incremento contiene: 123.24 g/L Glucosa y 5.75 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

## Resultados y Discusión:

Se diseñó un cultivo incrementado capaz de alcanzar 50 g/L de peso húmedo manteniendo los niveles de expresión.

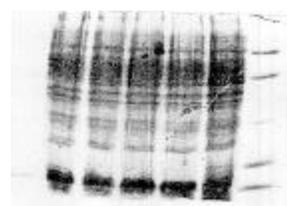
Se define cual es la cantidad de biomasa que se quiere obtener y se calcula la concentración de nutrientes que se debe suministrar.

El flujo se adiciona de forma exponencial en el tiempo, calculado mediante balances de masa. En el momento en que el oxígeno disuelto y el pH comienzan a aumentar indicando agotamiento de la fuente de carbono.

Se realizaron 3 experimentos variando el pH y manteniendo el resto de las condiciones constantes. El resultado de los tres experimentos aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudio comparativo del efecto del pH.

Exp.	Agit. Aereac.	pH	UDO	% Exp
1	1vvm, 700rpm	5.5	8.1	5
2	1vvm, 700rpm	Inicio 7, 5.5 final	32.7	10
3	1vvm, 700rpm	7	32.5	25



C+ 14h 13h 11h 4h PM

Fig.1 Electroforesis del Experimento 3

En el primer experimento los niveles de crecimiento alcanzados son bajos por lo cual fue desechado completamente. En el segundo caso el crecimiento fue alto, pero se obtuvo un 10% de expresión. En la última condición se llegó a un 25% de expresión (Fig. 1) entre las 12 y 14 horas manteniendo los niveles de crecimiento altos, 35 UDO. A la muestra final se le hizo estabilidad plasmídica cuyo resultado fue 96.7%.

Como conclusión final de los tres experimentos realizados se obtuvo que las mejores condiciones de operación en el cultivo incrementado son: Agitación 700 rpm, Aireación 1vvm, pH = 7 y Tiempo de fermentación 14 horas, lográndose obtener a las 14 horas 35 UDO con un 20% de expresión.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos tienen una gran importancia desde el punto de vista práctico y económico ya que se logró diseñar un medio de cultivo capaz de alcanzar 35 unidades de densidad óptica manteniendo los niveles de expresión en un 25%, empleando como mejor condición de operación: 700 rpm, 1vvm y pH=7. También se hicieron los cálculos para proponer el escalado a 50L.

Del análisis económico comparativo se llegó a la conclusión de que el aumento que se incurre en el costo del proceso por concepto de materia prima y energía se justifica con el aumento de los gramos por litros de proteína de interés.