

EMPLEO DE INSULINA RECOMBINANTE EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA OBTENCION DE ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE.

Odalys Ruiz*, Pilar Rodríguez, Mayté Pérez, Pedro Casanova, Ana Zuria Martínez, Rolando Paez, Maxlenin Peña.
División de Desarrollo Biofarmacéutico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa,
P.O. BOX 6162, La Habana 10600, CUBA. Teléfono: 53-7-216221 / 218008 /218466,
Fax: 53-7-214764 / 218070, e-mail: odalys.ruiz@cigb.edu.cu

Introducción: La Eritropoyetina es una glicoproteína hormonal que interviene en la formación de glóbulos rojos; es producida de forma natural en el riñón en respuesta a la epoxia. Ha sido purificada a partir de la orina de pacientes con anemia aplásica severa, pero rinde cantidades ínfimas del producto lo que dificulta su uso terapéutico, de ahí la importancia de su obtención por vía recombinante(1). Uno de los aspectos más importante a tener en cuenta en el trabajo con células de mamíferos es la determinación de la composición del medio de cultivo(2). Históricamente se han realizado numerosos esfuerzos para reducir o eliminar el suero del medio de cultivo, surgiendo formulaciones basales enriquecidas con nutrientes proteicos de origen animal como la insulina, transferrina y otros(3).

Para la obtención de Eritropoyetina humana recombinante en el CIGB se utiliza un medio de cultivo libre de suero suplementado con Insulina Bovina, material proteico de origen animal. El sustituto más conveniente en este caso es la Insulina recombinante por lo que en el trabajo se estudia la influencia de la misma en la productividad del proceso. De esta forma se ajusta a las regulaciones internacionales establecidas para productos de uso en humanos.

Metodología: Se emplearon Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) transformadas con el gen que codifica para la expresión de la Eritropoyetina humana recombinante. Las células son mantenidas en medio Dulbecco's MEM, suplementado con Suero Fetal de Ternero y gentamicina. En condiciones de cosecha se emplea un medio libre de suero suplementado con Insulina Bovina o Insulina recombinante según el experimento. Frascos roller de 1750 cm² se cultivan hasta la confluencia total realizando 4 ciclos de recuperación y cosechas de 48 horas a 37°C. A partir de 250 mL de sobrenadante de cosecha se realizan 3 pasos cromatográficos: gel filtración, intercambio iónico e hidrofobicidad. Finalmente se realiza un paso de gel filtración en HPLC para seleccionar la forma monomérica adecuada de la proteína. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Comassie (4).

Resultados y Discusión: Se realizó un diseño experimental 2² donde las variables de estudio fueron: concentración de insulina (10 y 20 µg/mL) y fuente de insulina (Bovina o Recombinante). Al finalizar el paso de filtrado del proceso de purificación de las cosechas 2 y 3 se evaluó la cantidad total

de EPO por roller. Un análisis de varianza fue utilizado para cada ensayo y aquellos valores de P< 0.05 fueron considerados significantes para determinar si existen diferencias entre las variantes estudiadas. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 1 y al ser analizados estadísticamente se demostró que no existen diferencias significativas entre las alternativas estudiadas. Por otra parte durante el proceso de cultivo no se observó al microscopio deterioro celular que indicara alguna afectación asociada al cambio en el medio de cultivo, por el contrario la monocapa celular se recupera completamente en los inicios de la segunda cosecha de la variante con Insulina recombinante a 10µg/mL.

Tabla 1. Estudio comparativo del efecto de la insulina en el medio

| INSULINA | | EPO (mg) | |
|--------------|---------------|-----------|-----------|
| Fuente | Concentración | Cosecha 2 | Cosecha 3 |
| Bovina | 10µg/mL | 1.65 | 0.77 |
| Recombinante | 10µg/mL | 1.66 | 1.50 |
| Bovina | 20µg/mL | 1.78 | 0.64 |
| Recombinante | 20µg/mL | 1.74 | 1.44 |

Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran que es posible, sin afectar la cantidad de la proteína de interés, lograr: disminuir en un 50 % la concentración de la insulina bovina, sustituir la Insulina Bovina por la Recombinante a una concentración de 10 µg/mL y así incrementar la seguridad del producto final al eliminar un reactivo de origen animal. Por otra parte si se tiene en cuenta que 1g de insulina bovina cuesta 975.00 USD y de insulina recombinante 175.00 USD, al sustituirla en el proceso se reducirían los costos de producción por este reactivo.

Bibliografía

1. Tsao, E., Bohn, M., and Munster, M. (1992). Optimization of a roller bottle process for the production of recombinant Erythropoietin. *Annals New York academy of Sciences*. 665,127-136.
2. Duval, D., Demangel, C., Mulier- Jolain, K., Miossec, S. and Geahel, I. (1991). Factors controlling cell proliferation and Mabs production in mouse hybridoma cells 1. Influence of the amino acid supply. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 561-579.

3. Xie, L. and Wang, D. (1994). Stoichiometric Analysis of animal Cell Growth and its application in medium design. *Biotechnol and Bioeng.* 43, 1164-1174.
4. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.