

# ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE UN PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL FACTOR ESTIMULADOR DE LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF)

Dinorah Torres Idavoy, Yai Cruz Ruiseco, Marbel Ramos Alfonso, Zeila Santana, Joel Ferrero, Victori Lugo, Rolando Páez, Jorge L. Vega. (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Ciudad de La Habana. Cuba, P.O. Box 6162, Ciudad La Habana, Cuba, Telefax: (53-7) 21 8070, E-mail dinorah.torres@cigb.edu.cu.

Palabras Claves: G-CSF, Purificación, renaturalización

**Introducción.** El G-CSF, proteína producida de forma natural por monocitos y fibroblastos,(1) obtenida por vía recombinante es aplicada, entre otros usos, en la neutropenia inducida por la quimioterapia y en la aceleración de la recuperación neutrófila después de los trasplantes de médulas óseas, así como su aplicación en pacientes con leucemias agudas.(2). La expresión de esta proteína en *E. coli* resulta en la formación de cuerpos de inclusión, debiendo ser incluidos en su proceso de obtención, la separación y semipurificación de estos agregados insolubles y un proceso de renaturalización de la proteína.

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de un proceso de purificación del G-CSF humano recombinante, expresado en *E. coli*.

**Metodología. Ruptura y lavado celular.** El material obtenido de la fermentación de 50 L de la cepa *E. coli* BL- 21 transformada con el plásmido pTE-9, fue sometido a un proceso de ruptura celular en un homogenizador de alta presión, seguido por un proceso de lavado que incluye el uso de Tritón X-100 y Urea.

**Extracción y Renaturalización.** La solubilización de la proteína se realizó con GndHCl 6M y la renaturalización se realizó en cromatografía de Filtración Gel (Sephadex G25) en tampón Tris -HCl pH 8 a un flujo lineal de 10 cm/h.

**Purificación.** El material renaturalizado se sometió a un proceso de cambio de tampón por filtración en gel para su aplicación posterior a una cromatografía de Intercambio cationico.

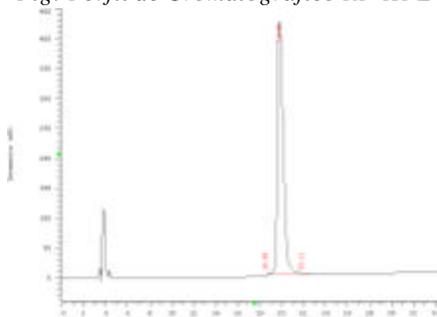
**Resultados y Discusión.** En la tabla se pueden apreciar los valores de pureza y rendimiento de las diferentes etapas del proceso, los valores de pureza del material son elevados desde la etapa de renaturalización, con el paso cromatográfico de intercambio cationico (Toyopearl Sp 650 200 mL) en tampón acetato 50 mM pH 4 y elución a 0.5M de NaCl se obtiene un producto de alta calidad, considerando para esta afirmación parámetros de pureza por RP -HPLC Fig , SDS-PAGE, actividad biológica (actividad específica  $1 \times 10^8$  UI/mg) e integridad de la molécula.

Tabla: Pureza y Rendimiento de las diferentes etapas del proceso

Etapas	%Pureza	Recobrado
Extracción	34.82	100
Renaturalización	90.4	37.5
I: Iónico	99.4	89.26
Total global		39.14

% de pureza por SDS-PAGE Y RP-HPLC.

Fig: Perfil de Cromatográfico RP-HPLC analítico (Columna C-8)



del producto final..

**Conclusiones.** El proceso de purificación que incluye la renaturalización por filtración en gel permite la obtención de un producto con una pureza mayor de un 95 % y un recobrado global del proceso superior a un 30 %.

## Bibliografía.

- 1- Nissen C. (1994) Glycosilation Colony Stimulating Factor: Implication for stability and Potency European J: Cancer.30A (3) s12-s14.
- 2- Alan C. H, Boone, C, Hsieng, S.Lu. (1996). Characterization, Formulation and Stability of Neupogen (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor. Pharm. Biotechnol. 9: 303-328.