

# ESTUDIOS DE LA AGREGACIÓN DE LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACIÓN.

Jorge Sánchez\* ; Rolando Paez ; Anazuria Martínez y Osmani Rodríguez. (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.

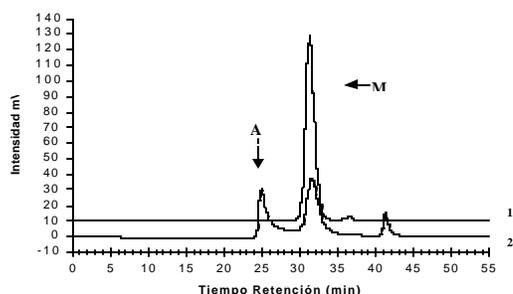
*Palabras claves: Eritropoyetina, agregación, etanol.*

**Introducción:** La Eritropoyetina humana (Epo-hu) es una hormona glicoproteica que interviene en la diferenciación y proliferación eritroide, dado su importancia en el tratamiento de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica y lo escasa que resulta la Epo-hu en su fuente natural se clonó el gen en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y se desarrolló un proceso de purificación en el cual se obtienen las glicofomas más activas con más de un 98 % de pureza.

En el proceso de purificación establecido se forman agregados solubles de la molécula en el último paso cromatográfico y desde el punto de vista regulatorio existen limitaciones estrictas en cuanto al porcentaje permisible de los mismos. Por todo lo anterior se realizó un estudio de los principales factores que inducen la agregación, además de buscar condiciones tecnológicas que favorezcan la aparición de las formas monoméricas de la Epohu-r.

**Metodología:** Se desescaló el proceso de purificación de la Epohu-r y se determinó por gel filtración HPLC TSK 3000 PW la presencia de la formación de agregados en la elusión con etanol al 50% (v/v) de la columna de hidrofobicidad. Además se realizó un estudio de la influencia del tiempo de reposo en etanol de la muestra eluída de la columna. Se determinó la influencia de la concentración de proteína y de la matriz hidrofóbica en la formación de agregados y como último se realizaron eluciones con etanol y Tween 20 como agente desagregante.

**Resultados y discusión:** Al analizarse la fracción eluída de la columna de hidrofobicidad TSK Butil 650S se observa la aparición de una fracción de alto peso molecular



correspondiente a 2 000 kDa (fig.1).

*Fig.1: Estudios en SEC-HPLC del eluato de la columna de hidrofobicidad a los 120 minutos de reposo.1: Material de referencia 2: la elusión de la columna de hidrofobicidad a los 120 min. de reposo. A: agregado M: monómero.*

Esta fracción por electroforesis y por ensayos de actividad biológica se confirmó que era Epohu-r. Por lo tanto la

fracción de agregados solubles correspondía a 59 unidades monoméricas de la Epohu-r. Al realizarse una cinética de agregación se observó que tenía un comportamiento de una ecuación de segundo orden con respecto al tiempo en etanol al 50%.

Además al estudiarse distintas cargas aplicadas a la matriz hidrofóbica se demuestra que para cargas inferiores a 0.4 mg de proteínas/ml de gel existe una independencia del tiempo de exposición en etanol al 50% con respecto a la formación de agregados, lo cual no se comporta de la misma forma para cargas superiores donde los valores de agregados llegaron a ser el 60 % de la proteína.

Cuando se comparó una muestra eluída por la columna y otra muestra con etanol al 50% pero sin procesarse por la matriz hidrofóbica se detecta que al cabo de los 120 min de reposo en etanol 50% existe un incremento de un 10 % de agregado en la muestra eluída de la columna indicándonos que la agregación se induce primeramente por la interacción con la matriz (1). Cuando se eluye con etanol 50% más 0.01% de Tween 20 existe una disminución del agregado que llega a valores de un 15 % (2).

**Conclusiones:** Se demostró que tanto la elusión con etanol al 50% como la matriz hidrofóbica influyen en la formación de agregados y que el tween 20 ejerce un efecto desagregante en el proceso.

## Bibliografía:

1. Nelu, Grinberg; Rigoberto Blanco; D. M. Yarmush; and B.L. Karger. 1989. Protein aggregation in high-performance liquid chromatography: hydrophobic interaction chromatography of  $\beta$ -lactoglobulin A. *Anal. Chem.*, 61,514-520.
2. Bam NB; Cleland JL; Maning MC; Carpenter JF; Kelley RF; Randolph TW. 1998. Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J. Pharm. Sci.*, Dec; 87(12):1554-9.