

## Control del proceso de purificación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (r-hEGF) mediante diferentes métodos analíticos

E. M. PÉREZ,<sup>1</sup> L. C. PÉREZ,<sup>1</sup> E. BOVER,<sup>1</sup> I. WONG,<sup>1</sup> A. M. CINZA,<sup>1</sup> A. MACÍAS<sup>2</sup> y C. M. MELLA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), Ministerio de Salud Pública, 29 y E, Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.

Recibido en octubre de 1989

Aprobado en enero de 1990

### RESUMEN

Se aplicaron diferentes métodos analíticos al control del proceso de purificación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (r-hEGF). El radioinmunoensayo en fase líquida con anticuerpos policlonales permitió con sensibilidad de 0,5 ng/ml cuantificar la proteína durante el proceso de producción. Se demostró la factibilidad del uso de anticuerpos monoclonales en sistemas en solución y en fase sólida para la sustitución de los anticuerpos policlonales. La separación con interacción hidrofóbica permitió la caracterización cromatográfica del r-hEGF evidenciando dos especies moleculares. Se estudió el comportamiento electroforético y se establecieron las condiciones óptimas para aplicar los sistemas electroforéticos en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) como criterio de pureza del producto final.

### ABSTRACT

Several analytical methods were applied to control the purification process of recombinant human Epidermal Growth Factor (r-hEGF). A liquid phase system of Radioimmunoassay (RIA) using polyclonal antibodies allowed us, specifically and with a sensitivity of 0.5 ng/ml, to quantify the protein during the production process. The feasibility of using monoclonal antibodies was proven in liquid and solid systems of RIA, as a substitute for polyclonal antibodies. Hydrophobic interaction high performance liquid chromatography allowed the

chromatographic characterization of r-hEGF, showing two molecular species. The r-hEGF was electrophoretically studied and characterized, thus setting the optimal conditions for the application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as a purity criterium of the final product.

### INTRODUCCION

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es un polipéptido de carácter ácido constituido por una simple cadena de 53 aminoácidos y tiene un peso molecular promedio de 6 050 dalton. Esta proteína fue aislada inicialmente de las glándulas submaxilares de ratón macho adulto (Cohen, 1962). Contiene seis residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro, los cuales confieren una estructura muy estable a la molécula (Savage *et al.*, 1972). Es un estimulante del crecimiento epidérmico y de la queratinización, así como un potente agente mitogénico, lo cual ha sido demostrado tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* en diferentes especies.

El EGF también se ha encontrado en el hombre, en fluidos corporales como la

orina, el calostro, el suero, la saliva y el líquido amniótico (Starkey y Orth, 1977). Se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de quemaduras, cicatrización y otras lesiones degenerativas de la piel (Barroso, *et al.*, 1989). Estas aplicaciones se han posibilitado con la utilización de la técnica del ADN-recombinante. Varios grupos han insertado el gen del h-EGF en vectores de expresión y lo han clonado en microorganismos transformados (Sumi *et al.*, 1985; George-Nascimento *et al.*, 1988; Brake *et al.*, 1984; Cinza *et al.*, 1989).

La detección del EGF de fuentes naturales y el control de los procesos de producción de la proteína obtenida por vía recombinante, se ha realizado mediante radioinmunoensayos, ensayos de unión a receptores e inmunoensayos enzimáticos. Se ha utilizado la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS como criterio de pureza.

En el presente trabajo se aplicaron y se optimizaron diferentes técnicas al control del proceso de producción del r-hEGF como radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales, la cromatografía de interacciones hidrofóbicas de alta resolución (IH-HPLC) y la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

## MATERIALES Y METODOS

### Factor de Crecimiento Epidérmico

El Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante fue purificado por cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular según Cinza *et al.* (1989).

### Preparación de anticuerpos

El anticuerpo policlonal anti r-hEGF en conejo se obtuvo utilizando el protocolo de inmunización de Bynny *et al.*, (1972). El anticuerpo monoclonal CB EGF 1 (Freyre *et al.*, 1988) fue suministrado por la

Agrupación de Hibridomas y Modelos Animales del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

### Radioiodación

El r-hEGF fue marcado con  $I^{125}$  (Amersham) utilizando el método de la cloramina-T (Hunter y Greenwood, 1962).

### Procedimiento del Radioinmunoensayo en fase líquida

Se utilizaron tubos de poliestireno de 2 ml LP-3 que contenían 100  $\mu$ l del anticuerpo específico policlonal (anti-EGF en conejo) o monoclonal (CB EGF1) en una dilución apropiada para obtener alrededor del 50% del conteo total, 20  $\mu$ l de los patrones de concentración 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ng/ml de rh-EGF (o de las muestras desconocidas que se desea evaluar) y 20  $\mu$ l de r-hEGF( $I^{125}$ ) diluido de forma que el conteo total sea alrededor de 100 000 cpm completado a 200  $\mu$ l con tampón RIA (37 mM de fosfato de sodio, 0,01% de azida sódica, 0,15 M de NaCl y 0,5% de seroalbúmina bovina). Se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente.

En la separación de las fracciones de EGF libre y EGF unido al anticuerpo, se utilizó la precipitación con segundo anticuerpo, añadiendo 100  $\mu$ l de una solución apropiada de este anticuerpo y 100  $\mu$ l de suero total no inmune. Se incubó 4 horas a temperatura ambiente, al término de este tiempo se detuvo el ensayo con un lavado de 1 ml de tampón fosfato frío. Se precipitó centrifugando 15 minutos a 10 000 rpm, se decantó el sobrenadante, se secaron los tubos y se efectuó el conteo de la radioactividad en un contador CLINIGAMMA (LKB).

### Procedimiento del Radioinmunoensayo en fase sólida

Se utilizaron microplacas de cloruro de polivinilo (PVC, Flow Laboratories) recubiertas con 200  $\mu$ l de una solución de CB-EGF1 de 10 mg/ml en tampón carbonato-bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,6 y se incubó 3 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se desecha el contenido y se lava una vez con una solución de Tween-20 al 0,05 % en agua.

El ensayo de competencia consiste en aplicar 100 ml de las siguientes concentraciones de una curva patrón: 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1 000 ng/ml o de las muestras de concentración desconocida apropiadamente diluidas en tampón RIA y 100  $\mu$ l de una dilución apropiada del EGF- $I^{125}$  que garantizan un conteo entre 50 000 y 100 000 cpm. Se incubó 3 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo se elimina el contenido de los pozos y se lava entre cinco y siete veces con la solución de Tween-20. Los pocillos se cortan y se colocan en viales apropiados para

el conteo de la radioactividad. El procesamiento de los resultados se realiza igual que para el RIA en fase líquida.

Ambos radioinmunoensayos requieren de los controles siguientes:

**RT:** Radioactividad total. Se cuenta la radioactividad de la dilución de EGF-1<sup>125</sup> que se aplica en el ensayo.

**Bo:** Unión total. En pocillos recubiertos se aplica solamente la solución de EGF-1<sup>125</sup>.

**NSB:** Unión no específica. Compiten por los sitios de unión del anticuerpo la solución de EGF-1<sup>125</sup> y un exceso de EGF no yodado. El valor de este control se le sustrae a todas las determinaciones.

### **Separación cromatográfica de interacciones hidrofóbicas**

Se aplicaron 200 µg del r-hEGF puro disuelto con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 M en tampón fosfato pH 7 a una columna TSK Butilo (7,5 mm x 7,5 cm, Merck). Se eluyó con un gradiente lineal de 80 minutos desde 0 hasta 100 % de etilenglicol al 20 % en tampón fosfato pH 7.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS**

Las electroforesis del r-hEGF se realizaron siguiendo los procedimientos descritos por Laemmli (1970) y Schagger y Von Jagow (1987). Este último con algunas modificaciones en el tratamiento de las muestras.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Empleo de la técnica de Radioinmunoensayo en el control de la producción del r-hEGF**

#### **RIA líquido con anticuerpos policlonales (anti r-hEGF en conejo)**

La figura 1 muestra una curva de desplazamiento, utilizando la transformación LOGIT de los datos (Ekins, 1974). El porcentaje de unión de la proteína yodada fue 55%. El coeficiente de correlación fue de 0,99898 y se alcanzó una alta sensibilidad, detectándose valores de hasta 0,5 ng/ml. Estos parámetros indicadores ofrecen una medida del funcionamiento de este sistema de RIA en

fase líquida, lo cual permite su uso en el control del proceso de purificación del r-hEGF. En la tabla 1 se presentó el control de calidad del ensayo, tomando como criterio el coeficiente de variación intra e interensayo de una muestra de concentración conocida, evaluada durante sucesivos ensayos. De forma general, el comportamiento de los coeficientes de variación para una y otra muestra están dentro de los límites establecidos (figura 1 y tabla 1).

La introducción del RIA utilizando anticuerpos policlonales permitió evaluar el proceso y obtener valores confiables de la proteína en las diferentes etapas de la purificación (tabla 2).

El radioinmunoensayo fue validado contra los diferentes tampones empleados en el proceso, contra los componentes del medio de cultivo y contra las proteínas de la cepa productora, no observándose interferencia en la cuantificación.

#### **RIA usando anticuerpos monoclonales**

Con el objetivo de lograr mayor especificidad y el uso de una fuente estable de anticuerpos, se estudió el uso del anticuerpo monoclonal CB-EGF1. Como sistema precipitante fue utilizado el método del segundo anticuerpo. Los resultados obtenidos no fueron similares a los del RIA con anticuerpos policlonales; las cantidades de anticuerpo monoclonal resultaban considerablemente altas para lograr uniones totales cercanas al 50 %; la sensibilidad del ensayo se vio afectada y el tiempo del ensayo resultaba ser el mismo, no obstante se demostró la utilización de los anticuerpos monoclonales en sistemas en solución, los cuales también han sido ensayados en sistemas de RIA en fase sólida sobre soportes de poliestireno con éxito por el Grupo de Hibridomas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Freyre et al., 1988).

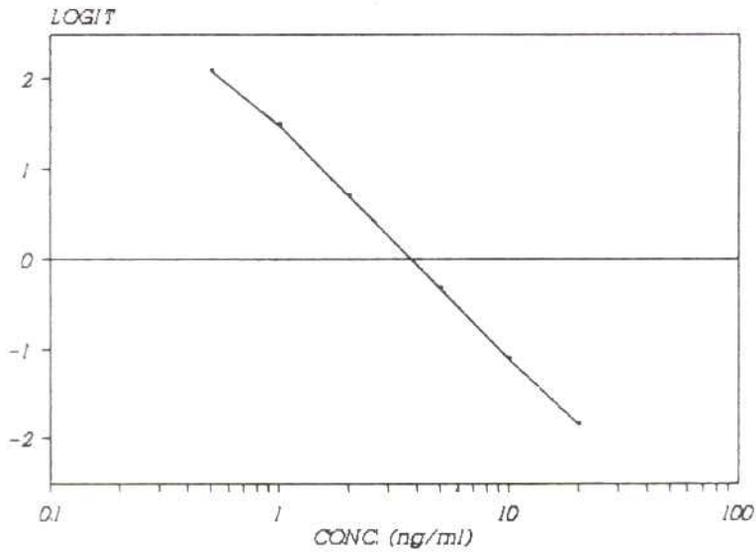


FIG. 1. Curva patrón del RIA en fase líquida con anticuerpos policlonales. El procesamiento de los datos se realizó con la transformación LOGIT.

**Tabla 1**  
PRECISION DEL RIA EVALUADA POR MEDIO DEL COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.) INTRA E INTERENSAYO

Muestra	Intraensayo (n-3)		Interensayo (n-9)	
	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)
Control	10.37	3.71	10.16	7.94

**Tabla 2**  
CONTROL DEL PROCESO DE PURIFICACION DEL r-hEGF UTILIZANDO EL RIA

Paso	Volumen ml	Actividad (RIA) mgEGF/ml	Actividad total mgEGF	Recup. (%)
Crudo	40000	0,021	840	-
Int. Cat.	4000	0,153	812	72,8
Int. Anion.	2000	0,22	440	52,3
P.F.	100	3,05	305	38,3

Este sistema en fase sólida ha sido llevado por nuestro grupo a placas de cloruro de polivinilo (PVC) para la cuantificación; los resultados han sido buenos. La sensibilidad del ensayo es menor (el límite de detección no supera 2 ng/ml), pero ha constituido un ahorro considerable de reactivos y tiempo (el tiempo del ensayo es de 6 horas y se ahorra por concepto de utilización de antisueros), asimismo la manipulación se hace más fácil.

En la figura 2 se muestra una comparación de ambos métodos en la evaluación de muestras de diferentes pasos del proceso de producción (evaluadas por el RIA en fase líquida con anticuerpos policlonales y por el RIA en fase sólida con anticuerpos monoclonales). En ninguno de los casos la variabilidad excedió un 15%. En estos momentos está establecido completamente el uso del sistema en fase sólida con anticuerpos monoclonales en el control del proceso productivo.

## Empleo de la cromatografía y la electroforesis como control de pureza del producto final

### Cromatografía de alta resolución en columna de interacciones hidrofóbicas

En la figura 3 se presenta un cromatograma correspondiente a una corrida del r-hEGF puro en una columna TSK-butilo. Los picos representan dos especies moleculares del EGF que por análisis de la estructura se ha demostrado que son el EGF (1-52) y el EGF (1-51) (picos A y B, respectivamente). Ambos picos corresponden a una sola banda en la electroforesis (figura 4). Cinza *et al.*, (1989) han reportado la aparición de estas especies y la relación entre ellas, así como la presencia de las formas oxidadas (met.-21) como dependientes del tiempo de la fermentación (figura 4)

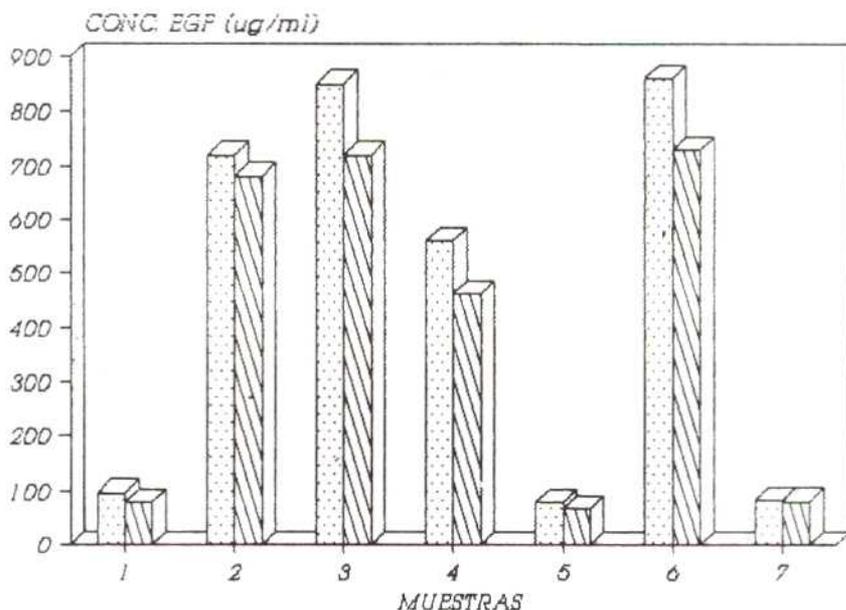


FIG. 2. Comparación de dos variantes de RIA aplicadas al control del proceso de purificación: RIA en fase líquida con anticuerpos policlonales; RIA en fase sólida con anticuerpos monoclonales. La variabilidad no excedió en ningún caso el 15%.

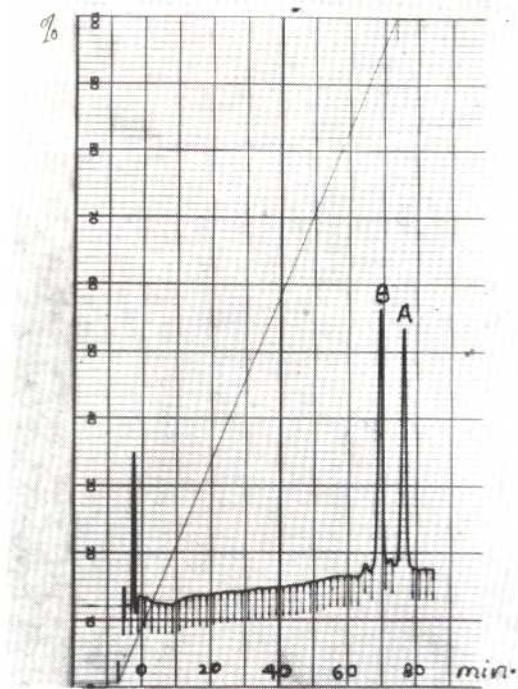


FIG. 3. Perfil cromatográfico en columna de interacción hidrofóbica TSK-butilo (HPLC).

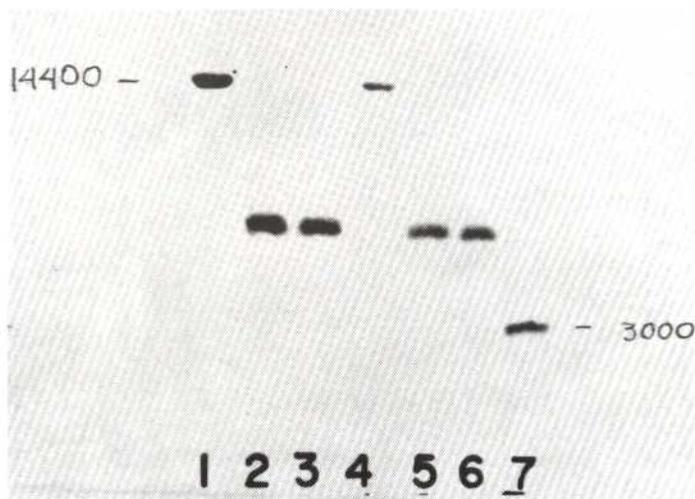


FIG. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida del r-hEGF con SDS. Las bandas 2, 3, 5 y 6 corresponden al producto final de diferentes lotes de producción de la proteína. Las bandas 1, 4 y 7 corresponden a marcadores de peso molecular.

Estas variaciones de la molécula no tienen efecto alguno sobre su actividad biológica, lo cual se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (apertura precoz del párpado en ratones recién nacidos y análisis de radiorreceptores, respectivamente). Su actividad y efectividad han sido igualmente demostradas por medio de su aplicación práctica en el tratamiento de diferentes lesiones de la piel, con magníficos resultados (Barroso *et al.*, 1989).

#### Electroforesis del r-hEGF en geles de poliacrilamida con SDS

En la electroforesis del r-hEGF se realizaron estudios preliminares utilizando modificaciones del sistema de Laemmli, que consistieron fundamentalmente en aumentar el porcentaje de acrilamida y el entrecruzamiento de los geles. En la

mayoría de los casos se obtuvieron resultados similares que no fueron satisfactorios, ya que no se lograba un buen patrón de bandas de la proteína.

Siguiendo el protocolo propuesto por Schagger, que se basa en los sistemas Laemmli, se estudió el comportamiento electroforético del r-hEGF. Este proponía utilizar 2% de mercaptoetanol en el tampón de tratamiento de las muestras y calentar durante 30 minutos a 40°C. Se obtuvo un patrón de bandas superior en relación con los ensayos anteriores. No obstante, se analizó que con motivo de la rigidez estructural del EGF, con tratamiento más drástico de las muestras para su total reducción, podría mejorarse considerablemente la aparición de la banda de la proteína. En la figura 5 se muestran las variantes ensayadas.

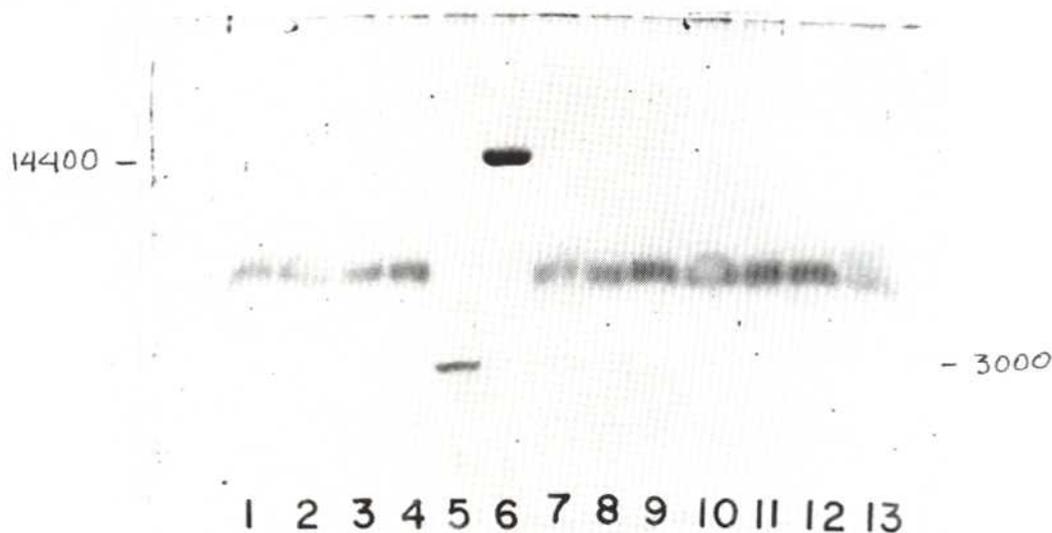


FIG. 5. Estudio de diferentes variantes de tratamiento del r-hEGF previo a su aplicación en la electroforesis. Las bandas 1, 2, 3 y 4 corresponden a 20 % de 2-mercaptoetanol en el tampón de muestra, con calentamiento durante 90, 60, 30 y 10 minutos, respectivamente. Las bandas 7, 8, 9 y 10 corresponden a 10 % de 2-mercaptoetanol, con 90, 60, 30 y 10 minutos de tratamiento, respectivamente. Las bandas 11, 12 y 13 corresponden a 2 % de 2-mercaptoetanol con tratamiento de 60, 30 y 10 minutos, respectivamente. La 5 y la 6 corresponden a marcadores de peso molecular.

Utilizando 2 y 10 % de mercaptoetanol, los resultados fueron similares, obteniéndose las mejores condiciones entre 30 y 60 minutos de tratamiento de las muestras; con tiempos mayores y menores hubo dispersión de las bandas. Utilizando 20 % de mercaptoetanol y menor tiempo fue posible obtener resultados similares. Estos resultados confirman que el EGF requiere un tratamiento particular para su aplicación en electroforesis, que consiste en condiciones más drásticas para su reducción.

Para el control electroforético de los lotes de EGF se decidió escoger condiciones intermedias. Se seleccionó 10 % de mercaptoetanol y ebullición durante 30 minutos. En la figura 4 se muestra la electroforesis correspondiente a los productos finales de varios lotes. Influyeron considerablemente en estos resultados:

- la reducción eficiente de la molécula en su tratamiento previo,
- el uso del Coomassie Blue G-50 como indicador de corrida sustituyendo al bromofenol azul, al cual pueden adelantarse algunos péptidos de bajo peso molecular,
- el empleo de la tricina como ión portador en sustitución de la glicina,
- la utilización de un gel espaciador.

Los tres últimos factores permiten, según ha reportado Schagger *et al.*, (1987) una buena resolución de proteínas de bajo peso molecular, ya que se logra una total separación de estas del exceso de SDS, evitándose la dispersión del patrón de bandas.

## CONCLUSIONES

Se aplicó al control del proceso de purificación del r-hEGF un RIA en fase

líquida utilizando anticuerpos policlonales (anti r-hEGF en conejo) con una sensibilidad de 0,5 ng/ml y coeficientes de variación intraensayo e interensayo inferiores al 5 y 10 %, respectivamente. El mismo permitió la cuantificación específica y la evaluación de la eficiencia del proceso.

Se ensayó el anticuerpo monoclonal CB-EGF1 en el sistema de RIA en solución y en fase sólida, resultando factible su uso con vistas a la sustitución de los anticuerpos policlonales en el control del proceso, lo que proporcionaría la utilización de una fuente estable y reproducible de anticuerpos.

En la caracterización de la pureza de los productos finales se siguieron dos criterios fundamentales: la cromatografía de HPLC de interacción hidrofóbica y la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. La cromatografía demostró la presencia de dos especies moleculares de r-hEGF biológicamente activas que en la electroforesis representan una sola banda.

Se evidenció la necesidad de modificar las condiciones del r-hEGF para su visualización electroforética, que consistieron fundamentalmente en un tratamiento más drástico de reducción de la molécula utilizando un mayor porcentaje de 2-mercaptoetanol (10%), temperatura más alta (100°C) y tiempo de tratamiento más prolongado (30 minutos).

## REFERENCIAS

- BARROSO, M.C.; J.ALERT; S.SALSINA; C. DÍAZ; R. FONSECA; J.LOMBARDERO y R.PEREZ (1989). *Factor de Crecimiento Epidérmico en úlceras cutáneas por radioterapia y quimioterapia*. Poster presentado en el III Seminario Cubano e Internacional sobre Interferón y Biotecnología, II Seminario Cubano e Internacional sobre Biotecnología, I Congreso Iberoamericano de Biotecnología, 17 al 22 de abril, 1989. Palacio de las Convenciones, La Habana.

- BRAKE, J. ANTHONY; J. P. MERRYWEATHER; D. G. COIT; U. A. HEBERLEIN; F. R. MASIARZ; G. T. MULLENBACH; M. S. URDEA; P. VALENZUELA y P. J. BARR (1984).  *$\alpha$ -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**: 4642-4646.
- BYNNY, R. L.; D. N. ORTH y S. COHEN (1972). *Radioimmunoassay of Epidermal Growth Factor*. Endo **90**: 1261-1266.
- CINZA, A. M.; M. QUINTANA; J. LOMBARDEO; R. POUTOU; E. PÉREZ; L. C. PÉREZ; C. M. MELLA; V. BESADA; G. PADRÓN; L. CASTELLANOS y J. GRILLO (1989). *Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción de Factor de Crecimiento Epidérmico. Caracterización del producto*. Interferón y Biotecnología (enviado para publicar).
- COHEN, S. (1962). *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animals*. J. of Biol. Chem. **237**: 1555-1562.
- EKINS, R. P. (1974). *Basic Principles an Theory*. Br. Med. Bull. **30**: 3-10.
- FREYRE, M.; J. VAZQUEZ; C. DUARTE; E. FERRA; I. LOPEZ; N. ARTEAGA; A. ALFARO y J. GAVILONDO (1988). *Anticuerpos monoclonales que reconocen a los Factores de Crecimiento humano y murino*. Interferón y Biotecnología, **6**(1):32-43.
- GEORGE-NASCIMENTO, C.; A. GYENS; S. M. HALLORAN; J. MERRYWEATHER; P. VALENZUELA; K. S. STEIMER; F. R. MASIARZ y A. RANDOLPH (1988). *Characterization of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Produced in Yeast*. Biochemistry **27**: 797-802.
- HUNTER, W. M. y F. C. GREENWOOD (1962). *Preparation of Iodine-<sup>131</sup> label Human Growth Hormon of high specific activity*. Nature **194**: 495-496.
- LAEMMLI, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680-688.
- SAVAGE, C. R.; T. INAGAMI y S. COHEN (1972). *The primary structure of Epidermal Growth Factor*. J. Biol. Chem. **247**: 7612- 7621.
- SCHÄGGER, H. y G. VON JAGOW (1987). *Tricine-Sodium Dodecil Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. **166**: 368-378.
- STARKEY, R. H. y D. N. ORTH (1977). *Radioimmunoassay of human Epidermal Growth Factor (Urogastrone)*. J. Cell Endocrinol. and Metabol **45**: 1144-1153.
- SUMI, S. I.; A. ASEGAWA; S. YAGI; K. I. MIYOSHI; A. KANESAWA; S. NAKAGAWA y M. SUZUKI (1985). *Overproduction of human Epidermal Growth Factor / Urogastrone in Escherichia coli and demonstration of its full biological Activities*. J. Biotechnol. **2**: 59-74.