

Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano en levaduras. Caracterización del producto

A. M. CINZA,¹ M. QUINTANA,¹ J. LOMBARDEO,² R. POUTOU,¹ E. PÉREZ,¹ L. C. PÉREZ,¹ C. M. MELLA,¹ V. BESADA,¹ G. PADRÓN,¹ L. CASTELLANOS,¹ R. ESTRADA¹ y J. MORALES-GRILLO¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

² Instituto de Oncología y Radiología, 29 y F, Vedado, La Habana, Cuba

Recibido en noviembre de 1989

Aprobado en febrero de 1991

RESUMEN

Se describe un proceso discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF-h) en *Saccharomyces cerevisiae*, con el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAP) y el sistema de secreción del factor *alfa*. La proteína se excreta al medio de cultivo lo que facilita la purificación. Utilizando separaciones cromatográficas de intercambio iónico y exclusión molecular se obtuvo un producto de pureza superior al 95% según los análisis en cromatografía de fase inversa y electroforesis en geles de SDS poliacrilamida. El proceso mostró un rendimiento del 36%. Se demostró que el producto obtenido fue biológicamente activo.

SUMMARY

A procedure for the production of Human Epidermal Growth Factor (r-hEGF) in *Saccharomyces cerevisiae* is described. The protein secretion was achieved by *alpha* factor mating type signal peptide under the control of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP) promoter. By the use of ion exchange and size exclusion chromatography, we obtained a product with a purity higher than 95%, according to reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) and electrophoresis of SDS gel polyacrylamide. The yield of the process was 36%. The biological activity of the final product was demonstrated.

INTRODUCCION

La tecnología del ADN recombinante ha posibilitado la obtención de numerosas proteínas de interés para el hombre mediante procesos fermentativos y de purificación empleando como organismos hospederos a bacterias, levaduras e inclusive células de mamíferos.

Las levaduras ofrecen ventajas para la producción de proteínas recombinantes de utilidad médica, pues no son organismos patógenos al hombre, no producen endotoxinas y existe una experiencia fermentativa industrial que data de muchos años (Carty *et al.*, 1987). Una ventaja adicional del sistema de expresión en levaduras es la capacidad de excretar la proteína madura al medio de cultivo, lo que facilita considerablemente su purificación.

El factor de crecimiento epidérmico murino (EGF-m) fue aislado originalmente de glándulas submaxilares de ratón macho adulto (Cohen, 1962). La proteína humana (EGF-h) aislada posteriormente de la orina (Cohen y Carpenter, 1975), es un polipéptido de 53 aminoácidos con efectos estimulantes

del crecimiento y de la diferenciación de numerosos tipos celulares en cultivo y algunos tejidos *in vivo* (Carpenter y Cohen, 1979).

La posibilidad de obtención del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF-h) en las cantidades necesarias para desarrollar sus aplicaciones *in vitro* e *in vivo* y alcanzar el posible uso clínico de esta proteína, es únicamente realizable mediante las técnicas de ingeniería genética pues su contenido en los líquidos biológicos es ínfimo.

El factor de crecimiento epidérmico se ha obtenido en levaduras utilizando el sistema de expresión y secreción del factor *alfa* con niveles entre 5 y 10 mg/l (Brake *et al.*, 1984). En bacterias se ha obtenido en forma de proteína híbrida (β -Galactosidasa-EGF) con niveles del 10% de la proteína total (Sumi *et al.*, 1985).

El presente trabajo describe un proceso discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF-h) en *Saccharomyces cerevisiae*, así como la caracterización fisicoquímica y bioquímica de esta proteína.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

Se utilizaron las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

- Pep 4-3 (*alfa*, Pep 4-3, SpRb1, 11-22 Leu 2, Ura 3, trp1)
- SRJY (*alfa*, Leu 2-3, -112, Ura 3-22, His 4-519)
- YBS-24 (*alfa*, Leu 2, ura 3, His 4, Pep 4-3, 2 μ)

Plasmidio

Se utilizó el plasmidio pIG39, donde el gen que codifica para la producción del EGF-h se encuentra bajo el control del promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAP). Contiene, además, el péptido señal del factor *alfa* responsable de la secreción y el gen que codifica para el uracilo 3, que posibilita la forma de selección de las células transformadas en el medio de cultivo.

Condiciones de crecimiento en zaranda

Los cultivos se realizaron en erlenmeyers a 30°C, en una zaranda a 240 rpm. El medio de crecimiento fue GO (Galzy y Slonimski, 1957) suplementado con hidrolizado de caseína al 1% (selectivo).

El medio rico (no selectivo) se logró con la adición de extracto de levadura. Se tomaron muestras a las 24 y 48 horas de crecimiento, determinándose el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF-hr) en el sobrenadante del cultivo mediante la técnica de análisis radiométrico basado en receptores.

Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un equipo Marubishi-MSJ-50, de 50 l de volumen efectivo, a 30°C y durante 34 horas. El pH del medio fue mantenido en 5,5 por adición de NaOH 20%. Se utilizó un electrodo de oxígeno para medir la tensión de oxígeno disuelto en el medio, controlándose mediante cambios en la velocidad de flujo de aire desde 0,5 hasta 2 VVM y velocidad de agitación desde 200 hasta 800 rpm. En el medio rico se utilizó sacarosa como fuente de carbono en lugar de glucosa.

Al final del proceso de fermentación, el cultivo fue centrifugado a 7 000 rpm y 4°C durante 20 min, obteniéndose el sobrenadante donde se encuentra el EGF-hr.

Purificación del EGF-hr

El EGF-hr se unió a un intercambiador catiónico (CM-Sephadex C-25) equilibrado con tampón de acetato de amonio mediante un procedimiento en lote.

El gel fue separado por decantación y se le aplicó un gradiente discontinuo de fuerza iónica desde 0,04 M hasta 2 M de acetato de amonio pH 3,5 para eliminar contaminantes, eluyéndose finalmente el EGF-hr con un cambio de pH.

El material obtenido se aplicó a continuación a una columna de intercambiador aniónico (DEAE Sephadex A-25), equilibrado con acetato de amonio, a un flujo de muestra igual a 1,5 ml/min. El EGF-hr fue eluido mediante dos gradientes exponenciales sucesivos de 0,1 a 0,3 M y de 0,3 a 0,5 M de acetato de amonio.

El producto obtenido se concentró mediante ultrafiltración empleando una membrana con porosidad de 2 000 dalton. Finalmente el producto fue purificado en cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-50 equilibrado con ácido acético 1 M.

La fracción mayoritaria conteniendo el EGF-hr, fue concentrada para su envase y liofilización en frascos con 2 mg de proteína.

Métodos analíticos

Las determinaciones de proteínas fueron realizadas mediante la técnica de Lowry (Lowry et al., 1951). La determinación de azúcares totales solubles se realizó mediante la técnica de Dubois et al. (1956) y los azúcares reductores totales mediante la técnica del ácido 3-5 dinitrosalicílico (Miller, 1950).

Radioinmunoanálisis (RIA)

El método analítico utilizado para el control del proceso de producción fue el radioinmunoanálisis. Tanto el patrón de EGF-hr como el producto marcado y el procedimiento de ensayo fueron utilizados como se reportó previamente (Pérez et al., 1990). El cálculo de los resultados se realizó mediante la transformación logit de los datos (Ekins, 1974).

Análisis radiométrico basado en receptores (RRA)

La concentración de EGF-hr fue determinada mediante análisis de unión competitiva a receptores en células de tumor ascítico de Ehrlich según se ha reportado (Macías et al., 1985).

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

La electroforesis del EGF-hr se realizó mediante los procedimientos descritos por Schaeffer y Jagow (1987), modificándose el tratamiento de las muestras con mercaptoetanol al 10%, calentándose a 100°C durante 30 minutos.

Análisis de aminoácidos del EGF-hr purificado

Las muestras obtenidas en las separaciones en cromatografía de fase inversa se liofilizaron y se hidrolizaron en ácido clorhídrico 6 N conteniendo 0,1% de fenol y 0,1% de 2-mercaptoetanol en ampollas selladas al vacío durante 24 horas a 110°C. El análisis se realizó en un equipo AminoSys (Farmacia, Suecia).

Secuencia aminoacídica

Las fracciones procedentes de separaciones preparativas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) fueron reducidas y carboximetiladas, purificándose de nuevo y realizándose la secuencia en

un equipo Applied biosystems 470 A (USA), identificándose los 23 primeros residuos a partir de la región N-terminal. Además cada fracción fue sometida a hidrólisis ácida parcial con ácido acético al 1% durante 30 horas a 110°C, obteniéndose los péptidos procedentes de la ruptura en el ácido aspártico. Cada uno fue purificado y secuenciado.

Análisis cromatográfico y verificación mediante espectrometría de masa

El EGF-hr obtenido en levaduras, una vez purificado por gel filtración es recromatografiado por cromatografía de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC). Se empleó una columna RP-C4 (Baker) con un gradiente lineal de 10% a 60% de Acetonitrilo (solvente B) en agua (solvente A) ambos conteniendo 0,05% de ácido trifluoro acético, a un flujo de 0,9 ml/min y 32°C de temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (YBS-24, PEP 4-3, SRJY) auxotróficas para el uracilo, las cuales fueron transformadas con el plasmidio de expresión que contiene el gen que codifica para el EGF-h.

Los valores más altos se obtuvieron con la cepa YBS-24 en medio rico (no selectivo), en zaranda a las 48 horas de crecimiento.

En la figura 1 se muestra el crecimiento de la levadura y la producción del EGF-hr en el fermentador, utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

El EGF-hr se obtuvo desde las primeras horas en el sobrenadante del cultivo y aumentó en proporción al crecimiento, alcanzándose niveles superiores a 12 mg/l en 20 horas. Al mismo tiempo se inició el consumo de la sacarosa y la formación de azúcares reductores en el medio como resultado de la hidrólisis del azúcar. A medida que aumentó el número de células en el cultivo, el consumo de ambos

Tabla 1
INFLUENCIA DE LA CEPA HOSPEDERO Y EL MEDIO DE CULTIVO EN LOS NIVELES DE EGF-hr
EN ZARANDA

| CEPAS + pIG39 | Medios | mg/l EGF | |
|---------------|--------|----------|----------|
| | | 24 horas | 48 horas |
| YBS-24 | M.S. | 1,40 | 4,70 |
| | M.R. | 2,90 | 5,90 |
| pep 4-3 | M.S. | 0,06 | 0,16 |
| | M.R. | 2,30 | 3,10 |
| SJRY | M.S. | 0,15 | 0,79 |
| | M.R. | 0,65 | 1,40 |

M.S.: medio selectivo

M.R.: medio rico, no selectivo

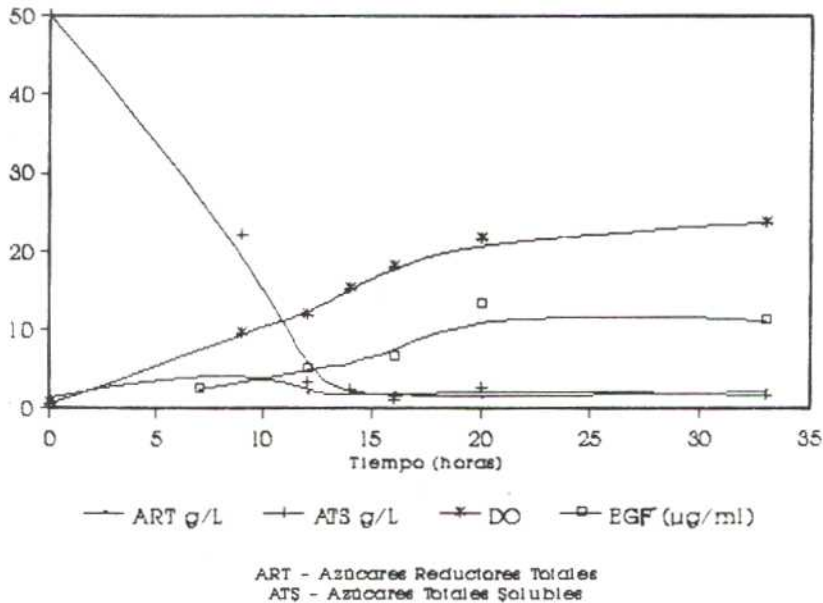


FIG. 1. Relación entre el crecimiento y la producción del EGF-hr en *Saccharomyces cerevisiae*

azúcares fue mayor, agotándose sobre las 12 horas de crecimiento. El tiempo de duplicación fue de 2,1 h y la velocidad específica de crecimiento resultó de $0,33 \text{ h}^{-1}$ durante la utilización de la fuente de carbono. Resultados similares han sido obtenidos por Copella y Dhurjati (1989) y

Zsebo *et al.* (1986), estudiando la cinética de expresión de proteínas recombinantes en levaduras.

En la figura 2 se muestra un diagrama de los pasos principales en la obtención del EGF-hr. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El rendimiento del proceso de purificación se analizó utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). El RIA resultó un método específico y sensible que permitió evaluar el proceso y obtener resultados confiables.

Sistemas de purificación similares a los nuestros han sido utilizados para la obtención de EGF-h (Tsukumo *et al.*, 1987) y murino (Savage y Cohen, 1972).

El método electroforético utilizado condujo a una reducción eficiente de



FIG. 2. Esquema del proceso de producción del EGF-hr.

El proceso general de purificación desde el sobrenadante crudo al producto final mostró un recobrado total de 36% (tabla 2).

la molécula, además de condiciones de corrida similares a las reportadas por Schaeffer y Jagow, 1987, obteniéndose bandas claramente definidas para el EGF-hr

Tabla 2
ANALISIS DEL PROCESO DE PURIFICACION DEL EGF-hr

| Paso | Volumen (ml) | Activ.(RIA) (mgEGF/ml) | Activ.Total (mgEGF) | Recup. (%) |
|-----------------------|--------------|------------------------|---------------------|------------|
| Crudo | 40 000 | 0,021 | 840 | --- |
| Intercambio catiónico | 4 000 | 0,153 | 612 | 12,8 |
| Intercambio aniónico | 2 000 | 0,220 | 440 | 52,3 |
| Filtración sobre gel | 100 | 3,050 | 305 | 36,3 |

(figura 3). La pureza del producto final se evaluó considerando la existencia de una sola banda de movilidad intermedia entre lisozima (carriles 1 y 4) y cadena b de la insulina (carril 7).

La recromatografía del producto final en RP-HPLC mostró dos constituyentes principales, biológicamente activos que se nombraron EGF-1 y EGF-2 en orden consecutivo de elución (figura 4).



FIG. 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS a diferentes lotes del producto final. 1 y 4) lisozima; 2, 3, 5, 6) lotes finales de producción; 7) insulina cadena B.

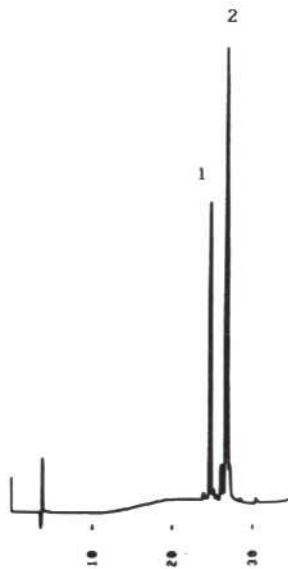


FIG. 4. Análisis en HPLC-RP del purificado final.

Cada fracción aislada fue recolectada y verificada su secuencia mediante espectrometría de masa y secuenciación automática de proteínas. Ambas especies corresponden con la estructura del EGF-h, presentando los tres puentes de disulfuro. En el caso del EGF-2 se encontró una deleción de arginina en el extremo C-terminal, mientras que el EGF-1 correspondió con la molécula humana con deleción de dos aminoácidos en el extremo C-terminal (Leu-Arg). Las proporciones de ambas fracciones pueden variar en dependencia de las condiciones de crecimiento y la presencia de inhibidores de proteasas (datos no publicados).

La composición de aminoácidos de los dos componentes mayoritarios encontrados en la preparación de EGF han sido publicados detalladamente por Castellanos y Estrada (1991). Ambos componentes son semejantes entre sí y prácticamente coinciden con los datos esperados para el EGF humano excepto el contenido de arginina que es inferior en un residuo al valor esperado para EGF-2 y el contenido de leucina y arginina inferiores en el residuo para EGF-1.

La presencia de carboxipeptidasas durante la producción y excreción del EGF-hr por células de levadura ha sido reportada por George-Nascimento *et al.* (1988), encontrando modificaciones de esta molécula por el extremo C-terminal.

Todos los lotes de producción se analizaron mediante cuantificación por la técnica de receptores. Aunque esta técnica es menos sensible que el RIA, ofrece la ventaja de medir una propiedad directamente relacionada con la actividad biológica. Como método de comparación de la actividad biológica del EGF se llevó a cabo la prueba clásica de apertura precoz

del párpado en ratón recién nacido (Cohen, 1962), aplicándosele inyecciones subcutáneas a una dosis de 1 μ g de EGF/g de peso. Se utilizó como control positivo EGFm. A los 9 días se obtuvo el efecto esperado en los animales donde se aplicó el producto así como en el control positivo, registrándose este efecto a los 13 días en aquellos animales a los cuales se les aplicó un placebo.

Diferentes autores han realizado estudios con este producto: el efecto cicatrizante en úlceras producidas por radiaciones ionizantes o por extravasación de citostáticos (Barroso *et al.*, 1989); acción radioprotectora local en la radioterapia empleada en las neoplasias malignas (Alert *et al.*, 1989).

Por último, los resultados obtenidos por Mainardi *et al.* (1989), sobre la inhibición del crecimiento de carcinomas epidermoides humanos en ratones atómicos, amplían las perspectivas de aplicación de esta molécula.

REFERENCIAS

- ALERT, J.; J. RODRIGUEZ; J. LOMBARDERO y R. PEREZ (1989). Acción radioprotectora local del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante: reporte preliminar. *Interferón y Biotecnología* 6:62-66.
- BARROSO, M. del C.; R. FONSECA; J. ALERT; S. ALSINA; E. VAZQUEZ; J. LOMBARDERO y R. PEREZ (1989). Efecto del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante sobre úlceras cutáneas: reporte preliminar. *Interferón y Biotecnología* 6:57-61.
- BRAKE, A. J.; J. P. MERRYWEATHER; D. G. COIT; U. A. HEBERLEIN; F. R. MASLARZ; G. T. MULLENBACH; M. S. USDEA; P. VALENZUELA y P. J. BARR (1984). Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4642-4646.
- CARPENTER, G. y S. COHEN (1979). Epidermal Growth Factor. *Ann. Rev. Biochem.* 48:193-216.

- CARTY, C. E.; F. X. KOVACH; W. J. Mc ALLEN y R. Z. MAIGETTER (1987). Fermentation of recombinant yeast producing Hepatitis B surface antigen. *J. Ind. Microbiol.* 2:117-121.
- CASTELLANOS, L. y R. ESTRADA (1991). Characterization of the primary structure of recombinant epidermal growth factor. *Biotechnología Aplicada* 8: 174-181.
- COHEN, S. y G. CARPENTER (1975). Human Epidermal Growth Factor. Isolation and Chemical and Biological Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1317-1321.
- COHEN, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237:1555-1562.
- COPPELLA, S. J y P. DHURJATI (1989). Alpha Factor Directed expression of the Human Epidermal Growth Factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. and Bioeng.* 33:976-983.
- DUBOIS, M.; Y. A. GELLES; G. HAMILTON; A. Y. ROBERTS y F. SMITH (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 58:350-353.
- EKINS, R. P. (1974). Principles and Theory. *Br. Med. Bull.* 30:3-10.
- GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). Variation physiologique de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Comptes. Rend. Acad. du Sci. (Paris)*, 245:2423.
- GEORGE-NASCIMENTO, C.; A. GYENES; S. M. HALLORAN; J. MERRYWEATHER; P. VALENZUELA; K. S. STEINER; F. R. MAISIARZ y A. RANDOLPH (1988). Characterization of Recombinant Human Epidermal Growth Factor produced in yeast. *Biochemistry* 27:797-802.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-267.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985). Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico II. Desarrollo de un radio receptor análisis para la determinación de cantidades picomolares. *Interferón y Biotecnología* 2:115-127.
- MILLER, G. L. (1950). Use of dinitrosalicilic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- MAINARDI, J. V.; J. LOMBARDERO; J. L. BELLO y R. PEREZ (1989). El factor de crecimiento epidérmico inhibe el crecimiento de carcinomas epidermoides humanos en ratones atímicos. *Interferón y Biotecnología* 6:132-142.
- PEREZ, E. M.; L. C. PEREZ; E. BOVER; T. WONG; A. M. CINZA; A. MACIAS y C. M. MELLA (1990). Control del proceso de purificación del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (r-hEGF) mediante diferentes métodos analíticos. *Biotechnología Aplicada* 7:188-196.
- SAVAGE, C. R. y S. COHEN (1972). Epidermal Growth Factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.* 247:7609-7611.
- SCHAEGER, H. y G. V. JAGOW (1987). Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDA. *Anal. Biochem.*, 166:368-379.
- SUMI, S. I.; A. HASEGAWA; S. YAGA; K. MIYOSHI; A. KANEZAWA; S. NAKAGAWA y M. SUZUKI (1985). Overproduction of Human Epidermal Growth Factor/Urogastrone in *Escherichia coli* and demonstration of its full biological activities. *Journal of Biotechnology* 2:59-74.
- TSUKUMO, K.; H. NAKAMURA y S. SAKAMOTO (1987). Purification and Characterization of high molecular weight Human Epidermal Growth Factor from human urine. *Biochem. Biophys Res Comm.* 145:126-133.
- ZSEBO, K. M.; H. S. Lu; J. C. FIESCHKO; L. GOLDSTEIN; J. DAVIS; K. DULCER; S. V. SNUGGS; P. H. LAI y G. A. BITTER (1986). Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the pre-pro alpha factor leader region. *J. Biol. Chem.* 261:5858-5865.