

OBTENCION A ESCALA PILOTO DE INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE EXPRESADO EN *Escherichia coli*.

María A. Tuñón, Caridad Rodríguez, Carmen Chuay, Marinieves Montero, Armando Alvarez, Marisel Quintana, Alejandro Silva, Luis Herrera.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba.

Recibido en marzo de 1993. Aprobado en septiembre de 1993

Key words: *Escherichia coli*, PL promotor, human recombinant interferon alpha 2b.

SUMMARY

Human recombinant interferon alpha 2b (hu-rec IFN α 2b) is being produced in Cuba for some years. In this work a construction where the codifying gene for hu-rec IFN α 2b synthesis is controlled by fago lambda PL promoter. The expression level was found to be highly dependent upon the host strain at incubator shaker level. The highest levels of protein were obtained using 0.4% glucose, 2% glycerol, 1% yeast extract and the induction was made when the optical density was 2. These results were scaled up to 50 and 200 l. The molecule identity was demonstrated through the Western blot technique using a monoclonal antibody.

RESUMEN

Desde hace varios años se produce en Cuba el Interferón alfa 2b humano recombinante (IFN α 2b hu-rec). En este trabajo se emplea una construcción donde el gen que codifica para la síntesis del IFN α 2b hu-rec se encuentra bajo el control del promotor PL del fago lambda. Se realizó la selección de la cepa hospedera a nivel de zaranda observándose una gran dependencia de la misma con respecto a la producción del IFN α 2b hu-rec. Los mayores niveles de la proteína se obtuvieron utilizando glucosa 0.4%, glicerol 2%, extracto de levadura 1% y realizando la inducción cuando el cultivo presenta densidad óptica de 2. Estos resultados se escalaron a niveles de 50 y 200 l. La identidad de la molécula se demostró mediante la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal.

INTRODUCCION

El clonaje del interferón alfa-2 humano en *Escherichia coli* fue reportado por primera vez por Nagata *et al.*, (1980). A partir de este resultado se dieron las condiciones para producir grandes cantidades de interferón utilizando la técnica del ADN recombinante.

Los interferones humanos han sido clonados y producidos en nuestro Centro en distintos hospederos y bajo diferentes promotores, por ejemplo teniendo como hospedero bacterias, con los promotores PR (Silva *et al.*, 1988), Ptrip (Quiñones *et al.*, 1988 y Silva *et al.*, 1991) y utilizando como hospedero levaduras: Pérez *et al.*, 1990 y De La Fuente *et al.*, 1988.

En este trabajo se estudió cómo influyen las condiciones de crecimiento y el sistema de inducción en la expresión del IFN α 2b hu-rec bajo el promotor PL del fago lambda en *E.coli* y su efecto a mayores niveles de fermentación. La proteína se obtiene en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas

Las células de *E. coli* K-12 utilizadas como hospedero fueron: W 3110 F.(Hill y Harnish, 1982).

JA 221 (*hfr*, *TripE5*, *leuB6*, *lacY*, *recA*⁻, *thi*⁻, *hsdM*⁺, *hsdR*⁻).

N 5656 [*his*⁻, *leu*⁻, *gal*⁻, *lac2*, *Tn10* (cI 857 Bam N7 N33 HI)].

Plasmidio

Las células fueron transformadas con el plasmidio PL474, vector derivativo de pUC 19, construido en nuestro centro que contiene el promotor PL de fago lambda bajo el cual se clonó el gen del IFN α 2b. Se utilizó como marcador la resistencia a la ampicilina.

Condiciones de cultivo

Las células de inóculo se crecieron en tubos con 5 ml de medio Luria broth, LB (Maniatis *et al.*, 1982) suplementado con ampicilina (50 μ g/ml). El cultivo se mantuvo durante 12 horas a una temperatura de 30°C y 250 rpm de agitación utilizando una zaranda modelo G-25 (New Brunswick Scientific Co. Inc, E.U.). Para realizar los experimentos de selección de la cepa hospedera, las células del inóculo crecidas en LB se pasaron a un medio mínimo M9 (Miller, 1972) enriquecido con hidrolizado ácido de caseína (Oxoid, Inglaterra) al 2%, 0.4% de glucosa y 100 μ g/ml de ampicilina. El cultivo en zaranda se realizó en erlenmeyers manteniendo una relación de volumen de 1/5 (volumen de cultivo/volumen total), agitación 240 rpm. Cuando la DO del cultivo alcanzó el valor de 0.6, la inducción se realizó por cambio de temperatura de 30 a 42°C por conducción, sumergiendo los enlarmeyers en un baño termostataado. Los cultivos se mantuvieron 6 horas a 42°C.

Para determinar las variables significativas del proceso de fermentación utilizando medio M9 suplementado con hidrolizado ácido de caseína 2% y 50 μ g/ml de ampicilina, se llevó a cabo una matriz experimental D para un diseño factorial 2³ donde las variables estudiadas fueron, X₁: DO de inducción

del cultivo (0.6 y 2 DO), X₂: fuente de carbono (glucosa 0.4% y glucosa 0.4%-glicerol 2%) y X₃: en presencia o en ausencia de extracto de levadura 1%. El cultivo se mantiene 6 h luego de la inducción.

Los experimentos fueron llevados a cabo en fermentadores de 7.5 l (B.E. Marubishi LTD, Japón) con 5 l de volumen efectivo, siendo las condiciones generales: 1 vvm de aereación, 500 rpm, inducción por cambio de temperatura de 30 a 42°C. En todos los casos la DO inicial del cultivo fue 0.1 (A530 nm).

Utilizando las condiciones de crecimiento definidas el escalado del proceso fermentativo se realizó a nivel de 50 l de cultivo utilizando fermentadores de 75 l (Marubishi LTD, Japón) siendo las condiciones establecidas: agitación 150 rpm, 0.4 vvm de aereación y pH 7±0.1 (controlado con NaOH y H₃PO₄ preparados al 40%).

El cultivo se mantuvo por 6 horas luego de realizar la inducción (DO = 2) por cambio de temperatura de 30 a 42°C.

A nivel de 200 l de fermentación se utilizaron 200 rpm de agitación y 0.4 vvm de aereación manteniendo las condiciones de inducción y fermentación anteriores.

En todos los procesos fermentativos se controló el comportamiento de los diferentes parámetros a través del sistema FERMACS (Gómez *et al.*, 1990).

Técnicas analíticas

El crecimiento celular se determinó utilizando un fotocolorímetro (Erma Optical Work, LTD, Japón) a 530 nm y expresado en unidades de densidad óptica. La determinación de proteínas se realizó según Lowry *et al.*, (1951) y la electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

La identidad de la molécula fue demostrada mediante western blot realizado según Burnette (1981) y utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFNα_{2b}, obtenidos según Duarte *et al.* (1987).

La actividad biológica del IFNα_{2b} hu-rec fue determinada a través de la técnica de inhibición del efecto citopatogénico del virus Mengo en células Hep-2 de tumor laríngeo humano, comparándose con un estándar internacional de interferón alfa (Barcelona, 1983). El IFNα_{2b} hu-rec presente en la biomasa fue extraído en 1% SDS a 90°C durante 2 minutos. Para determinar la presencia del IFNα_{2b} hu-rec soluble, la biomasa se concentró 5 veces, se resuspendió en una solución TRIS-HCl 50 mM pH 8 y cloruro de sodio 30 mM. La ruptura celular se realizó mediante ultrasonido (Brawn) a una concentración celular de 200 g/l utilizando 2 ciclos de ruptura de 2 minutos cada uno. La cuantificación del IFNα_{2b} hu-rec se efectuó mediante un método de ELISA según Pérez *et al.* 1991.

Los datos expresados son el resultado de 2 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de la cepa hospedera

Las cepas transformadas con el plasmidio PL474 y utilizadas para la síntesis de IFNα_{2b} hu-rec fueron cultivadas según se describe en materiales y métodos.

En la Tabla 1 se observa la influencia de las diferentes cepas en la expresión de IFNα_{2b} hu-rec a diferentes horas de cultivo luego de la inducción (6 y 12 h).

Tabla 1
Selección de la cepa hospedera.

Cepas	µg IFN/mg proteína	
	6 horas	12 horas
JA 221	9.6	5.21
W 3110	14.1	0.88
N 5656	6.46	0.77

Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar la cepa W-3110, utilizando como tiempo de inducción 6 h, lo cual es debido fundamentalmente a una mayor actividad específica obtenida en el cultivo, por lo que se demuestra que este parámetro depende en gran medida del hospedero utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Narciandi *et al.*, 1992).

A las 12 h comparadas con las 6 h de inducción, se observa una disminución de la actividad específica obtenida independientemente de la cepa hospedera, lo cual es debido a que la proteína es degradada por la acción de las proteasas (resultados no mostrados).

Influencia de las condiciones de cultivo en la obtención de IFNα_{2b} hu-rec.

Los resultados del diseño factorial efectuado se observan en la tabla 2. Luego de su procesamiento estadístico, se obtuvo la ecuación de regresión polinomial siguiente:

$$Y = 31.9 + 4.41 x_1 + 3.752 x_2 + 3.58 x_3 + 7.75 x_1 x_2 + 4.91 x_2 x_3 - 6.58 x_1 x_2 x_3$$

donde Y es la cantidad de IFNα_{2b} (en microgramos) por miligramos de proteína total.

Tabla 2.
Diseño experimental 2³ para los procesos de fermentación.

Corrida	D.I.	F.C.	F.N.	Y1	Y2
1	0.6	Glucosa 0.4%	No E.L.	15	16
2	2	Glucosa 0.4%	No E.L.	20	22
3	0.6	Glucosa 0.4% Glicerol 2%	No E.L.	18	21
4	2	Glucosa 0.4% Glicerol 2%	No E.L.	25	28
5	0.6	Glucosa 0.4%	Si E.L.	20	24
6	2	Glucosa 0.4%	Si E.L.	27	25
7	0.6	Glucosa 0.4% Glicerol 2%	Si E.L.	26	26
8	2	Glucosa 0.4% Glicerol 2%	Si E.L.	30	34

Leyenda

D.I. Densidad Optica de inducción. F.C. Fuente de carbono. F.N. Fuente de nitrógeno. E.L. Extracto de levadura. Y1. Y2. Actividad específica (µg IFN/mg proteína)

El término X1X3 no es estadísticamente significativo.

Acorde a estos resultados experimentales, se llegó a la conclusión de que el medio a utilizar consistía en sales M9 suplementado con hidrolizado ácido de caseína 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 0.4%-glicerol 2%, realizándose la inducción cuando el cultivo alcance una densidad óptica de 2 y manteniéndolo 6 horas luego de la inducción.

Se observa que es conveniente realizar la inducción a una DO=2, ya que en estas condiciones el proceso de inducción es realizado durante la fase logarítmica de crecimiento y disminuye el efecto neto del cambio brusco de temperatura sobre el crecimiento celular.

El efecto positivo de la utilización de extracto de levadura en el cultivo coincide con lo reportado por Xiaoli *et al.* (1990), donde se plantea que dentro de una acción compleja, el extracto de levadura puede afectar los procesos regulatorios concernientes con la iniciación de la transcripción y la traducción y también con la síntesis de ciertas proteínas. Además Nancib *et al.* (1991) comprobaron que la completa utilización del acetato obtenido como subproducto en el proceso fermentativo, requiere la presencia de factores contenidos en el extracto de levadura.

Cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono se obtiene una menor densidad celular final del cultivo y una mejor producción de la proteína de interés en comparación con los resultados obtenidos al utilizar glucosa y glicerol de forma conjunta.

Escalado del proceso fermentativo

Utilizando las condiciones de cultivo definidas anteriormente, se realiza la producción de IFN α 2b hu-rec utilizando diferentes niveles de fermentación a escala piloto (50 y 200 l de cultivo). En la figura 1 se grafican los resultados obtenidos observándose que al escalar la producción hasta un nivel de 50 l de cultivo, se obtienen resultados similares a los reportados a nivel de laboratorio (32 μ g IFN α 2b hu-rec/mg de proteína), mientras que al escalar la producción hasta 200 l de cultivo la expresión de la proteína de interés por célula de biomasa obtenida disminuye en un 43.5%; esto debe ser producto del aumento de la agitación del cultivo, lo que provoca un exceso de oxígeno disuelto e influye negativamente. Es conocido además que la formación de acetato depende de las condiciones de cultivo como concentración del oxígeno disuelto (Matsui *et al.*, 1989).

Caracterización de la proteína IFN α 2b hu-rec

Con vistas a determinar la identidad de la molécula expresada a diferentes niveles de fermentación, las muestras de los cultivos tomadas a las 6 h de inducción fueron analizadas mediante western blot (figura 2), observándose que la proteína es expresada en su forma monomérica.

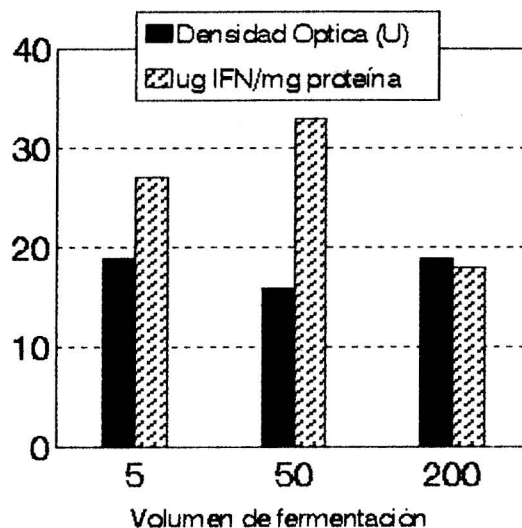


Fig. 1. Escalado del proceso fermentativo.

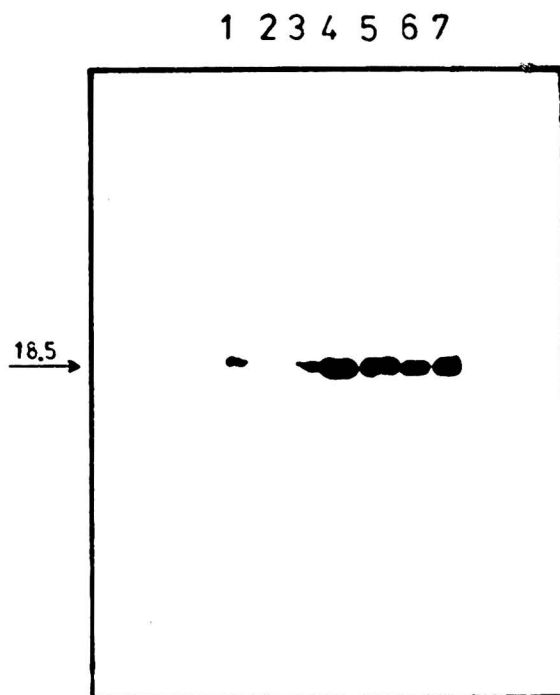


Fig. 2. Western blot. Biomasa de diferentes niveles de fermentación. Línea 1. Zaranda. Línea 2. Control negativo (célula W 3110). Línea 3. 5 l (volumen efectivo). Línea 4,5. 50 l (volumen efectivo). Línea 6. 200 l (volumen efectivo). Línea 7. Control positivo IFN (PM 18.5 kDa). Nota: En todos los casos se aplicó 20 μ g de proteína total.

REFERENCIAS

- BARCELONA, S. (1983). Determinación de la actividad de Interferón. Memorias del I Seminario Cubano sobre Interferón. La Habana pp 47-51.
- BURNETTE, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- DUARTE, C.; M.E. FERNANDEZ DE COSSIO; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón alfa 2 humano recombinante. Su empleo en la purificación y detección del antígeno. *Interferón y Biotecnología* 4:221-232.
- DE LA FUENTE, J.; A. HERRERA; A. SILVA; S. PEREZ; M. QUINTANA; J. DELGADO; J. FERNANDEZ y L. HERRERA. (1988). Expresión y secreción del Interferón α -2 por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Interferón y Biotecnología* 5:40-46.
- GOMEZ, A.; L. LUACES; A. ALFONSO (1990). FERMACS: un software interactivo para la supervisión y el control de un conjunto de procesos fermentativos. *II Congreso Latinoamericano de Biotecnología*. La Habana, Cuba.
- HILL, C.W. y B.W. HARNISH (1982). Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 149:449-457.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEMBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDAL (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269.
- MANIATIS, T.; E.F. FRISH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- MATSUI, T.; H. YOKOTA y S. SATO (1989). Pressurized culture of *Escherichia coli* for a high concentration. *Agricult. Biol. Chem.* 53: 3115-3120.
- MILLER, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 431-432.
- NAGATA, S.; H. TAIRA; A. HALL; L. JOHNSRUD; M. STREULI; J. ESCÓDI; W. BOLL; K. CANTELL y C. WEISSMANN (1980). Human leukocyte interferon produced by *Escherichia coli* is biologically active. *Nature* 287: 411-416.
- NANCIB, N.; C. BRANLAT y J. BOUNDRANT (1991). Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of recombinant strain of *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology* 8: 165-170.
- NARCIANDI, R.E.; Y. QUIÑONES; J. MORALES; I. TORRENS y L. HERRERA (1992). Obtención de quimosina bovina expresada en forma de cuerpos de inclusión insolubles en *Escherichia coli*. *Biotecnología Aplicada* 9:48-59.
- PEREZ, E.; L.C. PEREZ; V.M. MARAÑÓN y C.M. MELLA (1991). Tratamientos analíticos de muestras de IFN alfa hu rec para su cuantificación por ELISA. *Biotecnología Aplicada* 8:392-399.
- PEREZ, G.; M. QUINTANA; Y. QUIÑONES; J. VEGA y C. CHUAY (1990). Niveles de producción de Interferón alfa-2 recombinante por células de *Saccharomyces cerevisiae* libres e inmovilizadas. *Biotecnología Aplicada* 7:87-93.
- QUIÑONES, Y.; A. AGRAZ; A. SILVA; G. PADRON; C. MELLA; R. DIAZ; M. QUINTANA; M. GONZALEZ; V. BESADA; C. DUARTE; G. SIERRA; J. FERNANDEZ; R. UBIETA; J. MORALES; L. CASTELLANOS; V. MORERA; G. FURRAZOLA; M. MONTERO; A. SANTOS; A. DIAZ y L. HERRERA (1988). Clonación, expresión y producción de IFN- α en *E. coli*. Octavo Simposio Internacional de Biotecnología, París, julio 1988.
- SILVA, A.; J. DE LA FUENTE; G. PEREZ; Y. QUIÑONES; V. JIMENEZ; L. NOVOA y L. HERRERA (1988). Altos niveles de expresión del IFN 2 humano bajo el control del promotor derecho del fago lambda en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* 5:40-46.
- SILVA, A.; A. MENENDEZ; R. UBIETA; M. MONTERO; I. TORRENS; J. MORALES; A. SANTOS; M. GONZALEZ; V. JIMENEZ; J. DE LA FUENTE; C. SANTIZO y L. HERRERA. (1991). Expresión de Interferones humanos en *E. coli*. *Biotecnología Aplicada* 8(3):400-405.
- XIAOLI, L.; J.W. ROBBINS y K.B. TAYLOR (1990). The production of recombinant β -galactosidase in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. *J. Industr. Microbiol.* 5:85-94.