

NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTREPTOQUINASA RECOMBINANTE

Luciano Hernández Marrero, Natacha Pérez Rodríguez, Diana R Orta Jacobo, Ernesto Urrutia Valdés, Yamila Torres Reyes y Vivian Pujol García

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología,
apartado postal 6162, Ciudad de La Habana C.P. 10600, Cuba.

Introducción

La estreptoquinasa recombinante es una proteína obtenida por la tecnología del ADN recombinante (1), utilizada eficientemente como agente trombolítico en la terapia de diferentes afecciones como el infarto agudo de miocardio (2), la trombosis venosa profunda entre otras, que se encuentran entre las principales causas de muerte de los países en desarrollo.

El mecanismo de acción de la estreptoquinasa natural, y sus propiedades fisicoquímicas (3, 4) fueron la base para el estudio de la molécula recombinante y el desarrollo de un proceso de purificación. La estreptoquinasa puede ser purificada por afinidad utilizando su capacidad de formar un complejo estequiométrico con el plasminógeno humano (5), a través de su carga empleando intercambiadores iónicos (6) o sistemas que logran una separación diferencial de proteínas en base a sus propiedades hidrofóbicas (7).

Para el proceso de purificación de productos farmacéuticos es necesario, además de tener en cuenta elementos de escalado como: carga del gel, velocidad lineal, y dimensiones de la columna (7), que el proceso responda a las exigencias de pureza de la preparación, la eliminación de contaminantes proteicos y endotoxinas, además de conservar las propiedades biológicas de la proteína en cuestión.

Con este trabajo se modifica la tecnología inicial de purificación (cambio de la cromatografía de intercambio iónico por hidrofobicidad) y se mantiene el procesamiento continuo y rápido en esta etapa, se garantiza la calidad de la materia prima activa y se reducen los costos de producción.

Adicionalmente se valoraron nuevas alternativas para mejorar y optimizar el proceso de liofilización de la estreptoquinasa recombinante.

El objetivo fundamental de estos experimentos fue obtener un proceso que permitiera separar de forma efectiva la estreptoquinasa recombinante de las proteínas contaminantes de *Escherichia coli*.

Materiales y Métodos

El material inicial fue estreptoquinasa recombinante semipura después de dos pasos cromatográficos en gel filtración e intercambio iónico.

Se controlaron los parámetros a escalar: velocidad lineal, carga y dimensiones de la columna.

Se aplicó la proteína en una solución tampón de sulfato de amonio 0,86 M en Tris-HCl 20 mM pH 8,5. geles cromatográficos utilizados: TSK-Butilo (TosoHaas) y DEAE-sefarosa (Pharmacia).

De forma escalonada se redujo la interacción hidrofóbica proteína-ligando mediante la disminución de la molaridad de la solución inicial de sulfato de amonio y con el fin de separar la estreptoquinasa recombinante de sus contaminantes.

A continuación se realizó un intercambio iónico con el propósito de eliminar endotoxinas y concentrar la proteína eluída.

Los análisis realizados a las muestras fueron: proteína, según el método de Bradford (8), pureza mediante inmunodot y electroforesis de proteína en gel de SDS-poliacrilamida (9) y actividad biológica por la técnica del sustrato cromogénico S-2251(10).

Para la optimización del proceso de liofilización se estudió el efecto de las temperaturas fundamentales en el proceso de liofilización. Las variables medidas fueron actividad biológica, porcentaje de humedad residual y tiempo total del ciclo.

Resultados y Discusión

La nueva alternativa para la purificación, de la estreptoquinasa recombinante se basa en la combinación de un paso cromatográfico por interacciones hidrofóbicas y una cromatografía de intercambio iónico, lo cual permitió obtener un producto de alta pureza con las características requeridas para su aplicación en humanos.

La cromatografía por interacción hidrofóbica permitió la eliminación de contaminantes de *E. coli* presentes en el material inicial, mediante una separación diferencial basada en la hidrofobicidad de la estreptoquinasa respecto a las proteínas del hospedero presentes en la preparación (Tablas 1 y 2).

El producto se obtiene con un nivel de pureza mayor del 99 %.

El intercambiador iónico a continuación del paso de separación por hidrofobicidad permite la realización de lavados para eliminar endotoxinas existentes en el material, con lo que se obtiene la proteína

1. Estrada MP, Hernández L, Pérez A, Rodríguez P, Serrano R, Rubiera R et al. High level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1992;10: 1138-1142.

2. Hernández L, Rodríguez P, Serrano R, Muñoz E, Estrada MP, de la Fuente J. Recombinant streptokinase for the treatment of thrombotic disorders. *Annals New York Academy of Science* 1992;667:424-427.

3. Nagendra K, Reddy N, Markus G. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. *J Biol Chem* 1972;247(6):1683-1691.

4. Radek JT, Castellino FJ. Conformational properties of streptokinase. *J Biol Chem* 1989;264:9915-9922.

5. Rodríguez P, Hernández L, Muñoz E, Castro A, de la Fuente J, Herrera L. Purification of streptokinase by affinity chromatography on immobilized acylated human plasminogen. *BioTechniques* 1992;12(3):424-427.

6. De Renzo EC, Sütteri PK, Hutchings BL, Bell PH. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. *J Biol Chem* 1967;242(3):533-542.

7. Sakihama N, Ohmori H, Sugimoto N, Yamasaki Y, Oshino R, Shin M. Toyoparl MW-65 C: Ammonium sulfate as a new column chromatographic adsorbent for enzyme purification. *J Biochem* 1983;93:129-134.

8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.

9. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

10. Hernández L, Rodríguez P, Castro A, Serrano R, Rodríguez MP, Rubiera R et al. Determinación de actividad estreptoquinasa utilizando un ensayo. *Biotecnología Aplicada* 1990;7(2):153-160.

Tabla 1. Primer experimento: combinación de hidrofobicidad e intercambio iónico. Elución con un gradiente de sulfato de amonio del 40 al 0 %.

Muestra corrida en TSK-butilo.	Volumen (L)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI/mg)	Recobrado (%)	Contaminantes (%)
M. inicial	16,8	15100	83404	-	2,5 %
Lavado 40 %	13,0	5630	-	-	-
Lavado 20 %	6,6	5850	60046	46,1 %	0,2 %
Lavado 15 %	3,0	852	53628	6 %	0,14 %
Lavado 10 %	2,0	380	37757	2 %	1,18 %
Lavado 0 %	2,0	490	-	-	31,1 %
Muestra corrida en DEAE-Sefarosa.	Volumen (L)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI/mg)	Recobrado (%)	Contaminantes (%)
M. inicial	11,6	7082	50477	-	0,5 %
Elusión	1,9	6190	64995	87,4 %	0,35 %

Tabla 2. Segundo experimento: combinación de hidrofobicidad e intercambio iónico. Elución con un gradiente de sulfato de amonio del 20 al 0 %.

Muestra corrida en TSK-butilo.	Volumen (L)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI/mg)	Recobrado (%)	Contaminantes (%)
M. inicial	19,5	16399	75546	-	1,33 %
Lavado 20 %	6,3	7364	79110	45 %	0,16 %
Lavado 15 %	2,8	845	74218	5 %	0,18 %
Lavado 10 %	2,8	750	-	4,5 %	
Muestra corrida en DEAE-Sefarosa.	Volumen (L)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI/mg)	Recobrado (%)	Contaminantes (%)
M. inicial	11,9	8959	-	-	-
Elusión	1,5	7120	87854	79,5 %	0,3 %

con las especificaciones requeridas de: pureza, actividad específica, apirogenicidad y concentración para ser utilizada en la formulación final del producto inyectable.

El escalado de este proceso productivo y la estabilización de la producción a niveles de hasta 4 000 dosis mensuales, permitió reducir el costo de producción en un 23,6 % con respecto al proceso establecido anteriormente. El proceso de escalado se realizó acorde con las condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación establecidas a nivel internacional para este tipo de producto.

La optimización del proceso de liofilización de la estreptoquinasa recombinante, se realizó primero a escala piloto y luego a escala industrial. El incremento es de una liofilizadora de 20 Kg de hielo a una de 140 Kg, permitió lograr una reducción del tiempo de 20 h en la escala piloto y 18 h en la industrial, lo que significa un 52,38 % de ahorro energético además de aumentar la capacidad de producción.

Se han realizado 15 lotes de producto final bajo estas condiciones y es aplicable a las cuatro presentaciones del producto.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración prestada a este trabajo de: Jorge Sotolongo Peña, Publio Rodríguez Guzmán*, Julieta Camino Corona, Aleydis Gómez Ríos, Saul Albuquerque Pérez, Ulises Peñalver López, Ristofen Alfonso Nápoles, Rubén Bosch Garrido, Alexander Hernández de la Paz, Libert Tamayo Dickinson, Diosvel Cartaya Aguilar, Yohima Valdés Nuñez, Ernesto Olazábal Toledo, Juan Carlos Quesada Peña, Benito Castillo Ríos, Mayra Wood Duque, Emey Cardona Vega, Leonardo Pacin Olivares, Miriela Gil Mena, Alberto Agraz Fierro, Luis Herrera Martínez, Yamila Martínez Cuellar, Marisol Cruz Díaz, todos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

* EPB "Carlos J. Finlay", Ciudad Habana, Cuba