

# ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES VARIABLES PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL INTERFERÓN GAMMA HUMANO RECOMBINANTE

Gustavo Furrázola, ✉ Rebeca Bouyón, Roger Moya, Abel Domínguez y Yai Cruz

División de Producción de Interferones. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Telef: (53-7) 21 6022; Fax: (53-7) 21 8070; Telex: INGENCU 512330; E-mail: ifn@cigb.edu.cu

## ABSTRACT

Some variables of the purification process for recombinant human gamma interferon (rec-hum  $\gamma$  IFN) were studied in order to search for a more economic process that may increase the productive capacities of this protein. The reduction of the ionic strength in the renaturation process allowed a recovery of rec-hum  $\gamma$  IFN 1.82 times higher in this step as well as a higher stability of the protein under this condition. A new matrix, Fractogel EMD 650 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (S) was evaluated in the ionic exchange chromatography and the working parameters were established. A better recovery and reproducibility were achieved with a column charge of 10 mg of protein per miligram of resin and stepwise gradient at 0.46 - 0.49 M NaCl in this step. The use of lower ionic strength (0.01 M) showed no differences in the results obtained and at lower pH values there was an increase in the recovery of IFN, until a value close to 50 % for this step. The use of the more economic ion exchange matrix and the best conditions found in this study allowed a higher recovery in the purification step and at the same time to own a final product with higher stability and similar quality attributes.

Key words: chromatography, renaturation, recombinant gamma interferon, purification

Biotecnología Aplicada 1998;15:176-179

## RESUMEN

Se realizó un estudio de diferentes variables en el proceso de purificación del interferón gamma humano recombinante (IFN  $\gamma$  hu-r) con vistas a obtener un proceso de purificación más económico, el cual posibilite el incremento de las capacidades productivas de esta proteína. Con la disminución de la fuerza iónica en la renaturalización de 0,1 M a 0,01 M se logró un aumento del recobrado en el paso de 1,82 veces y la proteína mostró ser más soluble bajo estas condiciones. Se evaluó la matriz de intercambio catiónico Fractogel EMD 650 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (S) y se establecieron los parámetros de trabajo. Se obtuvo un mejor recobrado y reproducibilidad a una carga de 10 mg/mL de gel y gradiente escalonado entre 0,46 y 0,49 M de NaCl. Una fuerza iónica inferior (0,01 M) no mostró diferencias en los resultados y la disminución del pH produjo un aumento del recobrado, hasta un valor cercano al 50 % para este paso. Con la utilización de una matriz de intercambio iónico menos costosa y el empleo de las mejores condiciones estudiadas en la etapa de purificación, se logró incrementar el recobrado de la misma y se obtuvo un producto con una mayor estabilidad e igual calidad.

Palabras claves: cromatografía, renaturalización, interferón gamma recombinante, purificación

## Introducción

La producción de los interferones (IFN) a través de la tecnología del ADN recombinante ha permitido la obtención de grandes cantidades de estos productos con un alto nivel de pureza. La importancia del estudio y la producción de estas moléculas reside en sus propiedades antivirales, inhibidoras del crecimiento celular e inmunomoduladoras, las cuales las convierten en una herramienta en el tratamiento de diferentes afecciones (1, 2).

El IFN gamma humano recombinante (IFN  $\gamma$  hu-r) ha sido expresado en *Escherichia coli* de forma insoluble (3, 4). Esta proteína es una molécula dimerica, en su forma activa, cada monómero está constituido por 144 aminoácidos, posee un alto punto isoeléctrico (proteína básica) y la misma presenta una alta tendencia a la agregación y a la degradación por proteasas en el extremo C-terminal (4, 5).

La renaturalización constituye la etapa determinante en el recobrado de proteínas insolubles, este

trabajo tiene como primer objetivo el mejoramiento de este paso.

El recobrado alcanzado en este proceso ha sido menor de un 50 %, debido a que el mismo compete con la agregación y precipitación irreversible de la proteína.

La etapa de intercambio iónico es a su vez el paso cromatográfico fundamental pues en este se eliminan proteínas contaminantes, así como IFN  $\gamma$  degradado lo que determina la pureza final del producto. La matriz empleada en esta etapa ha sido la MONO S (Pharmacia) (3), una matriz de alta resolución la cual ha mostrado un buen desempeño en el proceso, pero a un costo elevado. En el presente trabajo se evalúa la matriz Fractogel EMD 650 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (S) (Merck) con vistas a lograr un producto con las mismas características y calidad obtenidas anteriormente a menor costo.

1. Vlachoyiannopoulos PG, Tsifetaki N, Dimitriou I, Galaris D, Papiiris SA, Moutsopoulos M. Safety and efficacy of recombinant  $\gamma$  interferon in the treatment of systemic sclerosis. *Rheum Dis* 1996; 55:761-768.

2. Meyskens FL, Kopecky KJ, Taylor CW, Noyes RD, Tuthill RJ, Hersh EM et al. Randomized trial of adjuvant human interferon gamma versus observation in high-risk cutaneous melanoma: a Southwest oncology group study. *J Natl Cancer Institute* 1995;87:1710-1712.

3. Arora D, Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *J Biotechnol* 1996; 52:127-133.

4. Haelewyn J, De Ley M. A rapid single-step purification method for human interferon- $\gamma$  from isolated *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biochem Mol Biol International* 1995;1163-1171.

✉ Autor de correspondencia

## Materiales y Métodos

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Los tampones fueron preparados con agua purificada (Super Q, Millipore) y filtrados por membrana microbiológica de 0,2  $\mu$ m (Sartorius).

### Renaturalización

El IFN  $\gamma$  hu-r desnaturalizado, en solución TE-GuHCl 4 M, es renaturalizado por medio de un proceso de desalinización en una columna K 50/60 (Pharmacia) empacada con gel Sephadex G-25 (Medium, Pharmacia). La proteína es aplicada a la columna a una concentración de 0,8 mg/mL. La solución empleada en la renaturalización fue acetato de amonio (0,1 M o 0,01 M) + 5 % sacarosa, pH 7,2 a una velocidad lineal promedio de 41,5 cm/h.

### Intercambio iónico

Los experimentos se realizaron en un sistema FPLC (Pharmacia) acoplado a una computadora con el software BIOCROM (CIGB, Cuba) (6) para registrar y almacenar los datos del proceso. Se empleó una columna HR 5/5 (Pharmacia) con un contenido de 1 mL de gel Fractogel EMD 650 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (S) (Merck). La proteína fue aplicada a una velocidad lineal de 150 cm/h disuelta en acetato de amonio (0,1 o 0,01 M) + 5 % sacarosa (Solución A, tampón de equilibrio) y eluida a través de un gradiente lineal con Solución B (Solución A+ NaCl 1 M) en 60 min.

Se probaron cuatro condiciones de pH: 7,2; 6,5; 6,0 y 5,5. El pH se reguló añadiendo hidróxido de amonio o ácido acético según el valor de pH requerido. El producto eluido de la columna se colectó en fracciones que fueron analizadas por electroforesis para chequear su pureza. Se tomaron las fracciones puras (sin degradación) y se mezclaron.

### Métodos analíticos

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (7) y la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS (EGPA-SDS) (8). Se utilizó el método de tinción con plata para la detección de las proteínas (9).

La determinación de la actividad biológica del IFN  $\gamma$  hu-r en las muestras se realizó midiendo la inhibición del efecto citopatogénico ejercida por este sobre células HEP-2 empleando el virus Mengo. Se utilizó un estándar internacional de IFN  $\gamma$  (Gg 23-901-530).

La pureza del IFN  $\gamma$  hu-r se verificó además por cromatografía de RP-HPLC, empleando una columna C8 de 4,6 x 100 mm (Bakerbond, JT Baker) y un gradiente lineal de 15 a 60 % de B en 40 min. La composición del sistema de solventes empleado fue:

- Solución A: ácido trifluoroacético (Pierce) 0,1 % en agua destilada
- Solución B: ácido trifluoroacético (Pierce) 0,05 % en acetonitrilo (Lichrosolv) (Merck).

## Resultados y Discusión

### Estudios de renaturalización con variación de la fuerza iónica

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la renaturalización empleando las dos soluciones con diferente fuerza iónica: acetato de amonio 0,1 y 0,01 M-5 % de sacarosa, pH 7,2 (los resultados son el valor promedio obtenido de tres corridas). Como se puede observar, el recobrado de proteínas a menor fuerza iónica es 1,82 veces superior que el obtenido con la otra variante; de este modo se logró un material con mayor calidad, en cuanto a sus características organolépticas. Este hecho representa una mejora importante, puesto que la precipitación de proteínas representa un inconveniente serio durante la filtración por membrana (0,2  $\mu$ m), la cual se realiza antes de la siguiente etapa, así como por la afectación en el tiempo de vida de las columnas y el recobrado del proceso que dependen de la calidad del material aplicado. La actividad específica del renaturalizado para ambos casos es similar. lo que indica que el mismo no se ha visto afectado con la disminución de la fuerza iónica del medio. El material obtenido en este paso posee un alto grado de pureza (Figura 1, línea 1).

Se estudió la solubilidad del material renaturalizado en solución a 4 °C, bajo las dos condiciones empleadas, hasta cinco días de almacenamiento posteriores a la fecha de realización del proceso (datos no mostrados). La pérdida por precipitación en el material procesado a mayor fuerza iónica fue de un 68 %; en el otro caso fue de sólo un 33 %.

La alta tendencia a la agregación de esta proteína durante la renaturalización ha sido previamente demostrada (10). Se ha observado que al renaturalizar IFN  $\gamma$  hu-r a partir de una solución de urea 7 M, por dilución, se obtienen dos formas en solución, las cuales difieren en tamaño y actividad biológica; ambas no se encuentran en un equilibrio rápido reversible. Estas formas representan moléculas plegadas de diferente forma y la proporción de las mismas, obtenida después de la renaturalización, está influenciada por la concentración de proteínas y la fuerza iónica del tampón empleado en dicho proceso (10). En nuestro caso, el efecto de la fuerza iónica del medio sobre el estado de plegamiento y/o agregación de la molécula, observada por otros investigadores, también explica los resultados obtenidos con las condiciones empleadas.

5. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP et al. Three-dimensional structure of recombinant human interferon- $\gamma$ . *Science* 1991;252:698-702.

6. Gómez A. BioCROM. Sistema automatizado de cromatografía líquida. Manual de usuario. Versión 2.1, 1992.

7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

8. Laemmli J. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

9. Wray WT, Boulikas VP, Wray R, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981;118:197-203.

10. Mulikerrin MG, Wetzel R. pH dependence of the reversible and irreversible thermal denaturation of gamma interferon. *Biochemistry* 1989;28:6556-6561.



Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 %. Línea 1: material renaturalizado (aplicado a la columna de intercambio iónico); línea 2: eluito de intercambio iónico y línea 3: material de referencia.

Tabla 1. Renaturalización del IFN  $\gamma$  empleando dos condiciones de fuerza iónica.

Fuerza iónica	Actividad específica (U/mg)	Recobrado (%)	Apariencia
NH <sub>4</sub> Ac 0,1M	9,24 x 10 <sup>6</sup>	41,3	Ligeramente turbia
NH <sub>4</sub> Ac 0,01M	7,15 x 10 <sup>6</sup>	75,2	Transparente

**Evaluación de la matriz de intercambio iónico**

*Estudio del gradiente de elución.* Se estudió la influencia del gradiente escalonado en el recobrado y la reproducibilidad del perfil cromatográfico, para ello se realizaron escalones entre 46-49 % de B (acetato de amonio 0,1 M, 5 % sacarosa + NaCl 1 M, pH 7,2). En este rango se logra la separación entre el pico correspondiente al IFN degradado del pico correspondiente al IFN puro, el cual comienza a eluir aproximadamente entre un 53-55 % de B (Figura 2).

Al analizar la pureza se obtuvo que en la primera fracción del pico de IFN existe un pequeño porcentaje de IFN degradado, por lo que aún logrando una buena resolución, es recomendable utilizar la electroforesis como criterio de pureza antes de mezclar las fracciones del pico de IFN puro. Con la utilización del escalón, se logró una reproducibilidad en el perfil cromatográfico y la presencia de IFN degradado se limita a la primera fracción del pico de IFN puro.

*Capacidad de carga.* Con el objetivo de definir la capacidad de carga más adecuada para esta matriz, se realizaron corridas empleando tres condiciones: 10, 20 y 30 mg de proteína por mililitro de gel. Los resultados se muestran en la Tabla 2 (los resultados son el valor promedio obtenido de tres corridas).

Una carga superior a 10 mg/mL de gel produce una disminución en el recobrado de IFN debido fundamentalmente a pérdidas por proteína no enlazada a la matriz así como se afecta su resolución. La disminución de la resolución de la matriz se muestra en las Figuras 3 A, B y C; para la carga máxima (30 mg/mL) se obtiene un solapamiento casi total entre el pico de proteína degradada (pico 1) y el pico principal de IFN (pico 2). Las fracciones del pico principal de IFN  $\gamma$  hu-r obtenidas de la corrida realizada a carga 10 mg/mL, analizadas por EGPA-SDS se observan en la Figura 4. En las primeras fracciones se aprecia una banda de IFN degradado asociado a la molécula intacta. En la Figura 1 se muestra un material aplicado en el paso de intercambio iónico (renaturalizado), un eluato de intercambio iónico (mezcla de fracciones que contienen el IFN  $\gamma$  hu-r puro) y un material de referencia aplicados en una EGPA-SDS; como se puede apreciar, el material eluido presenta una alta pureza.

*Estudio de la influencia del pH y la fuerza iónica.* Se probaron igualmente las dos condiciones de fuerza iónica en esta etapa del proceso: acetato de amonio 0,1 y 0.01 M-5 % de sacarosa, pH 7,2. No se obtuvieron diferencias en cuanto al recobrado de IFN ni variación en los perfiles cromatográficos al comparar ambas variantes (resultados no mostrados).

En relación con la variación en el pH de las soluciones, los resultados se muestran en la Figura 5. Para

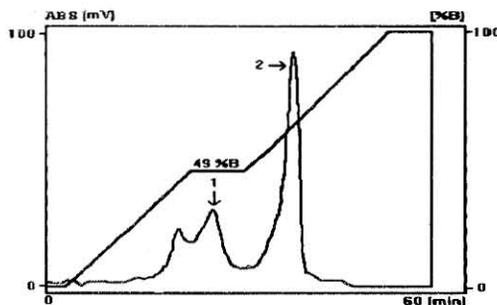


Figura 2. Perfil cromatográfico obtenido con gradiente de elución escalonado, pH 7,2; 0,1 M de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  y carga 10 mg/mL de gel. 1: IFN degradado; 2: IFN nativo.

**Tabla 2. Efecto de la carga de muestra aplicada a la columna en el recobrado del proceso.**

Carga (mg/mL)	Recobrado IFN (%)
10	35,3
20	33,2
30	28,1

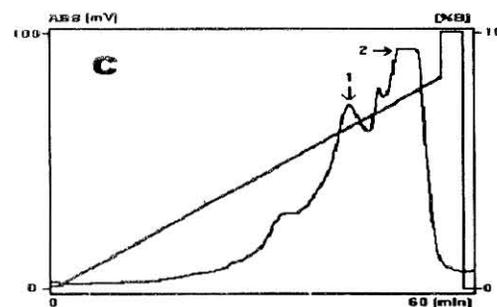
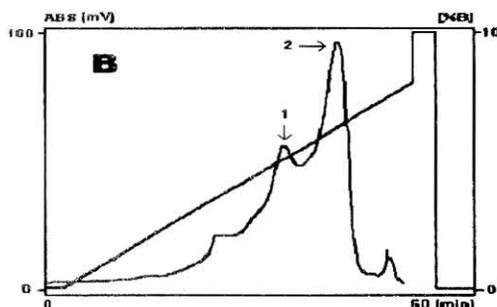
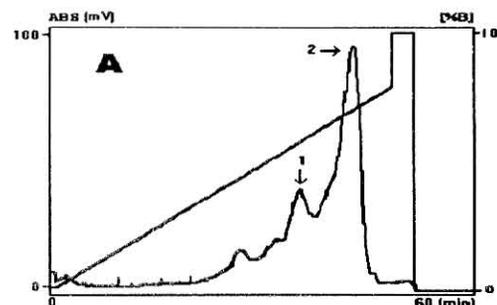


Figura 3. Perfil cromatográfico obtenido con gradiente de elución lineal, pH 7,2; 0,1 M de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  y carga: a) 10 mg de IFN/mL de gel, b) 20 mg de IFN/mL de gel y c) 30 mg de IFN/mL de gel. Pico 1: IFN degradado; pico 2: IFN nativo.

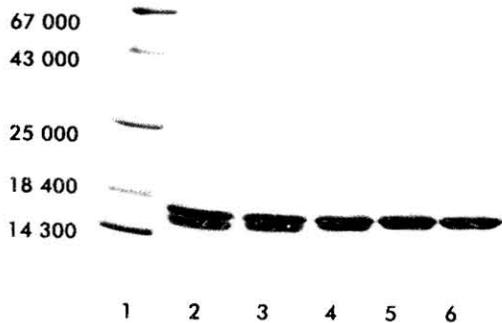


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 %. Línea 1: patrón de peso molecular; líneas 2-5: fracciones de la 1 a la 4 eluidas de la columna de intercambio iónico y línea 6: patrón de IFN  $\gamma$  hu-r.

ambas variantes de fuerza iónica se observa un aumento en el recobrado de IFN con la disminución del pH.

El IFN  $\gamma$  hu-r es una proteína básica, con un punto isoeléctrico igual a 8,2, el cual fue determinado experimentalmente (11). Es conocido que la solubilidad de las proteínas es generalmente mínima en la región cercana a su punto isoeléctrico y se incrementa sustancialmente al alejarnos hacia un pH más ácido o más básico (12). La disminución del pH de la solución provoca que la molécula adquiera una carga positiva mayor; con ello se fortalece la interacción entre la matriz y la proteína y esto haría también disminuir la agregación de la misma. De acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores (13) se ha propuesto que al moverse de pH 5 a pH 6, los cambios electrostáticos de la molécula de IFN  $\gamma$  hacen que aumente la estabilidad termodinámica de esta (lo cual significa que se necesita más energía para su desnaturaliza-

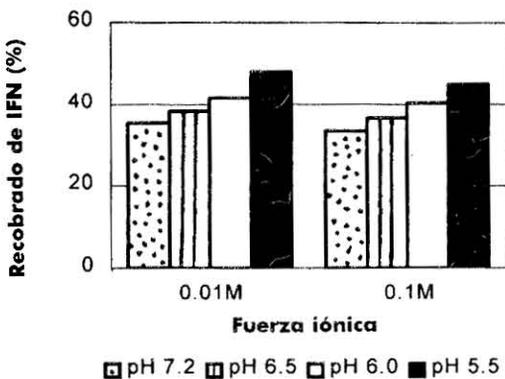


Figura 5. Influencia del pH y la fuerza iónica del tampón en el recobrado de IFN gamma en la cromatografía de intercambio iónico.

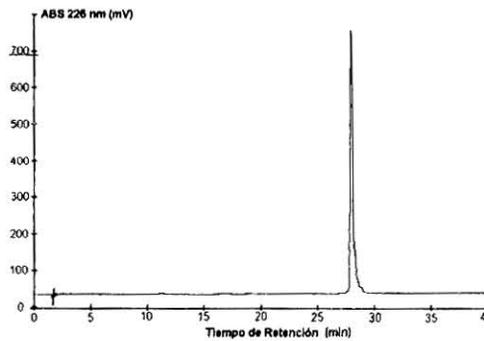


Figura 6. Determinación de la pureza por RP-HPLC al producto final obtenido por cromatografía de intercambio iónico a una fuerza iónica de 0,01 M de acetato de amonio-5 % de sacarosa, pH 5,5.

ción) pero a la misma vez, la pérdida de carga positiva (posiblemente por la deprotonación de las histidinas), produce un cambio dramático en las propiedades de solubilidad; ello la hace más susceptible a la agregación (13).

Los mejores resultados se obtuvieron con la variante de intercambio iónico realizada a menor fuerza iónica y pH 5,5. En la Figura 6 se muestra que la pureza del producto analizada por RP-HPLC fue superior a 97 %.

Los resultados de los parámetros de calidad obtenidos para la proteína producida con la nueva variante (menor fuerza iónica) son mostrados en la Tabla 3. Los mismos son semejantes a los obtenidos normalmente en la producción; con ello se evidencia la alta calidad del material purificado.

Como conclusiones de este trabajo se puede afirmar que la disminución de la fuerza iónica en el paso de renaturalización permitió aumentar el recobrado de esta etapa y contar con un material más estable y de Tabla 3. Controles de calidad realizados al producto final mayor calidad para las operaciones cromatográficas. Con el empleo de la matriz Fractogel EMD 650 SO<sub>3</sub> se logró un material que cumple con los parámetros de calidad establecidos para esta proteína, empleando un gel de menor costo. En su conjunto, con estas mejoras, es posible contar con un proceso más económico, lo cual permitirá un aumento en las capacidades productivas de esta proteína de interés terapéutico.

11. Registro Médico Sanitario HEBERÓN GAMMA R (en preparación).

12. Middaugh CR, Volkin DB. Protein solubility. In: Stability of protein pharmaceuticals. Part A: chemical and physical pathways of protein degradation. Plenum Press New York, 1992.

13. Arakawa T, Altan NK, Yueh-Rong H. Preparation and characterization of recombinant DNA-derived human interferon- $\gamma$ . The Journal of Biological Chemistry 1985;260:14435-14439.

Tabla 3. Controles de calidad realizados al producto final.

Análisis	Resultado
Concentración de proteínas	0,39 mg/mL
Actividad biológica	1,41 x 10 <sup>7</sup> UI/mL
Actividad específica	3,6 x 10 <sup>7</sup> UI/mg
Cromatografía de RP-HPLC	Pico en el tiempo de retención esperado, > 95 % de pureza
Electroforesis en gel de poliacrilamida	Una sola banda a la altura esperada
Proteínas contaminantes de <i>E. coli</i> por inmunodot	< 98 ng/dosis