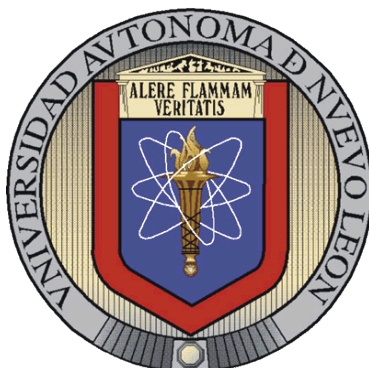


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Expresión, purificación, caracterización y evaluación biológica y toxicológica del  
factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante

Por

Isaac Enrique Díaz Ramos

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS

con Orientación en Farmacia

Diciembre 2015

Expresión, purificación, caracterización y evaluación biológica y toxicológica del

factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante.

Revisión de tesis:

---

Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera  
ASESOR

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
COASESOR

---

Dra. Sandra L. Gracia Vásquez  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. Ivonne A. Camacho Mora  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Isaías Balderas Rentería  
COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. María A. Hernández Ramírez  
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

# Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>16</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
2.1. EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS COMO BIOFÁRMACO .....	16
2.2. PROTEÍNAS DE FUSIÓN: SMBP Y CUSF .....	18
2.2.1. <i>CusF</i> .....	19
2.2.2. <i>SmbP</i> .....	19
2.2.3. <i>Purificación de proteínas de fusión</i> .....	20
2.2.4. <i>Cromatografía de afinidad</i> .....	21
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>24</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. HIPÓTESIS .....	24
3.2. OBJETIVO GENERAL .....	24
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>26</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>26</b>
4.1. MATERIAL, EQUIPO Y UBICACIÓN DEL EQUIPO. ....	26
4.2. METODOLOGÍA GENERAL.....	28
4.3. AMPLIFICACIÓN DE INSERTOS.....	28
4.4. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS .....	30
4.4.1. <i>Digestión de plásmido pET-30a(+), SmbP, CusF y hG-CSF</i> .....	31
4.4.2. <i>Ligación de plásmido pET-30a(+) con insertos</i> .....	33
4.4.3. <i>Transformación en E. coli cepa DH5<math>\alpha</math></i> .....	33
4.4.4. <i>Selección de transformantes y extracción de ADN plasmídico</i> .....	34
4.4.5. <i>Análisis por PCR para confirmar ligación</i> .....	34
4.5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS .....	35
4.5.1. <i>Transformación en E. coli BL21(DE3)</i> .....	35
4.5.2. <i>Expresión piloto</i> .....	36
4.5.3. <i>Escalamiento de la expresión de proteínas</i> .....	36
4.6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	37

4.6.1.	<i>Lisis celular y obtención de clarificados</i> .....	37
4.6.2.	<i>Cromatografía de afinidad para SmbP-G-CSF</i> .....	37
4.6.3.	<i>Cromatografía de afinidad para CusF-G-CSF</i> .....	39
4.6.4.	<i>Diálisis para la remoción de imidazol y cloruro de sodio</i> .....	40
4.6.5.	<i>Determinación de la concentración de proteínas</i> .....	40
4.7.	REMOCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN.....	42
4.8.	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE HG-CSF.....	42
4.9.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN SANGRE.....	43
4.9.1.	EXTRACCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE.....	43
4.9.2.	EXPOSICIÓN DE SANGRE A HG-CSF.....	43
4.9.3.	ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE GLÓBULOS BLANCOS.....	44
4.10.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DEL HG-CSF.....	44
4.10.1.	<i>Cultivo de líneas celulares</i> .....	44
4.10.2.	<i>Cultivo en placa de 96 pocillos</i> .....	45
4.10.3.	<i>Preparación de las muestras de hG-CSF</i> .....	45
4.10.4.	<i>Exposición de los cultivos celulares a hG-CSF</i> .....	46
4.10.5.	<i>Evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo WST-1</i> .....	47
<b>CAPÍTULO 5</b>	.....	<b>48</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	.....	<b>48</b>
5.1.	DISEÑO DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE HG-CSF.....	48
5.2.	AMPLIFICACIÓN HG-CSF.....	49
5.3.	CONSTRUCCIÓN PET30A-SMBP-HG-CSF Y PET30A-CUSF-HG-CSF.....	50
5.4.	EXPRESIÓN PILOTO DE PROTEÍNAS.....	51
5.5.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
5.5.1.	<i>Purificación CusF-hG-CSF</i> .....	53
5.5.2.	<i>Purificación SmbP-hG-CSF</i> .....	54
5.6.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	55
5.7.	REMOCIÓN DE PROTEÍNA DE FUSIÓN.....	56
5.8.	COMPARACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN.....	57
5.9.	PURIFICACIÓN DE HG-CSF.....	59
5.10.	ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN SANGRE.....	59
5.11.	DIFERENCIACIÓN MICROSCÓPICA DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.....	60
5.12.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	64
<b>CAPÍTULO 6</b>	.....	<b>66</b>
<b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	.....	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 7</b>	.....	<b>77</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	.....	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 8</b>	.....	<b>79</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	.....	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS</b>	.....	<b>81</b>
<b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO</b>	.....	<b>86</b>



## Lista de tablas

Tabla .....	Página
1. Iniciadores usados para la amplificación de G-CSF. .... Error! Marcador no definido.	
2. Componentes y condiciones para la amplificación de G-CSF.....	30
3. Componentes y condiciones para la digestión de plásmido pEt-30a(+). ....	31
4. Componentes y condiciones para la digestión de G-CSF.....	32
5. Componentes y condiciones para la digestión de SmbP y CusF. ....	32
6. Reactivos y condiciones para análisis por PCR de la ligación. ....	34
7. Composición de solución amortiguadora de unión.....	38
8. Composición de solución amortiguadora de lavado.....	38
9. Composición de solución amortiguadora de elución.....	38
10. Preparación de estándares de albúmina de suero bovino .....	41
13. Preparación de muestras sanguíneas para estudio de actividad biológica. ....	44
14. Preparación de muestra de G-CSF a diferentes concentraciones para su evaluación de citotoxicidad. ....	46
15. Diseño de iniciadores para la amplificación del gen de hG-CSF.....	48
16. Cuantificación de proteína por método Bradford. ....	56
17. Conteo de células sanguíneas y porcentajes de aumento de granulocitos. ....	60
18. Evaluación de citotoxicidad en células de hígado de Chang.....	64

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Gel de agarosa de 0.7 % donde se observa la amplificación de hG-CSF.....	49
2. Gel de agarosa de 0.7 % del análisis por PCR de las construcciones de SmbP-hG-CSF.....	50
3. Gel de agarosa de 0.7 % del análisis por PCR de las construcciones de CusF-hG-CSF.....	51
4. Niveles de expresión de hG-CSF fusionado con CusF en E. coli BL21(DE3)...	52
5. Niveles de expresión de hG-CSF fusionado con SmbP en E. coli BL21(DE3)..	53
6. Purificación de SmbP-hG-CSF. Análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación.....	54
7. Cromatograma de IMAC de la purificación de SmbP-hG-CSF.....	55
8. Curva de calibración de BSA para cuantificación de SmbP-hG-CSF.....	56
9. Seguimiento por SDS-PAGE del corte de enteroquinasa a diferentes tiempos en SmbP-hG-CSF.....	57
10. Análisis de niveles de expresión piloto por SDS-PAGE a 37°C, 1 mM IPTG, 4 hrs.....	58
11. Análisis de niveles de expresión piloto, por SDS-PAGE, a 25 °C con 0.1 mM de IPTG y por 16 horas.....	58
12. Expresión y purificación de hG-CSF a partir de SmbP.....	59

13. Frotis de control negativo a 40x. ....	61
14. Frotis de control negativo a 100x. ....	61
15. Frotis de control positivo a 40x.....	62
16. Frotis de control positivo a 100x.....	63
17. Frotis de hG-CSF a 40x.....	63
18. Frotis de hG-CSF a 100x.....	64
19. Comparación de viabilidad celular entre hG-CSF purificado por SmbP contra Biociclin. ....	65



## Nomenclatura

°C	Grados Centígrados
µL	Microlitros
3D	Tercera dimensión
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
anti-VEGF-A	Factor de Crecimiento Endotelial anti Vascular
ATCC	Colección de cultivos de tipo americano
BHK	Células de riñón de hámster
BL21(DE3)	Cepa de <i>Escherichia coli</i> para expresión de proteínas
bp	Pares de bases
BSA	Suero fetal bovino
CHO	Células de ovario de hámster
CusF	Proteína libre sensible a cobre
Co	Cobalto
Cu	Cobre
DH5α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> para proliferación de ADN
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
FDA	Administración de comida y medicamentosn
Fe	Hierro
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación-S-transferasa
hG-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos humano
His6	Polihistidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IBs	Cuerpos de inclusión
IMAC	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacáridos
MBP	Proteína de unión a maltosa
mL	mililitros
M	Molar
MEM	Medio esencial mínimo
mM	milimolar
NFS-60	Línea celular de mieloblastocitos murinos
ng	nanogramos
Ni	Níquel
nm	nanometros
NusA	N sustancia de utilización
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro unida a isomerasa

PD1b'a'	Dominio b'a' de PDI
pg	picogramos
rhG-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos recombinante humano
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SFB	Suero fetal bovino
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales
Thr	Triptófano
Trx	Tioredoxina
UV	Ultravioleta
WST-1	Tetrazolio soluble en agua

## RESUMEN

Isaac Enrique Díaz Ramos

Fecha de Graduación: Enero, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Expresión, purificación, caracterización y evaluación biológica y toxicológica del factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante.

Número de páginas: 97

Candidato para el grado de Maestría en  
Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Biotecnología farmacéutica

**Propósito y Método del Estudio:** La neutropenia febril es un padecimiento común en pacientes en tratamiento de quimioterapia con una tasa de mortalidad del 9.5%. Este padecimiento se caracteriza por la disminución en el conteo de neutrófilos en sangre. Estimaciones a nivel mundial calculan que este padecimiento está presente en un 50% de pacientes con algún tumor sólido y en un 85% de pacientes con alguna deficiencia hematológica.. El factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF) es una hormona de

origen proteico, la cual promueve la diferenciación de células precursoras en médula ósea a granulocitos y su activación.

El principal problema con la producción de proteínas recombinantes es la purificación y caracterización de las mismas, por ello es que se utilizan proteínas de fusión durante su expresión encargadas de conferir mejores cualidades a la proteína de interés para su expresión y purificación.

Durante este trabajo se llevó a cabo la expresión y purificación de hG-CSF recombinante por medio de dos proteínas de fusión: SmbP y CusF; buscando obtener una actividad biológica equiparable al hG-CSF que se encuentra comercialmente.

Se planteó la siguiente hipótesis: por medio de las proteínas de fusión CusF y SmbP se producirá hG-CSF recombinante en *Escherichia coli* con actividad biológica comparable al producto farmacéutico comercial. La metodología consistió en: 1) La obtención y amplificación del gen del hG-CSF, 2) construcción de plásmidos de hG-CSF con CusF y SmbP, 3) Propagación del plásmido en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, 4) Extracción del ADN plasmídico y expresión de proteínas en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, 5) Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, 6) Remoción de proteína de fusión, 7) Ensayo de actividad biológica en sangre de hG-CSF, y 8) Ensayo de citotoxicidad en células de Hígado de Chang de hG-CSF.

**Contribuciones y Conclusiones:** El uso de proteínas de fusión, SmbP y CusF, mejoran la expresión de hG-CSF soluble como se observó en los resultados obtenidos donde la banda de expresión del hG-CSF con proteína de fusión eran mayores que las del hG-CSF con un His-tag. Además, es viable el

uso de cromatografía de afinidad para la purificación de las proteínas SmbP-hG-CSF con Ni(II) mostrando una elevada pureza. El sistema de expresión de hG-CSF con SmbP mejora niveles de pureza en comparación con el sistema con CusF que utiliza Cu(II). También se concluyó que la remoción de la proteína de fusión no afecta la estructura terciaria del hG-CSF al conservarse su actividad biológica. Asimismo, el hG-CSF producido a partir de SmbP es comparable en su actividad biológica al filgrastim al observarse un aumento en el porcentaje de neutrófilos en sangre, lo cual indica que la proteína obtenida se encuentra en forma activa. Adicionalmente, el hG-CSF producido a partir de SmbP no es tóxico a células de hígado de Chang en las concentraciones evaluadas, mostrando valores de viabilidad celular comparables al filgrastim comercial.

Finalmente, el hG-CSF obtenido con el sistema de expresión-purificación de SmbP es equiparable al filgrastim comercial, siendo este sistema de expresión y purificación una opción viable para la producción de biofármacos con valor comercial.

# Capítulo 1

## 1. INTRODUCCIÓN

El factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF) es una proteína que controla la producción, diferenciación y función de los granulocitos, los cuales forman el 70% de los glóbulos blancos en sangre de una persona en condiciones sanas (Bath & Sprigg, 2012). El hG-CSF fue aprobado para el tratamiento de neutropenia febril (FN), un desorden que consiste en un conteo bajo de neutrófilos en sangre ( $<500000/\text{cm}^3$  de sangre) (PLM, 2014). La FN es considerada una consecuencia del tratamiento de quimioterapia mielosupresiva, la cual resulta usualmente en hospitalización para el tratamiento con antibióticos intravenosos (O'Brien, et al., 2014). La incidencia de la FN varía alrededor del mundo, puede ser tan baja como el 6% (cáncer de mama) hasta el 22% (Linfoma No Hodgkin) (Pettengall, et al., 2008). De hecho, se estima que más del 50% de pacientes con tumores sólidos y más del 80% de

pacientes con neoplasias hematológicas sufren FN tras su tratamiento de quimioterapia (Freifeld, et al., 2011). El G-CSF puede reducir la duración y severidad del periodo neutropénico (Pettengall, et al., 2008).

Inicialmente, el G-CSF fue introducido en la práctica clínica en 1991, fue purificado a partir de una línea celular de tumor que secretó continuamente dicha proteína (Nomura, et al., 1986). Sin embargo, con el avance del tiempo y la tecnología, se han desarrollado otras maneras biotecnológicas para su producción, las cuales han llevado hasta la expresión de hG-CSF en la levadura *Pichia pastoris* (Lasnik, et al., 2001) o en la bacteria *Escherichia coli* (Bich, et al., 2014).

Al ser un fármaco de origen proteico y producido por técnicas de biotecnología moderna, el G-CSF puede ser considerado un biofármaco. El término “biofármaco” se originó en los años 80’s, y llegó para describir la clase de proteínas o ácidos nucleicos como productos farmacéuticos, usados con propósitos terapéuticos o diagnóstico *in vivo*, y son producidos por técnicas de biotecnología moderna: vía ingeniería genética o tecnología del hibridoma (Walsh, 2007). Durante los años 90’s el concepto de medicamento de ácido nucleico para el uso de terapias génicas y tecnologías antisensitivas comenzaron a destacar en el área farmacéutica (Knäblein, 2005). Su aplicación se encuentra en terapias hormonales o anticancerígenos, sin embargo, el desarrollo y producción de éstos resulta ser muy costoso, por lo que es importante optimizar sus sistemas de expresión y purificación (Vogl, et al., 2013).



El G-CSF producido por tecnología recombinante incluye lenograstim (producido en células de ovario de hámster chino) y filgrastim (producido en *E. coli*), ambas tienen uso clínico en Europa y son de estructura conocida. El G-CSF ha sido aprobado en Estados Unidos, por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA), además de utilizarse para reducir la incidencia de infecciones manifestadas por neutropenia en pacientes a los que se les administraron medicamentos anticancerígenos mielosupresivos, también se estudia la posibilidad de usarse para mejorar la cognición y el perfil de conducta neuronal (Prakash, et al., 2013). Se han reportado estudios donde se ha expresado, purificado y caracterizado satisfactoriamente G-CSF en *Escherichia coli*, el proceso de purificación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Esto es un proceso de vital importancia, pues es necesario realizar la separación de las isoformas de la proteína y de otras proteínas que naturalmente puede expresar *E. coli* (Chang, et al., 2013).

La riqueza en productos y metodologías para la producción y purificación de proteínas recombinantes ha aumentado en años recientes. Esto ha contribuido al crecimiento en el uso de proteínas recombinantes en la investigación académica y aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, así como a nivel industrial (Demain & Vaishnav , 2009). Estas proteínas se producen por tecnología de ADN recombinante en sistemas heterólogos (Schumann & Ferreira, 2004), lo cual incluye la clonación de un gen específico que codifica para la proteína de interés en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible. El sistema de producción depende de la naturaleza de la proteína de interés (Terpe, 2006). Con la biotecnología, cualquier biofármaco

puede ser modificado genéticamente usando la fusión celular o la tecnología de ADN recombinante. Una de las ventajas de los biofármacos obtenidos por dicha tecnología es que presentan menos efectos adversos y hay un efecto más potente en la célula diana (Terpe, 2006). La producción de proteínas recombinantes de forma altamente pura y bien caracterizada se ha convertido en uno de los principales desafíos de la industria farmacéutica. Se han desarrollado diferentes estrategias para producir proteínas recombinantes a gran escala, una de ellas es mediante el uso de proteínas de fusión que posteriormente deben ser removidas en la purificación de la proteína de interés (Terpe, 2006).

La tecnología del ADN recombinante tiene un impacto positivo cuádruple sobre la producción de proteínas de importancia farmacéutica: Supera el problema de disponibilidad de la fuente, soluciona los problemas de seguridad del producto, provee una alternativa para la extracción directa de una fuente inapropiada o peligrosa, y facilita la generación de proteínas terapéuticas mostrando algunas ventajas sobre el producto de la proteína nativa (Walsh, 2007).

La llegada de la ingeniería genética y la tecnología de anticuerpos monoclonales apuntalaron el establecimiento de cientos de compañías biofarmacéuticas a finales de los años 1970s y principios de los años 1980s. La mayoría de estas compañías se encontraban en Estados Unidos, pero también se encontraban compañías en Europa y algunas otras regiones del planeta. Las farmacéuticas de aquella época, que ya se encontraban bien establecidas, optaron por desarrollar en poca medida la investigación biotecnológica. Sin

embargo, con el significado actual y la gran promesa que representan los productos biotecnológicos, es evidente que estas empresas bien establecidas se diversificaron dentro del área. Estas empresas tienen el poder económico para desarrollar nuevos productos farmacéuticos, a partir de investigaciones desarrolladas dentro o fuera de sus empresas. Aproximadamente uno de cada cuatro nuevos fármacos que se encuentran en el mercado, es un biofármaco. Estos productos son hormonas, factores sanguíneos, agentes trombolíticos, vacunas y anticuerpos monoclonales, en su mayoría, aunque también se están desarrollando biofármacos de origen ácido nucleico (Walsh, 2007).

La mayoría de los primeros biofármacos aprobados simplemente sustituían proteínas, por ejemplo, los factores sanguíneos o la insulina. El desarrollo de las técnicas para alterar secuencias de aminoácidos de una proteína implica un incremento en el entendimiento de la relación entre la estructura de la proteína y su función, lo anterior ha facilitado la llegada de varias proteínas terapéuticas. Hasta ahora, la gran mayoría de las proteínas recombinantes aprobadas son producidas a partir de la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o en líneas celulares animales como: células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de hámster bebé (BHK) (Walsh, 2007).

Siendo *E. coli* de los primeros hospederos, es también de los más ampliamente usados para la producción de proteínas heterólogas (Terpe, 2006). El sistema recombinante es construido invariablemente por la introducción de un gen o ADN que codifique para una proteína de interés bien caracterizada dentro de una célula productora. Varios microorganismos

representan sistemas de producción potencial atractivos para las proteínas terapéuticas. Estos microorganismos pueden ser cultivados a gran escala, sin que esto represente un gran costo económico y en un tiempo corto, por métodos estándar de fermentación. Las condiciones de producción pueden ser construidas en cualquier lugar del mundo, y la escala de producción puede variar según se requiera. La expresión de proteínas recombinantes en células, las cuales no las producen naturalmente, es conocida como producción de proteínas heterólogas. El primer biofármaco producido por ingeniería genética y ser aprobado, en 1982, fue la insulina humana recombinante producida en *E. coli*. Como un sistema de producción recombinante, *E. coli* muestra varias ventajas, entre las que se pueden enlistar:

- *E. coli* ha funcionado como un sistema modelo para el estudio relacionado con la genética procariota. En biología molecular está bien caracterizado.
- Se pueden alcanzar altos niveles de expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* recombinante. Promotores de alta expresión pueden asegurar que los niveles de expresión de la proteína recombinante alcancen niveles superiores al 30% de toda la proteína producida.
- *E. coli* puede crecer rápidamente en un medio relativamente sencillo y barato, y los métodos de fermentación adecuados están bien establecidos.

Estas ventajas, en especial la fácil manipulación genética, le ha dado a *E. coli* el honor de ser el sistema de producción de biofármacos primario por

varios años. Sin embargo, *E. coli* también muestra ciertos inconvenientes como productor de biofármacos, estos pudieran ser: las proteínas heterólogas se acumulan intracelularmente, la incapacidad de hacer modificaciones post traduccionales a las proteínas o la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en su superficie. La gran mayoría de las proteínas sintetizadas por *E. coli* son de forma intracelular. Son pocas las proteínas que son exportadas al periplasma o llevadas hacia el exterior de las células. Por tanto, las proteínas heterologas expresadas en *E. coli* se acumulan en el citoplasma de la célula. La producción de proteínas intracelulares complica el proceso sobre la corriente (downstream): se requieren pasos adicionales en el proceso primario y son necesarios procesos de purificación cromatográficos más extensos con el fin de separar la proteína de interés de las diferentes proteínas homólogas adicionales que son producidas por *E. coli* (Walsh, 2007).

Otra desventaja que presenta la expresión de las proteínas heterólogas intracelular en *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión. Sin embargo, la formación de cuerpos de inclusión presenta una ventaja en el procedimiento: facilita la obtención de cierto grado de purificación con un paso sencillo de centrifugación. De cualquier manera, se busca evitar la formación de los cuerpos de inclusión cuando se expresan proteínas heterólogas en *E. coli*. Algunos estudios han mostrado que una simple reducción en la temperatura del crecimiento bacteriano (de 37 °C a 30 °C) puede ser suficiente para un decrecimiento importante en la formación de cuerpos de inclusión. Otros estudios han mostrado que la expresión de la proteína de interés junto a una proteína de fusión homóloga a la bacteria elimina la formación de cuerpos de

inclusión en la mayoría de las instancias. Se han hecho experimentos para probar diferentes proteínas de fusión evaluando el porcentaje de expresión, así como, la solubilidad de la proteína expresada. Algunos ejemplos pudieran ser: His6, Trx, GST, PDib'a', MBP, PDI o NusA (Bich, et al., 2014).

En el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica se lleva a cabo el desarrollo de nuevas proteínas de fusión aplicadas a la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Estas proteínas, llamadas CusF y SmbP, son proteínas pequeñas de origen bacteriano (*E. coli* y *Nitrosomonas europaea*, respectivamente) que regulan las concentraciones de metales tóxicos (cobre y plata) dentro de la célula. CusF y SmbP han mostrado altos niveles de expresión utilizando proteínas reporteras, por lo que son capaces de expresar cantidades considerables de proteínas solubles y activas. Además, estas proteínas de fusión permiten la purificación de las proteínas recombinantes por medio de cromatografía de afinidad, utilizando iones de Cu(II) para CusF y iones Ni(II) para SmbP. La pureza obtenida, después de un solo paso de purificación es muy satisfactoria (aproximadamente 85% de pureza) debido al sistema diseñado para que la proteína de fusión (CusF o SmbP) sea separada de la proteína de interés por medio de la proteasa enteroquinasa.

Las proteínas de fusión para expresar hG-CSF que se utilizaron fueron SmbP y CusF. La primera posee un peso de 9.9 kDa, una estructura monomérica caracterizada por repeticiones de 10 aminoácidos y un inusual alto número de histidinas (17%). La proteína también está formada principalmente de alanina (16%), glutamato (14%), glicina (11%) y lisina (9%), siendo éstas el 67% de la composición total de aminoácidos. La proteína es de naturaleza y

diseño simple, y las predicciones de la estructura secundaria sugieren que es un complejo de cuatro hélices alfa (Brett , et al., 2004). CusF no tiene una secuencia similar con alguna otra proteína caracterizada, sin embargo, se han encontrado secuencias similares no caracterizadas en algunos marcos de lectura abiertos de otras bacterias.

Debido a los buenos resultados obtenidos con estas nuevas proteínas de fusión y a la importancia de optimizar la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante para el tratamiento de pacientes con cáncer, se busca desarrollar una nueva metodología para expresar y purificar este biofármaco por medio de las proteínas de fusión CusF o SmbP. Siendo CusF y SmbP proteínas de fusión, se puede suponer que ayudarán considerablemente a la solubilidad de G-CSF durante la expresión de éste en *E. coli*, y por medio de cromatografía de afinidad utilizando iones metálicos se contribuirá a la pureza final del biofármaco, finalmente, CusF o SmbP permitirán obtener altos rendimientos después de la separación de la proteína de fusión y G-CSF.

Tras la expresión del biofármaco por medio de las proteínas de fusión CusF y SmbP, es necesario el estudio de la actividad biológica del hG-CSF obtenido para corroborar la eficacia del mismo en comparación con medicamentos que ya se encuentran en el mercado. En este proyecto la evaluación de la actividad biológica del biofármaco se realizó en muestras de sangre esperando observar un aumento en el conteo de neutrófilos en las muestras con hG-CSF.

El hG-CSF es una glucoproteína que regula la producción y liberación de los granulocitos neutrófilos funcionales en la médula ósea. El filgrastim, G-CSF humano genotecnológico aprobado en 1991 por la FDA, aumenta considerablemente la cifra de neutrófilos en sangre periférica, en un plazo de 24 horas, con un aumento mínimo del número de monocitos. En algunos pacientes con neutropenia crónica grave, filgrastim induce asimismo un leve aumento menor del número de eosinófilos y basófilos circulantes, con respecto a los valores basales; algunos de estos pacientes pueden presentar eosinofilia o basofilia ya antes del tratamiento (Pettengall, et al., 2008).

El incremento de los neutrófilos depende de la dosis cuando el filgrastim se administra en dosis recomendadas. Los neutrófilos producidos en respuesta a filgrastim son normofuncionales o hiperfuncionales, de acuerdo con las pruebas de función quimiotáctica y fagocítica. Una vez terminado el tratamiento con filgrastim, el recuento de los neutrófilos circulantes se reduce a la mitad en los primeros días, y regresa a sus valores normales en un plazo de hasta siete días.

En este proyecto, también se requiere conocer la máxima concentración del compuesto que no altera factores que intervienen en la proliferación celular, con el fin de poder realizar otros ensayos usando dicho compuesto, pues se sabrá que la citotoxicidad no intervendrá en los resultados de los estudios. Para evaluar la citotoxicidad, se plantea utilizar células de hígado de Chang (Park, et al., 2014).



Recientemente, en 2012, se realizaron pruebas que arrojaron resultados indicando que el G-CSF afecta a las funciones de las células endoteliales vasculares y la angiogénesis vascular (Ribatti, 2012). Lo anterior ha venido a reforzar funciones conocidas desde 1988, donde se sabe que la expresión del receptor de G-CSF, en la superficie de las células endoteliales vasculares, se lleva a cabo expresando receptores específicos para G-CSF en sus superficies (Kojima, et al., 1989). G-CSF aumenta la proliferación de células endoteliales microvasculares humanas y murinas (Bocchietto, et al., 1993). Además, el efecto angiogénico de G-CSF parece estar relacionado con la insuficiencia de terapias anti-VEGF-A (anti Vascular Endothelial Growth Factor) en modelos de tumor murino (Shojaei, et al., 2009). En el 2013, Lee y colaboradores demostraron que el tratamiento con G-CSF después de la isquemia miocárdica aumenta la formación de nuevos vasos sanguíneos, mientras que, disminuye la apoptosis miocárdica (Lee, et al., 2013).

El tratamiento con G-CSF puede abarcar distintas áreas, y desde 2008 en Estados Unidos, se han aprobado siete productos farmacéuticos para las mismas indicaciones que el primer filgrastim. Aunque, estos siete biofármacos solamente representan 3 productos diferentes. El lenograstim se ha visto desplazado por el filgrastim en cuanto a su uso farmacéutico, aunque también se encuentra aprobado su uso en Europa (Gravel, et al., 2012).

Debido a la variedad de G-CSF que se encuentran en el mercado, es importante asegurar que el biofármaco obtenido cumpla con las características necesarias para una posible comercialización. El ensayo de citotoxicidad es necesario para realizar otros estudios de actividad biológica con dicho

compuesto. Para esta prueba se utilizarán células de hígado de Chang que son usadas comúnmente en este tipo de ensayos. En el 2013, Hyunfkyoung y colaboradores, realizaron un estudio de citotoxicidad comparando entre dos líneas celulares: células de hígado de Chang y células HepG2. Los resultados que obtuvieron mostraron que las células de hígado de Chang son más eficientes que las HepG2 en todas las concentraciones probadas, por lo cual se determinó que son una línea celular más eficiente para observar efectos citotóxicos (Hyungkyoung , et al., 2013).

## Capítulo 2

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1. El Factor estimulante de colonias de granulocitos como biofármaco

G-CSF es conocido por regular la proliferación de células progenitoras de neutrófilos y su diferenciación para granulocitos y neutrófilos maduros funcionalmente activos (Gascon, 2012). El gen de G-CSF existe en el cromosoma 17 que codifica dos productos de proteína debido al corte y empalme alternativo: isoforma A compuesta de 177 aminoácidos e isoforma B compuesta por 174 aminoácidos (Gravel, et al., 2012).

En 1988 Oheda y colaboradores, determinaron que lenogastrim es el que más se asemeja a la hG-CSF nativa glicosilada en Thr 133 con una cadena de azúcar que contienen varias proporciones de ácido siálico, galactosa y galactosamina (Oheda, et al., 1988); mientras que, en 1996 Hernan y colaboradores determinaron que filgrastim carece de dicha glicosilación y tienen

un grupo metionina en el N-terminal del último residuo de aminoácido como consecuencia de la expresión bacteriana (Hernan, et al., 1996). En todos los demás aspectos, filgrastim y lenograstim son estructuralmente iguales a la hG-CSF nativa.

La expresión del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos humano recombinante (rhG-CSF) en *E. coli* resulta, frecuentemente, en la formación de agregados insolubles, los cuales son llamados cuerpos de inclusión (IBs). Estos agregados son solubilizados en buffer que contiene agentes caotrópicos como la urea o cloruro de guanidina (Thomson, et al., 2012). Así, es importante renaturalizar las formas desnaturalizadas para ser formas biológicamente activas con una estructura 3D apropiada. Además, para conseguir un rhG-CSF de alta pureza, las isoformas, que son detectadas por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) durante la purificación, se deben separar por métodos adicionales (Hinderer & Scheckermann, 2012) como cromatografía de intercambio iónico (Schwanke, et al., 2009), cromatografía de interacción hidrofóbica (Wang & Geng, 2012), y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) (Chang-Kyu, et al., 2010).

En el 2013, Chang y colaboradores, reportaron detalles acerca del plegamiento, purificación y caracterización de rhG-CSF a gran escala en *E. coli*. Primero, se da la expresión de la proteína recombinante por una estrategia de cambio de temperatura sin inductor, lo cual es un método que se puede llevar a cabo para la producción a gran escala. Segundo, la purificación por un paso sencillo de HPLC después de la precipitación por pH de las muestras replegadas es suficiente para la producción en escala industrial. Además, se ha

demostrado que las isoformas de rhG-CSF pueden ser separadas durante el paso de HPLC. Es decir, se han descrito métodos y estrategias para producir proteínas recombinantes de alta pureza en una producción a gran escala (Chang, et al., 2013).

En 2014, Bich y colaboradores expresaron hG-CSF haciendo uso de diferentes proteínas de fusión: Trx, GST, PDIb'a', MBP, PDI o NusA, las cuales varían entre sí en su tamaño. En su trabajo varió condiciones de expresión como temperatura y tiempo, encontrando que para proteínas de fusión pesadas (mayores a 40 KDa) la temperatura de expresión óptima es de 30 °C, por otra parte, para proteínas de un tamaño menos a 40 KDa se encontraban mejor niveles de expresión a 18 °C. Demostrando así, que las proteínas de fusión y una temperatura de expresión baja pueden ser usadas satisfactoriamente para expresar hG-CSF soluble (Bich, et al., 2014).

## 2.2. Proteínas de fusión: SmbP y CusF

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de fusión son un enfoque empleado en el desarrollo y producción de sistemas de expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico. Se han reportado diversas aplicaciones de las proteínas de fusión en la biotecnología, estas incluyen la facilitación de la purificación de la proteína de interés, permitir la expresión de proteínas sobre la superficie celular, reducir la pérdida de la proteína de interés debido a la proteólisis, la construcción de moléculas reporteras para el monitoreo de la expresión de genes y la localización de proteínas así como para

incrementar la circulación y la vida media de las proteínas con fines terapéuticos.

### 2.2.1. CusF

CusF es una proteína que se encuentra en el periplasma de *E. coli* y está encargada de regular las concentraciones de iones metálicos tóxicos, como Cu(I) y Ag(I) (Loftin , et al., 2005). Los altos niveles de expresión de CusF han sido determinados utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína reportera de expresión y plegamiento, y comparándola con otras cuarenta proteínas. Se encontró que CusF-GFP obtuvo los niveles más altos de fluorescencia, es decir, CusF fue la proteína que produjo más GFP plegada correctamente (Zárate, et al., 2010).

En el 2006, Kittleson y colaboradores encontraron que CusF puede funcionar como una metalochaperona, uniéndose a metales desde el periplasma hacía un canal en la bomba de salida para ser exportada de la célula (Kittleson, et al., 2006). Sin embargo, no se han encontrado reportes acerca del uso de esta proteína de fusión para la síntesis de biofármacos. Sin embargo, se trata de una proteína prometedora dada sus características para aumentar el nivel de expresión, su capacidad para purificarse por cromatografía de afinidad y su bajo peso molecular de apenas 10 kDa

### 2.2.2. SmbP

SmbP (nombre por sus siglas en inglés Small Metal Binding Protein) pertenece a la familia de las metalohistinas, una clase de proteínas pequeñas y

ricas en histidina, que son capaces de unir múltiples iones metálicos. SmbP fue aislada de *Nitrosomonas europaea* y caracterizada hace más de diez años (Brett, et al., 2004). SmbP posee aproximadamente un átomo de cobre unido por molécula de proteína aunque es capaz de unirse con hasta 6 átomos de Cu(II). Y a diferencia de CusF que principalmente ha sido estudiada por su unión a iones de plata y cobre, con SmbP hay algunos estudios que han demostrado que además de Cu(II) es capaz de unirse a múltiples metales atómicos, incluyendo Mn(II), Ni(II), Mg(II), y Zn(II), así como Fe(III) (Brett , et al., 2004).

### 2.2.3. Purificación de proteínas de fusión

La purificación de proteínas se ha convertido en una amplia área de investigación debido la variable aplicación de las proteínas en diversas áreas, como puede ser biotecnología, medicina e investigación, entre otras.

Con el paso del tiempo y el desarrollo de la biología molecular, el proceso de obtención de una proteína específica se ha facilitado. Es también por ello que se han ido facilitando los medios para la purificación de proteínas, como lo es el uso de proteínas de fusión. La purificación depende principalmente de ciertas características que poseen las proteínas, como pueden ser: solubilidad, carga, tamaño, interacciones específicas o quizás algunas propiedades especiales como el resistir temperaturas por encima del promedio de otras proteínas, entre otras (Cutler, 2004).

Dependiendo de las características de la proteína que se trabaje, se pueden utilizar diversos métodos de uso común en los laboratorios para su

aislamiento y purificación. Esto depende también de la finalidad que tenga esta proteína: el uso que se le dará, la actividad biológica esperada, el grado de pureza requerido o los recursos disponibles para el proceso (Cutler, 2004).

Los métodos de purificación se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo de las propiedades de la proteína: características de la membrana, forma y tamaño, carga neta y biopropiedades (Ausubel, 2003). Biopropiedades es característico de las técnicas de cromatografía de afinidad.

#### 2.2.4. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa proteínas basándose en las interacciones reversibles de una proteína (o grupo de proteínas) y un ligando específico unido a una matriz cromatográfica. La técnica ofrece alta selectividad, por lo tanto, alta resolución (Turková, 1978).

La cromatografía de afinidad es única en tecnología de purificación, ya que es la única técnica que permite la purificación de biomoléculas en base a sus funciones biológicas o su estructura química individual. Algunas interacciones biológicas típicas, usadas frecuentemente en cromatografía de afinidad son:

- Enzima <-> Sustrato análogo, inhibidor, cofactor.
- Anticuerpo <-> antígeno, virus, célula.
- Lectina <-> polisacárido, glicoproteína, receptor en superficie celular, célula.



- Ácido nucleico <-> secuencia de base complementaria, histonas, ADN o ARN polimerasa, proteínas de unión a ácidos nucleicos.
- Hormonas, vitaminas <-> receptor, proteína acarreadora.
- Glutación <-> glutación-S-transferasa o proteína de fusión GST.
- Iones metálicos <-> proteínas de fusión con polihistidinas, proteínas nativas con residuos de histidina, cisteína o triptófano en su superficie.

Las proteínas y péptidos que tienen afinidad para iones metálicos pueden ser separados usando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (por sus siglas en inglés IMAC) (General Electric, 2007).

#### 2.2.4.1. Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados

Durante este proceso cromatográfico los metales son inmovilizados dentro de un medio cromatográfico por quelación. Ciertos aminoácidos, por ejemplo, histidinas y cisteínas, forman complejos con los metales en un pH neutral (pH 6-8) y es principalmente el contenido de histidina de una proteína el cual es responsable por la unión a los metales quelados. Esta técnica es excelente para purificar proteínas de fusión recombinantes así como otras proteínas naturales. Los iones metálicos usados comúnmente son iones divalentes como Ni(II), Zn(II), Cu(II), Ca(II), Co(II) o Fe(II) (Kline, 1993).

Estudios previos han demostrado que se puede purificar SmbP y CusF por medio de este tipo de cromatografía, usando iones de Ni(II) y Cu(II), respectivamente (Vargas-Cortez, et al., 2015).

#### 2.2.4.2. Purificación por medio de cromatografía de líquidos de proteínas rápida (FPLC)

El sistema FPLC es una variante del HPLC que permite una alta resolución gracias al diámetro pequeño de las fases estacionarias. La principal diferencia entre FPLC y HPLC radica en la presión a la que es sometido el sistema, en HPLC se usan presiones por encima de 400 bar, lo cual es considerada una presión alta. Por otra parte, FPLC se somete a presiones bajas, permitiendo recolectar una alta cantidad de proteínas (Madadlou, 2011).

El FPLC está diseñado para permitir la separación de proteínas conservando su configuración nativa activa. El sistema FPLC permite usar una amplia variedad de técnicas cromatográficas como: intercambio iónico, quimioenfoque, filtración por gel, fase reversa, interacciones hidrofóbicas, entre otras.

## Capítulo 3

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

Por medio de las proteínas de fusión CusF y SmbP se producirá hG-CSF recombinante en *Escherichia coli* con actividad biológica comparable al producto farmacéutico comercial.

#### 3.2. Objetivo General

Desarrollar una tecnología para la producción, purificación y caracterización de G-CSF recombinante activo utilizando SmbP o CusF como proteína de fusión y *Escherichia coli* como organismo hospedero para posterior análisis de la actividad biológica y citotóxica.

#### 3.3. Objetivos Específicos

- Sintetizar el gen G-CSF por medio de PCR para optimizar su producción en *Escherichia coli*.
- Construir plásmidos para la expresión y purificación de G-CSF recombinante por medio de SmbP o CusF.
- Purificar G-CSF recombinante por cromatografía de afinidad, intercambio iónico y exclusión.
- Evaluar la actividad biológica de G-CSF recombinante en muestras de sangre humana.
- Evaluar la toxicidad en células de hígado de Chang mediante ensayo con WST-1.

## Capítulo 4

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1. Material, equipo y ubicación del equipo.

Los equipos que se mencionarán a continuación se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, en Laboratorio de Biotecnología 2 y Laboratorio de Biotecnología 3 en División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés se utilizó el termociclador Corbett Research, modelo CG1-96. El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo utilizando una incubadora con agitación marca LabTech, modelo LSI-3016. Para la recolección de los sedimentos celulares se utilizó una microcentrífuga marca Thermo Scientific y una ultracentrífuga Sorval Lynx de Thermo Scientific. Para la visualización de la amplificación de los genes de interés, el análisis de restricción por medio de

geles de agarosa y las electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturizante se llevaron a cabo utilizando una cámara de electroforesis marca BioRad. La purificación de las proteínas se realizó utilizando el equipo ÄKTA Primeplus, cromatógrafo especializado para purificar proteínas (FPLC), marca General Electric, ubicado en el Laboratorio de Biotecnología 2.

Los materiales empleados en este proyecto incluyen: tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL marca Axygen, puntillas para micropipeta de volumen: 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L marca Rainin, tubos falcon de 15 mL y 50 mL marca Corning, tubos de cultivo con tapón de rosca marca KIMAX, matraces de 125 mL y 250 mL marca Pyrex y matraces para triptinización de 500 mL marca KIMAX.

El gen correspondiente a la proteína hG-CSF fue sintetizado por GenScript. Los iniciadores para los genes que codifican para las proteínas, SmbP-G-CSF y CusF-G-CSF fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies. Los reactivos para PCR correspondían a las marcas Thermo Scientific y Sigma Aldrich, mientras que las enzimas de restricción fueron de las marcas Thermo Scientific y New England Biolabs. La enzima T4 ADN ligasa fue de la marca Thermo Scientific o Invitrogen.

Para la purificación de las proteínas se utilizaron las siguientes columnas comerciales: HiTrap™ HP para Cromatografía por Afinidad, HiTrap™ Q FF para Cromatografía por Intercambio Iónico y Superdex 200 Increase 100/300 GL para Cromatografía por Exclusión de la marca GE Healthcare.

Para las biometrías hemáticas de la actividad biológica se utilizó el equipo ADVIA™ 60 Hematology System de Bayer® del Laboratorio de Análisis

Clínicos Q.F.B. Iris Guajardo Guajardo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para la evaluación toxicológica del G-CSF fue necesaria la siguiente línea celular.

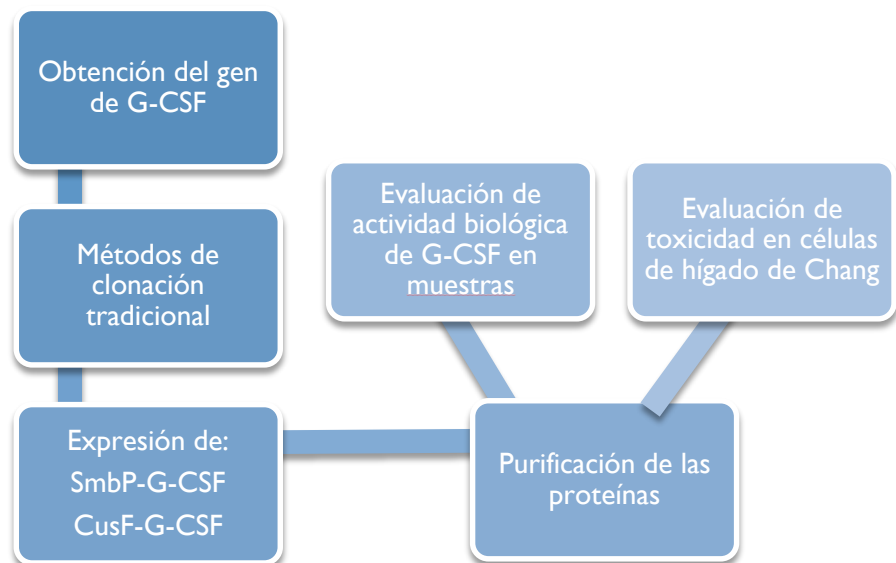
► Para estudio de citotoxicidad y viabilidad celular:

Línea celular: HeLa [Chang Liver] (ATCC® CCL-13™)

Organismo: Humano

#### 4.2. Metodología General

A continuación se representa la metodología general a llevar a cabo durante este proyecto.



#### 4.3. Amplificación de insertos

Se diseñaron los diferentes iniciadores delanteros y reversos para cada uno de los genes a amplificar: SmbP-G-CSF y CusF-G-CSF. Los iniciadores fueron diseñados incluyendo el sitio de corte para NdeI y KpnI para CusF y SmbP; NcoI y XhoI para G-CSF. La concentración final para cada uno de los iniciadores fue de 20 pmoles/ $\mu$ L.

*Tabla 1. Iniciadores usados para la amplificación de G-CSF.*

Iniciador	Secuencia de nucleótidos	Enzima de restricción
Delantero	5'-AGT CAG TCA <b>CCA TGG</b> GAA CCC CAC TGG G-3'	<b>Nco I</b>
Reverso	5'-AGT CAG TCA <b>CTC GAG</b> TTA AGG CTG AGC C-3'	<b>Xco I</b>

La reacción para la amplificación se llevó a cabo en tubos para PCR de 200  $\mu$ L. Para la amplificación de SmbP-G-CSF y CusF-G-CSF se utilizó la Accutaq ADN polimerasa de Sigma Aldrich.

En las siguientes tablas se muestran las cantidades de reactivos utilizados para cada reacción de PCR, junto con las condiciones de la reacción en el termociclador.



*Tabla 2. Componentes y condiciones para la amplificación de G-CSF.*

Reactivo	Cantidad	Condiciones
<b>ADN Molde</b>	1 $\mu$ L (50 ng)	
<b>dNTP's</b>	1.0 $\mu$ L	Desnaturalización Inicial: 95 °C por 2 minutos
<b>Iniciador delantero</b>	3 $\mu$ L (60 pmol)	
<b>Iniciador reverso</b>	3 $\mu$ L (60 pmol)	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
<b>Amortiguador de reacción 10x</b>	5 $\mu$ L	Alineamiento: 59 °C por 1 minuto
<b>ADN polimerasa</b>	0.5 $\mu$ L	Elongación: 72 °C por 1.20 minutos
<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	36.5 $\mu$ L	30 ciclos
		Elongación Final: 72 °C por 5 minutos

#### 4.4. Construcción de plásmidos

La construcción de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el método de clonación clásico: digestión, ligación, transformación y selección de transformantes para todas las construcciones de ADN. Se utilizó como vector el plásmido pET-30a(+), resistente a kanamicina y el cual contiene la secuencia del sitio de unión a la enteroquinasa, sitio de corte entre nuestras proteínas de fusión y hG-CSF.

Previo a la digestión, el ADN amplificado fue extraído mediante la técnica de extracción en gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

#### 4.4.1. Digestión de plásmido pET-30a(+), SmbP, CusF y hG-CSF

La digestión se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción NcoI (NEB) y XhoI (NEB) para G-CSF. Y las enzimas NdeI (Sigma Aldrich) y KpnI (NEB) para SmbP y CusF.

*Tabla 3. Componentes y condiciones para la digestión de plásmido pEt-30a(+).*

Componente	Cantidad	Condiciones
<b>Plásmido (1000 ng)</b>	18 $\mu$ L	
<b>Solución amortiguadora 10x</b>	3 $\mu$ L	Incubación a 37 °C por 1 hora
<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	4 $\mu$ L	
<b>Enzima Nde I</b>	1 $\mu$ L	
<b>Enzima Xho I</b>	1 $\mu$ L	Incubación 37 °C por 1 hora
<b>SAP</b>	1 $\mu$ L	Incubación 37 °C por 30 minutos

*Tabla 4. Componentes y condiciones para la digestión de G-CSF.*

Componente	Cantidad	Condiciones
<b>Inserto</b>	30 $\mu$ L	Incubación 37 °C por 1 hora
<b>Solución amortiguadora 10x</b>	4 $\mu$ L	
<b>Enzima Nco I</b>	1 $\mu$ L	
<b>Enzima Xho I</b>	1 $\mu$ L	
<b>BSA</b>	4 $\mu$ L	

*Tabla 5. Componentes y condiciones para la digestión de SmbP y CusF.*

Componente	Cantidad	Condiciones
<b>Inserto</b>	30 $\mu$ L	Incubación a 37 °C por 1 hora y purificar ADN.
<b>Solución amortiguadora 10x</b>	4 $\mu$ L	
<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	5 $\mu$ L	
<b>Enzima KpnI</b>	1 $\mu$ L	
<b>Enzima NdeI</b>	1 $\mu$ L	

Una vez finalizada la digestión, se realizó la purificación usando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

#### 4.4.2. Ligación de plásmido pET-30a(+) con insertos

La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando 2  $\mu$ L del plásmido pET-30a(+), 1  $\mu$ L de solución amortiguadora de ligación 10x, 1  $\mu$ L de T4 ADN ligasa (Thermo Scientific), 0-4  $\mu$ L de inserto y de 2-6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L. Dichas reacciones fueron incubadas a 25 °C por 1 hora y posteriormente fueron almacenadas a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente la ligasa fue desactivada mediante incubación a 65 °C por 10 minutos. Para las ligaciones que se realizaron usando la T4 ADN ligasa de Invitrogen se utilizaron 2  $\mu$ L de la solución amortiguadora de ligación 5x. Utilizando esta ligasa no fue necesario desactivar la enzima.

#### 4.4.3. Transformación en *E. coli* cepa DH5 $\alpha$

La transformación se llevó a cabo en células rubidio-competentes de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , en un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5  $\mu$ L del producto de ligación más 50  $\mu$ L de las células, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44 °C por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800  $\mu$ L de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 minutos, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 100  $\mu$ L del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/kanamicina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

#### 4.4.4. Selección de transformantes y extracción de ADN plasmídico

De las placas con LB/kanamicina que fueron sembradas previamente se seleccionaron varias colonias y se inocularon en 6 mL de caldo LB/kanamicina y se cultivaron a 37°C con agitación (200 rpm) por 16 horas. Posteriormente se recolectaron las células en tubos eppendorf de 1.5 mL mediante centrifugación a 13,300 rpm por 2 minutos. Una vez obtenido el sedimento celular se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.

#### 4.4.5. Análisis por PCR para confirmar ligación

Utilizando el ADN plasmídico previamente extraído se realizó un análisis por PCR para confirmar la presencia del inserto SmbP-G-CSF y CusF-G-CSF.

*Tabla 6. Reactivos y condiciones para análisis por PCR de la ligación.*

Reactivo	Cantidad	Condiciones
<b>ADN Molde</b>	1 $\mu$ L (50 ng)	
<b>dNTP's</b>	1.0 $\mu$ L	Desnaturalización Inicial: 95 °C por
<b>Iniciador delantero de proteína de fusión</b>	3 $\mu$ L (60 pmol)	2 minutos
<b>Iniciador reverso de G-CSF</b>	3 $\mu$ L (60 pmol)	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
<b>Amortiguador de reacción 10x</b>	5 $\mu$ L	Alineamiento: 59 °C por 1 minuto
<b>ADN polimerasa</b>	0.3 $\mu$ L	Elongación: 72 °C por 1.05 minutos
		30 ciclos

<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	36.7 $\mu$ L	Elongación Final: 72 °C por 5 minutos
--------------------------	--------------	---------------------------------------

#### 4.5. Expresión de proteínas

Tras la confirmación de la presencia de los insertos dentro del plásmido, se realizó la expresión de las proteínas en la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

##### 4.5.1. Transformación en *E. coli* BL21(DE3)

Utilizando el ADN plasmídico positivo en el análisis de restricción se llevó a cabo la transformación en la cepa *E. coli* BL21(DE3) la cual se utiliza para la expresión de proteínas. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20  $\mu$ L de células rubidio-competentes más 1  $\mu$ L (50 ng) de ADN plasmídico, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44°C por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800  $\mu$ L de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 min, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 50  $\mu$ L del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/kanamicina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

#### 4.5.2. Expresión piloto

Las expresiones piloto son una herramienta que se utiliza con el objetivo de corroborar la expresión de la proteína de interés, mediante su visualización en geles de poliacrilamida. De las placas con células transformadas, se tomaron diversas colonias las cuales fueron sembradas en un tubo con 2 mL de caldo LB/kanamicina y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que alcanzaran una  $DO_{600}$  entre 0.4 – 0.6, cuando los inóculos alcanzaron esta  $DO_{600}$  se agregaron 2  $\mu$ L de Isopropil-  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M alcanzando una concentración final de 1 mM; después se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) por 4 horas.

Para la preparación de las muestras se comenzó con la recolección del sedimento celular. En un tubo eppendorf de 2.0 mL se centrifugaron las células a 13,300 rpm por 2 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 120  $\mu$ L de  $H_2O$  ultrapura después se agregaron 40  $\mu$ L de solución amortiguadora para la muestra, se mezcló y se llevó a hervir por 10 minutos. Finalmente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 10 minutos.

Para la visualización de la expresión de las proteínas de interés, se corrió un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (SDS-PAGE) al 12%. Una vez terminada la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con Azul de Coomassie.

#### 4.5.3. Escalamiento de la expresión de proteínas

De las expresiones piloto se eligió la colonia que mostraba mejor expresión de las proteínas de interés. La expresión se llevó a cabo en matraces triptinizados de 500 mL hasta completar un volumen de expresión final de 2.5 litros.

En un matraz triptinizado de 500 mL se agregaron 125 mL de caldo LB con 125  $\mu$ L de kanamicina 3 mg/mL. Los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente crecido de la colonia seleccionada. Los matraces se incubaron a 37 °C con agitación constante (200 rpm) hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0.4 – 0.6, una vez alcanzada esta  $DO_{600}$  se comenzó la inducción con 125  $\mu$ L de IPTG 1M a 30 °C con agitación constante (200 rpm) por 4 horas. Posteriormente se recolectó el sedimento celular en frascos de plástico de 500 mL utilizando una centrifuga refrigerada a 4 °C, 8,000 rpm por 15 min. Finalmente los frascos con el sedimento celular se congelaron a -20 °C.

#### 4.6. Purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas se utilizaron dos técnicas cromatográficas: la primera mediante Cromatografía por Afinidad a la proteína de fusión y la segunda por Cromatografía por Intercambio Iónico del tipo Aniónico.

##### 4.6.1. Lisis celular y obtención de clarificados

El sedimento obtenido de la expresión de las proteínas de interés fue resuspendido en 30 mL de la solución amortiguadora de unión (50 mM TRIS, 500 mM NaCl pH 8.0). Las células resuspendidas en 50 mM TRIS, 500 mM NaCl pH 8.0 fueron lisadas utilizando una cámara de lisado con perlas de vidrio. El lisado obtenido fue centrifugado a 12,000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación se separó el clarificado para su purificación.

##### 4.6.2. Cromatografía de afinidad para SmbP-G-CSF



La purificación mediante cromatografía por afinidad se llevó a cabo utilizando la columna comercial HisTrap HP 1 mL de GE Healthcare Life Sciences.

Para esta cromatografía se utilizaron tres tipos de soluciones amortiguadoras: la primera, que corresponde a una solución amortiguadora de unión; la segunda, que corresponde a una solución amortiguadora de lavado; y la tercera, que es una solución amortiguadora de elución. La composición de cada una de ellas se describe en las siguientes tablas.

*Tabla 7. Composición de solución amortiguadora de unión.*

Componente	Concentración
TRIS	50 mM
NaCl	500 mM
pH 8.0	

*Tabla 8. Composición de solución amortiguadora de lavado.*

Componente	Concentración
TRIS	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	1 mM
pH 8.0	

*Tabla 9. Composición de solución amortiguadora de elución.*

Componente	Concentración
------------	---------------

TRIS	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	250 mM
pH 8.0	

El proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos rápido de proteínas ÄKTA Prime Plus de GE Health Care. El primer paso fue equilibrar la columna con 5 mL de la solución amortiguadora de lavado. Una vez terminado el equilibrio de la columna, se procedió con el cargado de la muestra a la columna. Cuando la muestra se inyectó a la columna, el valor de absorbancia disminuyó hasta hacerse constante usando la solución amortiguadora de lavado. Una vez que la absorbancia fue constante, se procedió a eluir la proteína con la solución amortiguadora de elución. Las fracciones obtenidas donde se observó un aumento de absorbancia en el cromatograma, fueron analizadas por SDS-PAGE para corroborar la presencia de la proteína de interés.

#### 4.6.3. Cromatografía de afinidad para CusF-G-CSF.

La purificación mediante cromatografía por afinidad se llevó a cabo utilizando la columna comercial HisTrap HP 1 mL de GE Healthcare Life Sciences con un tratamiento previo para cargar la columna con el ión Cu(II). Las soluciones amortiguadoras para el proceso de purificación corresponden a las mismas soluciones en el proceso de cromatografía de afinidad para SmbP-G-CSF y con la misma función.

El proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos rápido de proteínas ÄKTA Prime Plus de GE Health Care. El primer paso fue equilibrar la columna con 5 mL de la solución amortiguadora de lavado. Una vez terminado el equilibrio de la columna, se cargó la muestra en la columna. Cuando la muestra se inyectó a la columna, el valor de absorbancia disminuyó hasta hacerse constante usando la solución amortiguadora de lavado. Una vez sucedido lo anterior, se procedió a eluir la proteína con la solución amortiguadora de elución y se recolectaron fracciones de 500 µL. Las fracciones obtenidas donde se observaron un aumento de absorbancia en el cromatograma, se analizaron por SDS-PAGE para corroborar la presencia de la proteína de interés.

#### 4.6.4. Diálisis para la remoción de imidazol y cloruro de sodio

Las fracciones donde se encontró la proteína de interés fueron mezcladas y se llevó a cabo una diálisis para eliminar el exceso de imidazol y cloruro de sodio. Estas fracciones se colocaron en una membrana para diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y posteriormente se sumergieron en una solución amortiguadora de TRIS 50 mM pH8.0 a 4 °C con agitación constante. Se hicieron 3 diálisis de una hora cada una.

#### 4.6.5. Determinación de la concentración de proteínas.

Se utilizó el método Bradford para la cuantificación de proteínas totales. Para ello se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras a analizar utilizando una solución de 1 mg/mL de albumina de suero bovino como estándar de proteína. Se realizaron las siguientes diluciones del

estándar para la realización de la curva y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm en celdas de polipropileno.

*Tabla 10. Preparación de estándares de albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones.*

<b>Tubo</b>	<b>Volumen de estándar (µL)</b>	<b>Patrón estándar</b>	<b>Volumen de agua (µL)</b>	<b>Concentración final (µg/mL)</b>
<b>1</b>	70	Patrón 1 mg/mL	0	1000
<b>2</b>	75	Patrón 1 mg/mL	25	750
<b>3</b>	70	Patrón 1 mg/mL	70	500
<b>4</b>	35	Tubo 2	35	375
<b>5</b>	70	Tubo 3	70	250
<b>6</b>	70	Tubo 5	70	125
<b>7</b>	70	Tubo 6	70	62.5
<b>8</b>	-	-	70	0

De los tubos preparados se tomaron 20 µL y se pasaron a un microtubo de 1.5 mL donde se les añadió 1 mL de reactivo Bradford Bio Basic Canada Inc., se mezclaron adecuadamente los componentes y se trasvasaron a una celda de polipropileno, donde se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente para su lectura en el espectrofotómetro.

La muestra a analizar se midió en diferentes maneras: concentrada y diluida con agua 1:1, 1:5, 1:10 y 1:100. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de las muestras y se añadió 1 mL de reactivo Bradford. Tanto los ensayos de la muestra como los de la curva de calibración se llevaron a cabo por triplicado.

#### 4.7. Remoción de la proteína de fusión.

Para separar la proteína de fusión (SmbP y CusF) de la proteína de interés fue necesario el uso de una proteasa (Enteroquinasa) que rompiera la secuencia de aminoácidos que existe entre SmbP y CusF, y el hG-CSF.

En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de SmbP-G-CSF (fracciones obtenidas de la cromatografía por afinidad) y 5  $\mu\text{L}$  de enteroquinasa en concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La reacción se incubó a 25 °C durante 16 horas. Se hicieron muestreos de 20  $\mu\text{L}$  a la 1, 2, 4, 8 y 16 horas de incubación. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE.

Una vez que se obtuvo la correcta separación de la proteína de fusión y la proteína de interés se llevó a cabo una segunda purificación por afinidad, con el fin de separar ambas proteínas usando resina Bio-Rad Proaffinity IMAC cargada con Ni(II).

#### 4.8. Determinación de concentración de hG-CSF

El ensayo para la determinación de la concentración de hG-CSF tras la remoción de las proteínas de fusión se hizo por el método Bradford, siguiendo los pasos de la sección 4.6.5. Determinación de la concentración de proteínas.

#### 4.9. Actividad biológica en sangre

Se hizo la evaluación biológica en muestras de sangre humana con anticoagulante.

##### 4.9.1. Extracción de muestra de sangre

La extracción de sangre se hizo por venopunción en la parte interior del codo. El sitio de punción se limpió con etanol al 96 % con ayuda de una torunda.

Posteriormente, se colocó una banda elástica alrededor del antebrazo con el fin de ejercer presión al restringir el flujo sanguíneo a través de la vena.

Inmediatamente después, se introdujo una aguja en la vena y se tomó la muestra de sangre en tubos BD Vacutainer con EDTA K2. Mientras se realizó la toma de muestra se retiró la banda elástica para reestablecer el flujo sanguíneo. Al terminar de tomar de tomar la sangre, se retiró la aguja y se volvió a limpiar el sitio de punción.

##### 4.9.2. Exposición de sangre a hG-CSF

Se prepararon tres alícuotas de sangre de 2 mL en 3 tubos de ensayo con tapa diferentes:

Tabla 11. Preparación de muestras sanguíneas para estudio de actividad biológica.

	Control negativo	Biociclin (filgrastim comercial)	hG-CSF
Sangre	2 mL	2 mL	2 mL
Concentración hG-CSF	0 pg/mL	1x10 <sup>5</sup> pg/mL	1x10 <sup>5</sup> pg/mL

Los tres tubos se incubaron a 37 °C por 10 horas con agitación constante.

#### 4.9.3. Análisis de distribución de glóbulos blancos

Una vez terminado el proceso de incubación, las muestras fueron sometidas a una biometría hemática en un analizador automático de hematología para determinar la cantidad de linfocitos totales y su diferenciación entre neutrófilos, linfocitos y monocitos. Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de aumento de neutrófilos de la muestra con Biociclin y hG-CSF, con respecto al control negativo.

#### 4.10. Ensayo de citotoxicidad del hG-CSF

La actividad citotóxica se determinó en células de Hígado de Chang (ATCC: CCL-13™).

##### 4.10.1. Cultivo de líneas celulares.

Se descongelaron las células y se colocaron en frascos de cultivo agregando 4 mL de medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 10% de suero fetal

bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Los frascos con las células se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y 95% aire, hasta la formación de la monocapa celular, se realizó cambio de medio esencial mínimo cada 3 días.

#### 4.10.2. Cultivo en placa de 96 pocillos

Cuando el cultivo de células de Hígado de Chang estuvo al 80% de confluencia de toda la superficie se desechó el medio de cultivo anterior, las células se lavaron dos veces con 4 mL una solución de PBS, las células muertas se eliminaron junto con otros residuos. Posteriormente se añadieron de 0.5 a 1 mL de tripsina-EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) al 0.25% para disociarla, se añadió medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino para inactivar la tripsina y posteriormente se realizó un conteo celular con la cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión celular a 5,000 células por pozo y fueron sembradas en una placa de 96 pocillos, la cual se incubó a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora con CO<sub>2</sub> por 2 horas o hasta la formación de monocapa.

#### 4.10.3. Preparación de las muestras de hG-CSF

Cálculos para concentración de hG-CSF para ambos ensayos.

Concentración inicial de G-CSF= 100000 pg/mL

Volumen por pocillo con 5000 células= 200 µL

Volumen en el que se debe de añadir el biofármaco= 100 µL

$$7 \times 10^5 \times 10 \times 1000 \times 19.57 \times 100 \times 10 \times 100 = 13.69 \times 10^8 \times 73 = 1000000 \text{ pg/100}$$



A partir de la solución 1000 X de G-CSF se realizaron las diluciones para obtener las demás concentraciones. Se realizaron diluciones 1:10 secuenciales hasta llegar a la concentración de 0.1 pg/ $\mu$ L como se muestra en la tabla 12, el diluyente utilizado será medio MEM.

*Tabla 12. Preparación de muestra de G-CSF a diferentes concentraciones para su evaluación de citotoxicidad.*

<b>Tubo</b>	<b>Volumen de estándar (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Patrón estándar</b>	<b>Volumen de diluyente (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración final (pg/<math>\mu</math>L)</b>
<b>1</b>	10	1000000 X G-CSF	100	1000000
<b>2</b>	10	Tubo 1	100	10000
<b>3</b>	10	Tubo 2	100	1000
<b>4</b>	10	Tubo 3	100	100
<b>5</b>	10	Tubo 4	100	10
<b>6</b>	10	Tubo 5	100	1
<b>7</b>	10	Tubo 6	100	0.1

Al analizar los datos, se tomó el 100% de viabilidad celular al valor obtenido por los pocillos que únicamente contienen células (sin hG-CSF), y posteriormente se hicieron los cálculos por medio gráfico.

#### 4.10.4. Exposición de los cultivos celulares a hG-CSF

Una vez formada la monocapa de células de hígado de Chang en los pocillos de la placa, se añadió 100 µl con la concentración deseada de hG-CSF por triplicado, y posteriormente se incubó 24 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Para citotoxicidad se utilizó tritón como control positivo.

#### 4.10.5. Evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo WST-1

Se reemplazó el sobrenadante por 100 µl de medio MEM fresco y después se le añadió 10 µl del reactivo [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] (WST-1) y se incubó por 2 horas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> para finalmente medir la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas modelo ELx800 (BIOTEK). Como control positivo se utilizó tritón X-100 al 1% en PBS, como control negativo se usó cultivo sin ningún tratamiento y como blanco de reacción medio MEM y WST-1, y finalmente, se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas modelo ELx800 (BIOTEK).

## Capítulo 5

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. Diseño de iniciadores para la amplificación de hG-CSF

Se llevó a cabo el diseño de iniciadores para la amplificación de hG-CSF añadiendo el sitio de corte para las enzimas de restricción a usar durante la digestión del gen. El diseño se puede observar en la siguiente tabla, en los primeros seis nucleótidos de las secuencias se resalta la secuencia referente a la enzima de restricción.

*Tabla 13. Diseño de iniciadores para la amplificación del gen de hG-CSF.*

Iniciador	Secuencia de nucleótidos	Enzima de restricción
Delantero	5'-AGT CAG TCA <b>CCA TGG</b> GAA CCC CAC TGG G-3'	<b>Nco I</b>

Reverso	5'-AGT CAG TCA <b>CTC GAG</b> TTA AGG CTG	<b>Xco I</b>
	AGC C-3'	

## 5.2. Amplificación hG-CSF

En la figura 1 se presenta un gel de agarosa del 0.7 % como evidencia de la amplificación del gen de hG-CSF a partir del ADN optimizado para la expresión en *E. coli*. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. En el segundo y tercer carril se observan las bandas de la amplificación de hG-CSF con los iniciadores diseñados. El carril 4 y 5 se trata de los controles negativos, el primero de ellos sin ADN molde que amplificar y el segundo de ellos sin enzima ADN polimerasa. El gen de hG-CSF es de 525 pb y la señal obtenida se observa por encima de los 500 pb en comparación con el marcador usado.

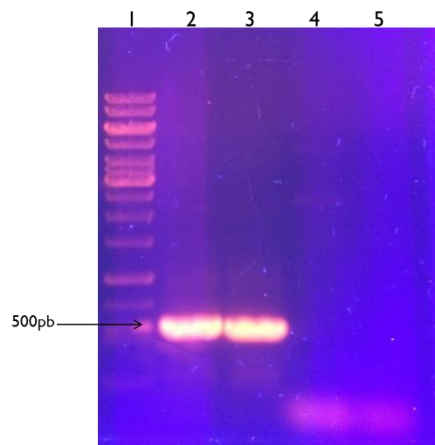
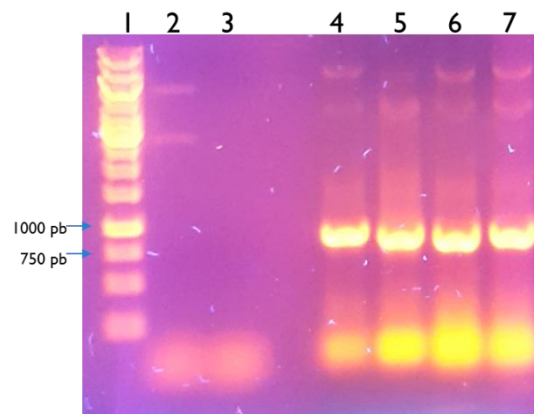


Figura 1. Gel de agarosa de 0.7 % donde se observa la amplificación de hG-CSF. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-3: amplificación hG-CSF. Carril 4-5: controles negativos.

### 5.3. Construcción pET30a-SmbP-hG-CSF y pET30a-CusF-hG-CSF

En la figura 2 se muestra un gel de agarosa de 0.7 % donde se evidencia la construcción de pET30a-SmbP-hG-CSF por medio un análisis por PCR con el iniciador delantero de SmbP y el iniciador reversa de hG-CSF. En el carril 1 se observa el marcador, en el carril 2 y 3 se observan los controles negativos de la PCR. En los carriles 4 al 7 se observa el resultado positivo al inserto de SmbP-hG-CSF ya que se observa una señal intensa entre 750 y 1000 pb, y el inserto es de 819 pb (279 pb de SmbP, 525 de hG-CSF y 15 pb del sitio de corte de la enteroquinasa).



*Figura 2. Gel de agarosa de 0.7 % del análisis por PCR de las construcciones de SmbP-hG-CSF. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-3: Controles negativos. Carril 4-7: Amplificación SmbP-hG-CSF.*

Por otra parte, en la figura 3 se muestra un gel de agarosa de 0.7 % donde se evidencia la construcción de pET30a-CusF-hG-CSF por medio de un análisis por PCR con el iniciador delantero de CusF y el iniciador reverso de hG-CSF. En el carril 1 se observa el marcador. En los carriles 2 al 4 se observa el resultado positivo al inserto de CusF-hG-CSF ya que se observa una señal intensa entre 750 y 1000 pb, y el inserto es de 870 pb (330 pb de SmbP, 525 de

hG-CSF y 15 pb del sitio de corte de la enteroquinasa). En el carril 5 se puede apreciar un resultado negativo pues no se encuentra ninguna banda en el peso esperado, y por último en el carril 6 se realizó un control negativo con ausencia de ADN.

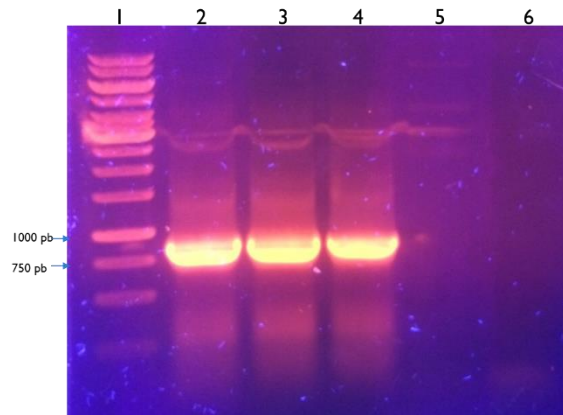


Figura 3. Gel de agarosa de 0.7 % del análisis por PCR de las construcciones de CusF-hG-CSF. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-4: amplificación CusF-hG-CSF. Carril 5-6: control negativo

#### 5.4. Expresión piloto de proteínas

Una vez confirmada las construcciones de pET30a-SmbP-hG-CSF y pET30a-CusF-hG-CSF se realizó la expresión de proteínas en 2 mL de medio LB y se analizó por SDS-PAGE al 12 %. En la figura 4 se analizó la expresión de CusF-hG-CSF en 4 colonias diferentes de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido construido. En el carril 1 está el marcador y en el carril 2 hay un control negativo de proteínas que expresa *E. coli* sin el plásmido de nuestra construcción. En el carril 3 y 4 se observa la expresión de proteínas en fracción soluble e insoluble, respectivamente, de una colonia de *E. coli* con el plásmido transformado. En el carril 5-6, 7-8 y 9-10 también se observa la expresión en las mismas condiciones que el carril 3 y 4 pero pertenecen a diferentes colonias de *E. coli*.

Este procedimiento piloto se hizo con la finalidad de elegir a la colonia que mejores niveles de expresión presentara para escalar el procedimiento. Cualitativamente se puede concluir que las colonias del carril 7 y 9 presentan una mayor índice de expresión que las colonias del carril 3 y 5, esto se ve en el tamaño de la señal que se encuentra dentro del recuadro. En cuanto a la proteína insoluble, todas las señales presentan poca intensidad para la proteína CusF-hG-CSF, lo cual es indicio de la escasa formación de cuerpos de inclusión.

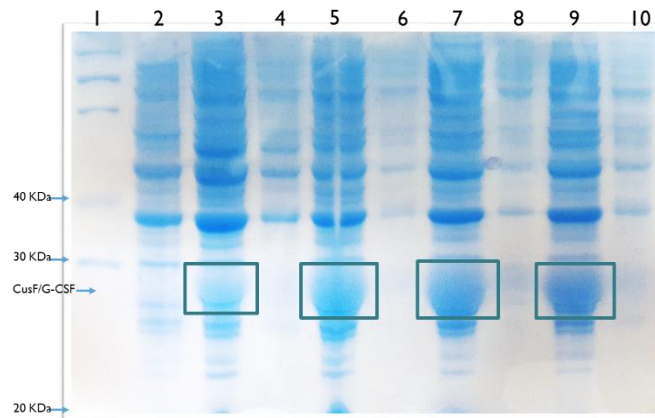
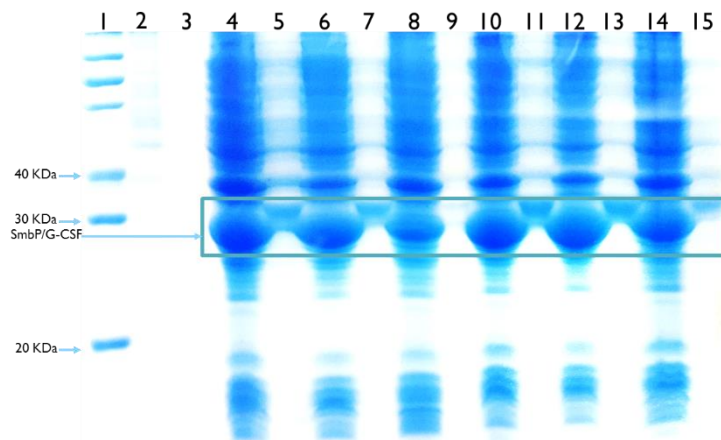


Figura 4. Niveles de expresión de hG-CSF fusionado con CusF en *E. coli* BL21(DE3). Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control negativo. Carril 3, 5, 7, 9: fracción soluble de CusF-hG-CSF. Carril 4, 6, 8, 10: fracción insoluble de CusF-hG-CSF.

En la figura 5 se analizaron los niveles de la expresión de SmbP-hG-CSF en 7 colonias diferentes de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido construido. En el carril 1 está el marcador y en el carril 2 hay un control negativo junto con su fracción insoluble en el carril 3. Del carril 4 hasta el 15 son expresiones de SmbP-hG-CSF, siendo en los carriles con número par las fracciones solubles, mientras que, en los carriles impares las fracciones insolubles. Cualitativamente se

puede notar que todas las colonias presentan niveles de expresión equiparables entre sí, con excepción de la colonia del carril 8, la cual claramente presenta una señal de intensidad menor. Por otra parte, el nivel de expresión de proteína insoluble que se observa en el carril 9 es casi nulo. A pesar de lo anterior, el nivel de proteína insoluble de las demás colonias es de una intensidad baja en comparación con la cantidad de proteína soluble.



*Figura 5. Niveles de expresión de hG-CSF fusionado con SmbP en E. coli BL21(DE3). Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control negativo. Carril 4, 6, 8, 10, 12, 14: fracción soluble de SmbP-hG-CSF. Carril 5, 7, 9, 11, 13, 15: fracción insoluble de SmbP-hG-CSF.*

## 5.5. Purificación de proteínas

Tras las expresiones piloto y la selección de las colonias que presentaron los mejores niveles de expresión para CusF-hG-CSF y SmbP-hG-CSG, se expresaron 2.5 L de medio LB de cada proteína. Las células se recolectaron y se lisaron, para posteriormente, obtener el clarificado que se utilizó para el proceso de purificación.

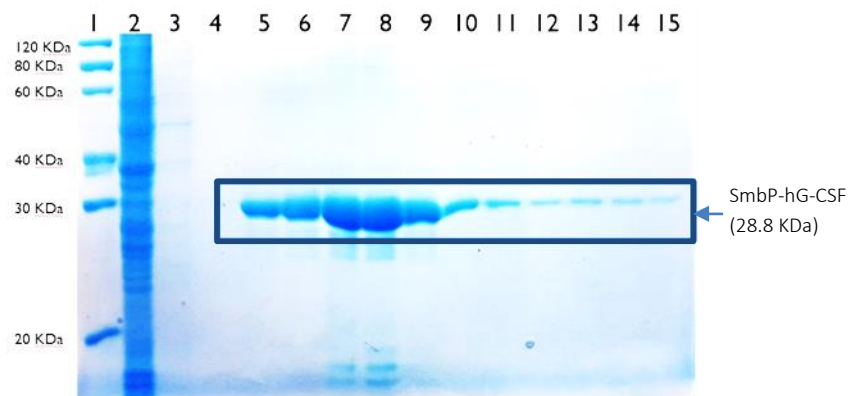
### 5.5.1. Purificación CusF-hG-CSF



Se purificaron 20 mL de clarificado de proteína utilizando una columna HisTrap FF de 5 mL. Las fracciones obtenidas de este proceso (0.5 mL) se analizaron por SDS-PAGE, como se muestra en la siguiente figura.

#### 5.5.2. Purificación SmbP-hG-CSF

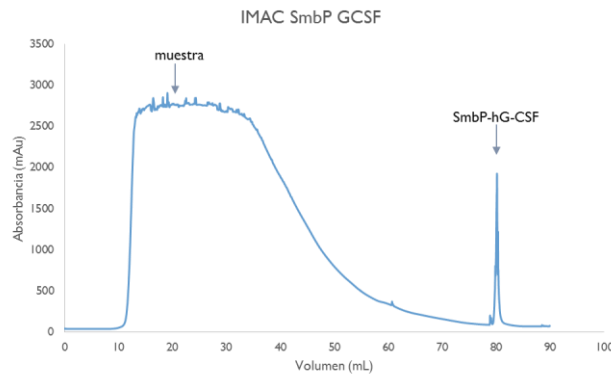
Se obtuvieron 20 mL de clarificado de proteínas el cual se purificó por medio de una columna HisTrap HP de 1 mL. Se recolectaron fracciones de elución de un volumen de 0.5 mL y se analizaron por SDS-PAGE.



*Figura 6. Purificación de SmbP-hG-CSF. Análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: fase no unida. Carril 4-15: fracciones de elución.*

En la figura 6 podemos observar el proceso de purificación. En el carril 2 se observa la fase no unida, donde se puede apreciar que prácticamente no hay SmbP-hG-CSF que no se haya unido a la columna. El carril 3 pertenece a la fracción de lavado, donde tampoco se aprecia que haya pérdidas de la proteína de interés. A partir del carril 4 y hasta el 15 son fracciones de la elución. En los carriles 6 al 9 se aprecia la mayor cantidad de proteína, sin embargo, ello no significa que sean las fracciones más puras, pues como se observa hay señales de proteína por encima y por debajo del peso de SmbP-hG-CSF. Por el contrario, del carril 10 en adelante, se observan las fracciones más puras pues

los carriles prácticamente sólo presentan la banda de SmbP-hG-CSF sin alguna otra proteína contaminante.



*Figura 7. Cromatograma de IMAC de la purificación de SmbP-hG-CSF.*

En la figura 7 se observa el cromatograma de la purificación por IMAC de SmbP, es un cromatograma típico de este tipo de cromatografía donde se puede observar la señal en el momento de la elución de SmbP-hG-CSF. Tras este proceso se juntaron todas las fracciones donde se observó la presencia de la proteína de interés y se concentraron para eliminar la mayor cantidad de buffer, posteriormente se realizó un proceso de diálisis para eliminar el imidazol presente en la muestra.

## 5.6. Cuantificación de proteínas

Usando el método Bradford para cuantificación de proteínas, se obtuvo la siguiente curva de calibración (figura 8) donde también se muestra la ecuación de la recta obtenida para la cuantificación de SmbP-hG-CSF.

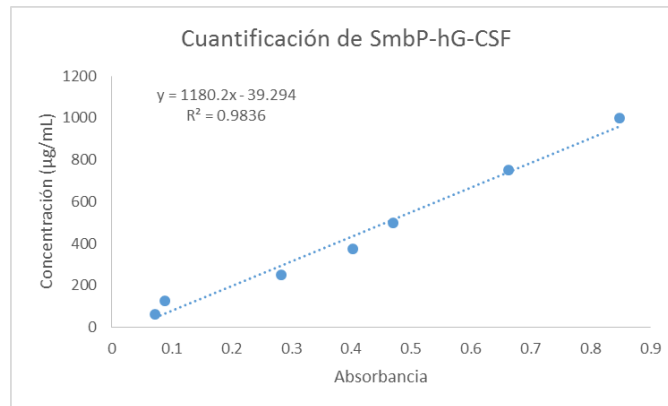


Figura 8. Curva de calibración de BSA para cuantificación de SmbP-hG-CSF.

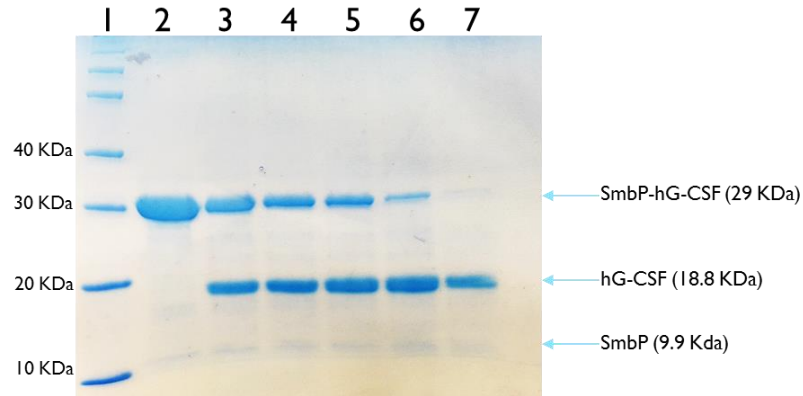
Con la ecuación de la recta calculada se pudo determinar la concentración de la proteína purificada, la cual se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 14. Cuantificación de proteína por método Bradford.

Proteína	Dilución	Absorbancia	Volumen de Proteína	Concentración
<b>SmbP-hG-CSF</b>	1:10	0.3737	15 mL	4017.47 µg/mL

### 5.7. Remoción de proteína de fusión

La secuencia de ADN que se clonó está compuesta por el gen de la proteína de fusión y el gen de hG-CSF separados por una secuencia que codifica a un sitio de unión a enteroquinasa (AspAspAspAspLys). Por medio de esta proteasa se pudo remover la proteína de fusión del biofármaco. Al proceso de remoción de SmbP se le dio seguimiento por SDS-PAGE y se muestra en la figura 9.



*Figura 9. Seguimiento por SDS-PAGE del corte de enteroquinasa a diferentes tiempos en SmbP-hG-CSF. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-7: corte de enteroquinasa a 0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas, respectivamente.*

En el carril 2 se observa la proteína antes de la presencia de la enteroquinasa. Del carril 3 al 7 se llevó a cabo el seguimiento de la reacción: en el 3 es a 1 hora, en el 4 es a 2 horas, en el 5 es a 4 horas, en el seis es a 8 horas y en el 7 es a las 16 horas de reacción. Es claro cómo se está dando la separación de las proteínas por la presencia de la banda de hG-CSF y por la desaparición de la banda de SmbP-hG-CSF.

### 5.8. Comparación de niveles de expresión

Se hizo una comparación de los niveles de expresión variando la proteína de fusión, tiempo, temperatura y concentración de IPTG para expresión. En la figura 10 se puede observar como el nivel de expresión con SmbP (carril 3) es superior al nivel de expresión de CusF (carril 5) y de hG-CSF sin proteína de fusión pero con un marcaje His-tag (carril 7) a una temperatura de 37 °C con una concentración de 1 mM de IPTG. Sin embargo, la fracción insoluble

producida por SmbP (carril 4) también es superior en comparación con la producida por CusF.

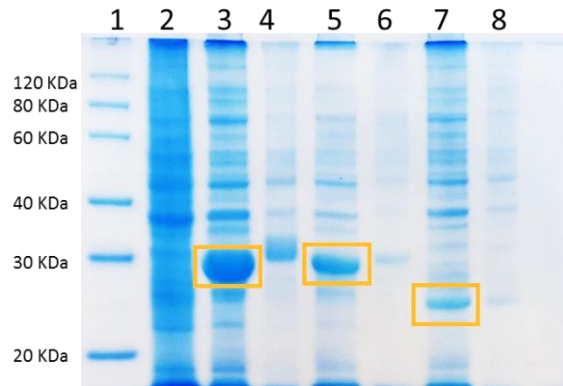


Figura 10. Análisis de niveles de expresión piloto por SDS-PAGE a 37°C, 1 mM IPTG, 4 horas. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control negativo. Carril 3, 5, 7: fracción soluble de SmbP-hG-CSF, CusF-hG-CSF y hG-CSF, respectivamente. Carril 4, 6, 8: fracción insoluble de SmbP-hG-CSF, CusF-hG-CSF y hG-CSF, respectivamente.

En la figura 11 se hizo la comparación entre estas proteínas de fusión a 25 °C y con una concentración de 0.1 mM de IPTG, además se aumentó el tiempo de expresión a 16 horas.

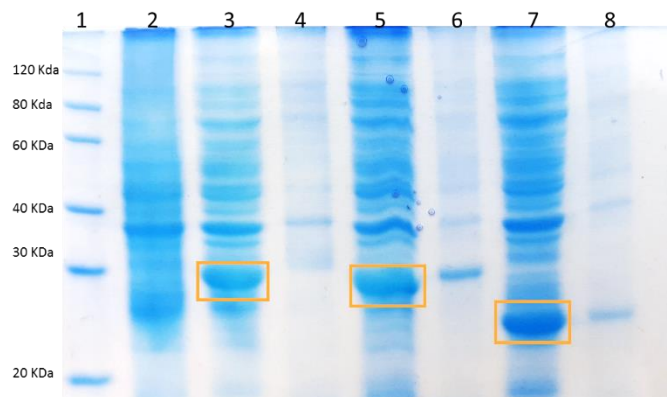


Figura 11. Análisis de niveles de expresión piloto, por SDS-PAGE, a 25 °C con 0.1 mM de IPTG y por 16 horas. Carril 1: marcador. Carril 2: control negativo. Carril 3, 5 y 7: fracción soluble de expresión de SmbP-hG-CSF, CusF-hG-CSF y hG-CSF sin proteína de fusión, respectivamente. Carril 4, 6 y 8: fracción insoluble de expresión de SmbP-hG-CSF, CusF-hG-CSF y hG-CSF sin proteína de fusión, respectivamente.

Los niveles de expresión de proteína soluble son equiparables entre las tres construcciones. Mientras que, en cuanto a proteína insoluble, SmbP (carril 4) claramente no produce, aunque CusF (carril 6) la produce baja medida en comparación a sus fracciones solubles.

### 5.9. Purificación de hG-CSF

Tras la acción de la enteroquinasa se obtuvo la mezcla de las dos proteínas: hG-CSF y SmbP. Para la purificación de hG-CSF de esta mezcla, se utilizó una resina cargada con Ni(II) a la cual SmbP presenta mayor afinidad que hG-CSF. La fracción de hG-CSF se eluyó a una concentración de 30 mM de imidazol, con un buffer de 50 mM TRIS, 500 mM NaCl pH 8.0.

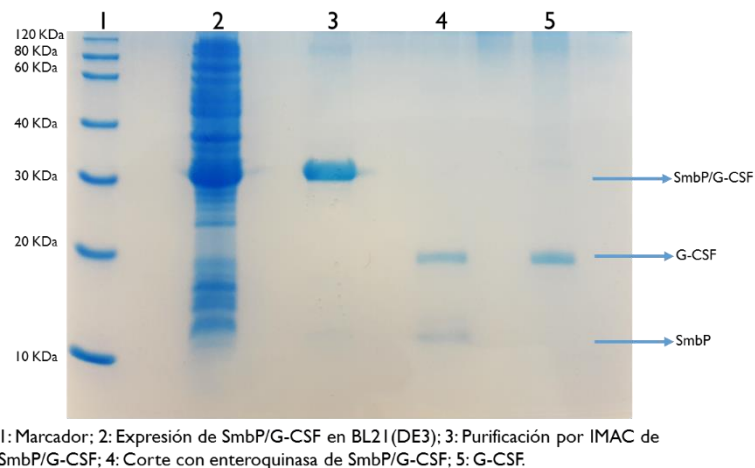


Figura 12. Expresión y purificación de hG-CSF a partir de SmbP.

### 5.10. Ensayo de actividad biológica en sangre

La actividad biológica determinó, por medio una biometría hemática, el conteo total de células hematopoyéticas en sangre. En la siguiente tabla se pueden observar los valores dados para las muestras analizadas.

Tabla 15. Conteo de células sanguíneas y porcentajes de aumento de granulocitos.

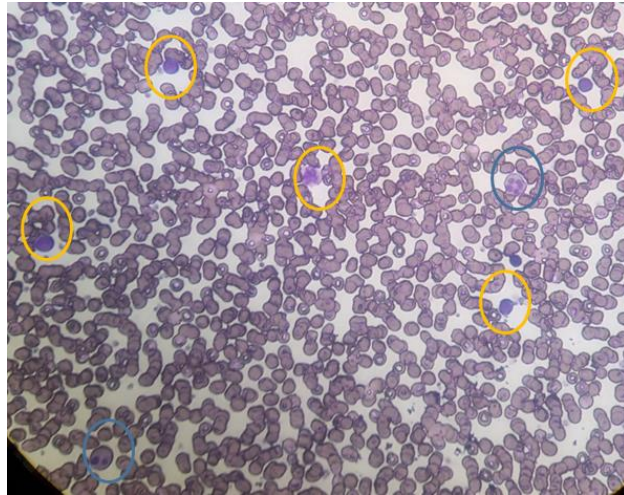
	Control Negativo	Biociclin™	hG-CSF
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /mL)	6.3	6.4	6.1
Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /mL)	5.44	5.27	5.34
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mL)	173	172	187
% Linfocitos	42.9	39.3	38.5
% Monocitos	10.8	5.8	5.6
% Granulocitos	46.3	54.9	55.9
Granulocitos (10 <sup>3</sup> /mL)	2.92	3.51	3.4
% aumento de granulocitos		20.21	16.44

Basándose en el conteo de leucocitos totales y el porcentaje (%) de granulocitos, se puede calcular el valor de granulocitos por mL de muestra. Y una vez determinado el valor de granulocitos, se puede calcular el porcentaje de aumento del control positivo y el hG-CSF en base al control negativo.

#### 5.11. Diferenciación microscópica de células hematopoyéticas

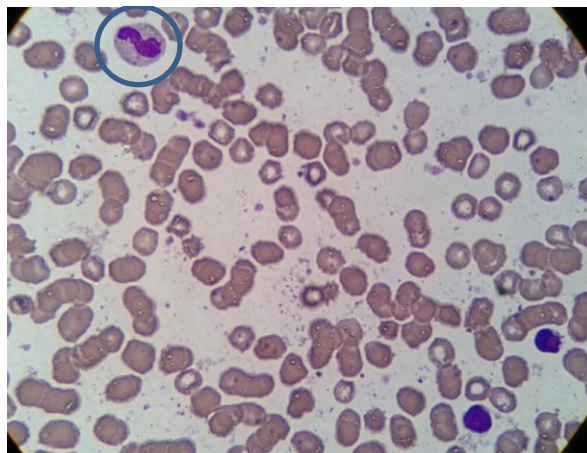
Para la diferenciación microscópica de neutrófilos se hicieron frotis de la sangre analizada en el ensayo de actividad biológica. Estos frotis se tiñeron por tinción de Wright.

La siguiente imagen muestra el frotis realizado para el control negativo. En la cual se observa que había una cantidad de linfocitos (círculos amarillos) mayor a la de neutrófilos (círculos azules) en un objetivo 40x.



*Figura 13. Frotis de control negativo a 40x.*

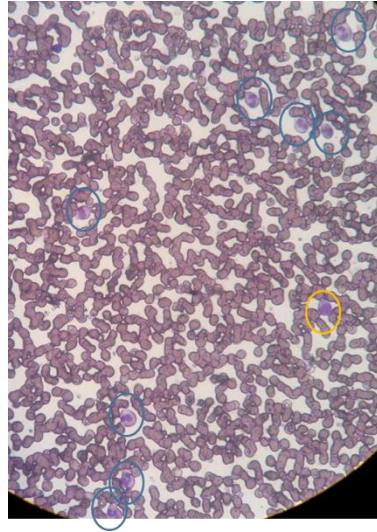
Para poder observar mejor los neutrófilos se tomaron imágenes con el objetivo 100x. A continuación se muestra una imagen del frotis del control negativo, donde en un círculo azul se puede observar el núcleo segmentado de los neutrófilos.



*Figura 14. Frotis de control negativo a 100x.*

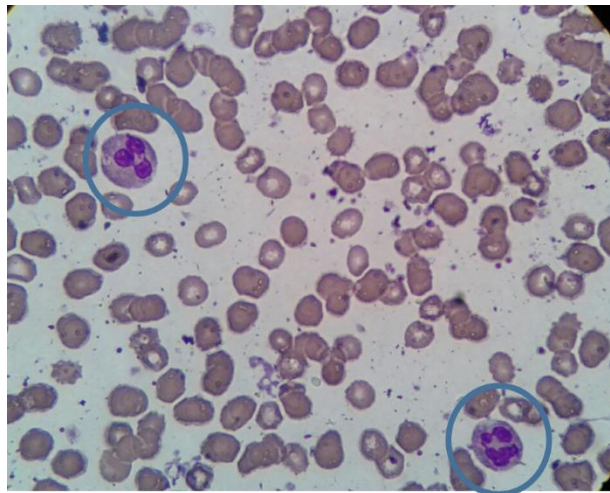


Siguiendo con el análisis de las muestras de sangre, se analizó la muestra control positivo (Biociclin). En la siguiente imagen se analiza el control positivo en un objetivo 40x.



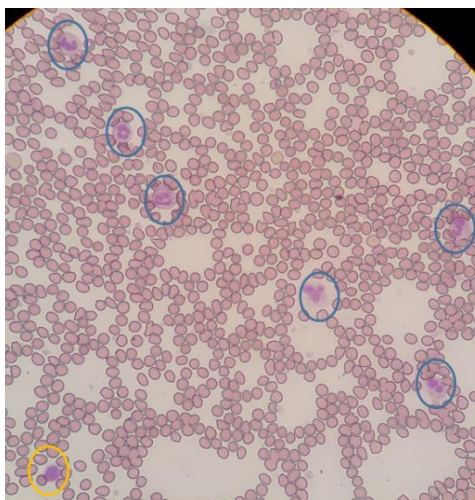
*Figura 15. Frotis de control positivo a 40x.*

En los círculos azules se aprecian los neutrófilos, los cuales se encuentran en mayor cantidad en comparación con otros leucocitos. Para observar mejor los neutrófilos se utilizó el objetivo 100x, como en la figura 16.



*Figura 16. Frotis de control positivo a 100x.*

El frotis de la muestra de sangre con el hG-CSF producido a partir de SmbP también fue observado a 40x y 100x. El aumento en el conteo de neutrófilos fue evidente pues se observaba una mayor cantidad de neutrófilos en los campos a 40x, como se observa en la siguiente imagen.



*Figura 17. Frotis de hG-CSF a 40x.*

En el círculo azul se encuentran identificados los neutrófilos, los cuales se analizaron también a 100x para poder observar el núcleo segmentado que los caracteriza.

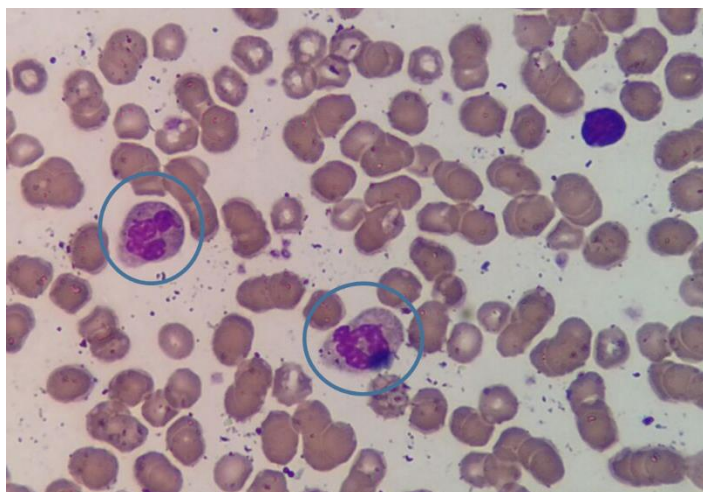


Figura 18. Frotis de hG-CSF a 100x

#### 5.12. Ensayo de citotoxicidad

Para la citotoxicidad se evaluó la muestra purificada de hG-CSF a diferentes concentraciones en células de hígado de Chang. Y se comparó contra la citotoxicidad del Biociclin a las mismas concentraciones sobre la misma línea celular. Después del ensayo WST-1 se hicieron los cálculos de viabilidad celular de los compuestos, los cuales pueden observarse en la tabla 17.

Tabla 16. Evaluación de citotoxicidad en células de hígado de Chang.

Concentración pg/mL	% Viabilidad celular. hG-CSF	Desviación estándar	% Viabilidad celular. Biociclin	Desviación estándar
100000	83.12	8.33	89.72	1.28
10000	98.56	2.89	102.14	2.32
1000	101.96	1.37	102.89	2.64
100	98.84	3.5564895	100.04	2.7053207

<b>10</b>	101.61	1.78806788	101.31	2.0428609
<b>1</b>	102.25	0.65621254	101.70	1.17130259
<b>0.1</b>	99.86	2.00750955	101.07	0.60245127

En el siguiente gráfico se pueden comparar los datos de viabilidad celular entre ambas proteínas, haciendo notar el declive en la viabilidad celular a la concentración de  $1 \times 10^5$  pg/mL.

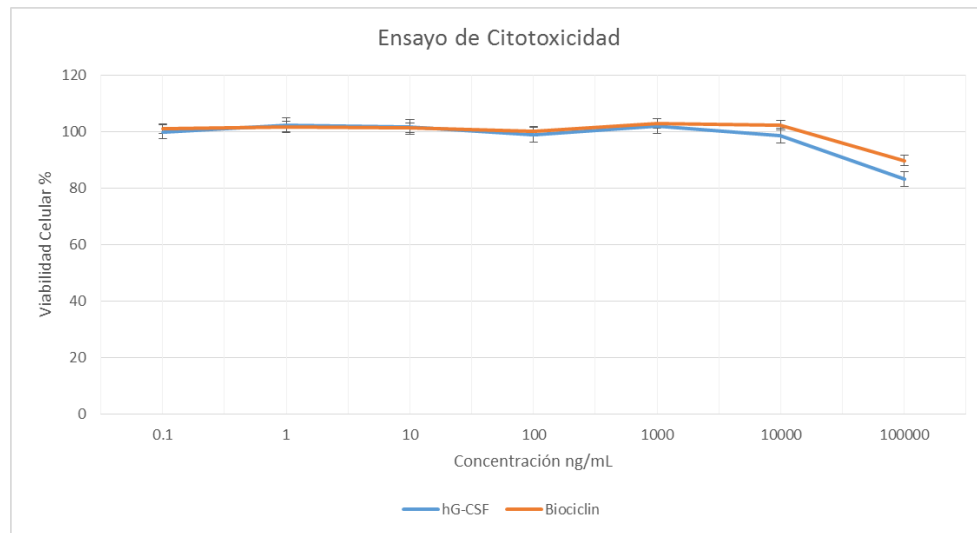


Figura 19. Comparación de viabilidad celular entre hG-CSF purificado por SmbP contra Biociclin.

## Capítulo 6

### 6. Discusión de resultados

Previo a la realización de las dos construcciones plasmídicas, se realizó la amplificación del gen de hG-CSF por medio de PCR donde se obtuvo un fragmento consistente con lo esperado (525 pb) en un gel de agarosa (figura 1). Se debe mencionar que la secuencia de hG-CSF fue sintetizado y optimizada para su expresión en *E. coli* (GeneScript), es decir, se hicieron algunas modificaciones como remplazar regiones ricas en guanina y citosina con regiones ricas adenina y timina o el remplazo de codones raros, como se ha reportado previamente (Jevsevar & Menart, 2006) (Jeong & Lee, 2001). Lo anterior es importante, porque al momento de expresar hG-CSF por si solo puede expresarse adecuadamente dentro de la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Varias proteínas humanas expresadas en organismos procariotas, como *E. coli*, son propensas a la agregación (cuerpos de inclusión). En consecuencia, se consumen tiempos y recursos en solubilizar y replegar dichas proteínas, además, estos procesos presentan bajo rendimiento, poca reproducibilidad y proteínas con poca actividad biológica. Esto pasa con hG-CSF, que al expresarse en *E. coli* se genera de manera insoluble. En este trabajo se

examinaron dos nuevas proteínas de fusión: CusF y SmbP. Estas proteínas de fusión para la producción de hG-CSF.

Se realizaron las construcciones de los vectores de expresión dentro de un sistema de expresión pET, el cual ya ha sido ampliamente usado para la producción de hG-CSF en *E. coli* (Chang, et al., 2013).

Las construcciones de los plásmidos pET30a-SmbP-hG-CSF y pET30a-CusF-hG-CSF se hicieron por los métodos de clonación tradicional con la finalidad de estudiar el efecto de las proteínas de fusión sobre la expresión de hG-CSF.

Estas construcciones estaban compuestas por el gen de la proteína de fusión y el gen de hG-CSF separados por el sitio de enteroquinasa (para facilitar la separación de las proteínas) dentro del sitio de clonación múltiple del vector pET30a. Las construcciones fueron realizadas correctamente, esto se corroboró por medio de PCR con los cebadores específicos del sitio proteína de fusión-hG-CSF. Ante esto no podría haber duda de que la construcción es correcta pues si no se encontrara la secuencia de alguno de los 2 genes dentro del sitio de clonación múltiple de pET, simplemente no habría amplificación de ADN.

Además, se realizó una secuenciación automática del sitio de clonación múltiple de pET30a que confirmó la presencia de los genes de las proteínas de fusión y del hG-CSF separados por el sitio de enteroquinasa.

Una vez corroboradas las construcciones, se hizo la expresión de las proteínas en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, una cepa adecuada para la transformación y la expresión de proteínas bajo el promotor T7. Las proteínas varían sus niveles de expresión y solubilidad de la proteína de acuerdo a las condiciones del medio: temperatura, concentración de inductor, tiempo, entre otras. En el 2014, Bich y

colaboradores produjeron el hG-CSF a partir de siete diferentes proteínas de fusión que variaban de tamaño, desde 0.8 kDa hasta 54.9 kDa. Su trabajo lo realizó variando temperaturas de expresión de 18 a 30 °C, encontrando que las proteínas de fusión más grandes de 40 kDa producen una cantidad superior al 88% de proteína soluble a cualquiera de las temperaturas, mientras que, las proteínas menores a 40 kDa no tienen la capacidad para producir proteína soluble a 30 °C (Bich, et al., 2014). SmbP y CusF son proteínas que se podrían considerar de un tamaño pequeño, apenas 10 kDa, y lo sobresaliente de ellas es que a pesar de su tamaño, muestran mejores niveles de expresión de proteína soluble que de proteína insoluble a 37 °C como se puede observar en la figura 10. Donde en el carril 4, 6 y 8 observamos la fracción insoluble de las expresiones piloto para SmbP-hG-CSF, CusF-hG-CSF y para hG-CSF marcada con un His-tag. Por otra parte, es de notar el nivel de expresión de proteína soluble producida por SmbP (carril 3) en comparación con hG-CSF con His-tag (carril 7) ya que es muy marcada la diferencia. Es notable el beneficio en el nivel de expresión con ambas proteínas de fusión.

Es importante recalcar que el gen del hG-CSF se encuentra dentro del sitio de clonación múltiple del vector pET30a, es por ello que la banda referente al hG-CSF (Fig. 2 carril 7) aparece en aproximadamente 25 kDa, porque junto con el hG-CSF se está expresando todas las proteínas que se encuentran dentro del promotor y terminador T7. El hG-CSF, de expresarse solo, debería de mostrar una banda por debajo de la señal de 20 kDa, exactamente en 18.8 kDa.

También es importante el parámetro de tiempo que se manejó, pues al realizarse la expresión por únicamente 4 horas se está evitando la degradación

de la proteína. La herramienta ProtParam de ExPASy le calcula un tiempo de vida media al hG-CSF de 10 horas en *E. coli*, es por ello y porque si se aumenta el tiempo, se puede aumentar la producción de cuerpos de inclusión, que se debió tomar en cuenta el tiempo de expresión. Sin embargo, se realizó también una expresión bajo las condiciones de 16 horas a 25 °C (figura 11) para intentar observar la formación de cuerpos de inclusión, no obstante, la formación de cuerpos de inclusión de hG-CSF con SmbP es casi nula (carril 4), y la de CusF (carril 6) y con un marcaje His-tag (carril 8) es inferior a la cantidad de proteína soluble para SmbP, CusF y con His-tag (carril 3, 5 y 7, respectivamente). Se debe tomar en cuenta que, el nivel de expresión de proteína soluble de SmbP es mayor a 37 °C que a 25 °C. Los niveles de expresión de proteína soluble cualitativamente son equiparables entre los tres sistemas de expresión, aunque, si se compara con la figura 10, el nivel de expresión de hG-CSF para SmbP se ve disminuido y el nivel de expresión con un His-tag se ve aumentado. Mientras que, con CusF parece que la temperatura y tiempo no afectan sus niveles de expresión de proteína soluble.

Cuando el tiempo de expresión se aumenta, también se debe de disminuir la temperatura de expresión, o viceversa, esto es para evitar la formación de cuerpos de inclusión (Vemula, et al., 2015). Pero esto no es algo que sólo dependa del tiempo o temperatura de expresión, también el método de expresión es importante. En 2015 Vemula y colaboradores, comparó los niveles de expresión de proteína insoluble de hG-CSF producidos por *E. coli* por tres métodos diferentes: agitación en matraz, batch y batch alimentado.

Encontrando que el método de agitación en matraz era el método que producía



menor cantidad de cuerpos de inclusión, produciendo menos de la mitad de cuerpos de inclusión que se producían por batch y una tercera parte de lo que se produjo por batch alimentado. El método que se siguió en este trabajo para la expresión de proteínas fue el de agitación en matraz.

Y como ya se ha descrito, otra variable dentro de la expresión de proteínas, fue la concentración de inductor IPTG. Comúnmente, el hospedero de producción tiene un profago ( $\lambda$ DE3) codificando a la altamente progresiva T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor inducible de IPTG *lacUV5*, eso significaría mantener un control estricto sobre la expresión basal del gen recombinante (Dubendorff & Studier, 1991). De acuerdo a los resultados que se han presentado en este trabajo, la concentración de IPTG para inducir la reacción, sólo afectó el nivel de expresión hG-CSF con SmbP, dado lo anterior, no se podría concluir que la concentración de IPTG que variamos sea algo determinante en la expresión. Sin embargo, existen reportes donde se obtienen altos niveles de expresión de hG-CSF sin necesidad de usar inductor en el sistema pET (Vanz, et al., 2008). Se cree que la expresión de proteínas en ausencia de inductor es una propiedad del sistema controlado *lac*, cuando las células se aproximan a la fase estacionaria en un medio complejo, y el AMP cíclico, acetato y un bajo pH es requerido para alcanzar un alto nivel de expresión en ausencia de inducción con IPTG, lo cual puede ser una respuesta celular general ante la limitación de nutrientes (Grossman, et al., 1998). La principal ventaja de no usar inductor es la reducción de costos. En 2013, Chang y colaboradores hicieron expresiones a gran escala de hG-CSF sin hacer uso de inductor, obteniendo únicamente proteína insoluble y un rendimiento

bastante considerable (1.75 g/L) (Chang, et al., 2013). Ahora bien, si se considera como una opción las expresiones sin inductor, se debe de tomar en cuenta que las proteínas se deben de replegar, lo cual aumenta costos y rendimiento. Otro ejemplo de expresiones sin uso de inductor es el trabajo donde, en 2008, Vanz y colaboradores expresaron hG-CSF en un vector pET sin ninguna proteína variando las concentraciones de IPTG, no obtuvieron expresión de proteína soluble, en cambio, al analizar la fracción insoluble, determinaron que todo el hG-CSF se encontraba en esas fracciones exceptuando las fracciones donde se indujo la expresión con IPTG, en esas no hubo expresión de hG-CSF. Ellos no logran determinar la razón por la cual sucede la falla en la expresión con inductor. Las fallas o los bajos niveles de expresión podrían deberse a una interferencia entre el gen de la proteína de interés con el gen de expresión, o simplemente pudiera deberse a que la síntesis de proteínas se detuvo antes de la producción de la proteína de interés (Venthanayagam & Flower, 2005). Todas estas fallas ya mencionadas también pueden ser un factor a considerar durante la expresión de las proteínas, sobre todo cuando los niveles de expresión son menores en comparación con los niveles de expresión de otro vector, por ejemplo, el nivel de expresión del hG-CSF con un His-tag a 37°C por 4 horas (Figura 10. Carril 7) comparándolo con el nivel de expresión con las dos proteínas de fusión (Figura 10. Carril 3 y 5). Por consiguiente, si se pretendiera realizar una expresión sin inductor, lo mejor sería estar listo para replegar proteínas insolubles.

No obstante lo anterior mencionado, no se puede generalizar con los efectos de las condiciones de expresión. Por ejemplo, no siempre que se disminuye la

temperatura de expresión, debe de aumentar la solubilidad de las proteínas expresadas. En 2014, Bich y colaboradores trabajaron con un His-tag como proteína de fusión para producir hG-CSF a 18 °C y no obtuvieron proteína soluble (Bich, et al., 2014), en este caso el factor a considerar sería el His-tag, que es de apenas seis aminoácidos.

Para la expresión de hG-CSF con ambas proteínas de fusión se determinó que las mejores condiciones de expresión eran 37 °C por 4 horas con una concentración de 1 mM de IPTG.

Entre las cualidades de SmbP y CusF como proteínas de fusión, se encuentra su afinidad a Ni(II) y Cu(II), respectivamente. Y basándonos en esa cualidad se eligió la cromatografía de afinidad de tipo IMAC como la mejor opción para la purificación. SmbP ha sido probada para purificarse con ambos cationes, con Cu(II) se observaron mejores rendimientos que con Ni(II), sin embargo, tras la purificación los niveles de pureza fueron superiores con Ni(II) (Vargas-Cortez, et al., 2015). El Ni representa una menor afinidad por SmbP, sin embargo, son pocas las proteínas que pueden interactuar con él, lo que permite mejores niveles de purificación. Como se mencionó en los antecedentes, principalmente son las histidinas las capaces de interactuar con Ni. Es decir, SmbP también pudo ser purificada por IMAC usando Cu(II), pero teóricamente se hubieran obtenidos niveles de pureza inferiores. En la figura 6 se puede observar el nivel de pureza obtenida tras purificar por IMAC con Ni, prácticamente del carril 11 al 15 no se observa alguna otra banda referente a otra proteína que no sea SmbP-hG-CSF.

En conclusión, la elección del proceso a utilizar para la purificación depende de la proteína de fusión y el grado de pureza que se pretenda obtener.

Por otra parte, CusF no cuenta con la disponibilidad de histidinas que SmbP, por ello su purificación con Ni no es viable. Por consiguiente, para purificar vía IMAC, usar Cu como metal se volvió la única opción. Entre las proteínas que interfieren con la purificación de CusF vía Cu(II) se encuentra el citocromo c y la quinol oxidasa, que son proteínas expresadas naturalmente por *E. coli* y que presentan afinidad al Cu (Pereira, et al., 2001).

La principal limitación de usar *E. coli* para producir hG-CSF es la ausencia de mecanismos de glicosilación en las células bacterianas, por ello, el hG-CSF expresado en *E. coli* se obtiene en estado no glicosilado. Lo cual pudiera representar algún problema al momento de evaluar la actividad biológica y citotoxicidad de las células. Un estudio realizado por Serdar y colaboradores, evaluó la actividad del filgrastim contra el lenograstim, concluyendo que estos dos biofármacos son comparables entre sí en cuanto a la movilización de células madre a sangre periférica (Serdar, et al., 2013). Es decir, la adición de una cadena de azúcar al hG-CSF no representa algún cambio en su función biológica.

La evaluación de la actividad biológica del hG-CSF, producido a partir de SmbP, se determinó en sangre humana midiendo un aumento en el conteo de neutrófilos en base a un control negativo sin adición de biofármaco. El aumento del 16% de neutrófilos se puede explicar en base a diferentes factores. El primero de ellos es la presencia de células banda neutrófila en sangre, las cuales son células precursoras de neutrófilos, cuya principal diferencia es el

núcleo no segmentado (Rodak, et al., 2014). Estas células representan entre 5 y 10% de leucocitos en sangre periférica, y al igual que los neutrófilos y todas sus células precursoras, cuentan con diferentes receptores en su superficie (entre 50 y 500 receptores por célula) para hG-CSF. El número de receptores, depende del nivel de maduración de las células, siendo los neutrófilos quienes cuentan con el mayor número de receptores. Y las células banda, al ser el precursor inmediato, cuentan también con un valor elevado de receptores para hG-CSF, lo cual estimularía la diferenciación hacia neutrófilos (Demetri & Griffin, 2011).

Sin embargo, el núcleo segmentado no es la única diferencia entre las células banda y neutrófilos, también la madurez de la membrana. Siendo la membrana de las células banda menos resistente que la de los neutrófilos (Rodak, et al., 2014). Aquí llega otro factor a considerar para el aumento en el conteo de neutrófilos en sangre. Pues el analizador automático de hematología utilizado para este conteo se fundamenta en la resistencia de la membrana celular de los leucocitos para poder cuantificarlos (Bayer HealthCare, 2003) ya que utiliza un buffer de lisis para poder romper las membranas de las células hematopoyéticas. Los granulocitos presentan la mejor resistencia de membrana de todos los leucocitos. Pero ya que las células banda no presentan la misma resistencia de membrana que los granulocitos, se cuantifican como linfocitos. Las células banda pueden ser estimuladas para su diferenciación a neutrófilos por el hG-CSF (Demetri & Griffin, 2011). Esto explica el hecho de que el conteo de granulocitos sea inferior en el control negativo en comparación con las muestras de sangre que contienen hG-CSF (control positivo y hG-CSF). En

consecuencia, también explica el decrecimiento en el número de linfocitos de las muestras con hG-CSF con respecto al control negativo. En resumen, el hG-CSF, producido a partir de SmbP, presenta la capacidad de estimular la diferenciación de células banda a neutrófilos en sangre periférica.

Usualmente los estudios de actividad biológica *in vitro* para hG-CSF se hacen en la línea celular M-NFS-60, la cual corresponde a mieloblastocitos murinos (Bich, et al., 2014), sin embargo, como pudimos observar en nuestro ensayo de actividad biológica, no toda la diferenciación celular se lleva a cabo dentro de la médula ósea.

En cuanto a la citotoxicidad en células de hígado de Chang, los resultados fueron lo esperado. El hG-CSF se produce naturalmente en el cuerpo humano, estimulado por diferentes factores como pueden ser: factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento endotelial vascular, lipopolisacaridos, interleucina 17, interleucina 1, entre otros (Jung, et al., 2001); y puede ser producido por diferentes tipos de células como: células epiteliales, células endoteliales, macrófagos, fibroblastos e, incluso, células hematopoyéticas (Demetri & Griffin, 2011). Al ser una proteína tan natural para el cuerpo humano, se esperaría que la toxicidad hacia células humanas no existiera. Y aunque se observó un declive en la viabilidad celular en las concentraciones de  $1 \times 10^5$  pg/mL, esto no es algo significativo si tomamos en cuenta que la dosis del medicamento es de 5  $\mu$ g/kg de peso del paciente, es decir, que una persona de 60 kg de peso en tratamiento con hG-CSF tendría una concentración sanguínea de 60 pg/mL de sangre. Un valor que es 1667 veces más pequeño que  $1 \times 10^5$  pg/mL. Y las

concentraciones de 10 y 100 pg/mL no mostraron ser tóxicas a células de hígado de Chang.

Es importante denotar la pureza de la proteína, pues al usarse *E. coli* como organismo hospedero, el hG-CSF se pudiera encontrar contaminado por proteínas ajenas a un organismo eucariota. La pureza de la proteína se corroboró por SDS-PAGE y se confirmó con los ensayos biológicos donde no hay toxicidad a células de hígado de Chang y estimula la diferenciación de neutrófilos.

## Capítulo 7

### 7. Conclusiones

- El uso de proteínas de fusión, SmbP y CusF, mejoran la expresión de hG-CSF soluble en *Escherichia coli* como se observó en los resultados obtenidos donde la banda de expresión del hG-CSF con la proteína de fusión eran mayores que las del hG-CSF con un His-tag.
- Es viable el uso de cromatografía de afinidad para la purificación de las proteínas SmbP-hG-CSF con Ni(II) mostrando una elevada pureza.
- El sistema de expresión de hG-CSF con SmbP mejora niveles de pureza en comparación con el sistema con CusF que utiliza Cu(II).
- La remoción de la proteína de fusión no afecta el hG-CSF ya que se conserva su actividad biológica.
- El hG-CSF producido a partir de SmbP es comparable en su actividad biológica al filgrastim al observarse un aumento en el porcentaje de neutrófilos en sangre, lo cual indica que la proteína obtenida se encuentra en forma activa.



- El hG-CSF producido a partir de SmbP no es tóxico a células de hígado de Chang en las concentraciones evaluadas, mostrando valores de viabilidad celular comparables al filgrastim comercial
- El hG-CSF obtenido con el sistema de expresión-purificación de SmbP es equiparable al filgrastim comercial, siendo este sistema de expresión-purificación una opción viable para la producción de biofármacos con valor comercial.

## Capítulo 8

### 8. Perspectivas

Debido a las fallas que se observaron en la purificación con CusF y la poca especificidad del Cu(II) para unirse a proteínas, podría intentarse una modificación o una adición a la proteína de fusión que le pudiera dar más afinidad a otro ión más específico. Una opción puede ser la adición de una secuencia de histidinas en el N-terminal de la proteína que le permitiera ser afín al ión Ni(II) sin afectar las mejoras que ya se han observado durante la expresión.

También sería importante llevar a cabo una evaluación de la actividad biológica sobre una línea celular de mieloblastocitos, los cuales son precursores de neutrófilos como las células banda, sólo que con una menor cantidad de receptores para hG-CSF por lo cual requieren de una mayor cantidad de tiempo de interacción con el hG-CSF. Una opción para la realización de este estudio sería la línea celular M-NFS-60, la cual consiste en mieloblastocitos murinos y que ya ha sido probada para la evaluación de rhG-CSF.



## Referencias

Ausubel, F., 2003. *Current protocols in molecular biology*. Nueva York: Wiley.

Bath, P. & Sprigg, N., 2012. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *The Cochrane collaboration*, Volumen 10, pp. 1-25.

Bayer HealthCare, 2003. *ADVIA 60 hematology system operator's guide*, Leverkusen: Bayer HealthCare LLC.

Bich, H. y otros, 2014. Soluble prokaryotic overexpression and purification of bioactive human granulocyte colony-stimulating factor by maltose binding protein and protein disulfide isomerase. *PLOS ONE*, 9(3), pp. 1-10.

Bocchietto, E. y otros, 1993. Proliferative and migratory responses of murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony-stimulating factor. *Journal of Cellular Physiology*, Issue 155, pp. 89-95.

Brett, M., Rusell, L. & Wilson, A., 2004. Characterization of a small metal binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry*, Issue 43, pp. 11206-11213.

Brett, M., Rusell, L. & Wilson, A., 2004. Characterization of a Small Metal binding Protein from *Nitrosomonas Europaea*. *Biotechnology*, Issue 43, pp. 11206-11213.

Brunton, L., Lazo, J. & Parker, K., 2006. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ra ed. Nueva York: McGraw Hill.

Chang, K., Chi, L., Seung-Bae, L. & Jae-Wook, O., 2013. Simplified large-scale refolding, purification, and characterization of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 8(11), p. e80109.

Chang-Kyu, K., Sang-Mahn, L. & Sang-Min, J., 2010. High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for production of rat procarboxypeptidase B. *Food Science and Biotechnology*, 6(19), pp. 1627-1633.

Cheol-Ki, M. y otros, 2011. Increased expression, folding and enzyme reaction rate of recombinant human insulin by selecting appropriate leader peptide. *Journal of Biotechnology*, Issue 151, pp. 350-356.

- Cutler, P., 2004. *Protein purification protocols*. 2da ed. Nueva York: Humana Press.
- Demain, A. & Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, Issue 27, pp. 297-306.
- Demetri, G. & Griffin, J., 2011. Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. *Blood Journal*, 78(11), pp. 2791-2796.
- Dubendorff, J. & Studier, F., 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol*, Issue 219, pp. 45-59.
- Freifeld, A. y otros, 2011. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 4(52), pp. 56-93.
- Gascon, P., 2012. Presently available biosimilars in hematology-oncology: G-CSF. *Targeted Oncology*, Issue 7, pp. 29-34.
- General Electric, 2007. *Affinity chromatography principles and methods*. Suecia: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Gravel, P., Naik, A. & Le Cottonnec, J.-Y., 2012. Biosimilar rhG-CSFs: how similar are they?. *Targeted Oncology*, Issue 7, pp. 3-16.
- Grossman, T., Kawasaki, E., Punreddy, S. & Osburne, M., 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, Issue 209, pp. 95-103.
- Hernan, A., Boone, T. & Lu, S., 1996. Characterization, formulation, and stability of Neupogen (filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. In: *Plenum Press*.
- Hinderer, W. & Scheckermann, C., 2012. *Method for obtaining biologically active recombinant human G-CSF*. Estados Unidos, Patente nº US2012/0328560.
- Hyungkyoung, L. y otros, 2013. Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Issue 36, pp. 732-740.
- Iwata, Y. y otros, 2013. Effects of stem cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor on endothelial function after sirolimus-eluting stent implantation: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *American Heart Journal*, Issue 165, pp. 408-414.
- Jeong, K. & Lee, S., 2001. Secretory production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, Issue 23, pp. 311-318.
- Jevsevar, S. & Menart, V., 2006. *Synthetic gene coding for human granulocyte-colony stimulating factor for the expression in E. coli*. Estados Unidos de América, Patente nº US200610228781.

- Jung, H. y otros, 2001. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Trangenic Res*, Issue 9, pp. 215-222.
- Kittleson, J. y otros, 2006. Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibirts high affinity and specificity for both Cu<sup>+</sup> and Ag<sup>+</sup>. *Biochemistry*, Issue 45, pp. 11096-11102.
- Knäblein, J., 2005. *Modern Biopharmaceuticals*. Primera ed. Alemania: Wiley-VCH.
- Kojima, S., Tadenuma, H., Inada, Y. & Saito, Y., 1989. Enhancement of plasminogen activator activity in cultured endothelial cells by granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Cellular Physiology*, Issue 138, pp. 192-196.
- Lasnik, M., Porekar, V. & Stalc, A., 2001. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by methylotropic yeast pichia pastoris.. *Pflugers Archiv*, Issue 442, pp. 184-186.
- Lee, A. y otros, 2013. Granulocyte colony-stimulating factor induces in vitro lymphangiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Issue 436, pp. 565-570.
- Loftin, I. y otros, 2005. A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry*, Volumen 44, pp. 10533-10540.
- Madadlou, A., 2011. Fast protein liquid chromatography. *Methods in Molecular Biology*, Issue 681, pp. 439-447.
- Mendoza Patiño, N., 2008. *Farmacología médica*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Metcalf, D., 2010. The colony-stimulating factors and cancer. *Nature reviwrs. Cancer*, Issue 10, pp. 425-434.
- Nomura, H. y otros, 1986. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *EMBO Journal*, Issue 5, pp. 871-876.
- O'Brien, C., Dempsey, O. & Kennedy, J., 2014. Febrile neutropenia risk assessment tool: Improving clinical outcomes for oncology patients. *Eur J Oncol Nurs*, Issue 18, pp. 167-174.
- Oheda, M., Hase, S., Ono, M. & Ikenaka, T., 1988. Structures of the sugar chains of recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biochemistry*, Issue 103, pp. 544-546.
- Park, E. y otros, 2014. Role of p53 in the cellular response following olic acid accumulation in Chang liver cells. *Toxicology Letters*, pp. 114-120.
- Pereira, M., Santana, M. & Teixeira, M., 2001. A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta*, 1505(2-3), pp. 185-208.

Pettengall, R. y otros, 2008. Neutropenia occurrence and predictors of reduced chemotherapy delivery: results from the INC-EU prospective observational European neutropenia study. *Support Care Cancer*, 11(16), pp. 1299-1309.

PLM, 2014. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. 60ma ed. México, D.F.: Royce Editores.

Prakash, A., Medhi, B. & Chopra, K., 2013. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid-B induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1(110), pp. 46-57.

Ribatti, D., 2012. Angiogenic activity of classical hematopoietic cytokines. *Leukemia Research*, Issue 36, pp. 537-543.

Rodak, B., Fritsma, G. & Keohane, E., 2014. *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. 4a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Schumann, W. & Ferreira, L., 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, Issue 60, pp. 522-533.

Schwanke, C. y otros, 2009. Molecular cloning, expression in *Escherichia coli* and production bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony stimulating factor. *International Journal of Biological Macromolecules*, Issue 45, pp. 97-102.

Secretaría de Salud, 2011. *Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos*. 10 ed. México, D.F.: Comisión Permanente de La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Serdar, S. y otros, 2013. *Transfus Apher Sci*, Issue 48, pp. 315-320.

Shojaei, F. y otros, 2009. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Issue 106, pp. 6742-6747.

Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiological Biotechnology*, Issue 72, pp. 211-223.

Thomson, C., Olson, M., Jackson, L. & Schrader, J., 2012. A simplified method for the efficient refolding and purification of recombinant human GM-CSF. *PLOS-ONE*, Issue 7, p. e49891.

Valdembri, D. y otros, 2002. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathways during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Issue 16, pp. 225-227.

Vanz, A. y otros, 2008. human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*, 13(7), pp. 1-12.

- Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J., Balderas-Renteria, I. & Zarate, X., 2015. Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomas europaea*. *Protein Expr. Purif.*
- Vemula, S. y otros, 2015. Improved production and characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor from *E. coli* optimized downstream process. *Protein Expr Purif*, Issue 108, pp. 62-72.
- Venthanayagam, J. & Flower, A., 2005. Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase. *Microb Cell Fact*, 3(4).
- Voet, D., Voet, J. & Pratt, C., 2009. *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Vogl, T., Hartner, F. S. & Glieder, A., 2013. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, Issue 24, pp. 1094-1101.
- Waldo, G., Standish, B., Berendzen, J. & Terwilliger, T., 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, Issue 17, pp. 691-695.
- Walsh, G., 2007. *Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications*. 1era ed. Londres: Wiley Editorial.
- Wang, C. & Geng, X., 2012. Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor using interaction chromatography at a large scale. *Process Biochemistry*, Issue 47, pp. 2262-2266.



## **Resumen autobiográfico**

Isaac Enrique Díaz Ramos

Candidato para el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Farmacia

**Tesis:** Expresión, purificación, caracterización y evaluación biológica y toxicológica del factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante

**Edad:** 24 años

**Campo de estudio:** Ciencias de la salud

**Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Distrito Federal el 22 de febrero de 1991, hijo de Ildelfonso Enrique Díaz Santín y María Elena Ramos Ibarra.

**Educación:** Egresado de la Universidad Nacional Autónoma de México, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en el 2013.