

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del CCH

Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Mor., México

03088

1
24

INSULINA HUMANA: PRODUCCION POR TECNICAS DE DNA RECOMBINANTE

Tesis que presenta

GUILLERMO GOSSET LAGARDA

para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

1993

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

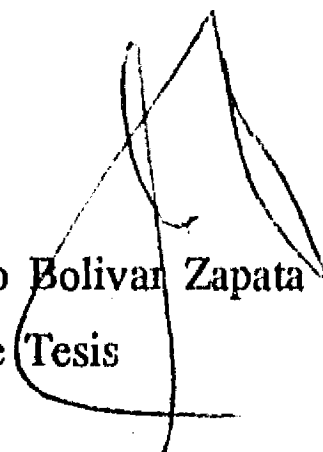
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HUMAN INSULIN: PRODUCTION BY RECOMBINANT DNA TECHNIQUES.

With the purpose of scaling-up the technology for the production of human insulin in Escherichia coli, a fermentative process for the growth of the recombinant strains and also methods for the purification of the A and B insulin chains were developed. Fermentation conditions were developed to achieve simultaneously a high biomass concentration and high-level expression of a hybrid cI-human insulin B peptide gene. In the 10 liter scale, in batch cultures with the E. coli W3110 trp strain transformed with the pNF21B plasmid, a final biomass concentration of 12 g/l dry weight can be obtained, and 0.53 g/l of cI-B chain hybrid protein is produced. Plasmid loss was detected, as only 62% of the cells retained the recombinant plasmid. In fed-batch cultures, where the specific growth rate was limited, it was possible to increase the final biomass concentration to 20 g/l, plasmid -bearing cells in the population to 90% and recombinant hybrid protein to 1.21 g/l. For the purification of the A and B human insulin chains, methods based on liquid chromatography were developed. The human insulin A chain was purified using ion exchange chromatography. With this method it is possible to obtain 0.5 g of A chain per liter, per hour. For the purification of the B chain a method based on high pressure liquid chromatography (HPLC) was developed. With this method it is possible to purify 26.4 g of protein with a 95% recovery.

Vo.Bo. Dr. Francisco Bolivar Zapata
Director de Tesis



INDICE

Nota aclaratoria	3
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	4
Diabetes e insulina	4
Consumo de insulina en México	4
Métodos de producción	5
Producción de insulina humana recombinante	5
Producción de proteínas recombinantes en <u>Escherichia coli</u>	9
Manipulación genética	10
Elementos genéticos más utilizados para la expresión de genes heterólogos	10
Fusiones genéticas para la producción de péptidos en <u>E. coli</u>	12
Estabilidad de plásmidos recombinantes	13
Fermentación e inducción	14
Estrategias de fermentación para obtener una alta densidad celular	14
Métodos de inducción en fermentador para el promotor <u>trp</u>	17
Recuperación y purificación	18
Métodos empleados para la purificación a gran escala de proteínas recombinantes	
OBJETIVO	19
RESULTADOS Y DISCUSION	20
ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y DE FERMENTACION	
a) Caracterización del sistema de expresión <u>E. coli</u> W3110 <u>trp</u> (pNF21B), bajo diferentes condiciones de crecimiento e inducción	20
b) Estabilidad de plásmidos recombinantes	20
c) Inducción del gene híbrido eI-cadena B y nivel de la proteína híbrida	21
d) Niveles de concentración celular	27
ASPECTOS DE RECUPERACION Y PROCESAMIENTO DE LA BIOMASA	28
ASPECTOS DE PURIFICACION DE LAS CADENAS DE INSULINA	
a) Purificación preparativa de la cadena B de insulina	29
b) Purificación preparativa de la cadena A de insulina	32
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFIA	37
RESUMEN DE RESULTADOS Y PUBLICACIONES	40

NOTA ACLARATORIA:

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fueron integrados en tres artículos. Es necesario resaltar la participación de las personas que contribuyeron a estos trabajos, sus nombres aparecen en las publicaciones respectivas. Estas se anexan en la sección de Resumen de Resultados y Publicaciones

Publicaciones:

Artículo 1:

-Recombinant protein production in cultures of an Escherichia coli trp⁻ strain.

G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez, R. Quintero y F. Bolivar. Aceptado para publicación en Applied Microbiology and Biotechnology. 1993.

Artículo 2:

-Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in Escherichia coli. N. Cruz, S. Antonio, R. de Anda, G. Gosset y F. Bolivar. 1990. Journal of Liquid Chromatography, 13:1517-1528.

Artículo 3:

-Preparative isolation of recombinant human insulin A chain by ion exchange chromatography. N. Cruz, M. López, G. Estrada, X. Alvarado, R. de Anda, P. Balbás, G. Gosset y F. Bolivar. 1992. Journal of Liquid Chromatography, 15:2311-2324.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Diabetes e insulina.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por la incapacidad del individuo para metabolizar glucosa de una manera normal, debido a la deficiencia absoluta o relativa de la hormona insulina. La diabetes insulino dependiente tiene un origen principalmente genético, aunque también puede iniciarse debido a ciertas infecciones virales que desencadenan una respuesta autoinmune a la células β del páncreas (Anderson, 1988). La diabetes no insulino dependiente se inicia debido a factores ambientales, aunque debe existir también una predisposición genética. La vejez, la multiparidad en mujeres y factores como la obesidad y una dieta deficiente en fibras vegetales, han sido relacionados con la aparición de la diabetes no insulino dependiente (Keen y Jarret, 1976).

El 10% de los pacientes diabéticos padecen la diabetes mellitus insulino dependiente o tipo I. Esta enfermedad puede ser controlada por medio de dietas especiales, hipoglucemiantes orales y en algunos casos, mediante la aplicación de insulina.

La hormona insulina fue aislada por primera vez en el año 1921 por Banting y Best (Goberna, 1978) y al año siguiente comenzó a utilizarse clínicamente. Hasta hace poco tiempo, la insulina se obtenía únicamente de páncreas provenientes de ganado bovino y porcino.

La síntesis natural de la insulina comienza con la traducción de su RNA mensajero específico en un polipéptido precursor de 110 aminoácidos llamado preproinsulina. Los primeros 24 aminoácidos de este péptido corresponden a la secuencia de aminoácidos que llevan la señal que promueve el transporte del polipéptido hacia el retículo endoplásmico de las células β . Esta secuencia de aminoácidos es removida, generándose la proinsulina. Posteriormente, un fragmento interno de 35 aminoácidos (aa), llamado péptido C o conector, es también removido, para producir la insulina madura. Esta se encuentra constituida por dos péptidos (cadena A con 21 aa y cadena B con 30 aa) unidos mediante dos puentes disulfuro (ver Fig. 1).

-Consumo de insulina en México.

Toda la insulina consumida en México es importada por una sola compañía productora. La insulina importada proviene de los Estados Unidos, Brasil y Argentina, y es enviada a granel y envasada en México. Así es posible estimar el consumo de insulina en nuestro país,

considerando los valores de importación para este producto. En base a esta información, se calculó que para el año 1989 hubo un consumo en México de 56 kg, y para el año 2000 se requerirán entre 81 y 100 kg de la hormona (de la Rosa y Favela, 1989).

-Métodos de producción.

Hasta 1983, toda la insulina utilizada para el tratamiento de la diabetes era extraída de páncreas de origen porcino y bovino. Sin embargo, el uso prolongado de este tipo de insulinas en algunos individuos, puede ocasionar una respuesta inmune, debido principalmente a dos factores: la diferencia parcial en la secuencia de la insulina de origen animal con la humana (ver Fig. 1) y la presencia de proinsulina en la preparación; lo anterior señala que la disponibilidad de insulina humana libre de proinsulina es muy deseable.

Existen cuatro posibles rutas para obtener insulina humana: extracción a partir de páncreas humanos, síntesis química total, modificación enzimática de la insulina porcina y producción por organismos modificados por ingeniería genética.

Las primeras dos opciones presentan serios problemas de factibilidad debido a la disponibilidad de páncreas humanos, y al alto costo de producción por síntesis química total.

Como puede verse en la Fig. 1, la única diferencia entre la insulina porcina y la humana se localiza en la posición 30 de la cadena B. La compañía Novo Industri ha desarrollado un método que permite cambiar el residuo de alanina por el de treonina. De esta manera se obtiene una molécula idéntica a la insulina humana. Una limitación de esta estrategia es que se prevé una baja disponibilidad de materia prima animal en el futuro y finalmente siempre se estará ligado al mercado de producción de ganado porcino.

-Producción de insulina humana recombinante.

Existen dos rutas para obtener insulina humana utilizando organismos modificados por ingeniería genética, (ver Fig. 2). Una de ellas consiste en producir las cadenas A y B por separado, para luego asociarlas *in vitro*. La otra se basa en la producción de proinsulina, para posteriormente procesarla enzimáticamente en insulina (Goeddel et al., 1979).

Estas dos rutas son empleadas actualmente en la producción comercial de insulina humana. En 1982, la compañía Eli-Lilly inició la producción comercial de insulina humana obteniendo las cadenas A y B por separado en *E. coli*, aunque actualmente ya la produce a

través de proinsulina. La compañía Novo Industri a su vez, fabrica insulina humana siguiendo la ruta de síntesis de proinsulina utilizando a la levadura como organismo productor.

Actualmente existen otras 16 compañías distribuidas en todo el mundo, con proyectos en diferentes fases de desarrollo, para producir insulina humana utilizando organismos recombinantes (Copsey y Delnatte, 1990).

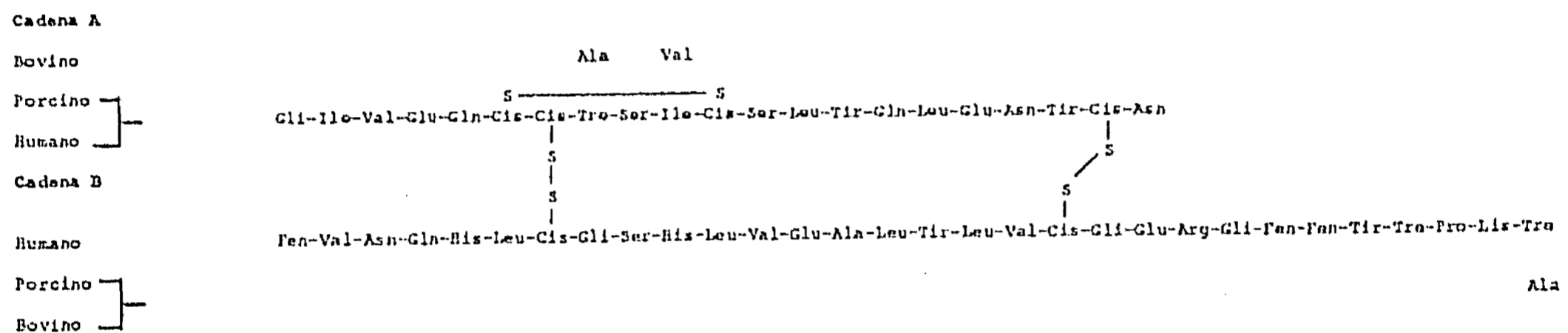


Figura 1

Comparación de la secuencia de aminoácidos de la insulina humana, con las insulinas bovina y porcina. Solo se señalan las diferencias con respecto a la secuencia humana.

En el Instituto de Biotecnología de la UNAM en el laboratorio del Dr. Francisco Bolívar Zapata, se han desarrollado cepas de la bacteria *Escherichia coli*, con la capacidad de sintetizar proteínas de fusión o híbridas cuyos extremos carboxilos terminales corresponden ya sea a la cadena A o a la cadena B de la insulina humana y recientemente también proinsulina. La proteína acarreadora que forma parte de la región amino terminal de la proteína híbrida, es un fragmento del represor λ del fago lambda. Como elemento regulador para la expresión de estos genes híbridos se utilizó a la región de regulación del operón de triptofano de *E. coli*.

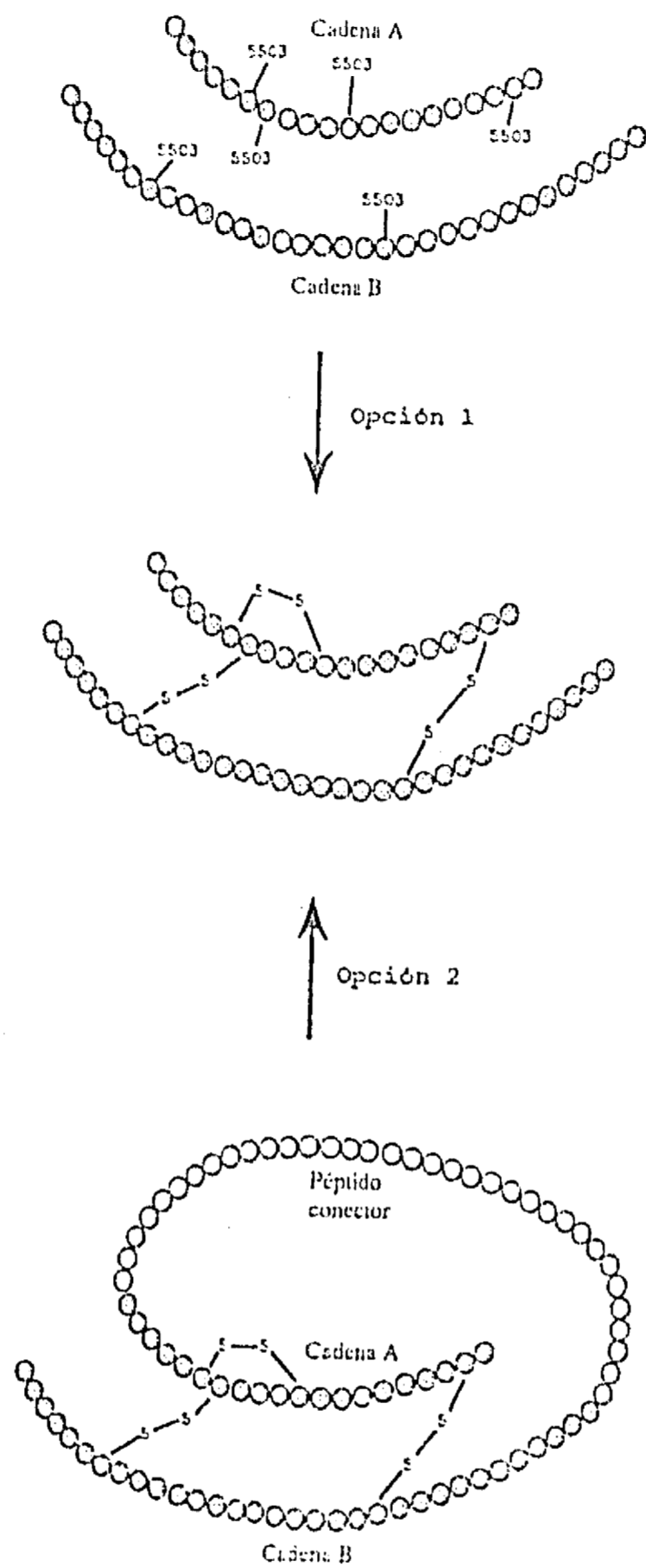


Figura 2. Rutas empleadas para la producción de insulina humana por medio de técnicas de DNA recombinante. La opción 1 consiste en producir las cadenas A y B por separado, purificarlas y asociarlas *in vitro* para obtener la insulina. La opción 2 se basa en la producción de proinsulina, a la cual se le remueve el péptido conector para obtenerse la insulina.

La transcripción a partir del promotor de esta región reguladora, es reprimida por concentraciones intracelulares elevadas de triptofano, e inducida por niveles bajos de este aminoácido (Flores et al. 1986; Yansura y Henner, 1990). Los plásmidos que llevan la información para la síntesis de las proteínas híbridas α -cadena A y α -cadena B (pNF21A y pNF21B) son derivados del pBR322 y fueron introducidos en diferentes cepas de la bacteria E. coli, para determinar en cual de ellas se lograba el nivel más alto de expresión. De este estudio, el sistema de producción final resultó ser la cepa W3110 trp de E. coli transformada con el plásmido pNF21A o pNF21B (Balbás et al., 1988).

Utilizando estas cepas recombinantes, se ha desarrollado una tecnología a nivel laboratorio que ha permitido la producción de las cadenas A y B de insulina como proteínas de fusión en E. coli, así como su recuperación, purificación preparativa y su asociación in vitro para formar insulina humana (Balbás et al., 1988; Cruz et al., 1990; Cruz et al., 1992).

PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN E. coli.

La ingeniería genética es un conjunto de metodologías que permiten el aislamiento, la caracterización y la manipulación del material genético de los seres vivos. Mediante estas técnicas, desde hace ya algunos años, es posible aislar genes de un organismo, modificarlos e introducirlos en otros seres vivos para su expresión. Los primeros experimentos en donde se aislaron y se introdujeron genes de un organismo en otro, fueron reportados en 1974 por Boyer y Cohen (Morrow et al., 1974). Unos cuantos años después, en 1978, el grupo de Herbert Boyer en colaboración con investigadores de City of Hope en Los Angeles E.U.A., lograron sintetizar un gene y expresarlo en la bacteria Escherichia coli. Este gene sintético codificaba para la hormona somatostatina humana, siendo así el primer ejemplo a nivel mundial en donde fue posible demostrar la producción de hormonas humanas en bacterias (Itakura et al., 1977).

Estos organismos recombinantes pueden ser el punto de partida para el desarrollo de procesos industriales, sin embargo, para que esto sea posible, es necesario además aplicar la ingeniería bioquímica. Esta puede ser definida como la actividad que se ocupa del procesamiento económico de materiales de carácter u origen biológico, con propósitos útiles (Aiba et al., 1973).

Uno de los frutos de la aplicación conjunta de la ingeniería genética y la ingeniería bioquímica ha sido la producción a nivel industrial de nuevas vacunas y proteínas terapéuticas humanas, como son: la insulina, los interferones, la hormona de crecimiento, el activador de plasminógeno tisular, los factores de coagulación, etc. La disponibilidad de este tipo de proteínas y otras que serán producidas en el futuro, ofrece nuevas posibilidades para la solución de problemas en sectores como la Salud y el Agropecuario entre otros (Antébil y Fishlock, 1986).

Para lograr lo anterior, que hoy ya permite la síntesis de muchas proteínas en diferentes organismos, fue necesario desarrollar un conjunto de herramientas moleculares sofisticadas, algunas de las cuales se mencionan a continuación.

-Manipulación genética.

-Elementos genéticos más utilizados para la expresión de genes heterólogos.

La expresión de un gene heterólogo requiere de secuencias reguladoras propias de la célula hospedera. Generalmente se desea que la expresión del gene recombinante pueda ser regulada, ya que esto permite controlar el momento en el cual comienza la síntesis de la proteína de interés. De esta manera, se divide la fermentación en dos fases, una de crecimiento y otra de producción en la cual puede o no continuar el crecimiento. Esta estrategia permite reducir algunos de los problemas asociados a la expresión de un gene heterólogo, a saber: la reducción en la tasa de crecimiento del organismo hospedero y un incremento en la proporción de células sin plásmido en el cultivo.

Es importante señalar que el promotor que se considere utilizar debe ser eficiente en cuanto a favorecer el inicio del proceso de la transcripción (síntesis de RNA a partir de DNA), por la enzima involucrada en este proceso, llamada RNA polimerasa; a esta eficiencia también se le llama "fuerza del promotor" y de esto depende la tasa de síntesis del RNA mensajero. Oponiéndose al proceso de inicio de la transcripción, se encuentra el efecto de secuencias reguladoras llamadas operadores, que son sitios de interacción de proteínas reguladoras que al unirse a ellos impiden el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa. Señales metabólicas específicas de tipo químico y/o físico determinan que un represor se una o no al operador, regulándose de esta manera la expresión genética. El tipo necesario de señal para favorecer el inicio de la transcripción o "inducir" al promotor, el costo y la posibilidad técnica de llevar a cabo la inducción en una escala grande, son factores relevantes a considerar si se contempla escalar los procesos de fermentación e inducción.

Otro aspecto importante a considerar en la elección de un promotor para la expresión de genes heterólogos, es el nivel de "transcripción de escape". Cuando el promotor se encuentra reprimido debido a la acción del represor, existe sin embargo una baja actividad de transcripción, llamada transcripción de escape. Esta es diferente para cada promotor, y en

este sentido es recomendable para procesos de producción, seleccionar aquellos sistemas con niveles bajos de transcripción de escape.

Resumiendo, las características con las que debe contar un promotor adecuado para este fin de fermentación son: a) una "alta eficiencia", b) que sea fácilmente inducible y c) que posea un bajo nivel de "transcripción de escape". Así, entre los promotores regulables de *E. coli* más utilizados se encuentran: lac-UV5, trp, lac y P_{λ} del fago lambda.

El promotor lac-UV5 ha sido empleado con mucha frecuencia, debido a que es uno de los mejor estudiados. Es relativamente débil, pero en cambio puede ser regulado fácilmente. Este promotor es derivado del promotor silvestre lac, el cual dirige la expresión del operón de genes cuyos productos están involucrados en la asimilación de lactosa. A diferencia del promotor silvestre, el promotor lac-UV5 no requiere de activación por el complejo AMP cíclico-CRP (Majors, 1975) y sigue siendo regulado negativamente por el represor lac. Por otro lado, en presencia del inductor natural lactosa o de isopropil- β -tiogalactósido (IPTG), que es un inductor gratuito del sistema, se elimina la represión, siendo posible el inicio de la transcripción.

El promotor trp dirige la transcripción del operón de genes cuyos productos están involucrados en la síntesis del aminoácido triptofano (Yanofsky et al., 1981). Su regulación depende del represor trp y de otro elemento de regulación interna, a nivel del RNA mensajero, llamado atenuador (Platt, 1980). Para la expresión de genes heterólogos, se ha usado la región de regulación trp que tiene el atenuador deletado, debido a que en esas construcciones se ha observado un alto nivel de expresión (Yanofsky, 1981). Para que el represor pueda unirse al operador, es necesaria la presencia del triptofano que actúa como correpresor. Por lo tanto, para que ocurra inducción de este promotor, el nivel intracelular de triptofano debe ser bajo. Sin embargo, ya que la célula sintetiza normalmente triptofano, generalmente es difícil lograr una buena inducción solo removiendo el triptofano del medio de cultivo. Esto puede mejorarse adicionando al medio un análogo de triptofano, el ácido-indol-acrílico (AIA), el cual ayuda a desplazar al triptofano de su sitio en el represor (Yansura y Henner, 1990); este promotor es aproximadamente 5 veces más "eficiente" que el promotor lac-UV5.

El promotor lac es un promotor híbrido derivado de los dos anteriores, que conserva la alta eficiencia del promotor trp, pero es regulado por el represor lac. Está constituido por la región -35 del promotor trp y la región -10 y el operador de lac. La eficiencia de este

promotor es prácticamente igual a la de *trp* (De Boer et al., 1982).

El promotor P_{λ} participa en el control del mantenimiento de la infección lítica del fago lambda. Su expresión es controlada por el represor fágico el durante el estado lisogénico del fago. Se han obtenido mutantes de este represor que lo hacen sensible a altas temperaturas de crecimiento (42° C). La eficiencia de este promotor es similar a la de *lac*.

Cualquiera de estos promotores puede ser útil para la expresión de genes que codifican para proteínas recombinantes, como ha sido demostrado por varios grupos. Sin embargo, si se desea que el proceso sea competitivo comercialmente, se deberá considerar el costo del método de inducción, así como la factibilidad técnica de transferirlo a una escala de producción.

El nivel final de proteína dependerá además de otros elementos genéticos presentes en el vehículo molecular y la célula hospedera; la dosis génica, determinada por el número de copias del plásmido recombinante al momento de la inducción, y las condiciones fisiológicas de la bacteria.

-Fusiones genéticas para la producción de péptidos en *E. coli*.

Un problema potencial al tratar de expresar un gene heterólogo en *E. coli*, es la posible degradación proteolítica del producto y esto ocurre preferencialmente en péptidos pequeños. Por ejemplo, la vida media de la proinsulina de rata expresada en *E. coli* es de 2 minutos (Talmadge, 1982).

Existen varias posibles soluciones a este problema y una de las más efectivas consiste en fusionar al gene del polipéptido, con el gene estructural de una proteína acarreadora estable (generalmente propia de *E. coli*). Al expresarse este gene híbrido, dará como producto una proteína híbrida o de fusión, que puede ser estable (Itakura et al., 1977; Uhlén y Moks, 1990).

Generalmente al sobreproducirse una proteína híbrida en *E. coli*, ésta se acumula en la célula como cuerpos de inclusión que son partículas densas que contienen a la proteína híbrida precipitada. La formación de estos cuerpos depende principalmente de la solubilidad de la proteína híbrida, su tasa de síntesis, y las condiciones de cultivo (Itakura et al., 1977; Marston, 1986). Las principales ventajas de producir la proteína híbrida como cuerpos de inclusión son que de esta manera se encuentra protegida de la proteólisis, y que además puede ser purificada

fácilmente por medio de centrifugación diferencial (Cruz et al., 1990). Sin embargo, una desventaja de los cuerpos de inclusión es que el producto se obtiene inactivo por encontrarse precipitado y por ello para recuperar su actividad, es necesario solubilizar y renaturalizar la proteína.

Es conveniente que la proteína acarreadora sea lo más pequeña posible, para que la proporción de la proteína de interés sea alta. Para la expresión de genes heterólogos en *E. coli*, se han empleado frecuentemente fusiones con genes o segmentos de los mismos, que codifican para las siguientes proteínas: β -Galactosidasa (Itakura et al., 1977), antranilato sintasa (Yansura, 1990), represor cI (Flores et al., 1986) y represor cII (Nagai y Thorgersen, 1984). Estas proteínas o porciones de ellas, han sido efectivas para lograr estabilizar proteínas heterólogas en *E. coli*.

-Estabilidad de plásmidos recombinantes.

Algunos plásmidos originales de *E. coli*, fueron utilizados inicialmente como vehículos moleculares para la clonación de DNA (Morrow et al., 1974). Sin embargo, éstos tienen grandes limitaciones por lo que fue necesario diseñar y desarrollar plásmidos con características superiores como vehículos de clonación. Un ejemplo de estos vehículos es el plásmido pBR322 (Bolivar et al., 1977), que ha sido usado junto con sus derivados (Balbás et al., 1986), para muchos experimentos clásicos de clonación y expresión de DNA.

La presencia del plásmido recombinante, portador del (los) gene(s) heterólogo(s), en un cultivo de producción, es un factor determinante de la productividad. La inestabilidad segregacional de un plásmido, depende de las características genéticas propias, de la cepa hospedera y del estado fisiológico de esta última.

La utilización de agentes selectivos (antibióticos) para evitar el crecimiento de células que han perdido el plásmido, ha resultado efectivo en cultivos a nivel laboratorio. Sin embargo, en cultivos a gran escala y/o de alta densidad celular, este método sería costoso y como ha sido demostrado, podría ser poco efectivo (Pierce y Gutteridge, 1985).

Otra manera de favorecer el mantenimiento del plásmido recombinante en la población, consiste en restringir la velocidad específica de crecimiento (μ) de las células (Seo y Bailey, 1985; Seo y Bailey, 1986; Lee y Chang, 1990). Al reducir μ , generalmente se ocasiona un incremento en el número de copias del plásmido recombinante, y con esto una reducción en

la frecuencia de segregación (Koizumi et al., 1985). Existen diversas maneras de restringir la velocidad específica de crecimiento, sin embargo, aquella que es usada con mayor frecuencia se basa en limitar algún nutriente en el medio de cultivo (Zabriskie y Arcuri, 1986).

-Fermentación e inducción.

La conversión de un proceso de producción a nivel de laboratorio en un proceso industrial, recibe el nombre de escalamiento. Es bien sabido que un proceso que funciona adecuadamente en la escala de laboratorio, puede no necesariamente funcionar o hacerlo deficientemente en escalas mayores. Es importante seleccionar desde el desarrollo de un proceso a nivel laboratorio, estrategias y operaciones que puedan ser escaladas eficientemente a nivel planta piloto o mayor.

El objetivo del proceso de fermentación como parte de una tecnología de producción, consiste en obtener la mayor cantidad de producto por unidad de volumen y de tiempo (productividad). Esta productividad está determinada por las características genéticas del sistema de producción (plásmido recombinante y cepa hospedera) y por las condiciones de cultivo.

Son tres los factores que influyen en mayor medida sobre la productividad de un cultivo con organismos recombinantes: la estabilidad del plásmido recombinante, la concentración celular final y el nivel de inducción del (los) gene(s) heterólogo(s). Estos factores tienen un límite determinado por las características genéticas del sistema de producción; sin embargo, estos elementos pueden ser manipulados, hasta cierto límite, al modificar las condiciones de cultivo.

-Estrategias de fermentación para obtener altas densidades celulares.

Uno de los factores que determinan la productividad en un cultivo donde el producto se acumula intracelularmente es la concentración celular final. En un cultivo bacteriano, la concentración celular aumenta hasta que se presenta una limitación para continuar creciendo. Esta puede ser la falta de nutrientes o la acumulación de metabolitos inhibidores del crecimiento (Zabriskie y Arcuri, 1986).

En el caso de los cultivos con E. coli, el nutriente que generalmente limita el crecimiento es el oxígeno (Paalme et al., 1989). Cuando el suministro de oxígeno por el equipo (N_a) es superado por la tasa de consumo de oxígeno por las células en cultivo ($Q_{O_2} X$), se establecen condiciones anaeróbicas, las cuales son desfavorables para lograr densidades celulares elevadas (Zabriskie y Arcuri, 1986).

Por lo tanto, un cultivo no estará limitado por oxígeno mientras se cumpla lo siguiente:

$$N_a \geq Q_{O_2} X$$

lo que es igual a:

$$k_{l,a} (C_g^* - C_l) \geq Y_{O_2} X \mu$$

en donde:

- $k_{l,a}$ Coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1}).
- C_g^* Concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el oxígeno de la fase gaseosa (g/L).
- C_l Concentración del oxígeno disuelto en el líquido (g/L).
- Y_{O_2} Rendimiento de oxígeno (g oxígeno/g células).
- X Concentración celular (g células/L).
- μ Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Gran parte de los estudios encaminados a lograr cultivos de alta densidad con E. coli, han sido enfocados a definir métodos para incrementar la transferencia de oxígeno o reducir su demanda biológica.

De acuerdo con lo anterior, en cuanto a la transferencia de oxígeno, los parámetros que pueden incrementarse son $k_{l,a}$ o C_g^* . Durante una fermentación, al aumentar la velocidad de agitación, es posible incrementar el $k_{l,a}$ del equipo para contender con el incremento en $Q_{O_2} X$. Sin embargo, en algún momento se llegará al máximo $k_{l,a}$ para ese equipo determinado y si el cultivo aún se encuentra metabólicamente activo, eventualmente su crecimiento se verá limitado por la falta de oxígeno. Para incrementar aún más el valor de N_a , se han desarrollado estrategias que aumentan el valor de C_g^* . Esto se ha logrado presurizando el fermentador, enriqueciendo el porcentaje de oxígeno del aire empleado, ó utilizando oxígeno puro. Este método ha permitido alcanzar densidades celulares muy altas (Shiloach y Bauer, 1975; Fass et al., 1989). Sin embargo, esta estrategia no puede ser aplicada fácilmente a escalas mayores

de 100 L, debido al costo y al peligro potencial de emplear oxígeno puro, aún cuando sólo se utilizara en las fases finales de la fermentación.

El consumo de oxígeno por las bacterias en cultivo depende de la concentración celular, de la fuente de carbono utilizada y de la velocidad específica de crecimiento (Quintero, 1981). El rendimiento de oxígeno (Y_{O_2}), depende de la fuente de carbono utilizada. Así, la concentración celular (X) irá aumentando conforme transcurre el tiempo de fermentación, y la μ puede variar o permanecer constante durante la fermentación.

Los estudios referentes a tratar de reducir el consumo de oxígeno, han estado enfocados principalmente a lograr controlar la velocidad específica de crecimiento. Una de las estrategias consiste en limitar la velocidad específica de crecimiento por medio del control de la temperatura del medio de cultivo. Este se sustenta en reducir paulatinamente la temperatura de la fermentación para controlar y disminuir la μ y por lo tanto el consumo de oxígeno. Esta estrategia ha tenido éxito solo en volúmenes inferiores a los 250 L; en esta escala, el calor producido por el cultivo, excede la capacidad de enfriamiento del fermentador (Gleiser y Bauer, 1981). Por lo tanto, para aplicar esta estrategia en este volumen o uno mayor, se necesitaría utilizar equipo adicional de enfriamiento.

La estrategia más comúnmente utilizada para controlar el consumo de oxígeno mediante la reducción de la μ , se basa en la limitación de uno o varios nutrientes en el medio de cultivo. El nutriente que generalmente se limita es la fuente de carbono, aunque también se ha reportado la limitación por la fuente de nitrógeno o algún nutriente esencial para el crecimiento celular. La tasa de alimentación del nutriente limitante se puede definir de diversas maneras, y así, se han probado tasas predeterminadas de alimentación, control por demanda de oxígeno o producción de bióxido de carbono, control por demanda de la base usada para controlar pH, etc. Hasta el momento no es claro cual o cuales de estas estrategias serían las mejores, ya que hay que considerar simultáneamente la facilidad de escalamiento y densidad celular alcanzada (Zabriskie y Arcuri, 1986).

Otro elemento que puede limitar la densidad celular final alcanzada en un cultivo, es la presencia de metabolitos inhibidores del crecimiento. La producción de este tipo de metabolitos es propiciada principalmente por tres factores: una alta concentración de la fuente de carbono (generalmente glucosa) en el medio, una alta velocidad específica de crecimiento y condiciones de limitación de oxígeno (Paalme et al., 1989). Las opciones para evitar la producción de

metabolitos inhibidores del crecimiento, son prácticamente las mismas empleadas para disminuir la μ por restricción de nutrientes. Además de la limitación de la fuente de carbono y la velocidad específica de crecimiento, una estrategia adicional para reducir el nivel de metabolitos inhibidores consiste en remover el medio de cultivo del fermentador por filtración tangencial y sustituirlo con medio nuevo. De esta manera, es posible reducir el nivel de los metabolitos inhibidores, y así favorecer que las células continúen creciendo (Lee y Chang, 1990). Una desventaja importante de este método es que se requiere reemplazar al menos un volumen de medio igual al del fermentador, por lo tanto no es fácilmente aplicable a escalas grandes de fermentación.

-Métodos de inducción en fermentador para el promotor trp.

Como ya ha sido mencionado, la región de regulación del operón de triptofano de *E. coli* ha sido utilizada ampliamente para controlar la expresión de genes heterólogos. El método más empleado para lograr la inducción de esta región de regulación, consiste en reducir la concentración de triptofano en el medio de cultivo mediante una dilución de 25 a 50 veces en medio mínimo, y agregar el inductor químico ácido indol-3-acrílico (Yansura y Henner, 1990). Este procedimiento generalmente causa una buena inducción del gene heterólogo, sin embargo, no es fácilmente aplicable a escalas de operación de 10 L o mayores, debido a la necesidad de diluir el cultivo y al costo del inductor.

Se han reportado métodos para lograr la reducción de la concentración extracelular y/o intracelular de triptofano, los cuales pudieran ser utilizados en fermentaciones de gran escala. Uno de estos métodos consiste en la degradación del triptofano intracelular por la enzima triptofanasa. La estrategia se basa en un cultivo tipo lote alimentado, donde se inicia alimentando glucosa, la cual reprime la síntesis de la enzima triptofanasa. Cuando se desea inducir a esta enzima, se cambia la fuente de carbono de glucosa a glicerol en la alimentación, induciéndose así la triptofanasa, la cual degrada al triptofano intracelular, lográndose con esto la inducción (Kawai et al., 1986).

Otro método se basa en la aplicación de la filtración de flujo tangencial, para reemplazar al medio de cultivo con triptofano, por otro que no lo contenga. De esta manera se va reduciendo el nivel de triptofano en el medio, hasta que se provoca la inducción del promotor (Iijima et al., 1987).

-Recuperación y purificación.

-Métodos empleados para la purificación a gran escala de proteínas recombinantes.

En un proceso para la producción de proteínas terapéuticas humanas, el costo de la purificación de las proteínas puede representar hasta el 80 o 90% de su costo total (James, 1984). Normalmente el modo de administración de este tipo de proteínas es mediante inyección, lo cual determina que el producto deba cumplir requisitos de pureza muy estrictos.

Por este motivo, y porque en *E. coli* los productos generalmente son intracelulares, la purificación de las proteínas heterólogas requiere de varias operaciones cromatográficas, basadas en diferentes propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, en cada paso existe una pérdida de material, y por ello es conveniente reducir el número de pasos involucrados.

Los métodos escalables más comúnmente empleados para la purificación de proteínas recombinantes se basan en cromatografía líquida, ya que este tipo de metodología permite lograr un alto grado de resolución en la separación de los componentes de una mezcla. Existen varias modalidades dentro de la cromatografía, y su aplicación dentro de una tecnología de producción va a depender principalmente de las siguientes consideraciones: propiedades fisicoquímicas del producto y del material contaminante, el uso al que estará destinado, la pureza requerida y el costo de operación. Para proteínas recombinantes, tanto la cromatografía de intercambio iónico, como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), han sido empleadas con éxito en escalas de producción. La cromatografía de intercambio iónico se basa en la separación de proteínas y otras moléculas dependiendo de su carga iónica. Es un método que puede ser escalado hasta el nivel industrial. La cromatografía líquida de alta presión de fase reversa, permite la separación de proteínas con base en su hidrofobicidad. Este es uno de los métodos cromatográficos de mayor resolución, pudiendo ser aplicado a escalas industriales de operación (Cruz et al., 1990).

OBJETIVO

El objetivo general de esta tesis fue desarrollar a partir de los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, algunos de los procesos que constituyen y pueden formar parte de una tecnología para la producción de insulina humana por técnicas de DNA recombinante.

Los objetivos particulares fueron:

- Desarrollo de un proceso fermentativo tipo lote alimentado en la escala de 10 litros con la cepa recombinante *E. coli* W3110 *trp* [pNF21B], que sea fácilmente escalable y que permita lograr un alto nivel de producción de la proteína híbrida cI-cadena B. Se pretende que este proceso además pueda servir de modelo para el escalamiento de la producción de la proteína híbrida cI-A.
- Desarrollo de procesos escalables basados en cromatografía líquida, para la purificación preparativa de las cadenas A y B de insulina humana, producidas en *E. coli*.

El cumplimiento de estos objetivos es parte del primer paso en el desarrollo de una tecnología a escala planta piloto para la obtención de insulina humana producida en *E. coli*. Los conocimientos adquiridos además podrán ser aplicados al desarrollo de tecnologías para la producción de otras proteínas por técnicas de DNA recombinante, incluida la proinsulina humana.

RESULTADOS Y DISCUSION

ASPECTOS MICROBIOLOGICOS Y DE FERMENTACION

-Caracterización del sistema de expresión E. coli W3110 trp (pNF21B), bajo diferentes condiciones de crecimiento e inducción.

Con el propósito de desarrollar un proceso fermentativo de alta productividad, susceptible de ser escalado, inicialmente se estudiaron bajo diferentes condiciones cultivo tipo lote, tres parámetros: a) estabilidad del plásmido pNF21B en la cepa E. coli W3110 trp; b) inducción del gene híbrido cl-cadena B en esta cepa y c) nivel de concentración celular final en fermentaciones de 10 litros. Con estos elementos se desarrolló un sistema de cultivo tipo lote alimentado, con el cual se logró alcanzar un alto nivel de producción de la proteína híbrida. A continuación se comparan y discuten los resultados más relevantes, y se refieren a las publicaciones resultantes.

a) Estabilidad del plásmido pNF21B en la cepa E. coli W3110 trp

Los resultados de experimentos en cultivo tipo lote, y lote alimentado indicaron que en el sistema de producción existe inestabilidad segregacional del plásmido pNF21B (Gosset et al., artículo 1). La disminución de la proporción de células portadoras de plásmido en un cultivo de bacterias recombinantes depende de dos factores: de la probabilidad con la que se generan células sin plásmidos y/o que se producen mutaciones en estos últimos, y de la diferencia en velocidades específicas de crecimiento entre las células con plásmidos y aquellas que los perdieron.

En los experimentos con los cultivos tipo lote donde se estudió el efecto de diferentes concentraciones de triptofano, pudo observarse una correlación entre el nivel de proteína híbrida producida y el porcentaje de células sin plásmido (Fig. 3, que es la Fig. 1 del artículo 1 y Tabla I, artículo 1). En este tipo de cultivo, la μ fue similar en las cuatro condiciones estudiadas. Por lo tanto fue posible atribuir al nivel de inducción de la proteína cl-cadena B, el grado de pérdida de plásmido en la población bacteriana. Este fenómeno puede explicarse si se considera que el nivel de inducción de la proteína híbrida puede tener un efecto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento. Por lo tanto, es posible pensar que al inducirse el gene híbrido se desvía parte de la capacidad biosintética de la bacteria hacia la síntesis de

la proteína híbrida, ocasionando una reducción en la μ , que es proporcional al nivel de la inducción. Este efecto favorecerá que la población presente de células sin plásmido, eventualmente supere en número a las células productoras. En la Fig. 4 se puede observar cómo la inducción provoca el cese en el crecimiento de la población portadora del plásmido (bacterias productoras), la población de células sin plásmido continúa creciendo, llegando a superar a la población productora.

Por otro lado, al comparar los resultados de los cultivos tipo lote con los de lote alimentado, se encuentra que la pérdida de plásmido es menor en el último caso, ver Tabla I, (Tabla I, artículo 1), siendo las diferencias principales entre estos dos tipos de cultivo la restricción de la μ y un menor nivel de inducción en el cultivo tipo lote alimentado. En este caso, el incremento en el porcentaje de células con plásmido al final del cultivo, puede ser atribuida al posible incremento en el número de copias del plásmido, debido a la reducción de la μ , y al menor nivel de inducción de la proteína híbrida. Puede observarse en la Fig. 5, cómo la aparición de células sin plásmido ocurre hasta la hora 10, y por otro lado, el crecimiento de las células productoras no se ve suprimido por la inducción del gene híbrido.

Estos datos indican que la inestabilidad en este sistema depende al menos de dos factores: el nivel de inducción del gene híbrido y la velocidad específica de crecimiento.

b) Inducción del gene híbrido cI-cadena B y niveles de la proteína híbrida.

Los resultados obtenidos de los cultivos tipo lote muestran la dependencia existente entre el nivel de triptofano en el medio de cultivo, y la represión e inducción del gene híbrido cI-B Tabla I, (Tabla I, artículo 1). Niveles de triptofano en el medio mayores de 200 $\mu\text{g/mL}$ logran mantener reprimido al gene híbrido. Por otro lado, si la fermentación se realiza en un medio con una concentración de triptofano menor a 150 $\mu\text{g/mL}$, entonces puede ocurrir la inducción. Es importante resaltar, en el caso de la condición F1, donde se agregaron 100 $\mu\text{g/ml}$ de triptofano al medio, que el nivel de la proteína híbrida en la población productora corresponde al 12.7% de la proteína total celular. En el cultivo tipo lote alimentado, la situación es diferente, ya que la inducción puede iniciar cuando la concentración de triptofano es de aproximadamente 300 $\mu\text{g/mL}$ y en este caso, el nivel de la proteína híbrida de la población productora corresponde al 12.2% de la proteína total celular (Fig. 6, que equivale

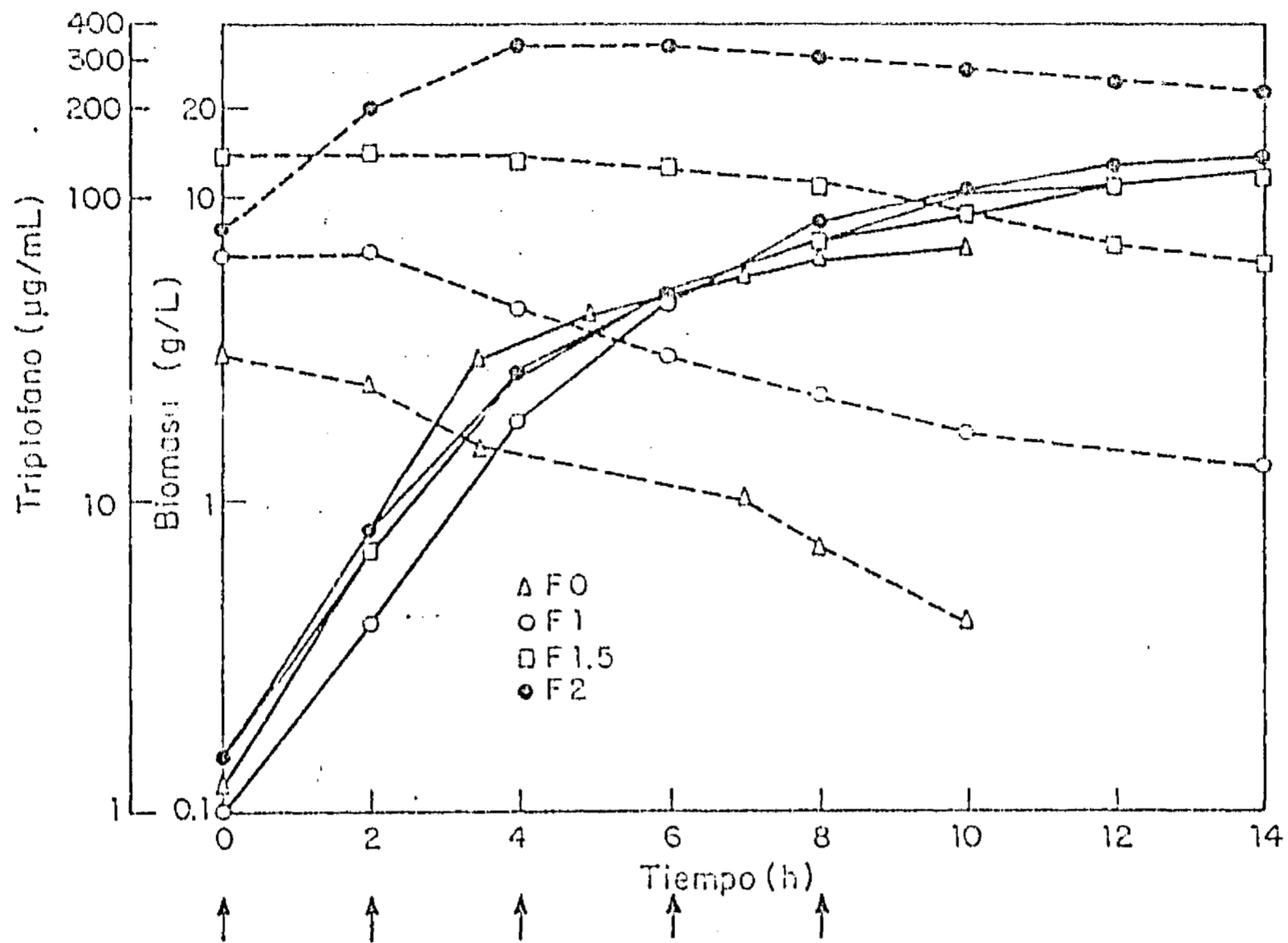


Figura 3. Crecimiento de la cepa *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B) en cultivo tipo lote con medio FEM suplementado con diferentes cantidades de triptofano. La concentración de biomasa está representada por líneas continuas y la concentración de triptofano por líneas punteadas. F0.- Medio FEM sin triptofano adicional. F1.- Medio FEM más 1 g/10 L de triptofano adicionado al tiempo 0. F1.5.- Medio FEM más 1.5 g/10 L de triptofano adicionado al tiempo 0. F2.- Medio FEM más 1 g/L de triptofano adicionado cada dos horas cinco veces a partir del tiempo 0. Las flechas indican el momento de adición de ampicilina (100 µg/mL).

Tabla I. (a) Efecto de la concentración de triptofano* sobre parámetros de fermentaciones tipo lote; (b) comparación entre cultivo tipo lote alimentado y cultivo tipo lote F1.

	(a)				(b)	
	F0	F1	F1.5	F2	Lote alimentado	Relación L alimentado/lote
F1						
Biomasa (g/l)	6.7	12	12	13.9	20	1.67
Población portadora de plásmido (%)	86	62	66	67	90	1.45
Población sin plásmido (%)	14	38	34	33	10	0.26
Relación de proteína híbrida a proteína total celular de la biomasa total (%)	4.6	7.9	7	<1	11	1.39
Relación de proteína híbrida a proteína total celular de la biomasa portadora de plásmido (%)	5.3	12.7	10.6	<1	12.2	0.96
Concentración final de la proteína híbrida (g/l)	0.17	0.53	0.46	---	1.21	2.28
Tiempo total del cultivo (h)	10	14	14	14	24	1.71
Duración de la fase de crecimiento (h)	5.2	5.2	6	14	8	1.54
Duración de la fase de inducción (h)	4.8	8.8	8	0	16	1.82
Rendimiento celular a partir de glucosa (g cels/g gluc.)	---	0.21	---	---	0.3	1.43
Rendimiento de proteína híbrida a partir de glucosa (g prot. híbrida/g gluc.)	---	0.009	---	---	0.018	2
Productividad (g prot. híbrida/l h)	0.02	0.04	0.03	---	0.05	1.25
Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	0.35	0.34	0.26	0.31	0.18	0.53

* Concentraciones de triptofano usadas: F0, medio FEM sin triptofano adicional; F1, medio FEM medium más 1 g/10 l de triptofano adicionado al tiempo 0; F1.5, medio FEM más 1.5 g/10 l de triptofano adicionado al tiempo 0; F2, medio FEM más 1 g/10 l de triptofano adicionado cada dos horas cinco veces, comenzando en el tiempo 0.

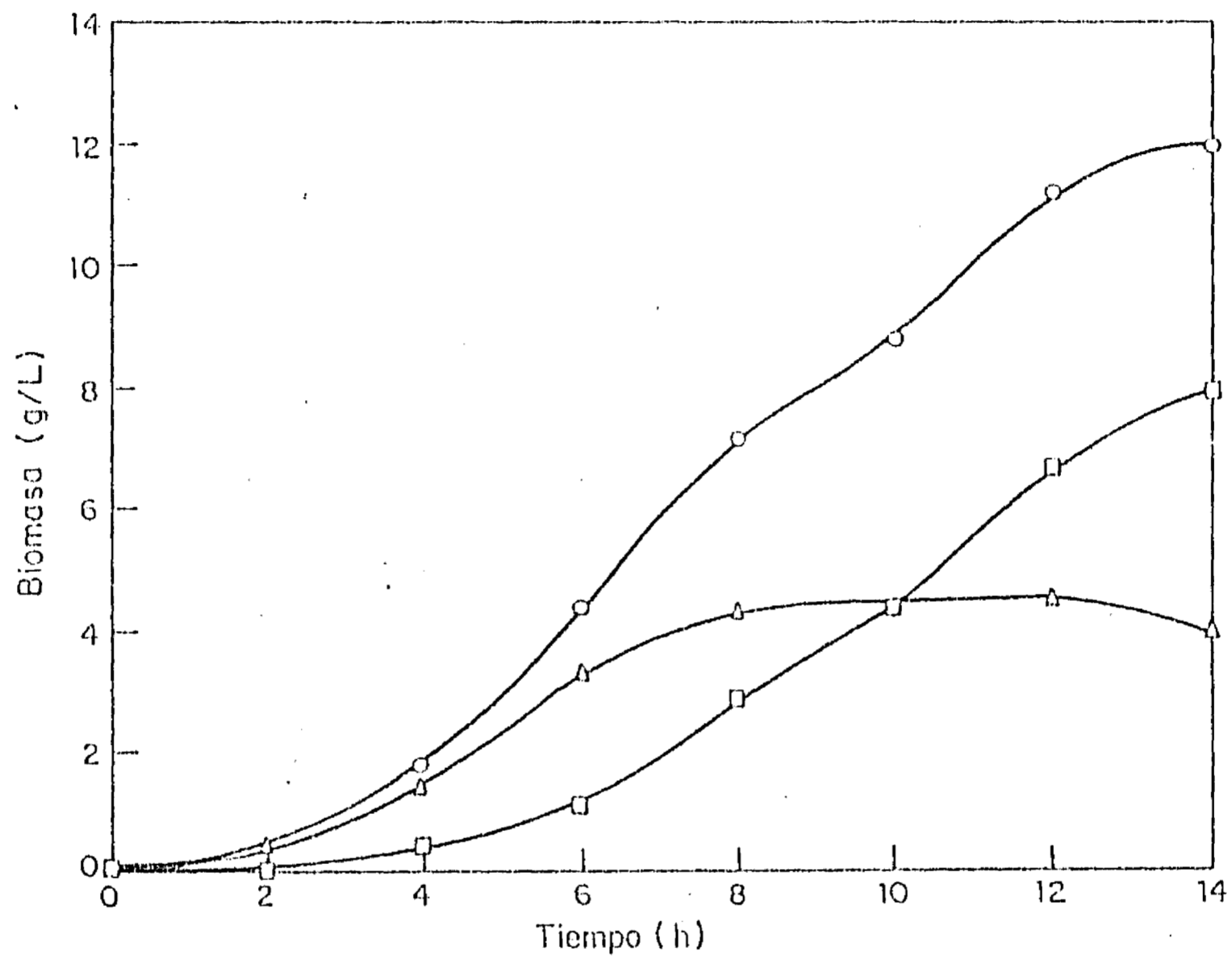


Figura 4. Cinética de crecimiento de biomasa total (○), biomasa portadora de plásmido (Δ) y biomasa sin plásmido (◻) de un cultivo tipo lote con la cepa *E. coli* W3110 *trp^r* (pNF21B). Para obtener estas curvas, muestras del cultivo fueron plateadas en medio Luria y medio Luria más ampicilina.

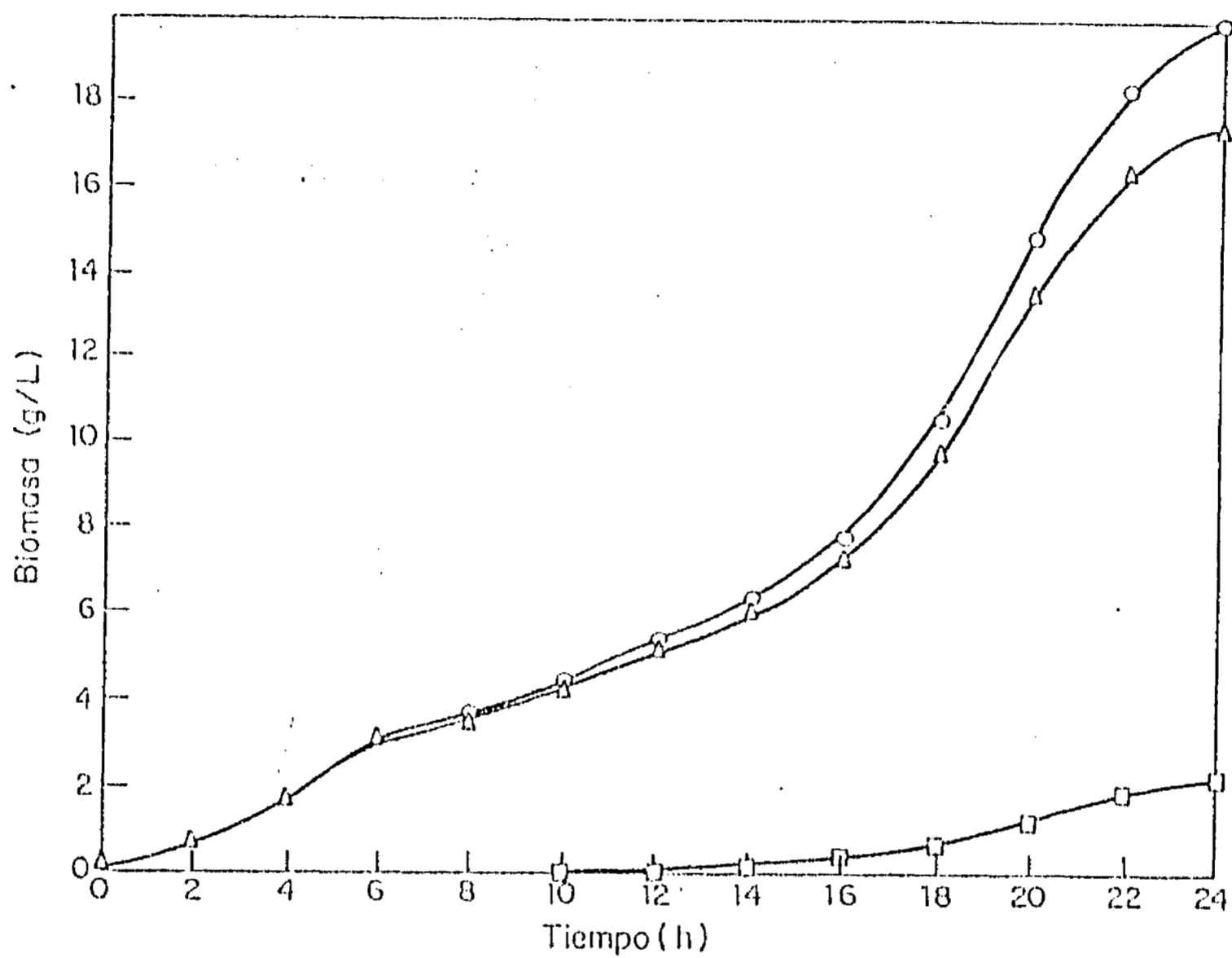


Figura 5. Cinética de crecimiento de biomasa total (○), biomasa portadora de plásmido (△) y biomasa sin plásmido (□) de un cultivo tipo lote alimentado con la cepa *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B). Para obtener estas curvas, muestras del cultivo fueron plateadas en medio Luria y medio Luria más ampicilina.

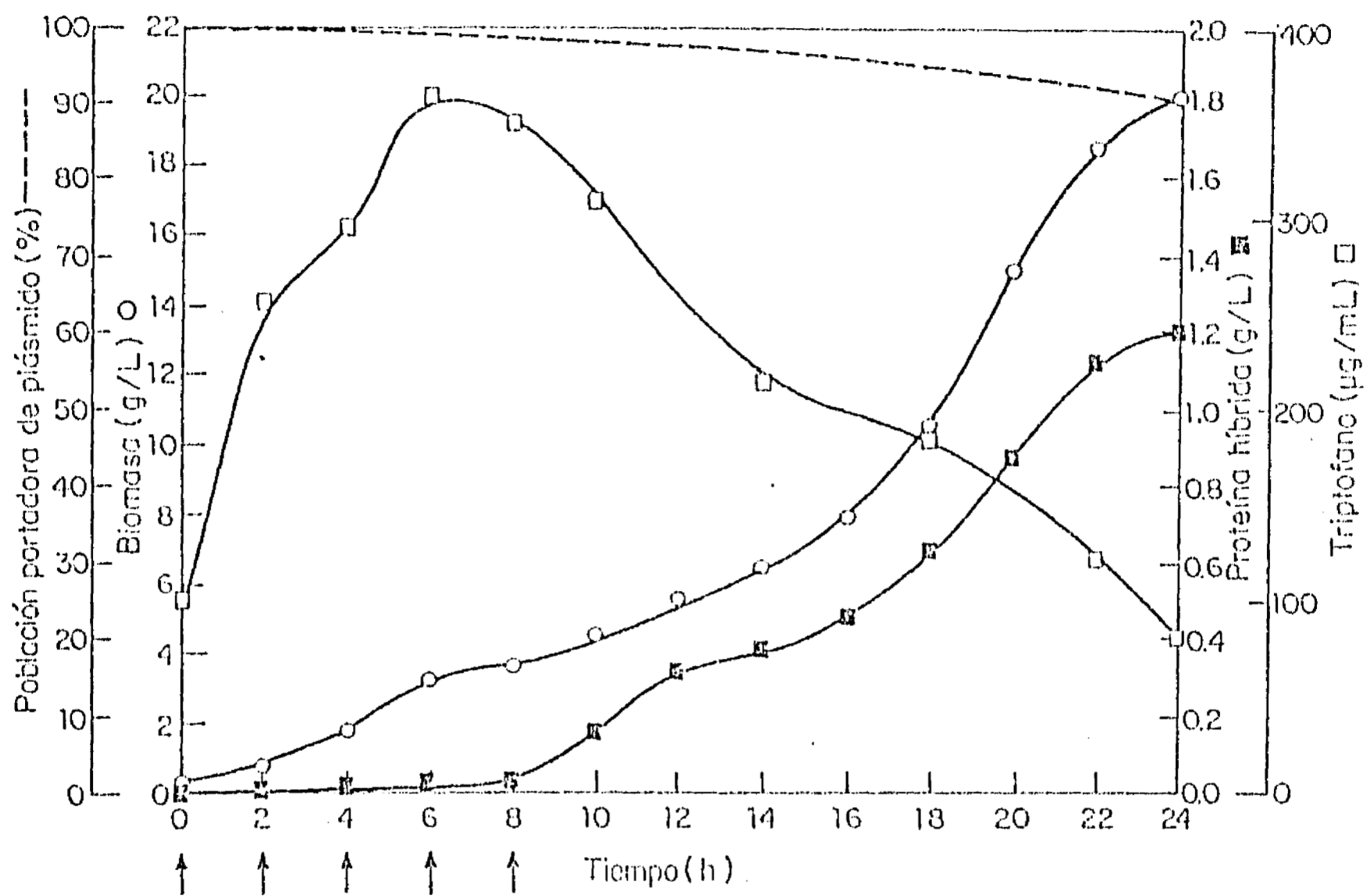


Figura 6. Cinética de una fermentación tipo lote alimentado de la cepa *E. coli* W3110 *trp*⁺ (pNF21B). Se determinaron niveles de biomasa (○), proteína híbrida α -cadena B (◻), triptofano (◻) y porcentaje de células portadoras de plásmido (- -). Las flechas indican el momento de la adición simultánea de ampicilina (100 μ g/mL) y triptofano (100 μ g/mL).

a la Fig. 4, artículo 1). De estos experimentos se concluye que es posible lograr un alto nivel de inducción a partir del promotor *trp*, mediante la depleción del triptofano por las células en el cultivo.

El análisis de los niveles de la proteína híbrida cI-cadena B en los cultivos tipo lote y lote alimentado, reveló que aún bajo condiciones de represión del gene híbrido, se logra detectar una pequeña cantidad de proteína híbrida (< 1% de la proteína total celular). Este nivel corresponde al producto de la transcripción de escape del gene híbrido. El fenómeno puede ser explicado en términos de considerar la titulación del represor *trp* debido al efecto multicopia del plásmido recombinante. La transcripción de escape en nuestros cultivos puede ocasionar un incremento en la tasa de aparición de células sin plásmido. Una solución a este problema sería incluir al gene que codifica para el represor *trpR* en el mismo plásmido recombinante.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de cultivos con organismos portadores de plásmidos recombinantes, la productividad dependerá principalmente de tres factores: la estabilidad del plásmido recombinante, el nivel de inducción y el nivel de la concentración celular final. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que existe una importante interrelación entre los tres factores. Según los resultados, el nivel de inducción es un factor que puede afectar negativamente el crecimiento celular, lo cual causaría una baja concentración celular final de las células productoras y el posible sobrecrecimiento de células sin plásmido. Lo anterior indica que una estrategia de desarrollo y optimización de un proceso con organismos recombinantes, no necesariamente debe intentar incrementar lo más posible el nivel de producción de una proteína de heteróloga que se acumule intracelularmente. Más bien, se debe definir el nivel óptimo de expresión para el gene de interés, y éste puede no ser el nivel máximo posible para el sistema bacteria hospedera-plásmido recombinante. Estas consideraciones son aplicables cuando se desea que las células continúen creciendo después de la inducción.

c) Niveles de concentración celular.

La relación entre la concentración celular final alcanzada con la cepa *E. coli* W3110 *trp* y el nivel de triptofano en el medio, se demostró en los experimentos con cultivos tipo

lote. En una de las condiciones estudiadas (F0), el bajo nivel inicial de triptofano (30 µg/mL) causó que el cultivo entrara prematuramente en la fase estacionaria (Fig. 3, que equivale a la Fig. 1, artículo 1). Estos experimentos nos permitieron definir, en las condiciones estudiadas, un rango dentro del cual no existe limitación para el crecimiento debido a la concentración de triptofano, ni represión del gene híbrido *cl-cadena B*. Este rango estaría comprendido entre 100 y 150 µg/ml de triptofano al inicio de la fermentación.

En los cultivos tipo lote no limitados por triptofano, el nivel final de concentración celular alcanzada fue de aproximadamente 12 g/L. Sin embargo, la biomasa producida no es la máxima esperada para la cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo. En estos cultivos el crecimiento se detuvo aún con la presencia de glucosa en el medio. Este hecho permite pensar que la presencia de metabolitos inhibidores del crecimiento, ocasionó la terminación del crecimiento. Así, al limitar la velocidad específica de crecimiento, mediante la alimentación de la glucosa y el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, se logró incrementar la concentración final de biomasa hasta 20 g/L peso seco (Fig. 6, que equivale a la Fig. 4, artículo 1).

Además de lograr un incremento en la concentración celular final de los cultivos lote alimentado, mediante la restricción de la μ , también se logró un incremento en los rendimientos de biomasa y proteína híbrida a partir de glucosa (Tabla I, Artículo 1).

ASPECTOS DE RECUPERACION Y PROCESAMIENTO DE LA BIOMASA

Además de los métodos descritos en esta tesis para el crecimiento de la cepa recombinante y la purificación de las cadenas A y B de insulina, se han desarrollado y escalado procesos y operaciones que en conjunto conforman la tecnología para producir insulina humana de origen recombinante. Aunque su desarrollo no formó parte de esta tesis doctoral, se mencionan aquí para presentar la tecnología en su totalidad y relacionarla con el trabajo de esta tesis.

Recuperación de la biomasa:

Se realizaron estudios para lograr la recuperación y la diafiltración de la biomasa que se generara en fermentaciones de 10 y 100 litros, utilizando equipo de filtración de flujo tangencial. Este método es adecuado para el manejo de organismos recombinantes, ya que al ser un sistema herméticamente sellado, no permite la liberación de los microorganismos. Para el proceso de diafiltración se definieron las siguientes condiciones de operación: tamaño de

poro de la fibras huecas, 100,000 daltones; superficie de filtración, 5 pies cuadrados; flujo de recirculación, 22.92 l/min; presión de entrada de 10 psi. La diafiltración se continua hasta que la conductividad del filtrado baja hasta 100 μ mhos. Posteriormente, en el mismo equipo se lleva a cabo la concentración de la biomasa por un factor de 10.

Ruptura celular:

La biomasa se rompe por medio de homogenización en una prensa francesa bajo las siguientes condiciones de operación: la concentración celular empleada es del 20%, la presión es de 500 kg/cm. Después de 5 pases bajo estas condiciones, se logra una liberación de proteína soluble mayor al 95%. Con este procedimiento es posible romper 3 kg de pasta celular húmeda en aproximadamente 2 horas. Este método resulta adecuado para procesar la biomasa proveniente de una fermentación de 100 litros.

Recuperación y purificación de cuerpos de inclusión:

Para la recuperación y purificación de los cuerpos de inclusión formados por las proteínas cI-A o cI-B, se emplea el método de centrifugación diferencial. El producto del rompimiento celular es sometido a centrifugación de alta velocidad (12,000 rpm) por 10 min y lavados sucesivos, para enriquecer los cuerpos de inclusión. Este procedimiento es repetido 3 veces, dando como resultado la proteína híbrida con un 70% de pureza.

Sulfitólisis y cianogenólisis:

Este proceso ha sido escalado para el procesamiento de material proveniente de aproximadamente 33 litros de fermentación. Por lo tanto en tres lotes sería posible procesar la proteína híbrida de una fermentación de 100 litros.

ASPECTOS DE PURIFICACION DE LAS CADENAS DE INSULINA

a) Purificación preparativa de la cadena B de insulina.

Utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC), se desarrolló un método sencillo para lograr la purificación de la cadena B de insulina humana a nivel de gramos. Se probaron tres sistemas analíticos basados en los solventes orgánicos acetonitrilo, isopropanol y metanol. En los tres casos se logró separar a la cadena B de los péptidos contaminantes (Fig. 7, que equivale a la Fig. 1, artículo 2). En pruebas con resina preparativa, se observó que nuevamente fué posible separar a la cadena B de los péptidos contaminantes, aunque la resolución disminuyó al compararlo con el sistema analítico (Fig. 8, que equivale a la Fig. 2, artículo 2).

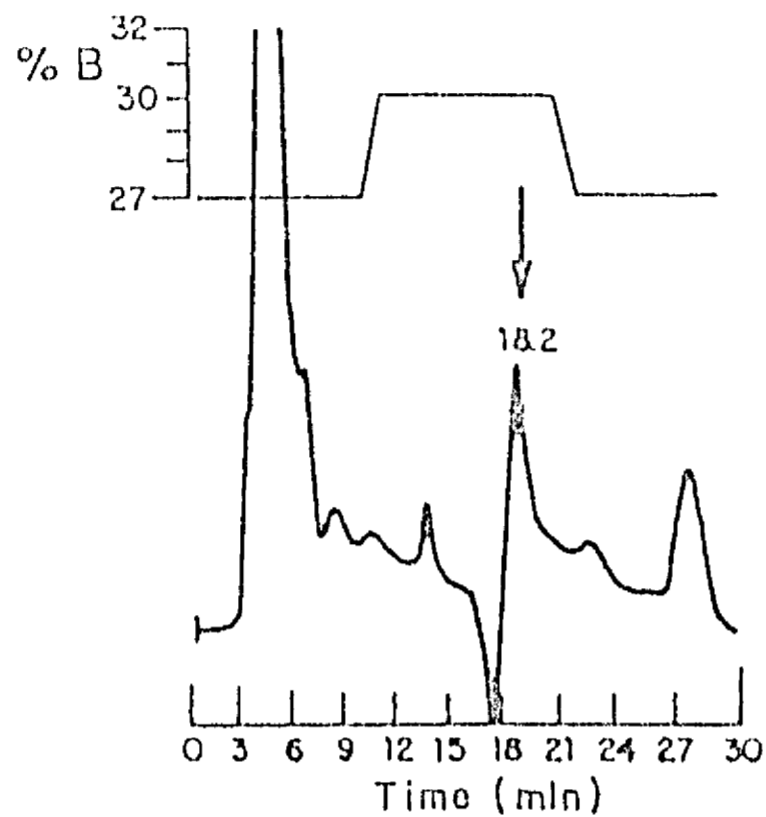


Figura 7. Cromatografía fase reversa analítica de cuerpos de inclusión que contienen la cadena B de insulina, tratados con bromuro de cianógeno. Una muestra de 50 μg fué corrida en una columna $\mu\text{Bondapak C18}$, con un flujo de 1 mL/min. La posición de la cadena B en el cromatograma está indicada con una flecha. El sistema buffer usado fué el siguiente: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15 mM; (B) isopropanol. Equilibrio: 27% B, 10 min; elución: 30% B, 10 min. Detección: 280 nm.

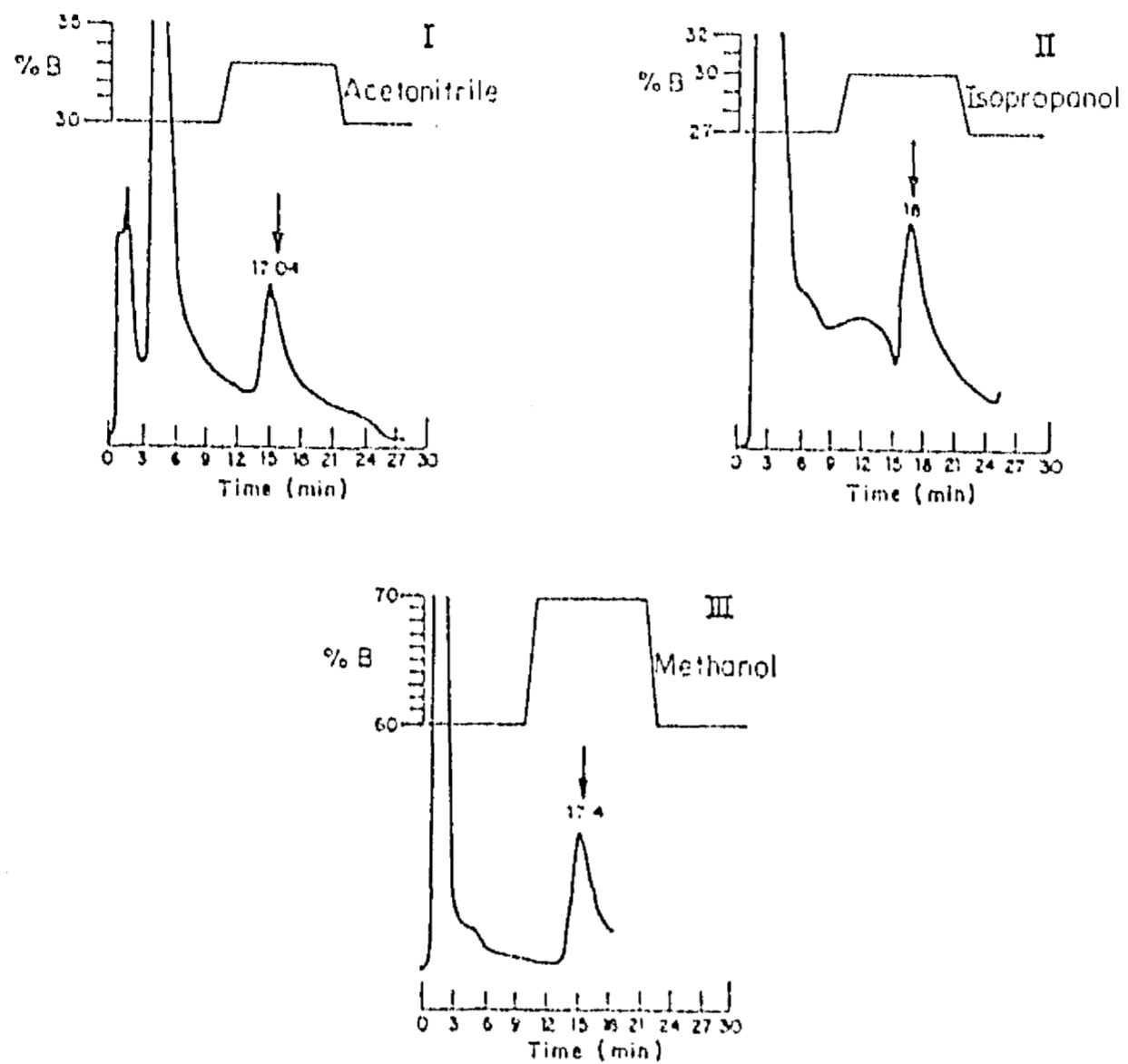


Figura 8. Purificación cromatográfica de la cadena B de insulina humana. Se muestra una cromatografía fase reversa, usando una columna analítica empacada con resina preparativa, de 100 μg de una muestra de cuerpos de inclusión tratados con bromuro de cianógeno. Panel I, composición del buffer: (A) HCOOH 2.8%, TEA 15 mM; (B) acetonitrilo; equilibrio: 30% B, 10 min; elución: 33% B, 10 min. Panel II, composición del buffer: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15 mM; (B) metanol; equilibrio: 60% B, 10 min; elución: 70% B, 10 min. En todos los sistemas se utilizó un flujo de 1 mL/min. La posición de la cadena B de insulina se indica con una flecha.

Se decidió continuar escalando el sistema basado en isopropanol, ya que en base al criterio de costo del solvente resulta el más conveniente. Este método se basa en dos pasos: equilibrio y elución, y presenta la ventaja de ser más fácilmente escalable que un sistema que requiera gradientes.

b) Purificación preparativa de la cadena A de insulina.

Para desarrollar este método de purificación, se consideraron las características particulares de la cadena A de insulina. Este polipéptido de 21 aminoácidos, posee cuatro residuos de cisteína. Como parte del procesamiento para su purificación, estos residuos de cisteína son transformados a S-sulfonatos ($A-(SSO_3)_4$), aumentándose el carácter aniónico de la cadena A y su solubilidad.

Utilizando el intercambiador aniónico Macro-Prep 50 Q, se estudiaron condiciones que permitieran separar a la cadena A de péptidos contaminantes. Se logró obtener a la cadena A con un 95% de pureza, equilibrando la columna con una solución buffer más NaCl 0.5 M y eluyendo con un gradiente lineal de 0.5 a 1 M NaCl (ver Fig. 9 que equivale a la Fig. 3, artículo 3). Los datos del experimento anterior indican que bajo condiciones de alta fuerza iónica (NaCl 0.5 M), solo la cadena A se une al soporte. Esto permitió purificar a la cadena A equilibrando la columna con solución buffer más 0.5 M NaCl y posteriormente eluyendo la cadena A con solución buffer NaCl 1 M (Ver Fig. 10 que equivale a la Fig. 4, artículo 3).

El pI de la cadena A es menor de 2 y esta característica fue aprovechada para lograr su unión al soporte, aún en condiciones de alta fuerza iónica. Bajo estas condiciones la mayoría de los péptidos contaminantes no se unen al soporte, por lo tanto, gran parte de la capacidad del mismo es aprovechada para unir a la cadena A. Con base en estas consideraciones, se desarrolló un método de purificación por cromatografía de intercambio iónico, el cual permitió obtener a la cadena A con un alto grado de pureza, siendo este un método simple y escalable.

Asociación de las cadenas A y B de insulina y purificación de la insulina humana:

Como parte de la tecnología para producir insulina humana por técnicas de DNA recombinante, se cuenta con un método para lograr la asociación con un 60% de eficiencia de las cadenas A y B de insulina humana en la escala de gramos. Así mismo se aplica un método para lograr la purificación preparativa por HPLC de la insulina humana activa, el cual ha sido escalado a nivel de gramos.

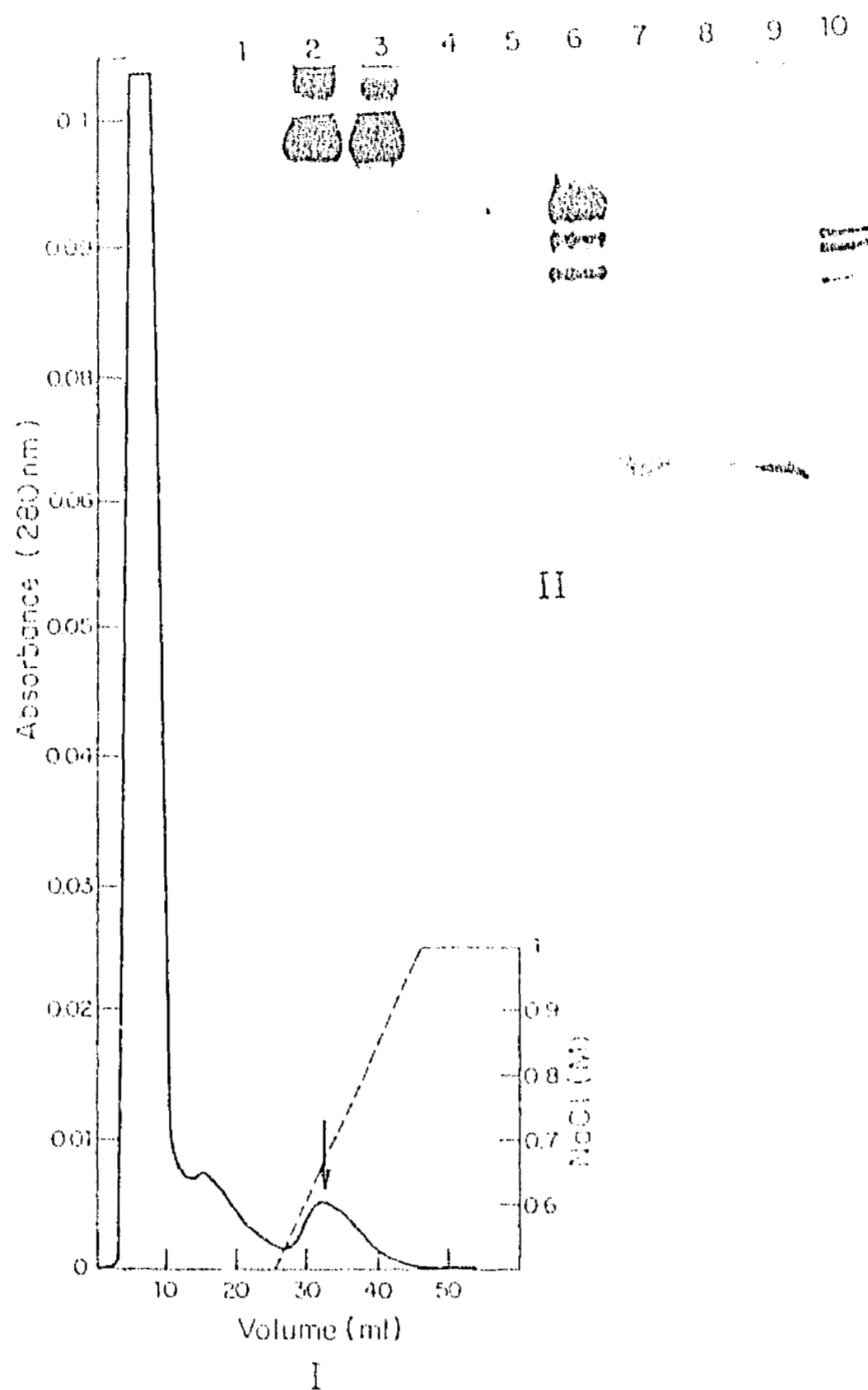


Figura 9. I.- Purificación cromatográfica de 5 ml de una muestra péptida tratada con bromuro de cianógeno, en una columna con 2 ml de soporte preparativo Macro-Prep 50 Q. Se utilizó un flujo lineal de 38 cm/h, equilibrando con una solución buffer compuesta de Tris/HCl 50 mM pH=8 + NaCl 0.5 M. La flecha indica el pico donde eluye la cadena A. Gradiente: NaCl 0.5-1 M en un total de diez volúmenes de columna. II.- Patrón electroforético en gel no desnaturalizante de poliacrilamida. Carriles 1-3: fracciones de proteínas no adsorbidas; carriles 4-6: fracciones eluidas con la solución buffer de equilibrio; carril 7: estandar de cadena A de insulina porcina; carriles 8 y 9: fracciones del pico eluido entre 30 y 40 ml; carril 10: muestra inicial.

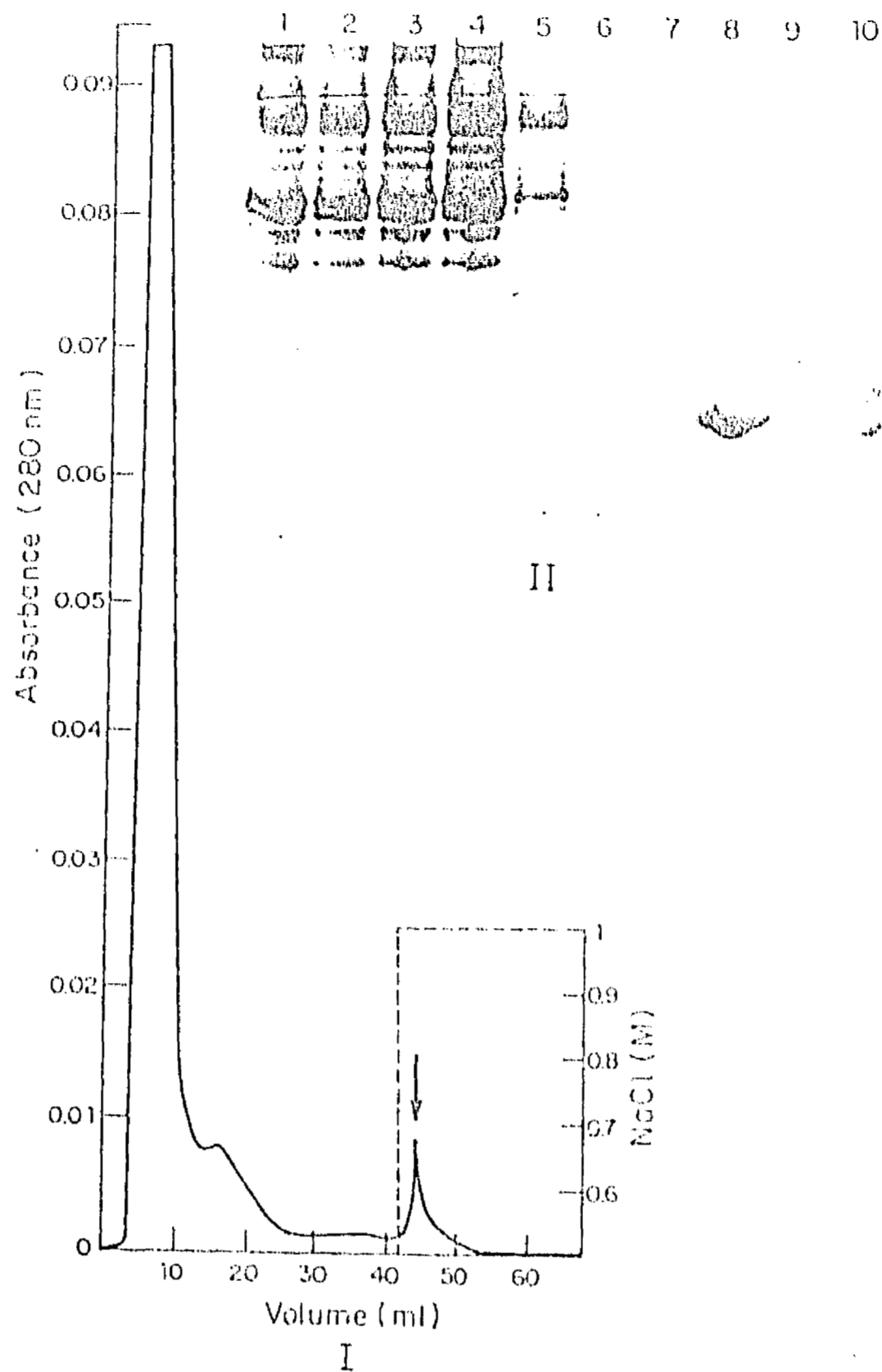


Figura 10. I.- Purificación cromatográfica de 5 ml de una muestra péptidica tratada con bromuro de cianógeno, en una columna con 2 ml de soporte preparativo Macro-Prep 50 Q. Se utilizó un flujo lineal de 38 cm/h, equilibrando con una solución buffer compuesta de Tris/HCl 50 mM pH=8 + NaCl 0.5 M. La elución se realizó en un solo paso con solución buffer de equilibrio + NaCl 1 M. La flecha indica la fracción donde la cadena A de insulina eluye. II.- Patrón electroforético en gel no desnaturizante de poliacrilamida. Carril 1: muestra inicial; carriles 2-4: fracciones de proteínas no adsorbidas; carriles 5-7: fracciones de proteínas eluidas con la solución buffer de equilibrio; carril 8: muestra del pico principal eluido; carril 9: fracción obtenida después de la elución del pico principal; carril 10: estandar de cadena A de insulina porcina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En nuestro laboratorio hemos logrado la producción de insulina humana asociando los péptidos A y B constituyentes, producidos en *E. coli* por ingeniería genética. Con el propósito de escalar esta tecnología, se caracterizó el sistema de expresión *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B), definiéndose las condiciones de crecimiento e inducción con las cuales se lograra alcanzar una biomasa elevada, una baja pérdida de plásmido y finalmente un alto nivel de la proteína híbrida cI-cadena B. Es importante señalar que no existían datos publicados sobre la utilización de una cepa *trp*⁻ para la expresión de genes heterólogos controlados por el promotor *trp*. En cultivos tipo lote alimentado en la escala de operación de 10 litros, la concentración celular final alcanzada fué de 20 g/L peso seco, y el porcentaje de la proteína híbrida cI-cadena B en relación a la proteína total celular correspondió al 11%. Por lo tanto se obtuvo una concentración final de la proteína híbrida de 1.2 g/L. Una sexta parte de la proteína híbrida corresponde a la cadena B de insulina, por lo tanto podrían recuperarse hasta 2 g de este péptido de una fermentación de 10 litros. Los valores alcanzados para estos tres parámetros son similares a los reportados por otros grupos que trabajan con sistemas para lograr un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes (Gold, 1990; Yansura y Henner, 1990). Este proceso fermentativo además presenta la ventaja de ser fácilmente escalable y de no requerir un inductor químico.

El método empleado para la purificación de la cadena B de insulina, permite el procesamiento de 26.4 g de proteína por lote, recuperándose el 95% de la proteína aplicada. Asimismo, utilizando cromatografía de intercambio iónico, se definieron las condiciones para lograr la purificación de la cadena A de insulina. Con este método, en una columna de 2.5 x 20 cm empacada con resina preparativa, es posible obtener 0.5 g de cadena A purificada, por litro de resina por hora. Una característica importante de estos dos métodos de purificación, es que pueden ser transferidos a escalas mayores fácilmente. Además, las cadenas A y B purificadas con estos métodos, han sido asociadas *in vitro*, obteniéndose insulina humana (Cruz et al., 1992).

Como se mencionó previamente, el proceso fermentativo desarrollado puede ser aplicado para el crecimiento de cepas portadoras de otros genes bajo en control del promotor *trp*. El proceso ha sido empleado también con éxito con la cepa *E. coli* W3110 *trp*⁻ transformada con

el plásmido pNF21A, productora de la proteína híbrida cl-cadena A (datos no mostrados).

Por otro lado, se ha iniciado el escalamiento del proceso a 100 litros en la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, empleando la cepa *E. coli* W3110 *trp* (pNF21A). Se alcanzó en un primer experimento en cultivo tipo lote, una densidad celular, de 9 g/L peso seco y un nivel de la proteína híbrida que corresponde al 12% de la proteína total celular equivalente a 0.59 g/L. Por lo tanto, en esta fermentación se produjeron 59 g de proteína híbrida cl-cadena A, donde la cadena A representa el 10%, equivalente a 5.9 g. Esto demuestra que el proceso fermentativo tipo lote es susceptible de ser transferido a una escala mayor. Posteriormente se escalará a 100 litros el cultivo tipo lote alimentado, esperándose un incremento en productividad al compararlo con el cultivo tipo lote, tal como ocurrió en la escala de 10 litros.

Al integrar los métodos para la fermentación de las cepas recombinantes y la purificación de las cadenas A y B de insulina, con los procesos y operaciones para la recuperación y procesamiento de la biomasa y las proteínas híbridas, se constituye una tecnología para la producción de insulina humana por técnicas de DNA recombinante. Actualmente la tecnología está siendo transferida a nivel Planta Piloto y se están determinando los rendimientos para los procesos y operaciones que la constituyen.

Recientemente se ha iniciado un proyecto para producir insulina humana a partir de proinsulina. Utilizando los resultados presentados en esta tesis, se trabaja en el desarrollo de condiciones de escalamiento para la producción de proinsulina humana. El gene que codifica para proinsulina humana ha sido fusionado al gene *TrpLE* de *E. coli*. Este gene híbrido se encuentra bajo control del promotor *trp* (Olmos et al., 1993). Por lo tanto, con este sistema se espera tener resultados similares a los obtenidos con los sistemas de producción de las cadenas A y B de insulina humana.

BIBLIOGRAFIA

- Aiba, S., Humphrey, A. E. y Millis, N. F. Biochemical Engineering. Academic Press, N.Y. 1973.
- Anderson, J. N. En: Modern nutrition in health and disease (Shills, M. E. y Young, V. R., eds.), p. 1220. Lea and Febiger, 1988.
- Antebi, E. y Fishlock, D. Biotechnology. The MIT Press. 1986.
- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomelí, H., Valle, F., Flores, N. y Bolivar, F., Gene, Vol. 50, 3 (1986).
- Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. y Bolivar, F. En: Cell function and disease (Cañedo, L., Todd, L., Jaz, J. and Parker, L., eds.), p. 59. Plenum Press, New York, N.Y., 1988.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. y Falkow, S., Gene, Vol. 2, 95 (1977).
- Casadaban, M. J., Martinez-Arias, A., Shapiro, S. K. y Chou, J. Meth. Enzymol., Vol. 100, p. 293 (1983).
- Copsey, D. N. y Delnatte, S. Y. J. Genetically engineered human therapeutic drugs. Stockton Press, New York, N.Y., 1990.
- Cruz, N., Antonio, S., de Anda, R., Gosset, G. y Bolivar, F. J. Liq. Chrom. Vol. 13, 1517 (1990).
- Cruz, N., López, M., Estrada, G., Alvarado X., de Anda, R., Balbás, P., Gosset, G. y Bolivar F. J. Liq. Chrom. Vol. 15, 2311 (1992).
- De Boer, H. A., Comstock, L. J., Yansura, D. G. y Heyneker, H. L. Promoters, structure and function (Rodriguez, R. L. y Chamberlin, M. J., eds.), p. 462. Praeger Publishers, New York, N.Y., 1982.
- De la Rosa, L. B. y Favela, R. Tesis de Licenciatura, U.N.A.M. (1989).
- Fass, R., Clem, T. R. y Shiloach, J. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 55, 1305 (1989).
- Flores, N., de Anda, R., Guereca, L., Cruz, N., Antonio, S., Balbás, P., Bolivar, F. y Valle, F. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 25, 267 (1986).
- Gleiser, I. E. y Bauer, S. Biotechnol. Bioeng. Vol. 23, 1015 (1981).
- Goberna, R. Investigación y Ciencia, Vol. 92 (1978).

- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyncker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Krazewski, A., Itakura, K. y Riggs, A. D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, 106 (1979).
- Gold, L. Meth. Enzymol. Vol. 185, p. 11 (1990).
- Iijima, S., Kawai, S., Mizutani, S., Taniguchi, M. y Kobayashi, T. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 26, 542 (1987).
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyncker, H. L., Bolivar, F. y Boyer, H.W. Science, Vol. 198, 1056 (1977).
- James, L. D. Biotechnology, Vol. 2, 957 (1984).
- Kawai, S., Mizutani, S., Iijima, S. y Kobayashi, T. J. Ferment. Technol. Vol. 64, 503 (1986).
- Keen, H. y Jarret R. J. En: The genetics of Diabetes mellitus (Creutzfeldt, N. et al. eds.) Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- Koizumi, J., Monden, Y. y Aiba, S. Biotechnol. Bioeng., Vol. 27, 721 (1985).
- Lee, Y. L. y Chang, H. N. Biotechnol. Bioeng., Vol. 36, 330 (1990).
- Lee, J., Youn-Hee, C., Shin-Kwon, K., Hyung-Hwan, P., y Ik-Boo, K. Biotechnol. Lett., Vol. 2, 695 (1989).
- Marston, F. A. O. Biochem. J. Vol. 240, 1 (1986).
- Majors, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, 4394 (1975).
- Morrow, J. F., Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer H. W., Goodman, H. M. y Helling, R. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 71, 1743 (1974).
- Nagai, K. y Thorgersen, H. C. Nature, Vol. 309, 810 (1984).
- Olmos, J., Cruz, N., López, M., Valle, F. y Bolivar, F. Manuscrito en preparación. 1993.
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K. y Vilu, R. Biotechnol. Bioeng., Vol. 35, 312 (1989).
- Pierce, J. y Gutteridge, S. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 49, 1094 (1985).
- Platt, T. En: The operon (Miller, J. H. y Reznikoff W. S., eds.), p. 263. Cold Spring Harbor., 1980.
- Quintero, R. Ingeniería Bioquímica. Editorial Alhambra, 1981.
- Seo, J. H. y Bailey, J. E. Biotechnol. Bioeng., Vol. 27, 1668 (1985).
- Seo, J. H. y Bailey, J. E. Biotechnol. Bioeng., Vol. 28, 1590 (1986).
- Shiloach, J. y Bauer, S. Biotechnol. Bioeng., Vol. 17, 227 (1975).

- Shiloach, J. y Bauer, S. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 17, 227 (1975).
- Talmadge, K. y Gilbert, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 79, 1830 (1982).
- Uhlén, M. y Moks, T. *Meth. Enzymol.*, Vol. 185, 129 (1990).
- Yanofsky, C. *Nature*, Vol. 289, 751 (1981).
- Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I. P., Nichols, B. P., Christie, G. E., Horowitz, H.,
VanCleave, M. y Wu M. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 9, 6647 (1981).
- Yansura, D. G. y Henner, D. J. *Meth. Enzymol.* Vol. 185, p. 54 (1990).
- Zabriskie, D. W. y Arcuri E. J. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 8, 706 (1986).

RESUMEN DE RESULTADOS Y PUBLICACIONES

Artículo 1:

-Recombinant protein production in cultures of an Escherichia coli trp⁻ strain.

G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez, R. Quintero y F. Bolivar. Aceptado para publicación en Applied Microbiology and Biotechnology. 1993.

Artículo 2:

-Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in Escherichia coli. N. Cruz, S. Antonio, R. de Anda, G. Gosset y F. Bolivar. 1990. Journal of Liquid Chromatography, 13:1517-1528.

Artículo 3:

-Preparative isolation of recombinant human insulin A chain by ion exchange chromatography. N. Cruz, M. López, G. Estrada, X. Alvarado, R. de Anda, P. Balbás, G. Gosset y F. Bolivar. 1992. Journal of Liquid Chromatography, 15:2311-2324.

**Recombinant protein production in cultures
of an Escherichia coli trp strain.**

G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez,
R. Quintero and F. Bolivar.

Departamentos de Biología Molecular y Bioingeniería
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Apdo. Postal 510-3

Cuernavaca, Mor. 62271, MEXICO

Running Title: Recombinant protein production in E. coli

Offprint requests to:

Francisco Bolivar.

Instituto de Biotecnología/UNAM

Apdo. Postal 510-3

Cuernavaca, MOR. 62271, MEXICO

Tels. (52)(73)172399,172799.

FAX: (52)(73)172388

Summary. Fermentation conditions were developed in order to achieve simultaneously a high biomass concentration and high-level expression of a hybrid cI-human insulin B peptide gene. In our system, this hybrid gene is under control of the *E. coli* *trp* promoter, in a *trp* derivative strain of *Escherichia coli* W3110. The dual role of tryptophan concentration on cellular growth and hybrid gene regulation, was studied in 10 l batch fermentations. In the best batch conditions, a biomass concentration of 12 g/l dry weight can be obtained, and 0.53 g/l of cI-insulin B hybrid protein is produced. Tryptophan in the culture medium is consumed by the growing culture, until a level is reached that causes induction of the hybrid gene. Plasmid loss was detected, as only 62% of the cells retained the recombinant plasmid. In order to increase the hybrid protein production level, a fed-batch culture strategy was developed where the specific growth rate of the cells was restrained; using the same amount of nutrients as in the batch fermentations, it was possible to increase the final biomass concentration to 20 g/l, plasmid-bearing cells in the population to 90% and recombinant hybrid protein to 1.21 g/l.

Introduction

Recombinant DNA technology has permitted the development of microorganisms with improved or new biosynthetic capabilities and a clear example is the production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. However, laboratory-scale procedures are generally not applicable to larger scale; therefore, specific production strategies must be

developed.

There are three main factors which may influence the productivity of a particular recombinant fermentation: plasmid stability, induction of the specific gene(s) and final biomass concentration. These factors have a limit imposed by the genetic characteristics of the recombinant plasmid and the bacterial host; however, they can be optimized by the manipulation of the culture conditions (Zabriskie and Arcuri 1986).

Several strategies can be followed to favor the growth of plasmid-bearing cells over the ones that have lost the plasmid, and one of them is the use of selective methods for plasmid maintenance, such as antibiotic resistance. This strategy alone, however, may not be sufficient for the maintenance of a pure plasmid-bearing population (Pierce and Gutteridge 1985). Other strategy is the reduction of cellular specific growth rate (μ), which generally increases plasmid copy number, and therefore a reduction in the frequency of appearance of plasmid-less cells (Koizumi et al. 1985; Seo and Bailey 1985; Seo and Bailey 1986; Lee et al. 1989).

In E. coli, the tryptophan operon regulatory region has been widely used for heterologous gene expression, since it possesses a strong promoter that exhibits a low basal expression level under repression conditions. The culture strategy commonly employed to achieve an adequate induction for this promoter, consists of maintaining repression until the late logarithmic growth phase, and then inducing the promoter by a severe reduction of the tryptophan intracellular pool (Mizukami et al., 1986). The most commonly used method at the laboratory level, involves a 25-50 fold dilution of the culture in minimal medium, and the subsequent addition of indole-3-acrylic acid (IAA) as the inducer (Yansura and Henner 1990).

To obtain a high cellular concentration is an important objective for most fermentation processes. At least two factors usually limit the attainment of a high cell density in a fermentor: an oxygen uptake rate higher than the oxygen transfer rate of the equipment, and the production and accumulation of growth-inhibiting metabolites by the cells in the culture (Paalme et al. 1989). Several strategies have been employed to overcome these problems, such as the use of pure oxygen for sparging (Shiloach and Bauer 1975), cross-flow filtration to remove inhibitory metabolites (Lee and Chang 1990) and reduction of oxygen consumption through limitation of specific growth rate (Cutayar and Poillon 1989; Gleiser and Bauer 1981; Lee et al. 1989; Paalme et al. 1989; Zabriskie and Arcuri 1986).

We have previously reported a process for the production of human insulin, where the A and B peptides are independently synthesized in two *E. coli* strains, purified, and associated *in vitro* to produce active insulin (Balbás et al. 1988; Cruz et al. 1990; Cruz et al. 1992). To transfer this laboratory-level process to a larger scale, we decided to develop as a first stage, a 10 l pilot plant-scale fermentation process, which could be further scaled-up. In this study we report the characterization and use, under different fermentation conditions, of an *E. coli* W3110 *trp* strain, for the expression of a *trp* promoter regulated recombinant heterologous gene. By limiting specific growth rate in a fed-batch culture, we have been able to obtain 1.2 g/l of the hybrid protein. Induction of the *trp* promoter is accomplished by depletion of tryptophan in the culture medium by growing cells.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids.

A trp derivative of E. coli strain W3110, was obtained from C. Yanofsky. Plasmid pNF21B was constructed in our laboratory. It contains a hybrid gene, under control of the trp promoter, that codes for a 21,992 Da hybrid protein carrying the first 156 aminoacids from the lambda cI repressor joined by a methionine residue to the human insulin B chain. This plasmid, a 3970 bp derivative of pBR322 (Bolivar et al. 1977), contains the gene that codes for the β -lactamase enzyme (Flores et al. 1986).

Media, inoculum development and growth conditions.

Composition for the inoculum medium (INO) was as follows: 3 g/l of K_2HPO_4 , 3 g/l of NaH_2PO_4 , 3 g/l of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/l of $(NH_4)_2HPO_4$, 3 g/l of glucose and 5 g/l of yeast extract. The initial pH of this medium was adjusted to 7.4 with NaOH. Medium for batch fermentations (FEM) is similar to the INO medium with the following differences: 66 g/l of glucose and 17 g/l of $(NH_4)_2HPO_4$. Unless otherwise indicated, in all fermentations, 100 μ g/ml of ampicillin, 25 μ g/ml of thiamine, and 20 ml/l of the following trace element solution were added to the culture media: 0.1 g/l of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g/l of $CuCl_2 \cdot 5H_2O$, 0.1 g/l of $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 g/l of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/l of $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.1 g/l of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.01 g/l of $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. Inocula were prepared as follows: Single colonies of the W3110 trp strain transformed with plasmid pNF21B and plated in L-broth (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl) plus ampicillin, were used to inoculate 2 l flasks containing 1 l of INO

medium plus 100 µg/ml of trp and ampicillin, and were grown for 14 hr. at 30 °C at 200 rpm.

Batch and fed-batch 10 l cultures were performed in a 14 l Microferm fermentor from New Brunswick Scientific. For batch fermentations, a 10% inoculum was used in FEM medium. At the moment of inoculation, ampicillin was added to the fermentor; the antibiotic was supplied every two hours as indicated in the figures.

For fed-batch fermentations, a 10% inoculum was used in FEM medium without glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. 2 l of a sterile nutrient solution composed of glucose (330 g/l) and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (85 g/l) were continuously fed to the fermentor immediately after inoculation, following a precalculated feeding rate to maintain an approximately constant specific growth rate of 0.2 h^{-1} . These nutrients were fed in order to maintain a constant low level and avoid possible acetic acid accumulation or growth inhibition due to high ammonium ion concentrations (Paalme et al. 1989; Thompson et al. 1985). An average cellular growth yield on glucose of 0.3 g cells/g glucose was used to calculate the nutrient solution feed rate. To maintain a constant 10 l volume, culture broth was periodically removed from the fermentor. Ampicillin and tryptophan (100 µg/ml) were added every two hours until the 8th hour.

The following conditions were used for batch and fed-batch fermentations: temperature 37 °C; pH regulated at 7.4 with NaOH 10 N; D.O. maintained above 20%; air flow 1 VVM; silicone antifoam was added as needed.

Analytical methods

Tryptophan concentrations were determined by measuring fluorescence emission at 370 nm in a LTC/Milton Roy fluoro. Monitor III (Riviera Beach, FL). Glucose was assayed enzymatically with a Glucose Analyzer 2 from Beckman Instruments (Fullerton, CA). Cell concentrations were determined by measuring the optical density of a diluted culture sample at 540 nm and comparison with a standard curve obtained by dry weight determinations. Drying was performed at 80 °C to constant weight. The optical density unit was equivalent to 0.4 g dry weight/l.

Hybrid protein levels were measured by subjecting samples taken from the fermentor to denaturing 6% SDS-PAGE, and the resulting protein band patterns quantified with a Biomed Instruments Inc. soft laser densitometer SCR-2D/1D (Fullerton, CA). From this analysis, the percentage of hybrid protein from the total cellular protein was determined. To calculate the amount of hybrid protein produced, it was considered that 55% of the cellular dry weight of *E. coli* W3110 corresponds to cellular protein, as determined using the method reported by Lowry, with bovine serum albumin as standard (Lowry et al. 1951).

The fraction of plasmid-bearing cells was determined by parallel plating diluted samples on nonselective L-broth plates and selective L-broth plates with ampicillin (100 µg/ml).

Results and discussion

Effect of tryptophan concentration on growth and hybrid protein production in batch cultures.

In order to study the relationships between tryptophan concentration in the culture medium, expression of the cI-insulin B peptide hybrid gene and cellular growth, we carried out batch culture experiments with different tryptophan concentrations.

In our system [*E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B)], tryptophan plays the double role of corepressor for the expression of the hybrid gene and metabolite requirement for the *trp*⁻ auxotrophy. For induction of the hybrid gene, a low tryptophan level is necessary, but this may be detrimental to the growth of the bacterial host. Therefore, the objective of the batch culture experiments was to determine the initial tryptophan concentration where the highest productivity of hybrid protein could be obtained.

The conditions studied differed only in the concentration of tryptophan in the culture medium. Figure 1 shows the biomass and tryptophan concentration profiles for the four conditions studied. It is important to acknowledge that in the F0 culture, where no exogenous tryptophan was added, the initial level of tryptophan is approximately 30 µg/ml; this amount, derived from the yeast extract, is also present in the other culture conditions. Cultures F1, F1.5 and F2 reached similar cellular concentrations (X), after 14 hours of growth: 12, 12 and 13.9 g/l respectively. The specific growth rate was considerably reduced in the F0 after 10 hours, reaching a cellular concentration of 6.7 g/l, so it was possible to infer that the amount of tryptophan in F0 becomes limiting at

the final stage of this culture.

Table I summarizes different parameters and results from these four culture conditions. Cultures F1 and F1.5 contained the highest percentage of cI-insulin B peptide hybrid protein (H), whereas culture F0, produced around half of that amount, and culture F2 contained a very low level of hybrid protein. The low tryptophan concentration in culture F0 not only caused a reduction in cellular concentration, but also reduced the amount of hybrid protein produced. A possible explanation for this low productivity, is that tryptophan deficiency which limited growth, also restricted protein biosynthesis. Culture F2 reached the highest cellular density; however, the high level of tryptophan in the culture medium repressed transcription of the hybrid gene and therefore, only a very small amount of hybrid protein was detected, as a result of the basal level of expression of the hybrid gene.

When the percentage of plasmid-bearing cells in the culture was determined for the four conditions studied, it was observed that samples taken at the start of the fermentation contained the expected number of colony forming units (cfu) (approximately 2×10^9 cells/ml for every unit of optical density at 540 nm) when plated in non-selective media. However, samples from the late logarithmic growth phase, contained a lower number of cfu (cells/ml) as follows: condition F0, 0.6×10^9 ; F1, 0.2×10^9 ; F1.5, 0.2×10^9 ; F2, 1.0×10^9 . These differences can be explained considering that upon induction of the heterologous gene and the subsequent intracellular accumulation of the hybrid protein, some cells are unable to grow and form colonies when plated on selective or non-selective media (Fu et al., 1992). Considering that the difference between samples taken before and after induction of the hybrid gene correspond to

plasmid-bearing cells, the values for the percentage of plasmid-bearing cells in the cultures were corrected. These results indicate that expression of the hybrid gene is an unfavorable physiological condition for cell growth, and that this effect is proportional to the level of induction, which depends on the level of tryptophan in the culture medium. The high level expression of the hybrid gene leads to a growth disadvantage of the plasmid-bearing cells, causing plasmid-less cells, already present in the culture, to overgrow them. F2 culture however, which did not exhibit induction, also presented a proportion of plasmid-less biomass at the end of the fermentation. Therefore, this alteration is possibly favored by the constant basal level of expression from the hybrid gene.

The previous data indicate that if a high biomass concentration is desired, tryptophan must be added to the culture media for adequate growth of this *E. coli trp* strain. However, a very high tryptophan concentration, as shown by the results obtained in the F2 condition, resulted in no product formation due to hybrid gene repression. It is important to point out that in F1 and F1.5 cultures, the tryptophan level is low enough to cause induction, but it is still sufficient for adequate protein synthesis and cellular multiplication in this *trp* strain.

Fermentation kinetics for the best hybrid protein producing conditions (F1) are presented in Figure 2. After 12-14 hours of fermentation, the culture entered into stationary phase, reaching a cellular concentration of 12 g/l. There are several possible explanations for this growth arrest; one of these is that it could be caused by the accumulation of acetic acid or other growth-inhibiting metabolites, since 9 g/l of glucose were still present in the culture medium; the calculated final cell yield on glucose ($Y_{x/g}$)

was 0.21 g cells/g glucose, and the product yield on glucose (Y_{pv}) was 0.009 g hybrid protein/g glucose.

In this fermentation, 100 $\mu\text{g/ml}$ of tryptophan were added at the moment of inoculation. As shown in Figure 2, there was an initial consumption of the aminoacid by the inoculum, since the concentration at time zero is 63 $\mu\text{g/ml}$. After 5.2 hours of growth when tryptophan concentration value was 32 $\mu\text{g/ml}$ and biomass concentration was 3.1 g/l, induction of the hybrid gene was detected. Figure 3, panel A, shows the electrophoretic pattern of a sample obtained from this fermentation after two hours of inoculation. From the densitometric scanning, it can be seen that a very small amount of the hybrid protein is present before induction (0.8% of the total cellular protein). This band is not detected at the moment of inoculation (data not shown), but only after 1-2 hours of growth. The presence of hybrid protein before induction, indicates a basal level of expression from the hybrid gene. Panel B, shows the electrophoretic pattern and the corresponding densitometric scanning of a sample taken after 14 hours of growth. The amount of hybrid protein represents in this case, 7.9% of the total cellular protein (see Table I).

The percentage of cells containing recombinant plasmid in this fermentation is also presented in Figure 2. Starting from a proportion of plasmid-bearing population to total biomass ($X\%^+$) of 100%, this value decreases to 62%. From these data, it is evident that during this fermentation, most of the time there is a mixed culture with plasmid-bearing (X^+) and plasmid-less cells (X^-). These results also indicate that under the conditions studied, ampicillin is only partially effective as a selective agent, even though it was added five times up to the 8th hour.

When the hybrid protein level of the plasmid-bearing fraction of the culture is calculated (H_p), the value reached 12.7% [see Table I, section (a)]. This is about half of the highest hybrid protein level reached with our production system (H_p value 20 to 25%), obtained with IAA induction (Yansura and Henner 1990) in low cell concentration (0.3 g/l) in shake-flask cultures (unpublished results).

Effect of controlling glucose and $(NH_4)_2HPO_4$ concentrations in fed-batch cultures on biomass concentration, plasmid loss and hybrid protein production

In order to increase the quantity of the cI-insulin B hybrid protein obtained in batch fermentations, we developed fermentation conditions that would provide simultaneously a high proportion of plasmid-bearing cells, a high final biomass concentration and a good induction level of the hybrid gene. A fed batch process was chosen where a precalculated feeding strategy for both the carbon and inorganic nitrogen sources was employed. The feeding rate was calculated to maintain a μ lower than 0.2 h^{-1} throughout the fermentation, in order to reduce plasmid loss, oxygen consumption and accumulation of growth limiting metabolites. Using these conditions it was expected to obtain a higher production of the hybrid protein and a higher cellular concentration than those produced in batch cultures (Paalme et al. 1989; Seo and Bailey 1985).

Figure 4 shows the fermentation kinetics for a typical fed-batch culture of the *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B) strain. After inoculation, feeding of glucose and $(NH_4)_2HPO_4$ was started. Tryptophan (at a final concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$) was added five times

simultaneously with ampicillin, since a single addition of the aminoacid resulted in a low induction of the hybrid gene (data not shown). After 24 hr of growth, a cell density of 20 g/l dry weight was reached, then the culture entered stationary phase (data not shown). Throughout the fermentation, glucose concentration remained below 1 g/l.

From culture times 2 to 8 h, a basal preinduction level for the hybrid gene was detected, with an average H value of 1.7%. At the eighth hour, when the tryptophan concentration reached 350 µg/ml and X reached 3.2 g/l, induction of the hybrid gene was detected. In this culture, the final hybrid protein level reached 11%, that represents a concentration of 1.21 g/l (see Table I).

In this fermentation the cfu values from samples taken from the late logarithmic growth phase were 21% lower than the values of cfu from a sample taken at the beginning of the fermentation. Considering these data, the final X%⁺ value was calculated to be 90%, confirming that the slower growth rate, when compared to a batch fermentation (see Figure 2), reduced considerably the proportion of plasmid-less cells. It is important to remark that the amount of ampicillin added to the culture was the same as in the F1 batch culture conditions.

Table I section (b) shows a comparison of relevant production parameters between batch F1 and fed batch fermentations. Most of the parameters related to biomass concentration, product concentration and yield values are higher in the fed-batch than in the batch fermentation. A 2.28 fold increase in P over the best batch fermentation conditions was achieved. The objective of significantly increasing P was accomplished even though H_c from the fed-batch culture was similar to that of the F1 batch condition, since the final X and X%⁺ were higher. It is important to remark that these results were

obtained by using an equal amount of nutrients in both batch and fed-batch fermentations, with the exception of tryptophan which was higher in the fed-batch fermentations in order to compensate for the higher biomass produced. It can also be observed that the fed-batch strategy followed and the slower specific growth rate, caused a more efficient utilization of the carbon source, resulting in higher yields for biomass and recombinant protein.

This work shows that high levels of a recombinant protein can be produced in an E. coli trp strain. The use of this strain allows efficient induction of the trp promoter, due to the consumption of tryptophan by the cells in the culture medium. In this system, chemical inducers like indole-3-acrylic acid are not required.

The results presented also demonstrate the benefits of restricting the specific growth rate through the limitation of nutrients in order to increment the final biomass, a higher proportion of plasmid-bearing cells and a final higher concentration of the recombinant hybrid protein per liter, when compared to batch fermentations in similar conditions.

Adequate manipulation of growth conditions through the use of a fed-batch fermentation, allowed this trp E. coli culture to produce 1.21 g/l of an heterologous hybrid protein as part of a final biomass concentration of 20 g/l. One sixth of the hybrid protein corresponds to human insulin B chain, so at the end of a 10 liter fermentation 2 g of this peptide can be recovered. An important characteristic of this process is that it can be scaled up easily. This strategy also avoids the use of costly elements to implement methods for large scale fermentation induction. This culture system can also be applied to achieve the expression of the hybrid genes cI-A chain and cI-human proinsulin, controlled by the trp promoter, to obtain the hybrid proteins cI-A chain and

cI-human proinsulin (data not shown). The production of the cI-A chain and cI-B chain hybrid proteins represents the first step in a process using purified A and B peptides for the production of human insulin (Goeddel et al., 1979).

Finally, we believe it is possible to further increase the productivity of this system, if a higher cell density is attained by using oxygen-enriched air for sparging (Fass et al. 1989), removing growth inhibitory metabolites by ultrafiltration (Lee and Chang 1990), using computer control (Paalme et al. 1989), or combinations of these strategies.

Acknowledgements. We wish to thank Paulina Balbás and Agustín López Munguía for critically reading this manuscript and Enrique Galindo for helpful discussions. We thank Mercedes Enzaldo, Mario Caro and Bernardo Urióstegui, for their technical assistance. This work was supported by grant IN300891 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., and grant 0248-N9107 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

References

- Balbás P, de Anda R, Flores N, Alvarado X, Cruz N, Valle F, Bolivar F (1988) Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. In: Cañedo L, Todd L, Jaz J, Parker L (eds) Cell function and disease. Plenum Press, New York, N.Y. p 59
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
- Cruz N, Antonio S, de Anda R, Gosset G, Bolivar F (1990) Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in Escherichia coli. *J Liq Chrom* 13:1517-1528
- Cruz N, López M, Estrada G, Alvarado X, de Anda R, Balbás P, Gosset G, Bolivar F (1992) Preparative isolation of recombinant human insulin A chain by ion exchange chromatography. *J Liq Chrom* 15:2311-2324
- Cutayar JM, Poillon D (1989) High cell density culture of E. coli in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnol Lett* 11:155-160
- Fass R, Clem TR, Shiloach J (1989) Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 55:1305-1307
- Flores N, de Anda R, Guereca L, Cruz N, Antonio S, Balbás P, Bolivar F, Valle F (1986) A new expression vector for the production of fused proteins in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol* 25:267-270

- Fu J, Togna AP, Shuler ML, Wilson DB (1992) Escherichia coli host cell modifications in continuous culture affecting heterologous protein overproduction: a population dynamics study. *Biotechnol Prog* 8:340-346
- Gleiser IE, Bauer S (1981) Growth of E. coli W to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnol Bioeng* 23:1015-1021
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD (1979) Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci* 76:106-110.
- Koizumi J, Monden Y, Aiba S (1985) Effects of temperature and dilution rate on the copy number of recombinant plasmid in continuous culture of Bacillus stearothermophilus (pLP11). *Biotechnol Bioeng* 27:721-728
- Lee J, Youn-Hee C, Shin-Kwon K, Hyung-Hwan P, Ik-Boo K (1989) Production of human leukocyte interferon in Escherichia coli by control of growth rate in fed-batch fermentation. *Biotechnol Lett* 2:695-698
- Lee YL, Chang HN (1990) High cell density culture of a recombinant Escherichia coli producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. *Biotechnol Bioeng* 36:330-337
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Mizukami T, Oka T, Itoh S (1986) Production of active human interferon in E. coli II. optimal condition for induced synthesis by 3,β-indoleacrylic acid. *Biotechnol Lett* 8:611-614

- Paalme T, Tiisma K, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R (1989) Glucose-limited fed-batch cultivation of Escherichia coli with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol Bioeng* 35:312-319
- Pierce J, Gutteridge S (1985) Large-scale preparation of ribulosebisphosphate carboxylase from a recombinant system in Escherichia coli characterized by extreme plasmid instability. *Appl Environ Microbiol* 49:1094-1100
- Seo JH Bailey JE (1985) Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng* 27:1668-1674
- Seo JH, Bailey JE (1986) Continuous cultivation of recombinant Escherichia coli: Existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnol Bioeng* 28:1590-1594
- Shiloach J, Bauer S (1975) High yield growth of E. coli. *Biotechnol Bioeng* 17:227-239
- Thompson BG, Kole M, Gerson DF (1985) Control of ammonium concentration in Escherichia coli fermentations. *Biotechnol Bioeng* 27:818-824
- Yansura DG Henner DJ (1990) Use of Escherichia coli trp promoter for direct expression of proteins. *Meth Enzymol* 185:54-60
- Zabriskie DW, Arcuri EJ (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb Technol* 8:706-717

FIGURES

Figure 1.-Growth in FEM medium of *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B) under batch culture conditions, supplemented with different amounts of tryptophan. Biomass final concentrations are presented by solid lines and tryptophan concentrations by dashed lines: F0.- FEM medium without added tryptophan, F1.- FEM medium plus 1 g/10 l of tryptophan added at time 0, F1.5.- FEM medium plus 1.5 g/10 l of tryptophan added at time 0 and F2.- FEM medium plus 1 g/10 l of tryptophan added every two hours five times, starting at time 0. Arrows indicate ampicillin (100 µg/ml) addition.

Figure 2.- Fermentation kinetics of F1 batch culture of *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B) in FEM medium. Biomass (O), cI-insulin B hybrid protein (■), glucose (●), tryptophan (□) and plasmid-bearing cells levels (---) were determined. Arrows indicate addition of ampicillin (100 µg/ml).

Figure 3.- SDS electrophoretic patterns and corresponding laser densitometric scans of total proteins from samples of an F1 batch culture of *E. coli* W3110 *trp*⁻ (pNF21B). The arrow indicates the position of the band corresponding to the cI-insulin B hybrid protein. Panel A: sample taken after 2 h. Panel B: sample taken after 14 h. Molecular weights in kDa are indicated at the side of the protein electrophoretic pattern. Absorbance units are indicated at the top of the densitometric scan.

Figure 4.- Fermentation kinetics of a fed-batch culture of *E. coli* W3110 *trp*(pNF21B). Biomass (O), cI-insulin B hybrid protein (■), tryptophan (□) and plasmid-bearing cells (---) levels were determined. Arrows indicate time of simultaneous addition of ampicillin (100 µg/ml) and tryptophan (100 µg/ml).

Table I. (a) Effect of tryptophan concentration on batch fermentation parameters; (b) comparison between fed-batch and FI batch fermentations.

	(a)				(b)	
	F0	F1	F1.5	F2	Fed-batch	Ratio of Fed-batch/ FI batch fermentation
Biomass (g/l)	6.7	12	12	13.9	20	1.67
Plasmid-bearing population (%)	86	62	66	67	90	1.45
Plasmid-less population (%)	14	38	34	33	10	0.26
Ratio of hybrid protein to total cellular protein of total biomass (%)	4.6	7.9	7	<1	11	1.39
Ratio of hybrid protein to total cellular protein of plasmid-bearing biomass (%)	5.3	12.7	10.6	<1	12.2	0.96
Final hybrid protein concentration (g/l)	0.17	0.53	0.46	---	1.21	2.28
Total culture time (h)	10	14	14	14	24	1.71
Duration of growth phase (h)	5.2	5.2	6	14	8	1.54
Duration of induction phase (h)	4.8	8.8	8	0	16	1.82
Cell yield from glucose (g cells/g gluc.)	---	0.21	---	---	0.3	1.43
Hybrid protein yield from glucose (g hybrid/g gluc.)	---	0.009	---	---	0.018	2

* Tryptophan concentrations used: F0, FEM medium without added tryptophan; F1, FEM medium plus 1 g/10 l of tryptophan added at time 0; F1.5, FEM medium plus 1.5 g/10 l of tryptophan added at time 0 and F2, FEM medium plus 1 g/10 l of tryptophan added every two hours five times, starting at time 0.

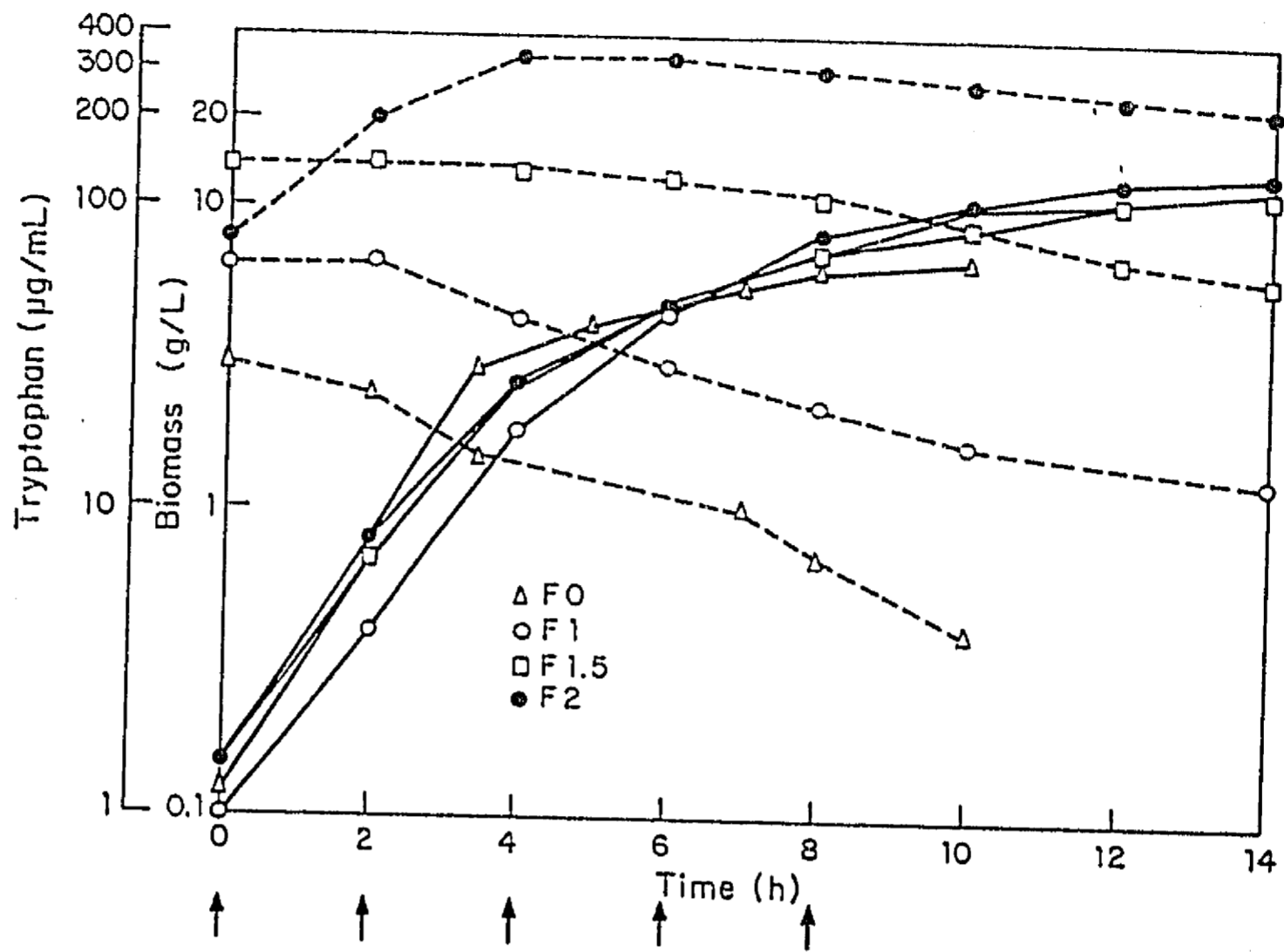


fig 1

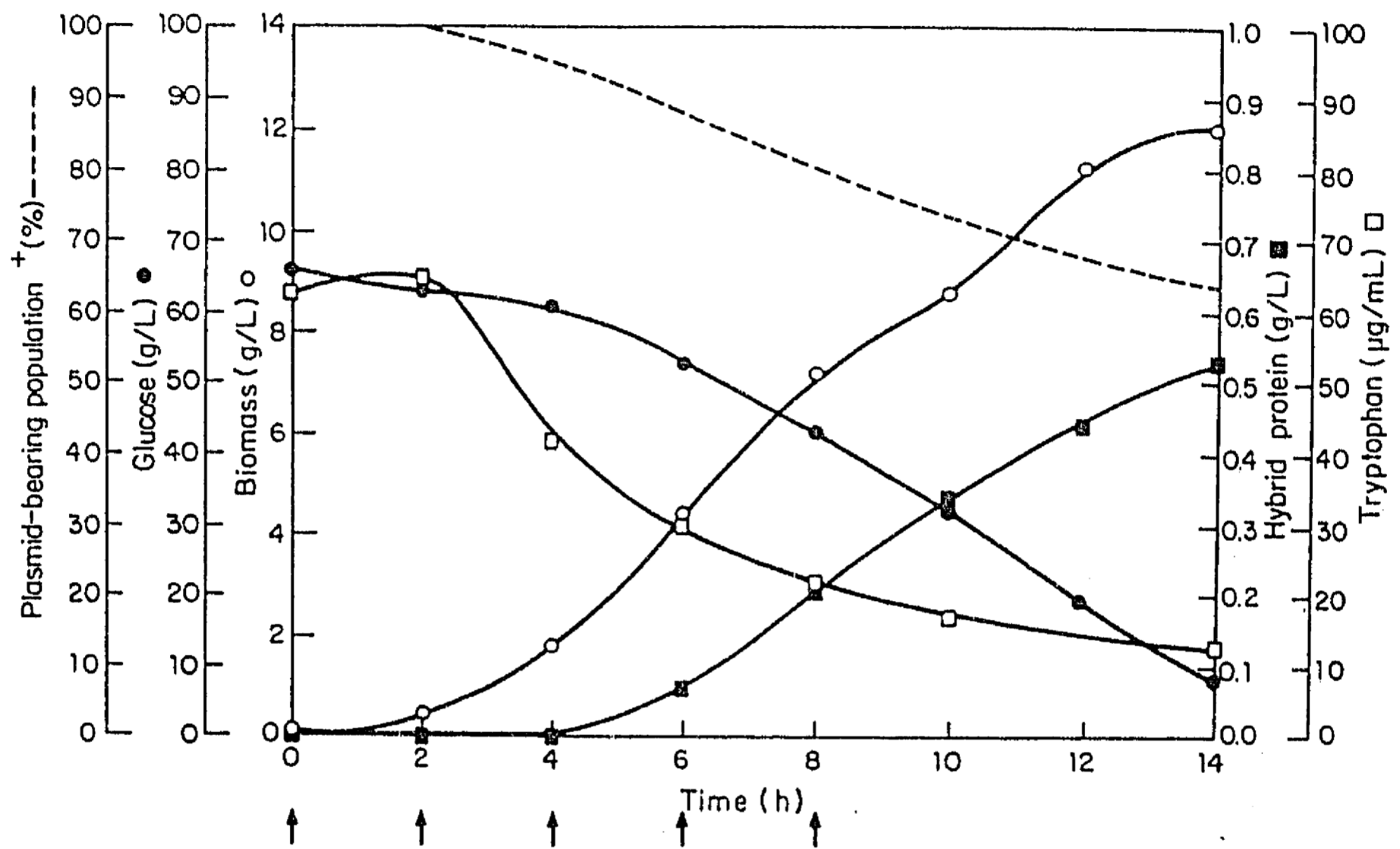


fig 2

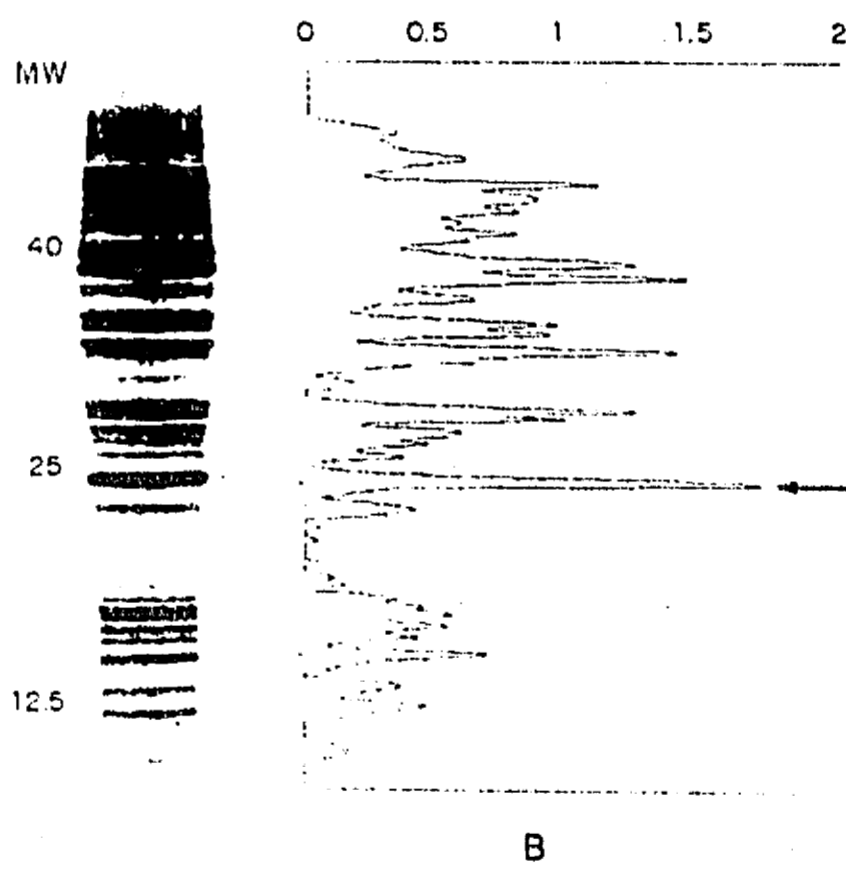
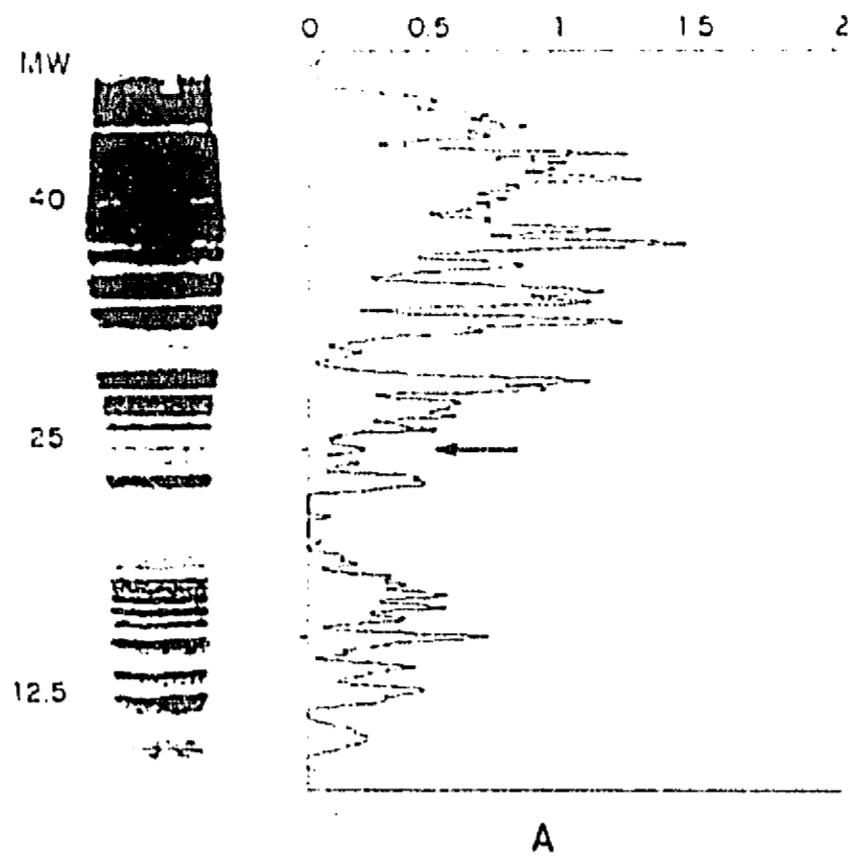


fig 3

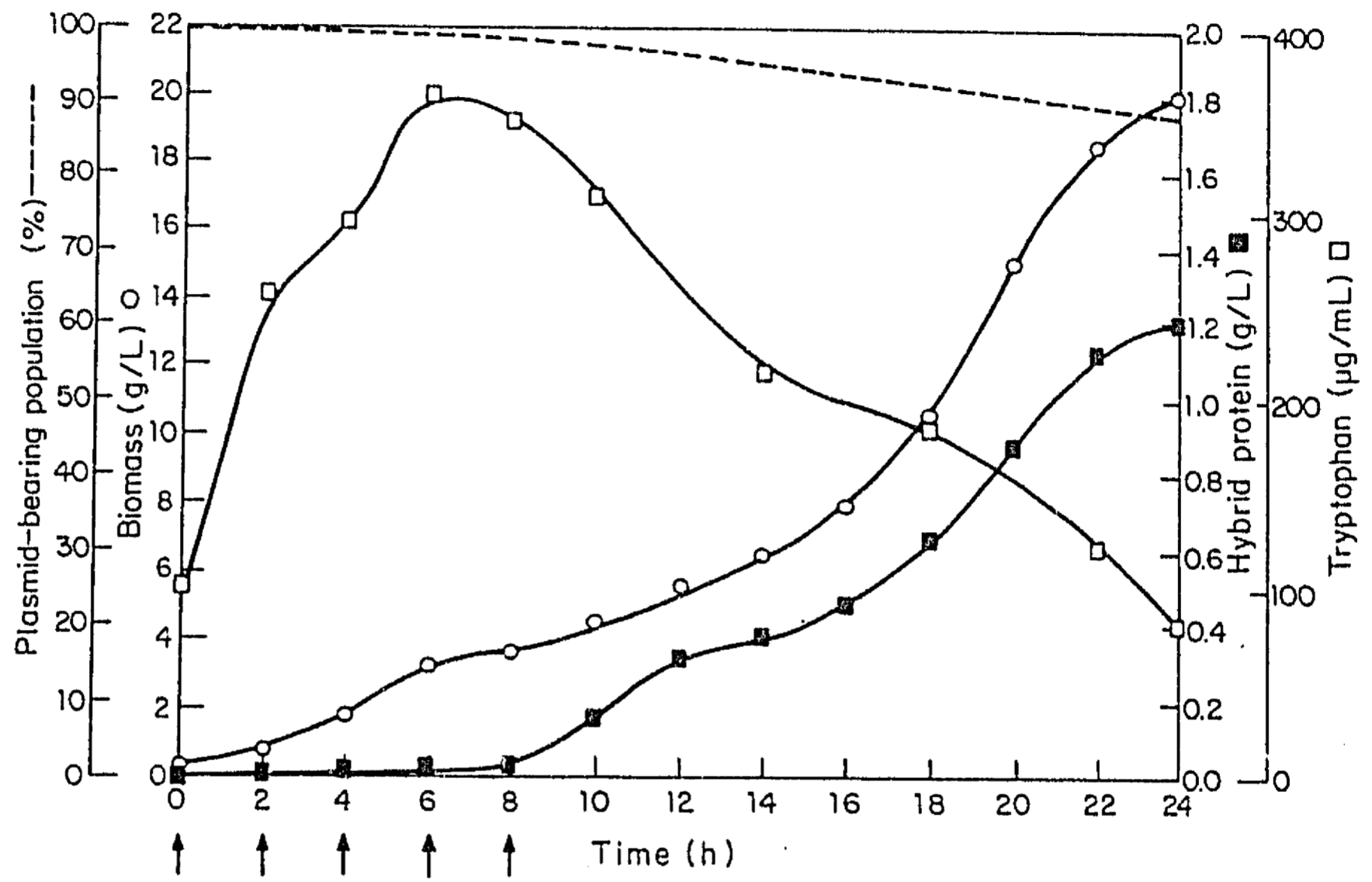


fig4

Applied
and **Microbiology**
Biotechnology



Springer International

Date 26.1.93

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your paper

"Recombinant protein production in cultures of..."

has been accepted for the above journal and is being sent to the publishers.

As you know, each article is limited to six (6) printed pages (i. e., 18 manuscript pages including figures and tables). DM 250.00 will be charged for each page exceeding this limit.

Please send further correspondence directly to:

Springer-Verlag, Journal Production Department II, Postfach 1052 80, D-6900 Heidelberg 1

Sincerely yours

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "U. J. Müller".

**PREPARATIVE ISOLATION BY
HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY OF HUMAN
INSULIN B CHAIN PRODUCED IN
ESCHERICHIA COLI**

**NORBERTO CRUZ, SALVADOR ANTONIO,
RAMÓN DE ANDA, GUILLERMO GOSSET,
AND FRANCISCO BOLIVAR**

*Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética
y Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico*

ABSTRACT

A simple method has been developed for the analytical and preparative purification of human insulin B chain from recombinant origin. Three solvent systems: acetonitrile, isopropanol and methanol, were studied to determine their capacity to resolve the insulin B chain from a mixture of cyanogen bromide generated bacterial peptides. Using a μ Bondapak C18 column, it was possible to resolve the insulin B chain in all three systems. On a preparative scale, using a PrePak 500 C18 column with the isopropanol system, it was possible to purify insulin B chain and to obtain a 95% protein recovery.

INTRODUCTION

Biosynthetic human insulin obtained by recombinant DNA techniques, represents a safe and important source of insulin for the treatment of

insulin-dependent diabetics. Since injection is at this time one of the few methods used for the administration of pharmaceutical proteins, the purification processes for these polypeptides must be designed to meet the stringent requirements of purity for solutions to be injected (1).

In the design of the recuperation procedure for a protein product, a number of parameters should be considered. These include the degree of purity desired, the physical and chemical properties of the product and its contaminants, and finally their cellular localization, for they may be found either in the cytoplasm, the periplasm or the growth media.

A purification process is usually a cascade of unitary operations, some of which may be repeated several times. Unfortunately, there is a loss of product in each operation and these losses grow geometrically with each step. For this reason, it is important to increase the yield in each step, or decrease the number of steps required (2).

The scale-up of a purification process from laboratory to pilot plant is not a direct process. It requires the knowledge of the physicochemical behavior of the product and its contaminants. Also it should be considered that the procedures used in the laboratory-scale purification process are not always convenient in other scales (3).

The method reported here for the purification of human insulin B chain from a bacterial peptide mixture, is based on the use of ion pair forming agents (4). In this case, formic acid and triethylamine were chosen since they modify the retention times of the peptides to be purified, allowing the resolution of human insulin B chain.

The criteria considered to develop this method were: capacity to purify the human insulin B chain from most of the bacterial contaminant peptides, low cost, flexibility for scaling up and the use of a volatile solvent system.

MATERIALS AND METHODS

High Performance Liquid Chromatography

Equipment.

Analytical chromatography was performed using the following equipment from Waters: M-45 and M-590 solvent delivery systems, automated gradient controller, U6K manual injector, Z module radial compression separation system and a M-481 L.C. spectrophotometer. Also, an OmniScribe recorder from Houston Instruments was utilized.

The preparative chromatography was performed using the Prep LC/System 500 A Liquid Chromatograph from Waters with a M-481 L.C. spectrophotometer with a preparative cell, and the OmniScribe recorder from Houston Instruments.

The columns used were: a μ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) from Waters, a metallic column (4.6 mm x 150 mm) packed with 1 gram of Pre-C18 preparative packing, and a PrepPAK 500 C18 cartridge (57 mm x 300 mm) from Waters.

Reagents

HPLC/Spectro grade methanol, isopropanol, and acetonitrile from Merck. Formic acid, sodium sulfite, urea and triethylamine from J. T. Baker. Cyanogen bromide and sodium tetrathionate from Sigma Co. Guanidinium chloride from Pierce. Insulin B chain derived from porcine (Sigma I-3505) was used as a standard.

Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate was performed as described by Laemmli (5).

Isolation and Purification of Inclusion Bodies

The method used was the one reported by Flores et al. (6).

RESULTS AND DISCUSSION

Our group has reported the construction of a recombinant plasmid where the human insulin B chain is produced as the carboxyl terminus of a fusion protein with the amino fragment from phage lambda cl protein. This hybrid protein is aggregated intracellularly as inclusion bodies, which after cell lysis are purified by a simple differential centrifugation step (6). The inclusion bodies are dissolved in 70% formic acid and treated with cyanogen bromide to release the insulin B chain (7). The formic acid is evaporated and the bacterial peptide mixture is dissolved in 8M guanidinium chloride. Sodium sulfite and sodium tetrathionate are added to protect sulfhydryl groups in the B chain from final oxidation, transforming them to sulfonate radicals or Bunte salts (8,9). The peptide mixture is dialysed, and urea is added to 8M. The resulting solution is diluted 1:1 with 5% formic acid, prior to HPLC.

Three analytical systems for the HPLC separation of human insulin B chain were studied. In all of them, the stationary phase employed was a μ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) with a particle size of 10 μ . The mobile phase used in the three systems was an organic solvent and an aqueous buffer A containing reagents which form ion-pairs. Buffer A was composed of 2.5% formic acid and 15mM triethylamine. Table 1 shows the proportion of organic solvent for each system in the equilibrium and elution buffers, as well as the retention times for porcine insulin B chain used as a standard in all systems. In all cases flow rate used was 1 ml/min.

In the systems studied, elution was carried out in two steps: equilibrium and elution (isocratic). This alternative was selected since it

TABLE I

Summary of Solvent Systems and the Retention Times (rt) for Porcine Insulin B chain Utilized as a Standard*.

	(a)	(b)	(c)	(d)
	μ Bondapak C18 column	Analytical column with C18 preparative packing	% organic equilibrium	% organic elution
System I (Acetonitrile)	rt(min) 17.04	rt(min) 17.04	30%	33%
System II (Isopropanol)	rt(min) 18.02	rt(min) 17.60	27%	30%
System III (Methanol)	rt(min) 18.30	rt(min) 17.40	60%	70%

* Retention times for porcine insulin B chain subjected to HPLC in systems I, II and III utilizing (a) a μ Bondapak C18 and (b) an analytical column with preparative packing. The proportion of organic solvent for each system in the equilibrium and elution buffers is presented in lanes (c) and (d).

is easier to scale up than gradients systems. The equilibrium and the elution phases were chosen so that their composition were similar, thus reducing the time needed to obtain the initial equilibrium.

As it can be seen in fig. 1, we were able to obtain a good separation of insulin B chain from the peptide mixture using the isopropanol solvent system. Similar results were obtained with the acetonitrile and methanol systems, (data not shown).

To scale up the analytical systems previously described, a metallic column (4.6 mm x 150 mm) was packed with 1 gram of Pre-C18 preparative packing using a particle size of 55-105 μ . This experiment allowed the determination of the effect of the particle size on the resolution of the peptide

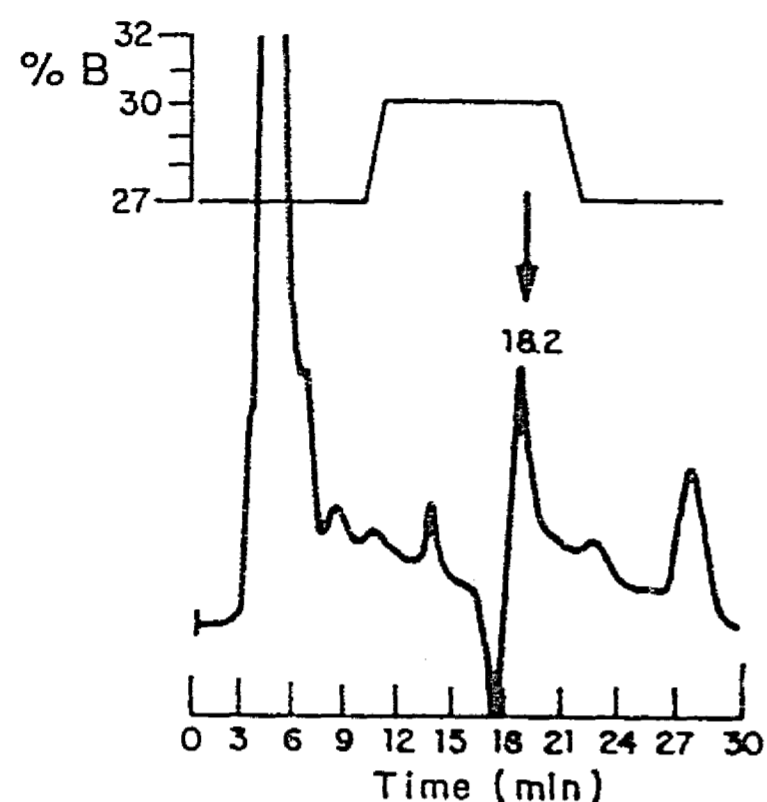


Figure 1. Analytical reverse-phase chromatography of the cyanogen bromide treated inclusion bodies containing the human insulin B chain. A 50 μ g peptide sample was passed through a μ Bondapak C18 column, with a flow rate of 1 ml/min. The position of insulin B chain in the chromatogram is indicated with an arrow. The buffer system used for the purification was: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) isopropanol. Equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30% B, 10 min. Detection: 280 nm, 0.05 AUFS.

mixture, and the prediction of the mass load capacity for a larger column with the same packing. The conditions used were the same as for the analytical systems.

As it can be seen in fig. 2 panels I, II and III, the resolution of the peptide mixture diminishes as compared to the analytical system (fig. 1), due to the increment in the packing particle size. However, this decrement in resolution did not affect the objective of the experiment since retention times for the indicated peaks in fig. 2 are similar to those obtained with porcine insulin B chain used as a standard (see Table I). Polyacrilamide gel electrophoresis of the peaks marked with arrows in fig.

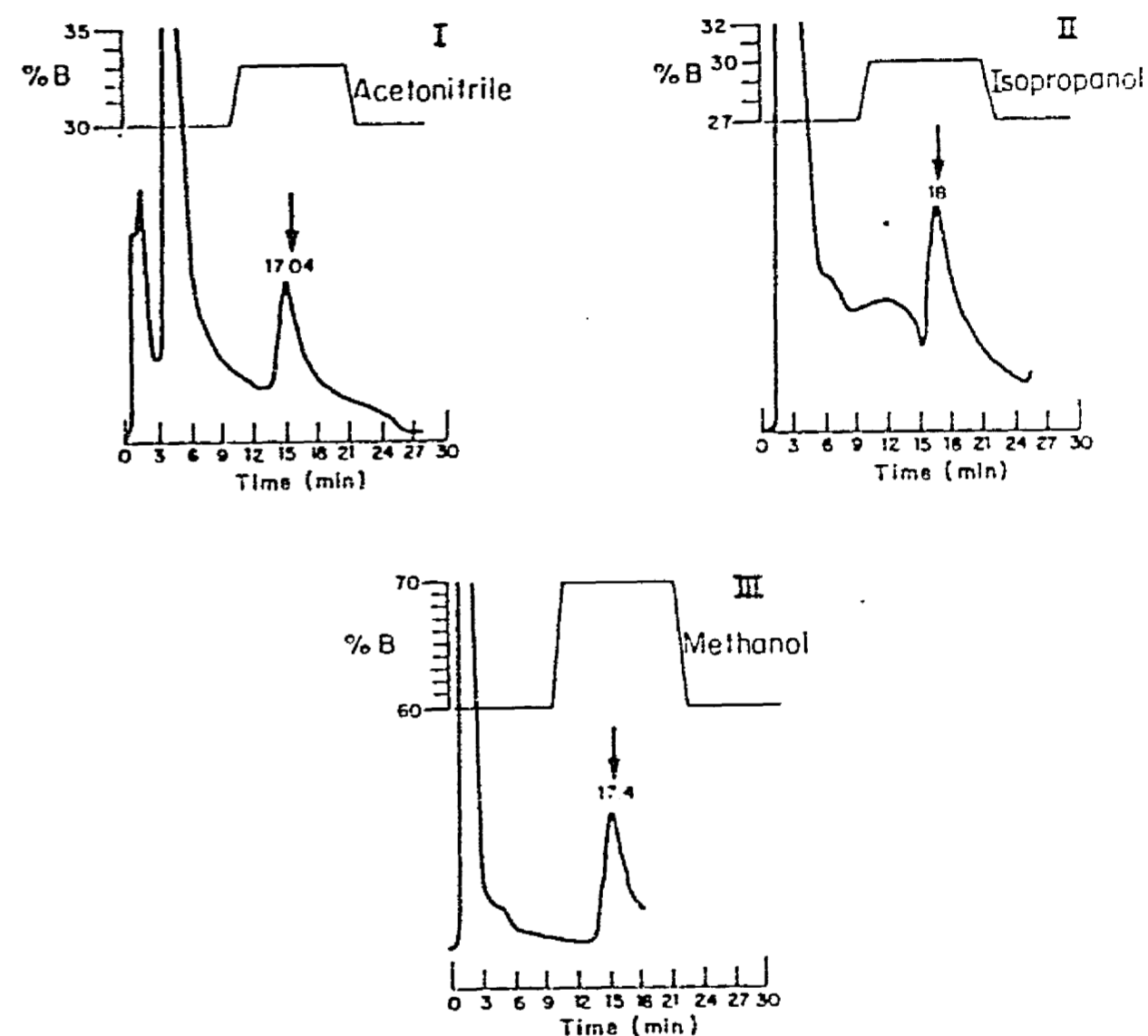


Figure 2. Analytical chromatographic purification of human insulin B chain. A reverse-phase chromatography using an analytical size metallic column with preparative packing of 100 μ g of the cyanogen bromide treated peptide mixture containing the insulin B chain polypeptide, is shown in panels I, II and III. Panel I, buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) acetonitrile; equilibrium: 30% B, 10 min; elution: 33% B, 10 min. Panel II, buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) isopropanol; equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30% B, 10 min. Panel III, buffer composition (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) methanol; equilibrium: 60% B, 10 min; elution: 70% B, 10 min. The flow rate used in all systems was 1 ml/min. Detection: 280 nm, 0.02 AUFS. The position of the human insulin B chain in each chromatogram is marked by an arrow.

2 panels I to III revealed a peptide band which commigrates with the standard (data not shown).

Since the resolution obtained for insulin B chain is similar in all three systems, all of them can be directly scaled up to a preparative level of several grams, once the calculations for mass load capacity and flow rate are performed. On the basis of cost, since this criterion becomes important once the purification process is scaled up, the isopropanol system was selected.

To determine the mass load capacity for a PrepPAK 500 C18 cartridge, maximum load tests were performed in a metallic analytical column (4.6 mm x 150 mm) with 1 g of C18 preparative packing. The maximum protein load determined for this column was 86 mg. After each of the parameters, such as flow rate and time, were defined for the metallic column, the scale-up proportion was calculated using the following equation.

$$C_m = (R_2)^2 / (R_1)^2 \times L_2 / L_1$$

$$C_m = (28.5 \text{ mm}) / (2.3 \text{ mm}) \times 300 \text{ mm} / 150 \text{ mm} = 307$$

where C_m is the mass of the sample with known concentration; R_2 is the radius of the larger column and L_2 its length; R_1 is the radius of the analytical column and L_1 its length. This calculation indicated that the amount of material that can be subjected to chromatography in the large column is approximately 300 times the amount of the analytical column, and this, in turn, indicates that 26.4 g of protein can be loaded per run.

Figure 3 panel I shows the chromatogram of a preparative run of 10 g of the bacterial peptide mixture on a PrepPAK 500 C18 cartridge (57 mm x 300 mm), using a flow rate of 100 ml/min in a Prep LC/System 500 A Liquid Chromatograph. The arrow indicates the position where porcine insulin B chain is resolved. As it can be observed, the profile obtained is similar to the one described for the preparative packed column (fig. 2, panel II). The material from the peak region "D" obtained in this

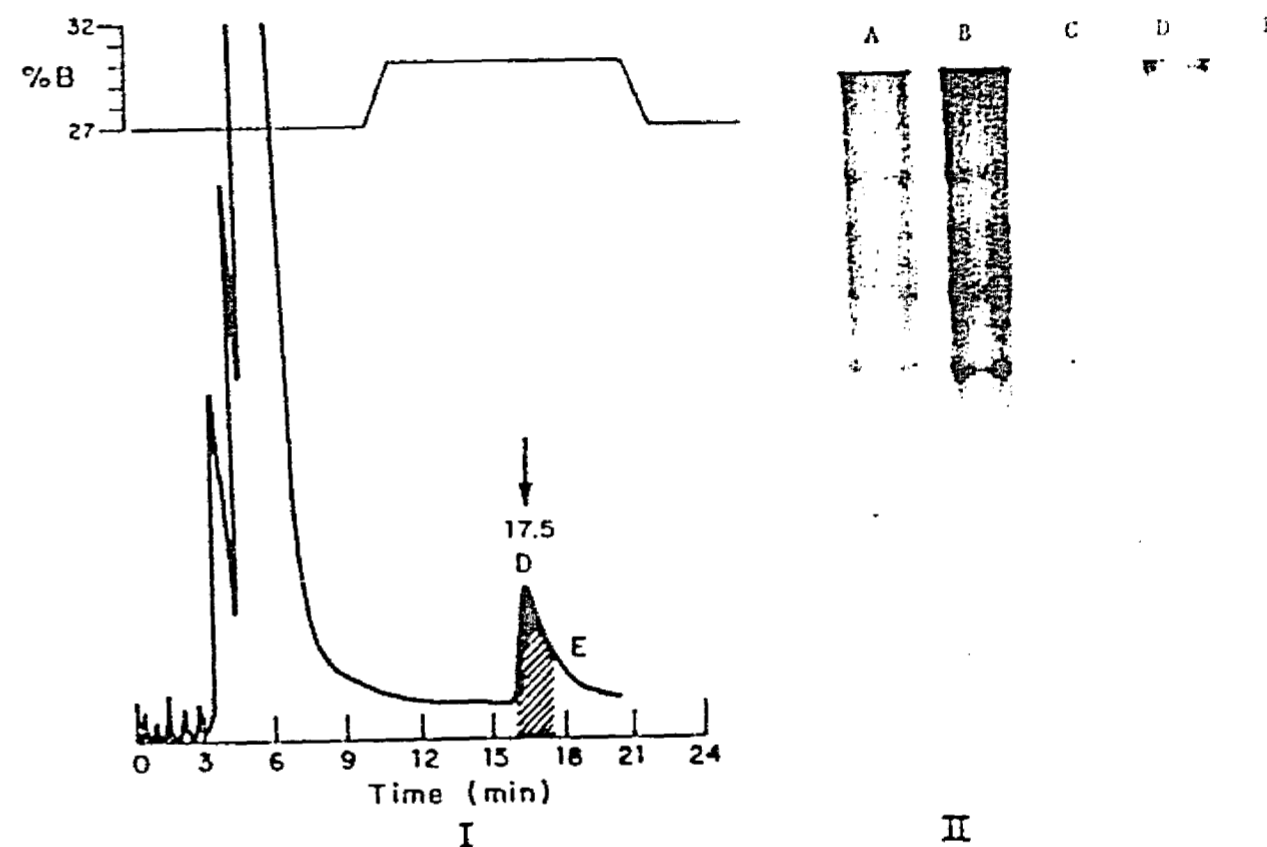


Figure 3. Preparative chromatographic purification of human insulin B chain. I) Preparative reverse-phase chromatography of 10 g of the cyanogen bromide peptide mixture containing the human insulin B chain. A) PrePak 500 C18 column utilizing the isopropanol solvent system was used and the flow rate was 100 ml/min. Buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) isopropanol; equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30%B, 10 min. Detection: 280 nm, 0.1 AUFS using the same detector with a preparative cell. The fractions containing the insulin B chain are marked by letters "D" and "E". II) PAGE analysis of preparative HPLC purified human insulin B chain. Lane A: 10 μ g of cyanogen bromide peptide mixture before purification; Lane B: 20 μ g of cyanogen bromide peptide mixture before purification; Lane C: 20 μ g of porcine pancreas insulin B chain (standard); Lane D: 5 μ g of fraction "D" from the preparative chromatogram; Lane E: 4 μ g of fraction "E" from the preparative chromatogram.

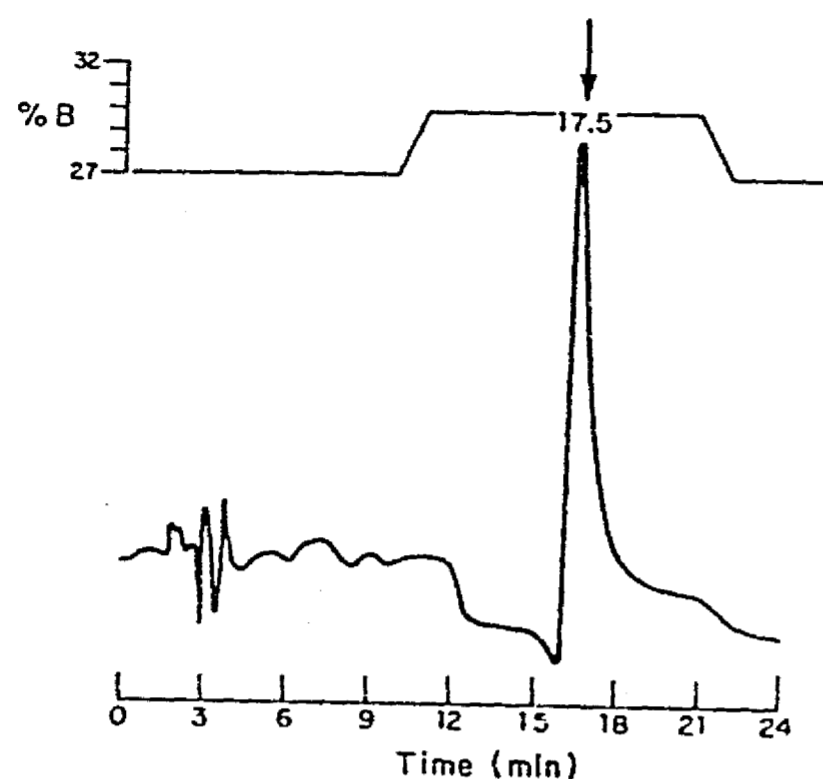


Figure 4. Rechromatography of a sample of material of fraction "D" derived from the preparative scale purification of insulin B chain. A sample of 5 μ l from fraction "D" (fig. 3, panel I) was passed through a μ Bondapak C18 column using the acetonitrile solvent system. Buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) acetonitrile; equilibrium: 30% B, 10 min; elution: 33% B, 10 min.

purification was collected and a sample was passed through an analytical μ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) using the acetonitrile solvent system. Figure 4 shows the chromatograph of this analytical run, where a major peak is evident.

As it can be observed in fig. 3, panel II, insulin B chain elutes in a peak that PAGE analysis revealed to be highly enriched for this peptide. Contaminant peptides are still present (fig. 3, panel II, lanes D and E), but in a much smaller proportion than in the unpurified mixture (fig. 3, panel II, lanes A and B). These peptides, originated mainly from the CNBr hydrolysis of the cl carrier protein, however, they do not interfere with the association reaction between the insulin A and B chains, and were eliminated in the HPLC purification of the correctly associated insulin molecules (data not shown) (6,10).

CONCLUSIONS

Starting with 100 g dry weight of bacterial paste containing 20% of its total protein as the cl-insulin B chain hybrid polypeptide, it is possible to obtain, approximately, 1.2 g of human insulin B chain after a four step process: cell sonication, differential centrifugation for the purification of inclusion bodies, cyanogen bromide treatment of the inclusion bodies (6) and the preparative HPLC chromatography described in this communication. This process can be accomplished in four days, with a 62% overall protein recovery.

The human insulin B chain obtained after the preparative HPLC purification has been associated with insulin A chain to produce active human insulin (data not shown) (6,10). This purification method could be further scaled up in order to process a larger amount of biological material, and eventually be used in a process for the large scale production of human insulin.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by a Grant (A. Noriega) from the Organización de Estados Americanos (OEA). We wish to thank Marcela López for her technical assistance, and Paulina Balbás and Lourival Possani for their critical reading of this manuscript. We are also grateful to Ma. del Carmen González for the typing of this manuscript.

REFERENCES

1. Frank, B. H. and Chance, R. Two routes for producing human insulin utilizing recombinant DNA technology. *Munch. Med. Wschr.* 125 (suppl. 1), 514 (1983).
2. James, L.D. Scaling up bio-product separation with high performance liquid chromatography. *Biotechnology* 2, 957 (1984).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

3. Gail, S. and Charles, M. From R & D to production: designing a chromatographic purification scheme. *Biotechnology* 5, 239 (1987).
4. Ladrón de Guevara, O., Estrada, G., Antonio, S., Alvarado, X., Güereca, L., Zamudio, F., and Bolivar, F. Identification and isolation of human insulin A and B chains by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat* 349, 91 (1985).
5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970).
6. Flores, N., de Anda, R., Güereca, L., Cruz, N., Antonio, S., Balbás, P., Bolivar, F. and Valle, F. A new expression vector for the production of fused proteins in *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 25, 267 (1986).
7. Gross, E. The cyanogen bromide reaction. *Meth Enzymol.* 11, 238 (1967).
8. Cole, R.D. Sulfhytolysis. *Meth Enzymol* 11, 206 (1967)
9. Goeddel, D.V., Kleid, D.F., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.S.D. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 106 (1979).
10. Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. and Bolivar, F. Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. *Cell function and disease* (Cañedo, L., Todd, L., Jaz, J. and Parker, L., eds.) Plenum Press, New York, N. Y. 59 (1988).

PREPARATIVE ISOLATION OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN-A CHAIN BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

NORBERTO CRUZ, MARCELA LÓPEZ, GEORGINA ESTRADA,
XÓCHITL ALVARADO, RAMÓN DE ANDA, PAULINA BALBÁS,
GUILLERMO GOSSET, AND FRANCISCO BOLIVAR

*Departamento de Biología Molecular
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico*

ABSTRACT

A simple, selective and high capacity process is described for the preparative purification of recombinant human insulin A chain, using ion exchange chromatography. This process was developed considering the particular physicochemical characteristics of this peptide. We have found that the insulin A chain binds strongly to the anionic exchanger Macro Prep 50 Q, which permits the equilibration of the resin to an ionic strength of 0.5 M NaCl. These conditions avoid the adsorption of most contaminant components, thus incrementing the capacity of the support for the insulin A chain. Moreover, the process can be easily automatized and scaled-up.

INTRODUCTION

Proteins produced through genetic engineering technology can be used as active substances, because they are chemically and biologically defined. Recent developments are focused to study and modify proteins to change their specificity in order to design new biological activities for industrial applications (1).

During the last decade, the development of the techniques for gene isolation and expression in different species, specially bacteria, has offered great possibilities, and in principle, today it is possible to produce a great variety of proteins. However, in some cases the expression of heterologous genes presents some inherent factors which may become significant obstacles for the production of proteins, such as the lack of knowledge about the final structure and the final biological activity of the protein produced (2). This aspect has fundamental importance for the development of purification processes, since factors such as temperature, pH, shear forces, oxidation, etc., may affect the final biological activity of the product (3).

Since the purification of recombinant proteins represents usually between 80-90% of the total cost of the process, it is necessary to design efficient methodologies, in order to lower the overall costs (4).

Typical purification processes for recombinant proteins from *E. coli*, require several chromatographic steps based on different physicochemical properties, such as: hydrophobicity, affinity, ionic exchange and gel permeation (1). As the number of steps increase in a particular purification process, there is also an increment in complexity, associated with higher costs and lower yields. Therefore, it is important to develop purification processes involving the fewest number of steps (5).

We have reported the construction of recombinant hybrid plasmids for the production of human insulin A and B chains in *E. coli*. These peptides are expressed fused to a fragment of the lambda cI repressor protein, and the *in vitro* association of the peptide chains yielded active human insulin (6). In order to scale-up these processes, it has been necessary to define the procedures and equipment required to work at larger scales. For these reasons, we have developed chromatographic systems that could be easily scaled-up.

Recently, we have reported the preparative purification of recombinant human insulin B chain, using HPLC (7). A similar procedure can be used for the isolation of the A chain; however,

considering the singularities of this peptide, we have developed an alternative, simpler and economical procedure. The insulin A chain is composed of 21 aminoacid residues, most of them acidic. Between them, there are four cysteine residues that when transformed to S-sulfonates (A-(SSO₃⁻)), there is an increase in the anionic character of the peptide and its solubility; the isoelectric point of this oxidized form is lower than 2 (8). Therefore, in a lightly basic pH, this peptide is strongly negatively charged. Because of these features, it is expected that insulin A chain may be purified using an anionic exchanger in a moderately basic pH.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Formic acid, hydrochloric acid and sodium chloride from Baker. Urea from Merck. Trizma base, cyanogen bromide, sodium tetraborate and sodium sulfite from Sigma. Guanidinium hydrochloride from Pierce. Porcine insulin A chain from Sigma (I-3505) was used as a standard. Macro Prep 50 Q and Biogel P2 from Bio Rad. Dialysis bags with a cutoff of 1000 Da from Spectrum.

Lysis buffer composition: 50 mM Tris, 0.1 mM EDTA and 1 mM β-mercaptoethanol.

Equipment

Buchi rotaevaporator. Ultrafilter DC 10 l and a hollow fiber cartridge with a filtration surface area of 0.45 and a cutoff value of 100 kDa, from Amicon. Manton Gaulin Homogenizer from Gaulin Corporation. Static centrifuge from Beckman. Columns 1 x 5 cm and 2.5 x 20 cm with adaptable pistons, fraction collector with UV detector and recorder from LKB. Masterflex peristaltic pump from Cole Parmer. For antifoam and precipitated salt removal, a Mont-Inox sieve No. 40 (0.42 mm), was used.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Slab gel electrophoresis in the presence of SDS was performed as described by Laemmli (9) for detection of hybrid proteins.

Slab gel electrophoresis without SDS was performed in 19% w/v acrylamide, 1% w/v bis-acrylamide gels for insulin A chain analysis (8).

Hybrid protein and A chain level measurements

The amount of cI-A protein and insulin A chain were determined by scanning polyacrylamide gels with the appropriate samples, using a soft laser scanner densitometer from Biomed Instruments, Inc. model SCR-2D/1D.

Protein determination

The method used was the one reported by Lowry (10).

Growth of recombinant Escherichia coli

The *Escherichia coli* W3110 strain transformed with the recombinant plasmid pINS-A (unpublished results) was used for the production of the cI-human insulin A chain hybrid protein. The production strain was grown under batch culture conditions using complex medium with the following parameters: temperature 37 °C, pH=7.4, and dissolved oxygen concentration maintained higher than 20%. A cellular concentration of 9 g/l dry weight was obtained, and the hybrid protein reached 9-12% of the total cellular protein.

RESULTS AND DISCUSSION

After fermentation of the *E. coli* W3110 (pINSA) strain, the cI-A hybrid protein represented between 9-12% of the total cellular protein, as determined by densitometric scanning of SDS-PAGE of total cellular proteins. 18 l of culture containing 9 g/l of *E. coli* cells dry weight, were sieved to remove the antifoaming agent and precipitated salts and subjected to cross-flow ultrafiltration in order to replace the culture media with water and to concentrate the cells by reducing the volume to 4 liters. Cellular rupture was performed using a Manton Gaulin high pressure homogenizer. Three passes, at 10 °C and 500-600

Kg/cm², were necessary for complete disruption. The recovery and partial purification of the cI-A protein inclusion bodies, was accomplished by 4 cycles of washing the pellet with lysis buffer and centrifugation.

The inclusion bodies were subjected to a cyanogen bromide (cyanogenolysis) reaction (11) to release the A chain from the cI carrier protein. The cI sequence was cleaved to several fragments of different sizes; more protein fragments were also generated from the CNBr action on contaminant proteins. The peptide mixture was further subjected to oxidative sulfitolysis, to protect the sulfhydryl groups of the cysteine residues, transforming them into stable S-sulfonate derivatives A-(SSO₃⁻), (12). Finally, the reaction mixture was dialyzed against water, in bags with a cutoff value of 1000 Da, to eliminate guanidinium hydrochloride and other salts used in the sulfitolysis reaction. As the ionic strength of the solution decreases, many proteins precipitate; since the insulin A chain is very soluble at pH>5, approximately 90% of it remains in the supernatant at the end of the dialysis. After several fermentations, the amount of A chain obtained varied between 2 to 5%, depending on the efficiency of the induction. Figure 1 shows the protein patterns obtained after these purification steps.

It has been found that the isoelectric point of the A chain as A-(SSO₃⁻), is lower than 2 (8), and it is also known that the solubility of the tetra S-sulfonate insulin A chain decreases drastically below pH=4 (13). As expected, this peptide is strongly adsorbed to an anion exchanger at neutral or slightly basic pH, when the maximum solubility of the peptide is reached.

A method for the chromatographic isolation of the tetra S-sulfonate A chain, was developed using a macroporous acrylic anion exchanger, Macro Prep 50 Q. The exchanger was equilibrated in a small column (1 x 2 cm), in 50 mM Tris/HCl pH=8 with an ionic conductivity of 1.0 millimhos, and a linear flow rate of 38 cm/hr.

A 5 ml aliquot of peptide sample with a protein concentration of 5.0 mg/ml adjusted to pH=8 with a few drops of NaOH 1 M (final

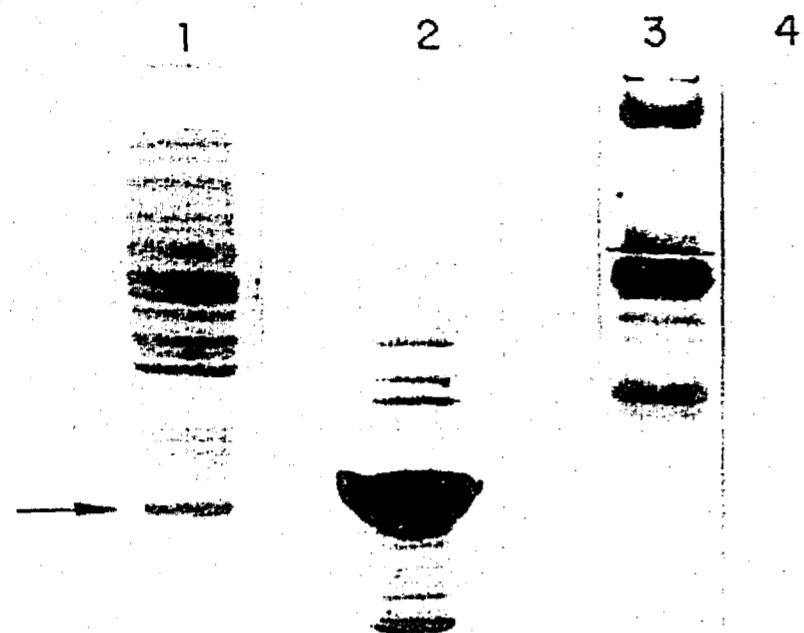


Figure 1.- Denaturing SDS polyacrylamide gel electrophoresis of several protein samples. Lane 1: total proteins from *E. coli* W3110 (pINSA); Lane 2: protein pattern obtained after purification of inclusion bodies. The arrow in lanes 1 and 2 indicate the position where the hybrid protein migrates; Lane 3: non-denaturing PAGE of peptide mixture obtained after CNBr treatment and sulfitolysis; Lane 4: porcine insulin A chain, used as a standard. The arrow in lanes 3 and 4 indicate the position where the insulin A chain migrates.

conductivity of 2.3 millimhos), was loaded to the column and then washed with six column volumes of equilibration buffer until the baseline was reached. The adsorbed peptides were eluted with ten column volumes of a 0-1 M NaCl linear gradient, followed by five column volumes of 1 M NaCl.

Fractions (3 ml) were collected, and their conductivities determined. Fractions containing NaCl were desalted using Biogel

P2 for PAGE analysis. It was found, see figure 2, that the insulin A chain is the last peptide to elute, at a conductivity of 32-36 millimhos.

From these results, it was evident that it is possible to increase the ionic strength of the buffer, without causing the elution of the A chain. Therefore, a second run was performed using buffer with 0.5 M NaCl, which has a conductivity of 26.5 millimhos, to equilibrate the column. The conductivity of the sample was adjusted by the addition of NaCl. A 5 ml sample was applied with a linear flow rate of 38 cm/hr, followed by eight column volumes of equilibration buffer and a 0.5 - 1.0 M NaCl linear gradient was applied to elute proteins. As can be seen in figure 3, the amount of adsorbed protein was reduced considerably, and the predominant component adsorbed in these conditions was insulin A chain. After elution, an electrophoretic analysis revealed a purity of at least 95% for this peptide. The remaining 5% represented mainly the desamido form of the A chain (14).

Since the insulin A chain is the unique component adsorbed to the anion exchange resin in conditions of 26.5 millimhos (0.5 M NaCl), it was concluded that instead of a gradient, a single elution step could be applied, to elute the A chain as a pure peptide.

Therefore, a 5 ml sample was loaded to the column under the previously described conditions, and elution was done with five column volumes of buffer containing 1 M NaCl (48 millimhos). The electrophoretic analysis of the fractions from this chromatography, shown in figure 4, clearly demonstrated a high degree of purity for the resolved insulin A chain.

To determine the maximum load capacity for the exchanger, 1000 ml of the peptide sample, were applied to a column (2.5 x 15 cm), containing 75 ml of packing, using a linear flow rate of 51 cm/h. Collected fractions were analyzed by PAGE, to determine when the insulin A chain was no longer retained. As seen in figure 5, under this high ionic strength conditions (26.5 millimhos), the bed can be loaded with 920 ml of sample, without

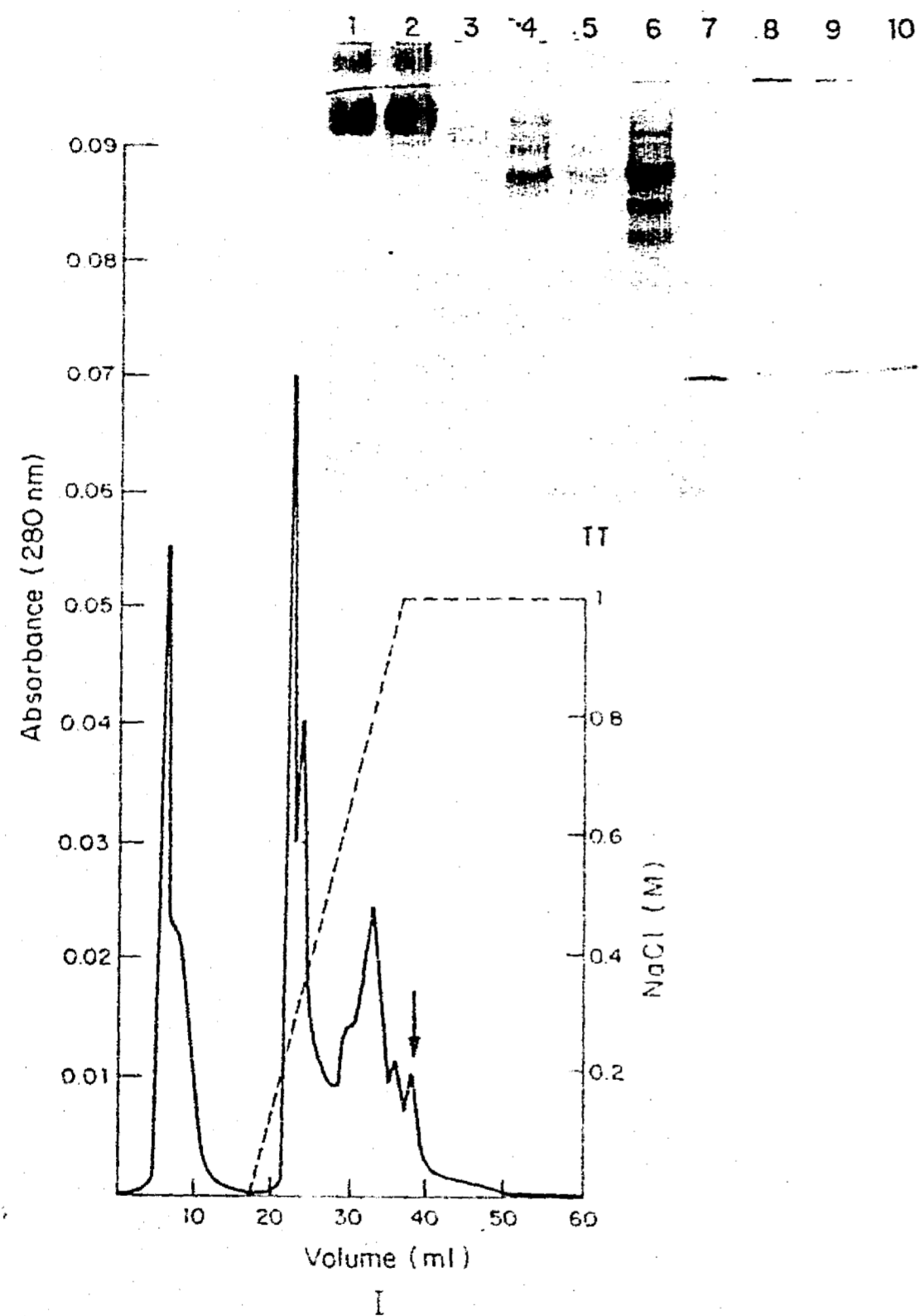


Figure 2.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h. Gradient: 0-1 M NaCl in a total of ten column volumes. The arrow indicates the peak where the insulin A chain elutes. II.- PAGE using 19% acrylamide crosslinked with 1% bis-acrylamide. Lanes 1-6 fractions collected before the A chain elution; lane 7 porcine insulin A chain as standard; lanes 8-10 represent the last fractions from the last peak.

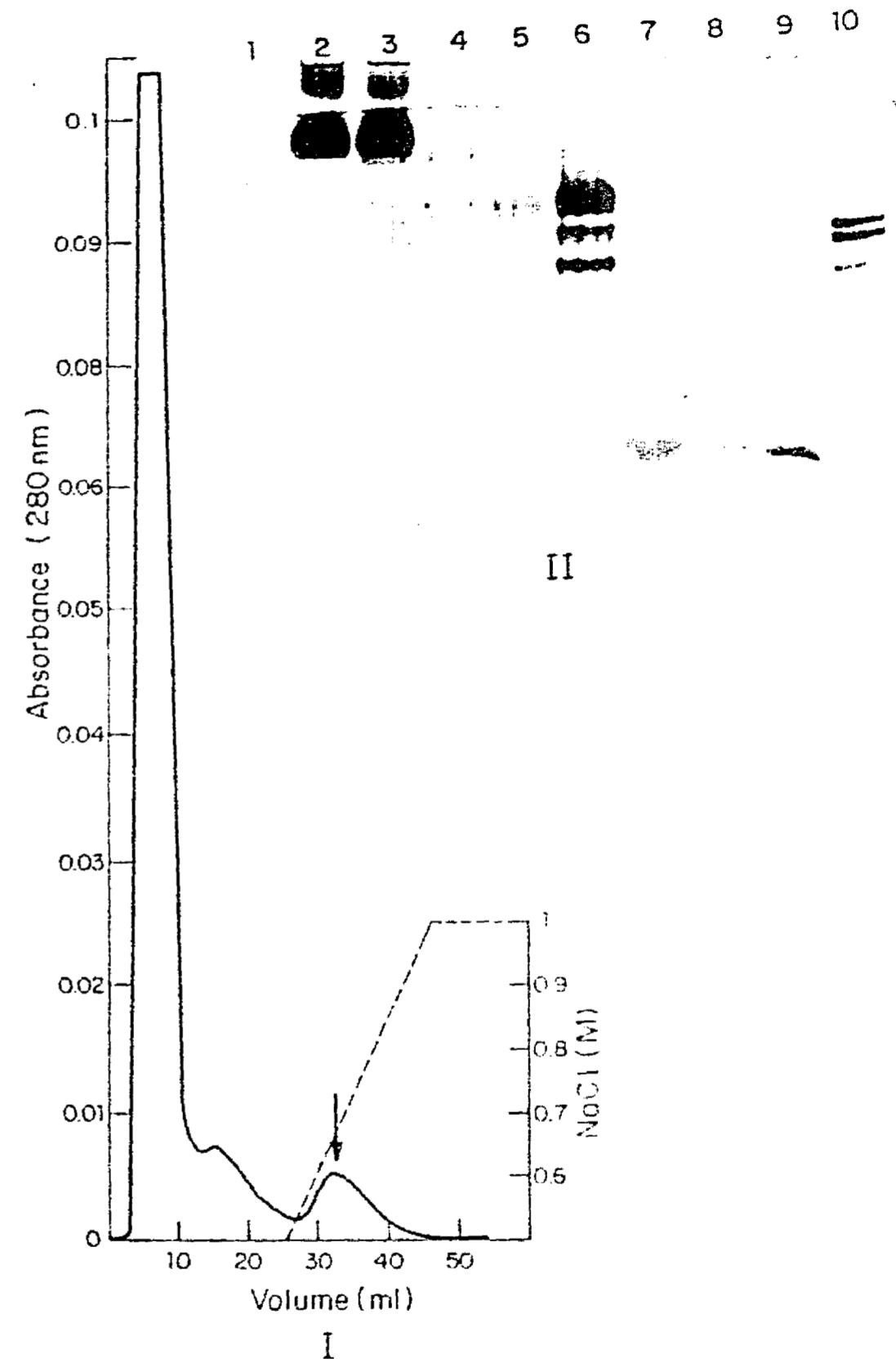


Figure 3.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h, equilibrated with a buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH=8 + 0.5 M of NaCl. The arrow indicates the peak where the A chain elutes. Gradient: 0.5-1 M NaCl in a total of ten column volumes. II.- Non-denaturing PAGE. Lanes 1-3, fractions of non adsorbed proteins; lanes 4-6, fractions eluted with equilibration buffer; lane 7, porcine insulin A chain as a standard; lanes 8 and 9, fractions of the peak eluted between 30 and 40 ml; lane 10, initial sample.

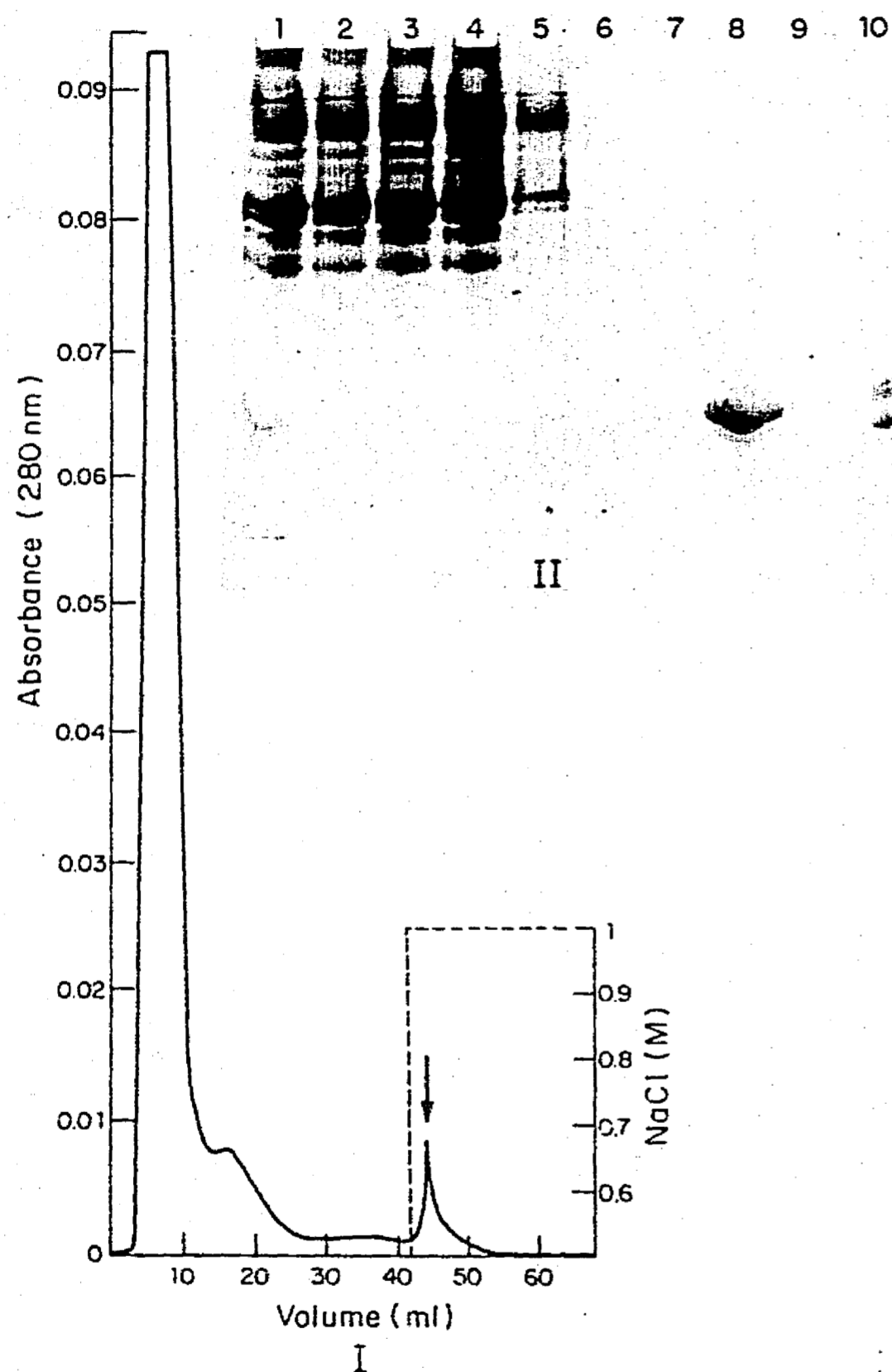


Figure 4.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h, equilibrated with a buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH=8 + 0.5 M of NaCl. Elution was performed in a single step with equilibration buffer + 1 M of NaCl. The arrow indicates the fraction where the insulin A chain elutes. II.- Non-denaturing PAGE. Lane 1, initial sample; lanes 2-4, fractions of non-adsorbed proteins; lanes 5-7, fractions of proteins eluted with equilibration buffer; lane 8, sample of the principal peak eluted; lane 9, fraction after elution of the principal peak; lane 10, porcine insulin A chain as a standard.

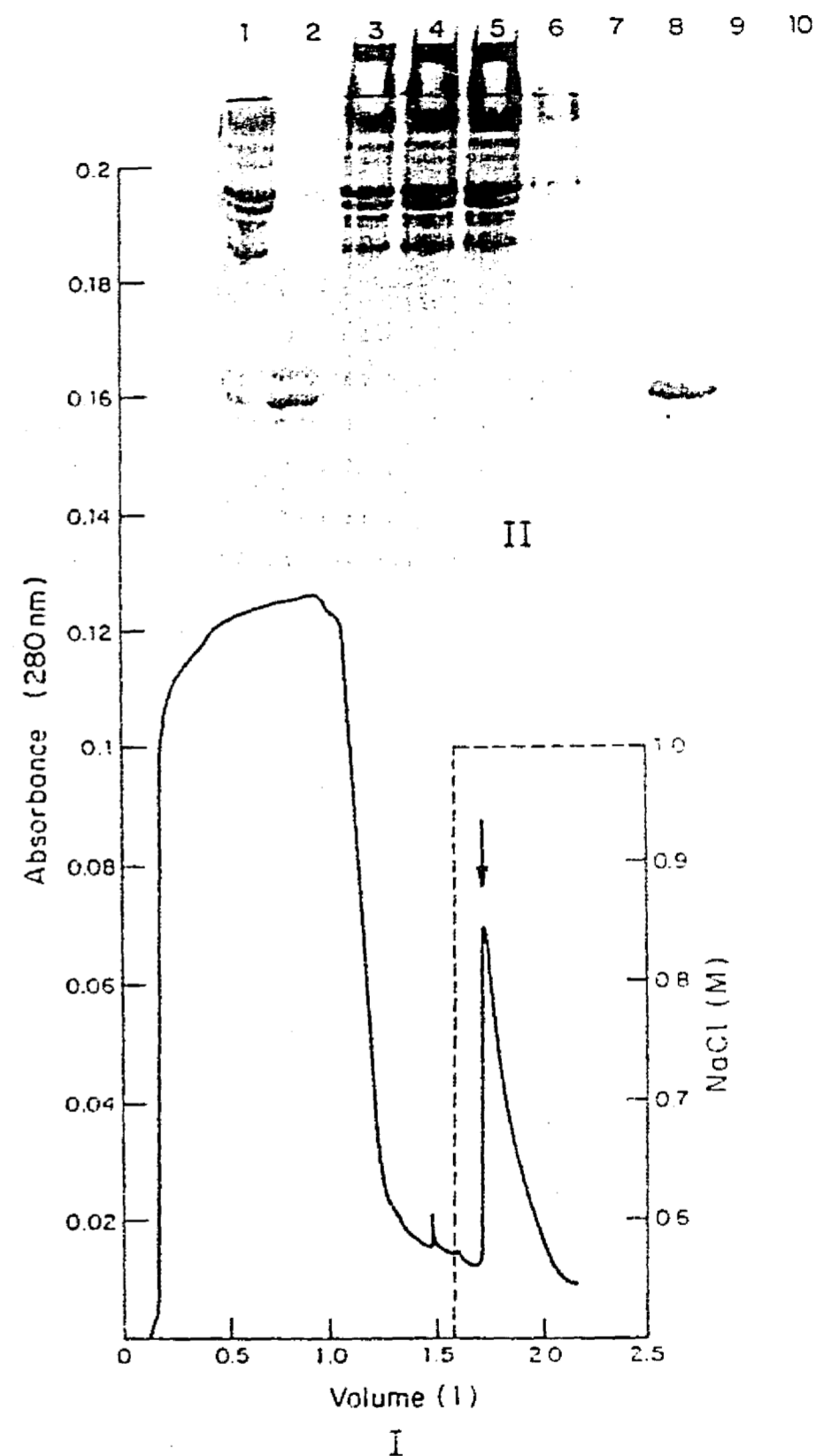


Figure 5.- I.- Chromatographic purification of 1000 ml of the cyanogen bromide treated peptide mixture (5 mg/ml) in a 2.5 X 20 cm column, packed with 75 ml of Macro-Prep 50 Q preparative packing, using a linear flow rate of 51 cm/h. Elution was carried out in the same conditions as indicated in figure 4. The arrow indicates the fraction where the insulin A chain elutes. II.- Non-denaturing PAGE. Lane 1, initial sample; lane 2, porcine insulin A chain used as a standard; lanes 3-5, fractions of non-adsorbed proteins; lane 6-7, proteins eluted with equilibration buffer, lanes 8-10; fractions of the principal peak.

eluting the A chain. Since the A chain represents 3.5% of the total protein in the sample, under the conditions established, the support had a capacity for A chain of 2.14 mg/ml of packed bed. This relatively low capacity is probably due to the extreme conditions used for the selective adsorption of the A chain, which resulted in a high degree of purification as well as a very simple process. These are important characteristics to be considered for automatization and scaling-up. However, utilizing a linear flow rate of 100 cm/h for a 20 cm long column, a cycle of 4.5 h is needed for loading (twelve column volumes), washing (five column volumes), eluting (three column volumes) and re-equilibration (five column volumes at 200 cm/h); under these conditions a throughput of 0.5 g of purified insulin A chain per liter of packed bed, per hour, can be obtained.

CONCLUSIONS

The human insulin A chain displays singular physicochemical properties, which were used to develop a purification process, which offers high selectivity in a single chromatographic step.

An inherent advantage to the purification process developed was that the adsorption of contaminant peptides was avoided at the high ionic strength where the insulin A chain was quantitatively adsorbed with an acceptable capacity. The capacity of the support for the A chain was increased by minimizing the adsorption of contaminants.

The insulin A chain was recuperated quantitatively applying a single elution step, instead of a gradient elution, which reduced dilution. Moreover, the system operation is convenient for automatization and scaling-up. Further optimization of the flow rate at pilot-scale operation is needed to maximize throughput.

The purity of the human insulin A chain (95%) obtained by this method has been found adequate for chemical association with recombinant human B chain to yield human insulin with the expected efficiency (data not shown) (6,7).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank L. Güereca for the critical reading of this manuscript. We also thank H. J. Salinas for the gift of the Bio-Rad 50 Q support. This work was supported by grant IN300891 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, and grant 0248-N9107 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

1. Blohm, D., Bollschweiler, C. and Angew, H.H., Pharmaceutical proteins. *Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 207 (1988).
2. Bialy, H., Recombinant proteins: virtual authenticity. *Bio/Technology* 5, 883 (1987).
3. Dunnill, P., Integrated Bioprocessing for Recombinant Proteins in: An International Conference from the Cambridge Series on Biotechnology St. John's College, Cambridge, UK 27th/28th September (1990).
4. Dwyer, J.L., Scale-up of bioproduct separation with high performance liquid chromatography. *Bio/Technology* 2, 957 (1984).
5. Bonnerjea, J., OH., S., Hoare and M.M. Dunnill, P., Protein purification: the right step at the right time. *Bio/Technology* 4, 954 (1986).
6. Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. and Bolivar, F., Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. Cell function and disease (Cañedo, L., Todd, L., Jaz, J. and Parker, L., eds.) Plenum Press, New York, N.Y. 59 (1988).
7. Cruz, N., Antonio, S., De Anda, R., Gosset, G., and Bolivar, F., Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in *Escherichia coli*. *Journal of Liquid Chromatography* 13, 1529 (1990).
8. Güereca, L., Aislamiento del péptido A de la insulina a partir de cepas bacterianas modificadas genéticamente. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Master Thesis (1984).

9. Laemmli, U.K., Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227, 680 (1970).
10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
11. Gross, E., The cyanogen bromide reaction. *Meth. Enzymol.* 11, 267 (1967).
12. Cole, R.D., Sulfitolysis. *Meth Enzymol.* 11, 206 (1967).
13. Yu-cang, D., Yu-shang, Z., Zi-xian, L. and Chen-lu, T., Resynthesis of insulin from its glycyl and phenylalanyl chains. *Scientia Sinica.* 10, 84 (1961).
14. Kroeff, E.P., Owens, R.A., Campbell, E.L. Johnson, R.D. and Marks, H.I., Production scale purification of biosynthetic human insulin by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 461, 45 (1989).