



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Químico Farmacobiólogo

**Expresión, Purificación y Caracterización Funcional
del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
Humano Recombinante (rhG-CSF)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA**

GIOVANNI PALOMINO VIZCAÍNO

Tijuana, B. C.

Junio de 2010.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.007/09
Tijuana, Baja California
Junio 4 /10

C. GIOVANNI PALOMINO VIZCAÍNO
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

es propuesto por el **DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA**

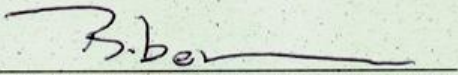
quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:
**"Expresión, Purificación y Caracterización Funcional del factor estimulante de
colonias de Granulocitos Humano Recombinante (rhG-CSF)"**

el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Asesor


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Sub- Director


MC. Rubén Guillermo Sepúlveda Marqués
Director

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección y Tutoría del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
(12a Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación)

Por creer en mí.

Por permitirme equivocarme.

Por su amor, aliento y comprensión.

Por su apoyo en la lucha por cumplir mis sueños.

Por mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi empeño y por todo lo que soy como persona.

Con todo mi amor, cariño y admiración

A mis padres Rogelio y Martha

A mi hermana Kenia

Los Amo

AGRADECIMIENTOS

A ti, a quien no puedo describir con ninguna palabra.

Al **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, por ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos, por forjar mi espíritu científico, por inspirar mi sed de conocimientos y por su insuperable dirección.

A la **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre**, por todo su apoyo incondicional.

Al **Dr. José Manuel Cornejo Bravo** y al **Dr. Samuel Guillermo Meléndez, López** por sus acertados consejos.

Muy especialmente a la Familia Ramos Mares, por permitirme compartir con ustedes mi paso por esta gran experiencia.

A todos los compañeros, con los que tuve la oportunidad de compartir esta travesía, gracias por formar parte de una de las mejores etapas de mi vida.

Muchas Gracias.

“La gloria del mundo es transitoria, y no es ella la que nos da la dimensión de nuestra vida, sino la elección que hacemos de seguir nuestra leyenda personal, tener fe en nuestras utopías y luchar por nuestros sueños”.

Paulo Coelho

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	7
Índice de Figuras.....	9
Abreviaturas	10
Índice de Tablas	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1. Hematopoyesis.....	13
I.2. Factores de crecimiento hematopoyético y estimulación celular.....	15
I.3. Factor estimulante de colonias de granulocitos	16
I.4. Importancia del G-CSF	21
I.5. Indicaciones terapéuticas del G-CSF	22
I.6. Farmacología de G-CSF	23
<i>I.6.1. Neutropenia inducida por quimioterapia en cáncer</i>	<i>23</i>
<i>I.6.2. Neutropenia febril</i>	<i>24</i>
<i>I.6.3. Neutropenia en LMA y LLA</i>	<i>26</i>
<i>I.6.4. Otras aplicaciones</i>	<i>27</i>
<i>I.6.5. Reacciones adversas</i>	<i>28</i>
<i>I.6.6. Farmacocinética y farmacodinamia</i>	<i>29</i>
I.7. Biotecnología y biofármacos	30
II. OBJETIVOS.....	32
II.1. Objetivo general	32
II.2. Objetivos específicos.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
III.1. Reactivos biológicos y químicos	34
<i>III.1.1. Células y medios de cultivo</i>	<i>34</i>
<i>III.1.2. Plásmidos.....</i>	<i>35</i>
<i>III.1.3. Enzimas y otros reactivos biológicos.....</i>	<i>36</i>
<i>III.1.4. Oligonucleótidos sintéticos.....</i>	<i>37</i>
<i>III.1.5. Reactivos químicos</i>	<i>37</i>

III.1.6. <i>Sistemas de purificación</i>	38
III.2. Equipo	38
III.3. Clonación	39
III.3.1. <i>Amplificación del gen humano codificante para G-CSF</i>	39
III.3.2. <i>Construcción del plásmido pQE30:HuGCSFF2R1</i>	40
III.3.3. <i>Transformación bacteriana</i>	41
III.3.4. <i>Selección y análisis de transformantes estables</i>	42
III.4. Expresión de G-CSF humano recombinante	44
III.4.1. <i>Mini-escala</i>	44
III.4.2. <i>Midi-escala</i>	47
III.5. Purificación de G-CSF humano recombinante	47
III.5.1. <i>Cromatografía de afinidad a metales y plegamiento en columna</i>	47
III.5.2. <i>Purificación por exclusión molecular</i>	48
III.5.3. <i>Cuantificación de proteínas</i>	48
III.5.4. <i>Cuantificación de tioles libres</i>	49
III.6. Bioensayo de estimulación de la proliferación celular	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
IV.1. La variante 2 del gen humano codificante para G-CSF	50
IV.2. Amplificación del gen humano codificante para G-CSF	51
IV.3. Clonación del gen humano codificante para G-CSF	52
IV.4. Caracterización del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2	53
IV.5. Análisis de expresión de la proteína HuG-CSF recombinante	53
IV.6. Lisis celular y fraccionamiento en condiciones nativas	56
IV.7. Purificación de la proteína HuG-CSF recombinante	57
IV.8. Estado de oxidación de la proteína HuG-CSF recombinante	58
IV.9. Actividad biológica de la proteína HuG-CSF recombinante	59
V. CONCLUSIONES	62
VI. BIBLIOGRAFIA	63

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la hematopoyesis.....	15
Figura 2. Representación esquemática del arreglo genómico de la secuencia codificante para la proteína G-CSF (CSF3) de humano.....	17
Figura 3. Alineamiento de secuencias polipeptídicas de las variantes de la proteína G-CSF de humano.....	18
Figura 4. Representación esquemática de la secuencia polipeptídica precursora de G-CSF de humano.....	19
Figura 5. Representación gráfica de listones (amino [azul] a carboxilo [rojo]) de la estructura tridimensional de la proteína humana G-CSF.....	20
Figura 6. Representación esquemática de la familia de plásmidos comerciales pQE-3X (Qiagen).....	35
Figura 7. Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, de la variante 2 del gen humano G-CSF contenido en el plásmido comercial pCMV6-XL5:HuGCSF.....	50
Figura 8. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) del fragmento nucleotídico codificante para el péptido maduro G-CSF amplificado por PCR (denominado GCSF30).....	51
Figura 9. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) de los productos de la digestión de las clonas pQE30-HuGCSFF2 con las endonucleasas <i>Eco</i> RI y <i>Hind</i> III.....	52
Figura 10. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) de los fragmentos de restricción obtenidos de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.....	54
Figura 11. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 15%) de los lisados bacterianos totales de las clonas C1, C3, C5 y C7 que portan el plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.....	55
Figura 12. Reconocimiento e inmunodetección de la proteína recombinante HuG-CSF mediante western blot, usando anticuerpos anti-polihistidinas.....	56
Figura 13. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12%) de las fracciones proteicas colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína HuG-CSF recombinante.....	57
Figura 14. Estimulación de la proliferación y diferenciación celular inducidas por la proteína HuG-CSF recombinante.....	60
Figura 15. Análisis microscópico de la diferenciación, proliferación y formación de colonias de células de médula ósea murina estimuladas por la proteína HuG-CSF recombinante.....	61

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
A_{nm}	Absorbancia a longitud de onda específica (324, 490, o 595)
BM	Biología molecular
BSA	Albumina sérica bovina
CTH	Células troncales hematopoyéticas
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
C, Cys	Cisteína
CI	Con inductor
DTT	Ditrioteitol
dNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfados
<i>et al.</i>	Y colaboradores (del latín <i>et allos</i>)
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FC	Factor de crecimiento
FCH	Factor de crecimiento hematopoyético
FEC	Factor estimulante de colonias
FNP	Fraccion no pegada
FS	Fracción soluble
FI	Fracción insoluble
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
G-CSFR	Receptor del Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HuG-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos humano
rHuG-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante
HuGCSFv2	Factor estimulante de colonias de granulocitos humano variante 2
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
TNF	Factor de necrosis tumoral
K_d	Constante de disociación
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo daltons
Epo	Eritropoyetina
HC	Hormona de crecimiento
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LMA	Leucemia mielocítica aguda
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
μ L, mL, L	Microlitro, mililitro, litro
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LTBS	Lisado total bacteriano soluble
LT	Lisis total
LPS	Lipopolisacaridos
ng, mg, kg	Nanogramo, miligramo, kilogramo

M, mM, μ M, pM	Molar, milimolar, micromolar, picomolar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
min, h	Minutos, hora
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
UI	Unidades internacionales
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
DMSO	Dimetilsulfóxido
GSSG	Glutación oxidado
SI	Sin inductor
UFC	Unidad formadora de colonias
NF	Neutropenia febril
PBSC	Del inglés <i>Peripheral Blood Stem Cells</i>
PCR	Del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen codificante para la proteína G-CSF humana.....	36
Tabla 2. Sustituciones en la secuencia del gen humano codificante para G-CSF.....	39
Tabla 3. Fragmentos de restricción esperados de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.....	53
Tabla 4. Análisis de expresión y purificación de la proteína HuG-CSF recombinante mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y exclusión molecular (PD-10). ..	58

I. INTRODUCCIÓN

Diariamente, miles de millones de células sanguíneas maduras mueren y son eliminadas de la circulación [Ramírez, 2004]. Para compensar esta pérdida, nuestro organismo produce cantidades extraordinarias de células sanguíneas, *p.e.* un adulto produce por día 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos, compensando la pérdida y asegurando los niveles requeridos de estas células en la circulación. El proceso a través del cual se generan los elementos celulares de la sangre se denomina “hematopoyesis” [Mayani, 2007; Demetri, 1991].

I.1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de formación de las células sanguíneas, a través de la proliferación, diferenciación y maduración de células madre hematopoyéticas, que tiene lugar en los denominados “órganos hematopoyéticos” (saco vitelino, bazo, hígado y médula ósea). En estos órganos, el micro-ambiente regula cada una de las etapas que conducen a la generación de células primarias, intermedias y maduras [Mayani, 2007].

La hematopoyesis está regulada por mecanismos de gran complejidad, en los que las células hematopoyéticas interaccionan entre sí, con su micro-ambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular. Estas interacciones coordinan la función de la célula y, para ello, requieren de un amplio grupo de receptores en la superficie celular, altamente especializados, que interviene tanto en la adhesión celular como en la transmisión de señales procedentes de otras células, de los factores de crecimiento y de la matriz

extracelular [Florensa, 2006]. El funcionamiento correcto de este sistema asegura la producción de las células responsables del transporte de oxígeno, la coagulación sanguínea y la inmunidad [Ramírez, 2004].

El micro-ambiente hematopoyético consiste en una estructura altamente organizada de células del estroma y sus productos; en conjunto, regulan la proliferación, maduración, auto-renovación y migración de las células hematopoyéticas [Mayani, 2007]. La hematopoyesis requiere, asimismo, de un aporte adecuado de minerales (*p.e.* hierro, cobalto y cobre) y vitaminas (*p.e.* ácido fólico, vitamina B₁₂, piridoxina, ácido ascórbico y riboflavina) [Kaushansky, 2007]. La complementación inadecuada de los nutrientes esenciales o de los factores de crecimiento origina deficiencias de células sanguíneas funcionales [Masters, 2007]. De esta manera, los progenitores hematopoyéticos se diferencian a células precursoras, a través de una serie de eventos, en donde grupos alternados de genes, en asociación con diversos factores de crecimiento, determinan el destino celular, donde cada célula madura tiene una identidad y función definida.

De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos (Figura 1): el primer compartimento corresponde a las células primarias, llamadas células troncales hematopoyéticas (CTH), las cuales se caracterizan por ser capaces de auto-renovarse y ser multi-potenciales. Las CTH dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), que conforman el segundo compartimento; éstas han perdido su capacidad de auto-renovación, pero pueden ser multi-potenciales, bi-potenciales o mono-potenciales. Las CPH dan origen a precursores hematopoyéticos (reconocibles por su morfología) que constituyen el tercer compartimento, y los precursores hematopoyéticos al madurar generan las células sanguíneas circundantes, que integran el cuarto

compartimento [Mayani, 2007]. Los factores de crecimiento son indispensables para el desarrollo de células hematopoyéticas [Florensa, 2006].

I.2. Factores de crecimiento hematopoyético y estimulación celular

Los factores de crecimiento hematopoyético (FCH) son hormonas glucoproteicas que, junto a los neurotransmisores, desempeñan una importante función en la comunicación

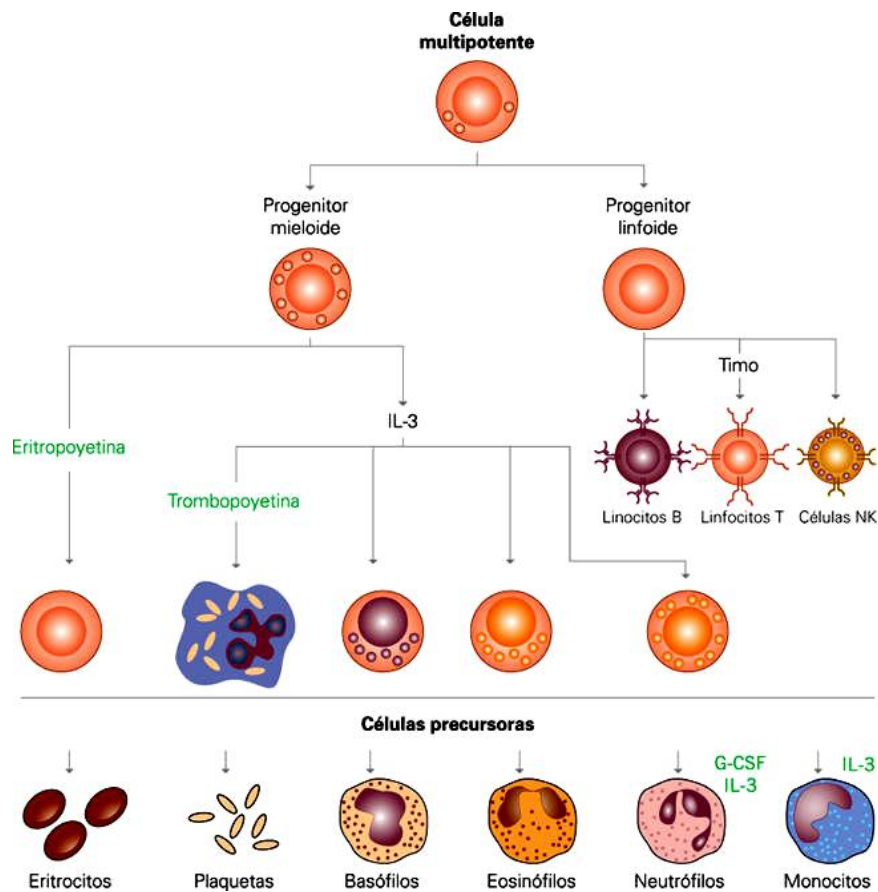


Figura 1. Representación esquemática de la hematopoyesis.

Los linajes celulares y algunos factores estimulantes del crecimiento celular (eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF e IL3) se indican.

intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es el control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G_0) y la entrada de la célula a la fase G_1 ; además, (i) modulan la hematopoyesis, y (ii) controlan la supervivencia, la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea [Flórez, 2008; García-Roldán, 2003; Masters, 2007]. Los FCH actúan a través de receptores de membrana de la super-familia de receptores de citocinas [Kaushansky, 2007]. Casi todos los FCH actúan sinérgicamente con otros factores y, asimismo, estimulan la producción de otros factores de crecimiento [Kaushansky, 2007].

Durante la hematopoyesis, a partir de la CTH se derivan las posibles líneas de desarrollo celular. Los FCH son capaces de dirigir el desarrollo y maduración de las células sanguíneas periféricas a partir de la CTH. Las CTH se encuentran en fase quiescente o de reposo (G_0); sin embargo, cuando reciben el estímulo de los FCH entran en fase de síntesis (S), expresando en su superficie receptores para algunos tipos de FCH; específicamente, aquellos considerados de acción temprana (p.e. IL-3). Además, conforme el proceso de diferenciación avanza hacia alguna línea hematopoyética específica, desaparecen los receptores tempranos y aparecen otros de acción intermedia (p.e. GM-CSF) o tardía (p.e. G-CSF, EPO, M-CSF, IL-5 y IL-6) [Torres, 1994].

I.3. Factor estimulante de colonias de granulocitos

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es clasificado dentro del grupo de las citocinas, que se caracterizan por ser importantes factores polipeptídicos producidos por células linfoides, monocíticas y hematopoyéticas. Las citocinas conforman un grupo heterogéneo de mediadores proteicos/peptídicos producidos y liberados por

células del sistema inmunológico durante la reacción inflamatoria. La super-familia de las citocinas suele comprender a las interleucinas (IL), las quimiocinas, los factores de crecimiento (FC), los factores estimulantes de colonias (FEC), los interferones (IFN) y los factores de necrosis tumoral (TNF), la eritropoyetina (Epo), la hormona de crecimiento (HC) y la prolactina, entre otros.

El G-CSF es un factor de crecimiento que juega un papel importante en el control de la hematopoyesis, regulando el crecimiento, diferenciación, sobrevivencia y activación de neutrófilos y sus precursores (Figura 1) [Soo-Hyung, 1995; Jeong, 2001]. Este proceso fisiológico juega un papel crucial en el sistema de defensa del individuo [Vanz, 2008; Jeong, 2001]. Un adulto (de peso promedio) producirá aproximadamente 120 000 millones de granulocitos por día, solo para reponer la perdida diaria normal [Demetri, 1991]. Esta enorme capacidad de producción puede incrementarse (al menos 10 órdenes de magnitud) bajo condiciones de estrés; *p.e.* infecciones.

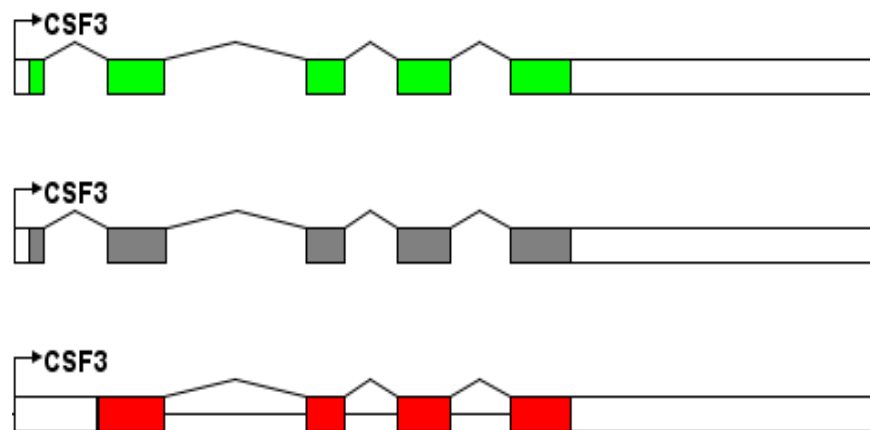


Figura 2. Representación esquemática del arreglo genómico de la secuencia codificante para la proteína G-CSF (CSF3) de humano.

Los productos de "splicing" alternativo se muestran en color (verde, variante 2; gris, variante 1; rojo, variante 3).

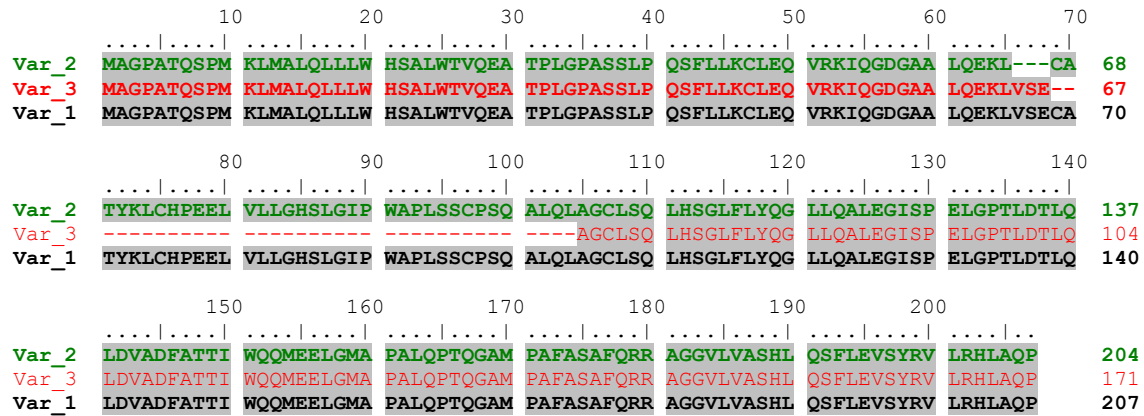


Figura 3. Alineamiento de secuencias polipeptídicas de las variantes de la proteína G-CSF de humano.

El gen codificante para el G-CSF humano, localizado en el *locus* 17q11-12, está conformado de 5 exones, distribuidos en aproximadamente 2.3 Kb (Figura 2). En el extremo 5' del segundo intrón se encuentran dos secuencias donadoras de “empalme (*splicing*)” una tras otra, separadas por solo 9 pb; debido a esto, se pueden encontrar dos diferentes transcritos codificantes para el G-CSF humano, los cuales son producidos por un “*splicing*” alternativo, usando uno de estos dos sitios donadores y un sitio común aceptor del intrón 2. A partir de este mecanismo, se pueden generar dos ARN mensajeros, los cuales son traducidos en dos proteínas, una de 207 (variante 1) y otra de 204 (variante 2) residuos de aminoácidos (Figura 3) [Demetri, 1991].

El precursor de G-CSF es una glicoproteína de 207 residuos de aminoácidos, con un peso molecular calculado de 22.3 KDa, el cual se caracteriza por un péptido señal de 30 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, un sitio de O-glicosilación (Thr 166) que protege a la proteína de la agregación, pero no crucial para su actividad biológica; además, contiene 5 residuos de cisteína: una libre (C47) y cuatro formando enlaces

disulfuro (C69-C75 y C97-C107, respectivamente), que le confieren estabilidad a su estructura nativa (Figura 4) [Vanz, 2008; Demetri, 1991]. La forma biológicamente activa es el monómero.

La estructura cristalográfica del G-CSF muestra el plegamiento característico de la super-familia de los factores de crecimiento (un paquete de cuatro hélices). La proteína G-CSF posee cuatro hélices largas dispuestas de acuerdo al motivo estructural arriba-arriba-abajo-abajo (Figura 5).

Después de recibir la estimulación adecuada, varios tipos celulares tienen como característica la habilidad de producir el G-CSF. Las células del linaje de los monocitos/macrófagos son los más destacados productores del G-CSF [Demetri, 1991], pero este factor también puede ser producido por células de origen mesodérmico, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y células del endotelio vascular [Demetri, 1991; Kaushansky, 2007]. La producción del G-CSF puede ser estimulada *in vitro* en estas células por una amplia variedad de agentes, incluyendo LPS, TNF, IL-1, GM-CSF, IL-3, IL-4 e interferón- γ . En virtualmente todas las células analizadas hasta la fecha la producción del G-CSF es altamente regulada [Demetri, 1991].

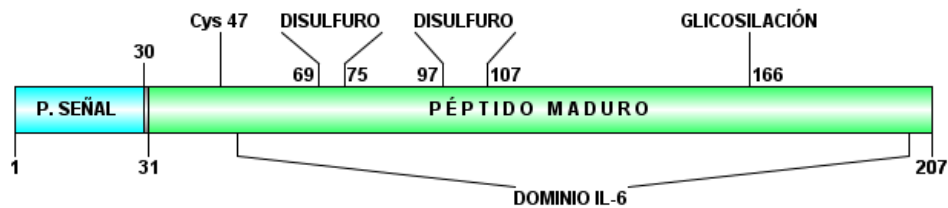


Figura 4. Representación esquemática de la secuencia polipeptídica precursora de G-CSF de humano.

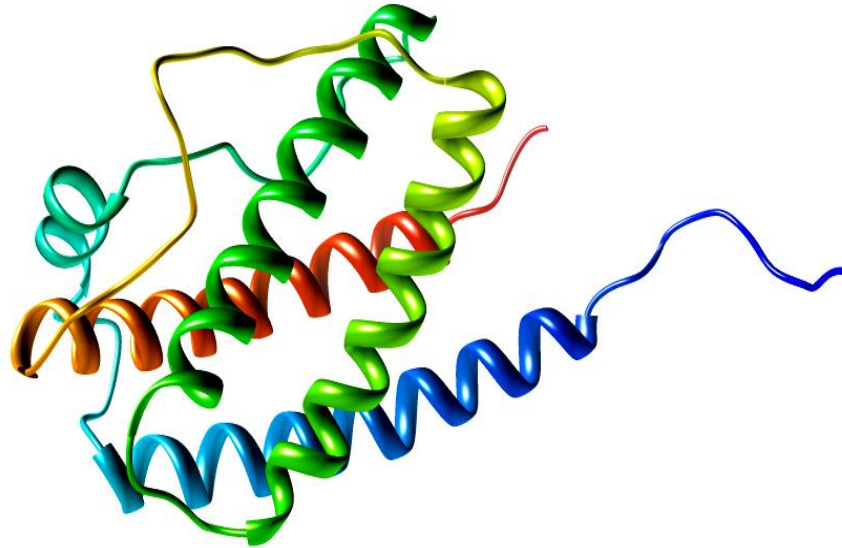


Figura 5. Representación gráfica de listones (amino [azul] a carboxilo [rojo]) de la estructura tridimensional de la proteína humana G-CSF.

El G-CSF, tal como otros CSF e IL, ejerce su actividad biológica al unirse a un receptor específico (G-CSFR), saturable, de alta afinidad (presente en células pertenecientes al linaje de los neutrófilos, en un rango de 700-1500 por célula), con una K_d aparente de aproximadamente 900 pM, a 37 °C [Demetri, 1991].

El receptor G-CSFR es expresado tanto por células mieloides progenitoras como por neutrófilos maduros, monocitos, macrófagos, células endoteliales y linfocitos T y B. Ratones carentes de G-CSF endógeno desarrollan una neutropenia crónica y una disminución de la movilización de neutrófilos, indicando que el G-CSF es indispensable para mantener el equilibrio cuantitativo normal de la producción de neutrófilos durante la granulopoyesis basal *in vivo* [Welter, 1996]. Cabe mencionar que el mecanismo de activación de las cascadas de transducción mediado por el receptor para G-CSF, no ha sido definido completamente [Demetri, 1991].

I.4. Importancia del G-CSF

El G-CSF es un factor de crecimiento que regula la producción de los neutrófilos. Este proceso fisiológico promueve la formación del sistema crítico de defensa de huésped [Demetri, 1991]. La clonación molecular y purificación del G-CSF se llevo a cabo entre 1984 y 1986, mismo periodo durante el cual inicio su desarrollo clínico. En febrero de 1991, el G-CSF obtuvo la aprobación para su uso clínico en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia en los Estados Unidos de Norteamérica. En los primeros 5 años, 1.2 millones de pacientes fueron tratados con *Filgrastim*® (la proteína HuG-CSF recombinante comercial) [Welter, 1996]. *Filgrastim*® fue inicialmente usado como un adyuvante en la quimioterapia para tratar la neutropenia, uno de los mayores efectos secundarios de la quimioterapia anti-cancerígena [Welter, 1996].

Muy frecuentemente, la neutropenia febril lleva a retrasos o reducciones en la dosis de quimioterapéuticos, lo cual puede ocasionar: (i) mayor tiempo de hospitalización, (ii) incremento del monitoreo, y (iii) aumento en los costos de diagnostico y tratamiento; conduciendo a una marcada reducción en la calidad de vida del paciente [David, 2002].

El uso de *Filgrastim*® ha logrado una reducir las admisiones hospitalarias por infecciones en pacientes con cáncer. Además de emplearse para tratar la neutropenia inducida por quimioterapia, *Filgrastim*® ha sido aprobado en más de 70 países para el tratamiento de mielosupresión después de un trasplante de medula ósea, neutropenia crónica severa, leucemia aguda, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico y movilización de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica para trasplante. El uso de *Filgrastim*® ha hecho posible administrar altas dosis de quimioterapéuticos, ha permitido a los pacientes

completar su régimen quimioterapéutico y ha beneficiado a pacientes inmunocomprometidos [Welter, 1996].

Probablemente, la función más importante que desempeña el G-CSF en los trasplantes, es su efecto en la movilización de células troncales a sangre periférica (*Peripheral Blood Stem Cells*; PBSC). Estas células han reemplazado tanto a la medula ósea como a las células madre hematopoyéticas, utilizadas en el trasplante autólogo. El uso de PBSC para el trasplante alogénico también está en investigación. Las células pueden recolectarse en un ambiente extra-hospitalario con un procedimiento que reduce o evita los riesgos y molestias de la recolección de medula ósea, incluyendo la necesidad de anestesia general. Además, se acepta más rápidamente que el injerto de todas las líneas celulares hematopoyéticas y presenta índices reducidos de rechazo al injerto o de recuperación plaquetaria tardía [Masters, 2007].

I.5. Indicaciones terapéuticas del G-CSF

Existen varios usos importantes para el G-CSF en pacientes oncológicos. Estos usos se pueden categorizar como profilaxis primaria (*p.e.* antes de la aparición de la neutropenia); profilaxis secundaria (*p.e.* en los ciclos de quimioterapia subsecuentes al desarrollo de neutropenia prolongada inducida por quimioterapia o neutropenia febril). Además, el G-CSF puede ser utilizado como soporte en pacientes sometidos a trasplante autólogo de medula ósea (específicamente, para acelerar la recuperación de neutrófilos y reducir la gravedad de las complicaciones por infecciones) y para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica [Dale, 2002].

El grupo de los leucocitos es el principal componente celular de la respuesta inflamatoria e inmunitaria, está formado por los neutrófilos, los linfocitos, las células citolíticas, los monocitos, los eosinófilos y los basófilos. Estas células desempeñan funciones específicas, como la destrucción de bacterias, y juegan un papel importante en las infecciones vírales. El número normal de estas células en sangre es de 4.3 a 10.8×10^9 por litro; de ese valor, los basófilos representan del 0 a 2%, las células en banda del 0 a 4%, los eosinófilos del 0 a 7%, los monocitos del 4 a 10%, los linfocitos de 16 a 45%, y los neutrófilos de 45 a 74% [Holland, 2006].

La producción de neutrófilos se lleva a cabo de manera normal en la médula ósea y requiere de factores estimulantes de colonias. El sistema hematopoyético no solo produce la cantidad necesaria de neutrófilos para llevar a cabo las funciones fisiológicas, sino también incluye una importante reserva celular, almacenada en la médula ósea, que puede ser movilizada por reacción a la inflamación o la infección. El aumento en el número de neutrófilos en la sangre se denomina *neutrofilia* y la disminución del número de neutrófilos en la sangre se conoce como *neutropenia*. Las causas de la neutropenia son: la disminución de la producción de neutrófilos, el incremento de la destrucción periférica de los mismos, o la acumulación periférica excesiva de células inmaduras [Holland, 2006].

I.6. Farmacología de G-CSF

I.6.1. Neutropenia inducida por quimioterapia en cáncer

La neutropenia inducida por quimioterapia es el resultado del efecto mielosupresor del tratamiento en cáncer, lo cual incrementa el riesgo de infecciones en pacientes que reciben quimioterapia sistémica, comprometiendo severamente la inmunidad innata contra

microorganismos patógenos e incrementando el riesgo de desarrollar serias infecciones microbianas y sepsis [Dale, 2002; Vanz, 2008].

La magnitud de la neutropenia depende de la intensidad del régimen quimioterapéutico y de la frecuencia de administración, en tanto que el riesgo de infección y el índice de mortalidad están directamente relacionados al grado y duración de la neutropenia desarrollada. Los pacientes con neutropenia están en riesgo de desarrollar fiebre (*p.e.* neutropenia febril), y presentan un riesgo mucho más elevado para desarrollar infecciones bacterianas y fúngicas fatales. El riesgo de contraer fiebre con una neutropenia severa después de una quimioterapia intensiva se incrementa en aproximadamente 10% por día [Dale, 2002].

I.6.2. Neutropenia febril

La neutropenia febril (NF) se define como la aparición de fiebre ($>38.2^{\circ}\text{C}$ por más de 1 h) asociada con un recuento absoluto de neutrófilos menor a 0.5×10^9 por litro; sin embargo, un recuento menor a 1.0×10^9 por litro puede ser considerado como criterio de inclusión. La terapia estándar para la NF incluye hospitalización, cultivos de sangre y otros fluidos biológicos, y terapia empírica con antibióticos de amplio espectro. Aún con estas intervenciones, la NF continúa siendo un riesgo significativo. Se ha documentado que del 33 al 50% de los pacientes con NF presentan infecciones bacterianas [Dale, 2002].

En un régimen quimioterapéutico común, la incidencia de NF es de 25 a 40% en pacientes sin tratamiento previo, y es dependiente de la intensidad de la dosis del régimen quimioterapéutico, del historial del paciente de terapia de radicación o tratamiento citotóxico [Dale, 2002]. La neutropenia e infección tienen relevancia clínica debido a

representan un problema grave, con altos índices de morbilidad y mortalidad, los cuales se pueden modificar con medidas preventivas y terapéuticas [González-Llaven, 2000].

En un estudio realizado por el Departamento de Oncología y Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, se observó que el 70% de los pacientes presentó NF; de los cuales, el 40% requirió tratamiento combinado con antibióticos y el otro 60% recibió monoterapia profiláctica con antibióticos/antimicóticos. Aproximadamente un cuarto de los pacientes que fallecen en este departamento presentan esta complicación. En 1999, la NF fue la primera causa de muerte, siendo 1.6 veces mayor que la producida por infarto de miocardio, La gravedad de esta complicación se refleja claramente en el índice de mortalidad [González-Llaven, 2000].

El G-CSF es más efectivo que el GM-CSF para el tratamiento de neutropenia; por tal motivo, G-CSF ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de neutropenia causada por quimioterapia para el tratamiento de cáncer [Jeong, 2001; Vanz, 2008]. El G-CSF reduce la duración y severidad de la neutropenia; la incidencia de NF e infecciones documentadas; la duración de hospitalizaciones relacionadas a la NF; el uso de antibióticos y; quizá, la necesidad de la reducción de la dosis de la quimioterapia o el retraso de la misma, lo cual puede resultar en un aumento de la supervivencia global [Dale, 2002].

Los lineamientos clínicos para el uso de G-CSF, después de la quimioterapia, recomiendan reservar la aplicación de G-CSF para pacientes que hayan presentado un episodio previo de NF después de cursar con tratamientos de quimioterapia citotóxica, pacientes tratados con dosis intensivas de quimioterapia, pacientes tratados con alto riesgo de desarrollo de neutropenia febril, y para quienes no sea probable la supervivencia a un episodio de NF [Masters, 2007].

I.6.3. Neutropenia en LMA y LLA

Las complicaciones infecciosas son el mayor problema del tratamiento de soporte de pacientes con leucemia aguda y en pacientes con síndrome mielodisplásico. El G-CSF es benéfico durante la terapia de inducción para leucemia mielocítica aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA), por la reducción en la duración de la neutropenia [Dale, 2002].

Los pacientes con LMA están en riesgo creciente de contraer infecciones bacterianas y fúngicas subsecuentes a quimioterapia intensiva, el G-CSF ha demostrado ser eficaz para reducir el tiempo de restablecimiento del conteo de neutrófilos (≥ 500 por μL) después de la administración de quimioterapia por 2 a 6 días, y reduce significativamente la duración de la hospitalización y el uso de antibióticos [Asano, 2003; Lilienfeld-Toal, 1988; Dale, 2002].

La utilidad y seguridad del G-CSF para el cuidado *post*-quimioterapia de pacientes con LMA ha sido explorada en un número considerable de estudios clínicos [Masters, 2007]. Dado que las células leucémicas surgen de las células madre cuya proliferación y diferenciación está regulada normalmente por FCH, incluyendo el G-CSF, existía la preocupación de que estos factores pudieran estimular el crecimiento de las células leucémicas y aumentar la frecuencia de recaídas [Masters, 2007]. Los resultados de estudios clínicos aleatorios sugieren que tanto G-CSF como GM-CSF son seguros después del tratamiento de inducción y consolidación de la leucemia mielocítica y linfoblástica [Masters, 2007].

El G-CSF acorta de manera significativa la duración de neutropenia en pacientes con LLA que reciben terapia de inducción y consolidación. Recientemente, utilizando regímenes profilácticos con antibióticos sistémicos y G-CSF, particularmente en pacientes

mayores de 60 años, se observó una reducción tanto en la duración de la neutropenia como en el tiempo necesario para la recuperación del título de neutrófilos [Dale, 2002].

Los FCH aceleran la recuperación del título de neutrófilos y disminuyen tanto los índices de infección como los días de hospitalización. Ambos, G-CSF y GM-CSF, tienen aprobación de la FDA para el tratamiento de pacientes con LMA [Masters, 2007]. Un estudio retrospectivo realizado a pacientes con LMA que han utilizado al G-CSF como tratamiento de primera línea por un periodo prolongado de tiempo (10 años) sugiere un pequeño pero significativo incremento en el índice de recaídas (3.2%) [Socie, 2007].

I.6.4. Otras aplicaciones

El G-CSF puede ser eficaz para tratar neutropenias, incluyendo neutropenia congénita, mielodisplasia y anemia aplásica. Además, puede ser usado para reforzar el sistema inmune en pacientes con VIH, neumonía e infecciones de pie diabético [Vanz, 2008]. Muchos pacientes con estas enfermedades responden de manera satisfactoria, observándose un incremento rápido, y a veces notorio, del recuento de neutrófilos. En algunos casos, esto disminuye la frecuencia de infecciones. El G-CSF es capaz de revertir parcial o totalmente la neutropenia de pacientes con SIDA que reciben zidovudina [Kaushansky, 2007]. Como el G-CSF no estimula la formación de eritrocitos o plaquetas, en ocasiones se utiliza con otros factores de crecimiento para el tratamiento de pancitopenia [Masters, 2007].

El G-CSF se utiliza de manera sistemática en pacientes a los que se les practica una recolección de células troncales de sangre periférica (PBSC) y reciben un trasplante de células madre, ya que estimula la liberación de células progenitoras CD34⁺ desde la médula ósea, lo cual reduce el número de recolecciones necesarias para el trasplante. Más aún, las

células movilizadas con G-CSF parecen tener más capacidad para establecerse con rapidez en el hospedero. Los pacientes con trasplante de PBSC requieren menos días de transfusiones de plaquetas, eritrocitos y una hospitalización más breve, comparados con aquellos que reciben trasplante autólogo de médula ósea [Welter, 1996; Kaushansky, 2007]. El G-CSF es la citocina más utilizada para la movilización de PBSC por su gran eficacia y poca toxicidad, comparada con el GM-CSF [Masters, 2007].

Los factores de crecimiento mieloide tienen una función importante en los trasplantes autólogos de células madre en pacientes sometidos a altas dosis de quimioterapia. Los regímenes de altas dosis producen mielosupresión extrema, la cual es contrarrestada por la re-infusión de las células madre hematopoyéticas del mismo paciente (colectadas antes de la quimioterapia) [Masters, 2007]. La administración temprana de G-CSF y GM-CSF, después del trasplante autólogo, reduce el tiempo de aceptación del injerto y de la recuperación de la neutropenia [Demetri, 1991]. Estos efectos se aprecian en pacientes tratados con linfoma o tumores sólidos [Masters, 2007]. Los G-CSF y GM-CSF también se utilizan como apoyo en pacientes que reciben trasplante alogénico de médula ósea, en el tratamiento de neoplasias hematológicas o en estado de insuficiencia de médula ósea, ya que rápidamente estimulan la proliferación celular y permiten la recuperación de la neutropenia, sin aumento en la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped [Masters, 2007].

I.6.5. Reacciones adversas

Aunque otros factores de crecimiento tienen efectos similares en las cuentas de neutrófilos, el G-CSF se utiliza con mayor frecuencia porque exhibe una mayor tolerancia [Masters, 2007]. Los efectos adversos observados en pacientes tratados con G-CSF son

relativamente suaves y sugieren que el factor es bien tolerado como terapia de largo plazo. Dolor óseo transitorio (probablemente debido a la expansión de la médula ósea), dolor de cabeza, erupciones cutáneas y trombocitopenia son generalmente fáciles de controlar y no requieren suspender la terapia con G-CSF [Dale, 1993]. Se han observado reacciones cutáneas locales después de la inyección subcutánea, y rara vez, una vasculitis necrosante cutánea. [Kaushansky, 2007]. La esplenomegalia puede ocurrir en algunos pacientes, generalmente no causa síntomas y no se requiere esplenectomía. Los estudios en animales sugieren que la ampliación esplénica es atribuible a la hematopoyesis extra-medular, debido a la movilización de los precursores hematopoyéticos de la médula ósea al bazo [Dale, 1993]. En pacientes que han recibido el G-CSF durante un periodo prolongado puede sobrevenir granulocitosis notoria, con un recuento mayor a 100 000 por μL ; no obstante, esto no se ha relacionado con un incremento en la morbilidad clínica o mortalidad y se resuelve una vez que se suspende el tratamiento [Kaushansky, 2007].

I.6.6. Farmacocinética y farmacodinamia

El G-CSF humano recombinante (rHuG-CSF; *Filgrastim*®) producido en un sistema de expresión bacteriana; es un polipéptido de cadena única que contiene 175 aminoácidos, con peso molecular de 18.8 KDa que posee una metionina N-terminal y, a diferencia de la proteína humana nativa, la proteína recombinante no está glicosilada [Bronchud, 1987; Kaushansky, 2007].

La proteína rHuG-CSF puede ser administrada tanto por vía intravenosa como subcutánea [Bronchud, 1987; Gutiérrez, 2005]. Las concentraciones séricas se mantienen por arriba de 10 ng/mL durante 8 a 16 horas después de la administración subcutánea. El volumen de distribución en la sangre es aprox. de 150 mg/kg. El aclaramiento sigue una

farmacocinética de primer orden, después de la administración. La vida media sérica de eliminación es de 3.5 horas y la velocidad de eliminación se aproxima a 0.6 mL/min/kg. Su efecto sobre el número de neutrófilos circulantes se inicia en 4 horas y es máximo en las primeras 24 de su administración [Rodríguez, 2005; Gabrilove, 1988; Gutiérrez, 2005; Kaushansky, 2007]. No se ha determinado la dosis máxima tolerada y no existen reportes de sobredosis; por otro lado, se desconoce su excreción en leche materna [Rodríguez, 2005]

I.7. Biotecnología y biofármacos

La biotecnología se puede definir como una actividad multidisciplinaria, conformada por diversas ciencias o disciplinas, entre las que destacan la biología molecular, la ingeniería bioquímica, la microbiología, la inmunología, la bioquímica, la genómica, la bioinformática, y la ingeniería de proteínas, entre otras [Bolívar Zapata, 2003]. En términos generales, la biotecnología comprende el uso de organismos vivos o sus compuestos para obtener productos de valor para el hombre.

La biotecnología ha estado presente por mucho tiempo, desde los procesos clásicos, como la producción de cerveza, vino, queso y yogurt, hasta lo que hoy conocemos como biotecnología moderna, la cual ha dado origen a nuevas disciplinas como la biorremediación, la medicina molecular, la nanobiotecnología, la agrobiotecnología y la biofarmacéutica [Bolívar Zapata, 2003].

La industria biofarmacéutica ha presentado un desarrollo impresionante desde que en 1982 fuera aprobado el primer agente terapéutico producido utilizando tecnología de ADN recombinante, lo que dio origen al primer biofármaco: la insulina recombinante. Actualmente, los biofármacos van mucho más allá de ser solo hormonas, ahora es posible

encontrar factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, vacunas y anticuerpos monoclonales, los cuales han venido a revolucionar los tratamientos antes conocidos, aumentando la calidad y la esperanza de vida de los pacientes [Walsh, 2000; Walsh, 2005].

Los biofármacos han dado origen a un nuevo mercado multimillonario, con más de 60 millones de consumidores [Walsh, 2000]. Las industrias biofarmacéuticas alrededor del mundo han reportado ganancias superiores a los 30 000 millones de euros anuales, con varios productos que generan utilidades multimillonarias anuales [Walsh, 2005]. En el periodo comprendido entre 2000 y el 2004, se aprobaron 65 nuevos biofármacos y se estima que actualmente existen más de 500 productos en ensayos clínicos [Walsh, 2005].

Aunque todavía es incierto, el futuro de la biotecnología, en la generación de agentes terapéuticos, se muestra muy prometedor en algunos campos, tales como las proteínas recombinantes, las proteínas modificadas, la generación de cambios post-traduccionales, nuevas alternativas en los sistemas de producción, algunas alternativas en los sistemas de liberación y hasta terapias basada en células madre [Walsh, 2005].

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la expresión y purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos humano, utilizando un sistema de expresión recombinante en el citoplasma de *Escherichia coli* y purificación mediante métodos cromatográficos.

II.2. Objetivos específicos

1. Diseñar un par de oligonucleótidos específicos para la amplificación y subclonación de un fragmento del gen humano codificante para la proteína G-CSF, considerando una serie de mutaciones silenciosas en la secuencia codificante para el extremo N-terminal.
2. Obtener un fragmento del gen humano G-CSF mediante una reacción de PCR usando un plásmido comercial como molde y los oligonucleótidos gen-específicos como iniciadores de la reacción.
3. Obtener un plásmido recombinante de expresión citosólica de la proteína HuG-CSF mediante técnicas de biología molecular.
4. Realizar estudios, a pequeña escala, de expresión de la proteína HuG-CSF mediante la obtención de fracciones bacterianas totales y solubles (en condiciones nativas) y análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida.
5. Obtener la proteína HuG-CSF recombinante mediante métodos cromatográficos y análisis de pureza y estabilidad.

6. Realizar una prueba preliminar de actividad biológica de la proteína HuG-CSF recombinante mediante un ensayo de estimulación de la diferenciación y proliferación de células madre de médula ósea murina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Reactivos biológicos y químicos

III.1.1. Células y medios de cultivo

La cepa *Escherichia coli* XL1- Blue MRF' (*Stratagene*) fue utilizada rutinariamente en las técnicas de biología molecular y para la expresión proteica. Las bacterias competentes para la transformación por choque térmico fueron preparadas de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio [Sambrook, 1989]. Las bacterias fueron cultivadas en medios complejos líquidos o sólidos (1.7% de agar). Los medios *Luria-Bertani* (LB) [1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 0.5% de cloruro de sodio] y 2X-YT [1% de triptona, 1% de extracto de levadura y 0.5% de cloruro de sodio] se prepararon de acuerdo a las instrucciones estándar de laboratorio [Sambrook, 1989].

Las células de médula ósea murina fueron obtenidas de un ratón adulto sacrificado por dislocación cerebro-espinal. Brevemente, la médula ósea de ambos fémures fue extraída con medio RPMI 1640 + 2.5 mM de L-glutamina (*HyClone*). Posteriormente, las células fueron lavadas mediante resuspensión en 3 mL del mismo medio y centrifugadas a 2,000 rpm durante 5 min. La pastilla celular fue resuspendida en 2 mL de medio y las células fueron cuantificadas utilizando un hematocitómetro; además, la viabilidad celular fue verificada mediante tinción con azul de metileno al 0.02%. Finalmente, la suspensión celular fue centrifugada y resuspendida en suficiente medio para obtener una concentración final de 2,000 células/ μ L.

Para el análisis de estimulación de la proliferación celular, las células eucariotas de médula ósea murina fueron cultivadas en medio RPMI 1640 + 2.5 mM de L-glutamina suplementado con 5% de suero bovino fetal (*HyClone*) y una mezcla de antibiótico/antimicótico (*HyClone*) [100 UI/mL de penicilina G, 100 UI/mL de estreptomycin, 0.25 µg/mL de anfotericina B], en un ambiente de temperatura, humedad y contenido de CO₂ controlado.

III.1.2. Plásmidos

La secuencia codificante para el factor estimulante de colonias de granulocitos humano variante 2 (HuGCSFv2) fue amplificada utilizando como molde el plásmido comercial pCMV6-XL5:HuGCSF (*TrueClone*TM *OriGene*).

Para la expresión heteróloga de la proteína G-CSF humana recombinante, se utilizó

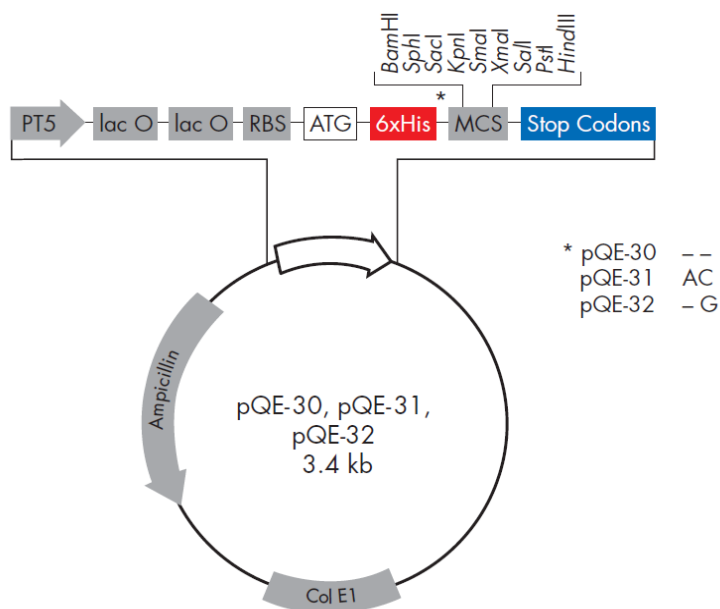


Figura 6. Representación esquemática de la familia de plásmidos comerciales pQE-3X (Qiagen).

el vector pQE30 (*Qiagen*) (Figura 6), el cual fue seleccionado por sus altos índices de expresión proteica en el citosol bacteriano, bajo el control del promotor T5/*LacO*, e incorpora un hexámero de histidinas en el extremo amino terminal, permitiendo una rápida purificación proteica; además, como marcador de selección posee el gen que codifica para la β -lactamasa (*bla*), la cual confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos a las transformantes estables.

III.1.3. Enzimas y otros reactivos biológicos

Para el ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa (*Novagen*). Utilizando la enzima fosfatasa alcalina recombinante *bCIP* (*New England Biolabs*) se llevo a cabo la defosforilación del vector. La enzima T_4 ADN ligasa (*New England Biolabs*) fue utilizada para la inserción del producto de PCR en el vector. Las digestiones nucleotídicas se realizaron mediante el uso de endonucleasas de restricción *Ava* I, *Bam* HI, *Bgl* II, *Bst* XI, *Eco* RI y *Hind* III del proveedor *New England BioLabs*. La mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y los marcadores de peso molecular λ - *Hind* III, 100pb *DNA Ladder*, *ColorPlus Prestained Protein Marker Broad Range* y *Prestained Protein Marker Broad Range* se adquirieron de *New England BioLabs*.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen codificante para la proteína G-CSF humana.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Endonucleasa
GCSF30F2	TATAAAAAAGATCTACTCC ATTAGGT CCTGCCAGC	<i>Bgl</i> II
GCSF30R1	AAAAAGCTTCAGGGCTGGGCAAGGTGGCG	<i>Hind</i> III

Los sitios de reconocimiento por las endonucleasas se indican subrayados. Los residuos nucleotídicos que fueron sustituidos para introducir mutaciones silenciosas en el extremo N-terminal de la proteína se muestran en negritas.

III.1.4. Oligonucleótidos sintéticos

El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando el software disponible en línea *OligoPerfect™ Designer* (www.invitrogen.com). Las propiedades fisicoquímicas y la estructuración secundaria fueron calculadas usando el servidor *Oligo Calc* (www.basic.northwestern.edu). Los oligonucleótidos fueron adquiridos a través del servicio de síntesis química de la compañía *Operon Technologies*.

III.1.5. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados grado BM (biología molecular) como Tris (tris-[hidroxietil]-aminometano), SDS (dodecilsulfato de sodio), EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), DTT y glicerol fueron adquiridos de la compañía *IBI*. De la compañía *Sigma de México* fueron adquiridos los siguientes reactivos (grado BM): ampicilina, cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glutatión oxidado, *Tween® 20*, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, bromuro de etidio, azul de xylencianol, azul de bromofenol, azul de metileno, DMSO (dimetilsulfóxido), bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida) y acetato de sodio.

Las soluciones concentradas de ácido clorhídrico, ácido acético, alcohol etílico, metílico e isopropílico fueron adquiridas de la compañía *Productos Químicos de Monterrey*. Los reactivos azul de *Coomassie R-250* y TEMED (N,N,N',N'-tetra-metilen-etilendiamina) fueron adquiridos de la compañía *BioRad*. Los reactivos β-mercaptoetanol (*EM Science*), glicina (*ICN*), imidazol (*Fisher Biotech*), acrilamida (*EMD*), isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (*Invitrogen*) y las sales fosfato dibásico de potasio (*Mallinckrodt AR*)

y persulfato de amonio (*J.T. Baker Inc.*) fueron adquiridos de diferentes proveedores. De la compañía *Promega* se obtuvo el estuche comercial *CellTiter® 96 AQueous One*.

III.1.6. Sistemas de purificación

Para la purificación de ADN plasmídico y productos de reacción de PCR se utilizaron los estuches comerciales *QIAprep® Spin Miniprep Kit* y *QIAprep® PCR Purification Kit*, respectivamente. Para la extracción de ADN a partir de gel de agarosa se utilizó el estuche comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit*. Los diferentes estuches comerciales fueron adquiridos de la compañía *Qiagen*.

El estuche comercial *CellLytic® B Plus (Sigma)* se utilizó para la realización de la lisis celular en condiciones nativas, siguiendo las sugerencias del proveedor. La purificación en condiciones nativas de la proteína recombinante se llevó a cabo siguiendo los protocolos del manual *The QIAexpressionist® (Qiagen)*, los cuales se basan en una cromatografía de afinidad a níquel, la cual retiene aquellas biomoléculas que posean un hexámero de histidinas como etiqueta. Para cambiar el amortiguador y estabilizar la proteína recombinante purificada se realizó una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna comercial *PD-10 (Amershan Biosciences)*.

III.2. Equipo

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador *Multigene Gradient Labnet (International Inc.)*. Para la digitalización y visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o geles de poliacrilamida teñidos con azul de *Coomassie* se utilizó el fotodocumentador *Gel Doc® 2000 (BioRad)*. Las mediciones de las

absorbancias para la cuantificación de proteína se realizaron en el espectrofotómetro *SmartSpec™ Plus (BioRad)* y para la lectura de absorbancias en placa de ELISA se utilizó el lector de microplaca Modelo 680 (*BioRad*). Las bacterias fueron cultivadas en incubadoras *New Brunswick* de ambiente controlado y las células eucarióticas fueron cultivadas en una incubadora de ambiente y CO₂ controlado (*VWR*).

III.3. Clonación

III.3.1. Amplificación del gen humano codificante para G-CSF

Como estrategia de amplificación se utilizó una reacción de PCR mutagénico, a través de la cual se incorporaron adaptadores para sitios de restricción en ambos extremos de la secuencia (Tabla 1); además, se añadieron mutaciones puntuales en el extremo N-terminal, las cuales redujeron el porcentaje de G y C sin alterar la secuencia polipeptídica codificada (Tabla 2); de esta forma se evitó la estructuración del ARN promoviendo una traducción de manera eficiente [Devlin, 1988]. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos.

La mezcla de reacción para la amplificación del gen humano codificante para G-CSF contenía 2 ng del plásmido pCMV6-XL5:HuGCSF, 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa, 4 μM de cada uno de los oligonucleótido GCSF30F2 y GCSF30R1, 50 μM de dNTPs y 2% de DMSO en un volumen de reacción final de 50 μL, conteniendo la solución

Tabla 2. Sustituciones en la secuencia del gen humano codificante para G-CSF.

Secuencia							
Residuo	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser
Nativa	ACC	CCC	CTG	GGC	CCT	GCC	AGC
GCSF30F2	ACT	CCA	TTA	GGT	CCT	GCC	AGC

amortiguadora 10 mM de Tris-HCl, 15 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, pH 8.3. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial [5 min a 94 °C]; diez ciclos de amplificación inicial [20 seg a 94 °C, 20 seg a 50 °C, 30 seg a 72 °C]; treinta ciclos de amplificación final [20 seg a 94 °C, 20 seg a 60 °C, 30 seg a 72 °C]; y un ciclo de extensión final [7 min a 72 °C].

El producto de PCR HuGCSF fue analizado y visualizado mediante electroforesis de gel de agarosa al 1 %, conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Para eliminar los remanentes de la reacción, el producto de PCR fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep® PCR Purification Kit*.

III.3.2. Construcción del plásmido pQE30:HuGCSFF2R1

Digestión del producto de PCR HuGCSF. El producto de PCR HuGCSF purificado fue digerido de manera secuencial con las endonucleasas de restricción *Hind* III y *Bgl* II. Para la digestión con *Hind* III se utilizaron 1500 ng del producto de PCR purificado y 10 U de *Hind* III en un volumen de reacción final de 20 µL, conteniendo la solución amortiguadora 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ditioneitol, pH 7.9. La reacción se llevo a cabo durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 20 U de *Bgl* II y se llevo a un volumen final de 40 µL, conteniendo la solución amortiguadora 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. La reacción se llevo a cabo durante 1 h a 37 °C. El producto de digestión fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep® PCR Purification Kit*. El producto purificado fue analizado y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio.

Digestión del plásmido pQE30. El vector pQE30 fue digerido de manera simultánea con las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Se colocaron 500 ng del vector, 10 U de *Bam* HI y 10 U de *Hind* III, en un volumen de reacción final de 20 μ L, conteniendo una solución amortiguadora 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. La reacción se llevó a cabo durante 1h a 37 °C.. Adicionalmente, el plásmido fue defosforilado, utilizando 10 U de la enzima fosfatasa alcalina (*bcIP*), durante 30 min a 37 °C. El producto de digestión fue separado y visualizado en gel de agarosa al 1%, conteniendo 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio. El fragmento de interés fue cortado del gel y purificado utilizando el estuche comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit*. Posteriormente, la presencia del fragmento esperado fue verificada en un gel de agarosa al 1%, conteniendo 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio.

Ligación. El fragmento del gen humano codificante para G-CSF fue ligado en el vector pQE30, utilizando la enzima T₄ ADN ligasa. La reacción se preparó mezclando 120 ng del inserto digerido (PPCR HuGCSF / *Bgl* II - *Hind* III), 2 ng del vector digerido defosforilado (pQE30 / *Bam* HI - *Hind* III) y 5 U de la enzima T₄ ADN ligasa en un volumen final de 10 μ L, conteniendo una solución amortiguadora 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP. La reacción se llevo a cabo durante toda la noche a 16°C.

III.3.3. Transformación bacteriana

El producto de ligación fue transfectado en células de *E. coli* XL1-Blue MRF' competentes mediante choque térmico [Sambrook, *et al.*, 1989]. Brevemente, 1 μ L de la ligación fue mezclado con 100 μ L de células competentes en un microtubo y se mantuvo en hielo durante 30 min; posteriormente, la mezcla fue expuesta a un choque térmico (42°C

durante 5 min e inmediatamente 5 min en hielo). Finalmente, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio líquido 2X YT, e incubadas durante 30 min a 37 °C y 300 rpm. Para la selección de transformantes, alícuotas de 100 y 900 µL de la suspensión celular fueron dispersados en cajas petri con medio LB sólido suplementado con 150 µg/mL de ampicilina e incubadas durante toda la noche a 37 °C.

III.3.4. Selección y análisis de transformantes estables

Las transformantes capaces de crecer en la presencia de antibiótico se consideraron estables. Para la selección de clonas positivas; es decir, plásmidos que contengan el gen humano codificante para el G-CSF, se realizó un análisis endonucleolítico basado en la variabilidad de la longitud de los fragmentos de restricción.

Extracción de ADN plasmídico y análisis endonucleolítico inicial. A partir de unidades formadoras de colonias seleccionadas aleatoriamente, se prepararon cultivos jóvenes y se realizó una extracción del ADN plasmídico, utilizando el estuche comercial *QIAprep® Spin Miniprep Kit*. El escrutinio inicial, para identificar clonas candidatas a un análisis endonucleolítico amplio, fue realizado mediante un análisis del patrón de restricción obtenido utilizando las endonucleasas *Eco* RI y *Hind* III. Las reacciones de digestión fueron preparadas usando 250 ng de los plásmidos purificados, 20 U de *Eco* RI y 5 U de *Hind* III en un volumen de digestión final de 10 µL, cuyo contenido final fue 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂ y 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 h a 37°C.

Análisis de amplio espectro endonucleolítico. Las clonas positivas al análisis endonucleolítico inicial fueron sometidas a un análisis de amplio espectro endonucleolítico: (i) *Ava* I, (ii) *Hind* III / *Ava* I, (iii) *Hind* III / *Bam* HI, y (iv) *Hind* III / *Bst* XI.

(i) Digestión sencilla con *Ava* I. En microtubos, se mezclaron 200 ng del plásmido y 5 U de *Ava* I en un volumen final de 10 μ L, en una solución amortiguadora cuyo contenido final fue 50 mM de acetato de potasio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de ditioneitol, pH 7.9. Las reacciones fueron incubadas durante 2 h a 37 °C.

(ii) Digestión secuencial con *Hind* III / *Ava* I. En microtubos, se mezclaron 200 ng del plásmido y 5 U de *Hind* III en un volumen final de 10 μ L, en una solución amortiguadora cuya composición final fue 10 mM de 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 5 U de *Ava* I y llevó a un volumen final de 15 μ L, en una solución amortiguadora cuya composición final fue 50 mM de acetato de potasio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones se incubaron, adicionalmente, durante 1 h a 37 °C.

(iii) Digestión secuencial con *Hind* III / *Bam* HI. En microtubos, se mezclaron 200 ng del plásmido y 5 U de *Hind* III en un volumen final de 10 μ L, en una solución amortiguadora cuya composición fue 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 10 U de *Bam* HI y se llevó a un volumen final de 15 μ L, conteniendo una solución amortiguadora 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones se incubaron, adicionalmente, durante 1 h a 37 °C.

(iv) Digestión secuencial *Hind* III / *Bst* XI. En microtubos, se mezclaron 200 ng del plásmido y 5 U de *Hind* III en un volumen final de 10 μ L, en una solución amortiguadora cuya composición final fue 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM

DTT, pH 7.9. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 5 U de *Bst* XI y se llevó a un volumen final de 15 µL, en una solución amortiguadora cuya composición final fue 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7.9. Las reacciones se incubaron, adicionalmente, durante 1 h a 37 °C.

Los productos de las digestiones, simples y secuenciales, fueron analizados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Aquellas clonas que presentaron el patrón de restricción esperado se consideraron positivas.

III.4. Expresión de G-CSF humano recombinante

III.4.1. Mini-escala

Mini-ensayo de inducción y análisis de expresión proteica. 4 mL de medio LB suplementado con 150 µg/mL de ampicilina fueron inoculados con 80 µL de un cultivo joven de *E. coli* XL1-Blue MRF' que porta el plásmido recombinante pQE30:HuGCSFF2R1. Los cultivos fueron incubados durante 2 h a 37°C, 300 rpm. Posteriormente, el cultivo fue dividido en dos fracciones, de 2 mL cada una. Una fracción (marcada como "CI") fue suplementada con 2 µL de una solución 1 M de IPTG (concentración final de 1 mM de IPTG); la otra fracción fue utilizada como control (marcadas como "SI"). Ambas fracciones fueron incubadas durante 4 h a 37°C, 300 rpm. A partir de 1 mL de cultivo, se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación durante 2 min a 10,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue lisado en 400 µL del amortiguador de carga desnaturizante y reductor [5 % de glicerol, 1.25 % de SDS,

2.5% de 2-mercaptoetanol, 0.001% de azul de bromofenol; 25 mM Tris-HCl, pH 6.8] durante 10 minutos a $T > 90$ °C. Los lisados bacterianos totales fueron separados mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% [Laemmli, 1970], teñido con azul brillante de *Coomassie*.

Western blot e inmunodetección. Los lisados bacterianos totales fueron obtenidos y separados mediante SDS-PAGE como se describió en el mini-ensayo de inducción y análisis de expresión proteica. Después de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema *CriterionTM Blotter* (Biorad) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente; el gel fue equilibrado en el amortiguador de transferencia [25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 10 % (v/v) de metanol, a 4°C]; posteriormente, se preparó el sistema de transferencia tipo emparedado; y, finalmente, se procedió a la transferencia durante 30 min a 100 volts. Después de la transferencia, la membrana fue tratada durante la noche con solución de bloqueo [5% de leche *SveltyTM Nestle*®; 150 mM de NaCl; 0.05% de Tween® 20; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0]. Al día siguiente, la membrana fue lavada con solución TBST [150 mM de NaCl; 0.05% de Tween® 20; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0] durante 30 min (3X, 10 min). El reconocimiento primario fue realizado utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidinas (1:10,000) durante 1 hora. La membrana fue lavada con solución TBST durante 30 min (3X, 10 min). El reconocimiento secundario fue realizado utilizando un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (1:5,000) durante 1 h. La membrana fue lavada con solución TBST durante 30 min (3X, 10 min). Finalmente, el reconocimiento indirecto fue revelado utilizando una solución que contiene los sustratos solubles para fosfatasa alcalina, BCIP y

NTB (*Zymed*). La reacción se detuvo agregando 50 mL de una solución de EDTA 5 mM, pH 8.0.

Análisis de expresión en condiciones nativas. 3 mL de medio LB suplementado con 150 µg/mL de ampicilina fueron inoculados con 60 µL de un cultivo joven de *E. coli* XL1-Blue MRF' que porta el plásmido recombinante pQE30:HuGCSFF2R1. Los cultivos fueron incubados durante 2 h a 37°C, 300 rpm. Posteriormente, el cultivo fue suplementado con 3 µL de 1 M de IPTG (concentración final de 1 mM de IPTG). Enseguida, el cultivo fue incubado durante 4 h a 37°C, 300 rpm.

A partir de 2 alícuotas de 1 mL de cultivo, se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación durante 2 min a 10,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue congelado -12°C durante toda la noche. Al día siguiente, un paquete celular bacteriano fue etiquetado como “LT (lisado total)” y fue mantenido a temperatura ambiente hasta la desnaturalización. El otro paquete celular bacteriano fue resuspendido en 200 µL del reactivo *CellLytic® B* (*Sigma*), sometido a agitación en vórtex durante 1 min y mantenido en agitación durante 10 min.

Posteriormente, la fracción insoluble fue separada mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio y etiquetado como “FS (fracción soluble)” y el precipitado fue etiquetado como “FI, (fracción insoluble)”. A cada muestra (LT, FS y FI) se le agregaron 400 µL del amortiguador de carga desnaturizante y reductor. Finalmente, las proteínas fueron desnaturalizadas por calor durante 10 min a $T > 90$ °C. Las fracciones proteicas fueron separadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % [Laemmli, 1970] y visualizados mediante tinción con azul brillante *Coomassie*.

III.4.2. Midi-escala

Cultivo y lisis celular en condiciones nativas. 100 mL de medio LB suplementado con 150 µg/mL de ampicilina fue inoculado con 2 mL de un cultivo joven de *E. coli* XL1-Blue MRF' que porta el plásmido recombinante pQE30:HuGCSFF2R1. El cultivo fue incubado durante 2 h a 37°C y 300 rpm. Posteriormente, se le agregaron 10 µL de una solución 1 M de IPTG (concentración final de 0.1 mM de IPTG) y se continuó la incubación durante 4 h a 37°C y 300 rpm. La pastilla celular fue colectada, en un tubo cónico de 50 mL, mediante centrifugación durante 10 min a 4500 rpm. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue congelada hasta su uso. Para la purificación del la proteína HuGCSF recombinante, se prepararon 5 pastillas celulares, a partir de 100 mL.

La lisis fue realizada mediante resuspensión del paquete celular en 5 mL del reactivo *CellLytic® B* (Sigma), suplementada con 100 µL de lisozima [10 mg/mL], 2 µL de benzonasa [250 U/µL] y 50 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas. La suspensión celular fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min con agitación. Posteriormente, la solución fue centrifugada durante 10 min a 14,000 rpm. Finalmente, el precipitado fue descartado y el sobrenadante (conteniendo las proteínas solubles) fue colectado y almacenado hasta la etapa de purificación.

III.5. Purificación de G-CSF humano recombinante

III.5.1. Cromatografía de afinidad a metales y plegamiento en columna

En una columna de cromatografía, fue colocada una cama uniforme de 0.5 mL de la resina Ni-NTA-Agarosa. La resina fue lavada con 1 mL de la solución de lavado [20 mM de imidazol, 0.4 mM GSSG, 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0], para eliminar

remanentes del conservador. Se recolecto una alícuota de 25 μ L de la fracción del lisado total bacteriano soluble (LTBS), posteriormente el LTBS fue cargado en la columna, enseguida, una alícuota de la fracción no pegada (FNP) fue colectada (25 μ L). Consecutivamente, la columna fue lavada con 10 mL de la solución de lavado. Una alícuota de la parte final del lavado (W) fue colectada (25 μ L). Finalmente, la proteína recombinante fue eluída y colectada en fracciones de 0.5 mL (E1-E10) con solución de elución [250 mM de imidazol, 0.4 mM GSSG, 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH₂PO₄, pH 8.0]. Las alícuotas colectadas (LTBS, FNP y W) y una muestra de las eluciones E1-E6 fueron separadas mediante SDS-PAGE al 15 % [Laemmli, 1970]. Las proteínas fueron visualizadas mediante tinción con azul brillante *Coomassie*.

III.5.2. Purificación por exclusión molecular

Se montó un sistema de cromatografía de filtración en gel utilizando una columna PD10 (*Amersham Biosciences*). Primeramente, la columna fue lavada con 25 mL de una solución 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. Posteriormente, la muestra (previamente diluida hasta un volumen final de 2.5 mL, usando el mismo diluyente) fue cargada en la columna. El efluente inicial fue descartado; enseguida, la fracción proteica fue eluída con 3.5 mL de solución 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) y el efluente fue recolectado en un tubo cónico de 15 mL estéril.

III.5.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína fue cuantificada mediante un micro-ensayo de Bradford. Brevemente, se realizó una curva patrón utilizando diferentes concentraciones finales de BSA [0, 4, 8, 12, 16 y 20 μ g/mL]; simultáneamente, se preparó una dilución

1:100 de la muestra. En una microplaca de titulación, se colocaron 50 μL de las muestras estándar y desconocida; enseguida, se mezclaron con 50 μL del reactivo de Bradford y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. La lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm fue registrada en un lector de microplaca.

III.5.4. Cuantificación de tioles libres

En un microtubo, se mezclaron 500 μL de una solución 1 mM de 4-ditio-dipiridina (4-DTDP) y 200 μL de la proteína, la solución fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente; posteriormente, la lectura de absorbancia a 324 nm fue registrada en un espectrofotómetro. La cantidad de tioles libres fue calculada utilizando la relación molar 4-tiopiridona/rHuG-CSF.

III.6. Bioensayo de estimulación de la proliferación celular

En una micro-placa de cultivo celular, se colocaron 1×10^5 células/pozo (viabilidad >90%) de médula ósea murina en medio RPMI 1640 + 2.5 mM L-glutamina, suplementado con 5% suero bovino fetal y una mezcla antibiótico-antimicótico en ausencia o presencia de *Filgrastim*® [0.1 y 0.01 $\mu\text{L}/\text{mL}$] o rHuG-SCF [10, 1.0, 0.1 y 0.01 $\mu\text{L}/\text{mL}$]. Los cultivos fueron incubados en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C durante 72 h. Posteriormente, la proliferación celular fue cuantificada utilizando el reactivo *CellTyter 96® AQueous One* (Promega), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1. La variante 2 del gen humano codificante para G-CSF

El gen humano codificante por la proteína madura G-CSF (o CSF3) fue amplificado utilizando como molde el plásmido comercial pCMV6-XL5:HuGCSF, el cual contiene la variante 2 (Figura 7).

```
atg gct gga cct gcc acc cag agc ccc atg aag ctg atg gcc ctg cag ctg ctg ctg tgg cac agt gca ctc tgg < 75
M A G P A T Q S P M K L M A L Q L L L W H S A L W
tac cga cct gga cgg tgg gtc tcg ggg tac ttc gac tac cgg gac gtc gac gac gac acc gtg tca cgt gag acc

tataaaaaagatct act cca tta ggt cct gcc agc
Bgl II ==* ==* ==* ==* ==* ==* ==*
aca gtg cag gaa gcc acc ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag tgc tta gag caa < 150
T V Q E A T P L G P A S S L P Q S F L L K C L E Q
tgt cac gtc ctt cgg tgg ggg gac ccg gga cgg tcg agg gac ggg gtc tcg aag gac gag ttc acg aat ctc gtt

gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag gag aag ctg tgt gcc acc tac aag ctg tgc cac ccc gag < 225
V R K I Q G D G A A L Q E K L C A T Y K L C H P E
cac tcc ttc tag gtc ccg cta ccg cgt cgc gag gtc ctc ttc gac aca cgg tgg atg ttc gac acg gtg ggg ctc

gag ctg gtg ctg ctc gga cac tct ctg ggc atc ccc tgg gct ccc ctg agc agc tgc ccc agc cag gcc ctg cag < 300
E L V L L G H S L G I P W A P L S S C P S Q A L Q
ctc gac cac gac gag cct gtg aga gac ccg tag ggg acc cga ggg gac tcg tcg acg ggg tcg gtc cgg gac gtc

ctg gca ggc tgc ttg agc caa ctc cat agc ggc ctt ttc ctc tac cag ggg ctc ctg cag gcc ctg gaa ggg atc < 375
L A G C L S Q L H S G L F L Y Q G L L Q A L E G I
gac cgt ccg acg aac tcg gtt gag gta tcg ccg gaa aag gag atg gtc ccc gag gac gtc cgg gac ctt ccc tag

tcc ccc gag ttg ggt ccc acc ttg gac aca ctg cag ctg gac gtc gcc gac ttt gcc acc acc atc tgg cag cag < 450
S P E L L G P T L D T L Q L D V A D F A T T I W Q Q
agg ggg ctc aac cca ggg tgg aac ctg tgt gac gtc gac ctg cag cgg ctg aaa cgg tgg tgg tag acc gtc gtc

atg gaa gaa ctg gga atg gcc cct gcc ctg cag ccc acc cag ggt gcc atg ccg gcc ttc gcc tct gct ttc cag < 525
M E E L G M A P A L Q P T Q G A M P A F A S A F Q
tac ctt ctt gac cct tac cgg gga cgg gac gtc ggg tgg gtc cca cgg tac ggc cgg aag cgg aga cga aag gtc

cgc cgg gca gga ggg gtc ctg gtt gcc tcc cat ctg cag agc ttc ctg gag gtg tcg tac cgc gtt cta cgc cac < 600
R R A G G V L V A S H L Q S F L E V S Y R V L R H
gcg gcc cgt cct ccc cag gac caa cgg agg gta gac gtc tcg aag gac ctc cac agc atg gcg caa gat gcg gtg
===
gcg gtg

ctt gcc cag ccc tga < 615
L A Q P *
gaa cgg gtc ggg act
===
gaa cgg gtc ggg act tcgaaaaa
Hind III
```

Figura 7. Secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, de la variante 2 del gen humano G-CSF contenido en el plásmido comercial pCMV6-XL5:HuGCSF.

Las regiones de hibridación de los oligonucleótidos se muestran en cajas coloridas: verde, sentido; rojo, anti-sentido. Además, se muestra la secuencia de los oligonucleótidos, indicando los sitios de restricción y las mutaciones (*).

IV.2. Amplificación del gen humano codificante para G-CSF

Utilizando oligonucleótidos gen-específicos, la secuencia codificante para la proteína madura G-CSF fue amplificada mediante PCR. Los oligonucleótidos sintéticos incorporaron mutaciones silenciosas en la secuencia codificante para el extremo N-terminal, esta estrategia (utilizada con el propósito de disminuir el porcentaje G+C y la estructuración secundaria, y por ende, favorecer la traducción) fue exitosamente aplicada. Como se observa en la Figura 8, un producto de 522 pb fue amplificado mediante PCR, el cual corresponde al tamaño esperado.

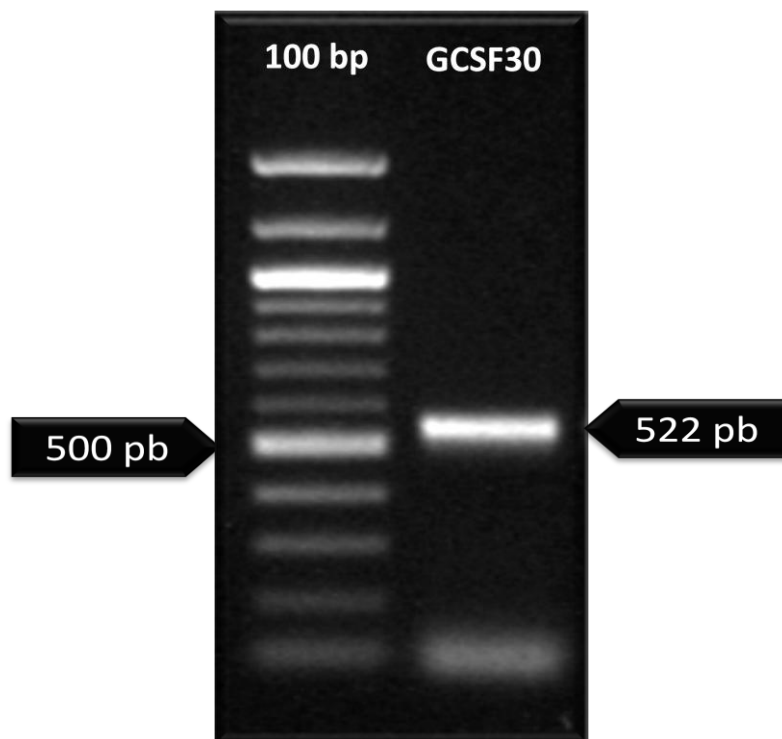


Figura 8. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) del fragmento nucleotídico codificante para el péptido maduro G-CSF amplificado por PCR (denominado GCSF30).

IV.3. Clonación del gen humano codificante para G-CSF

El producto de PCR fue digerido con las endonucleasas *Bgl* II y *Hind* III. Posteriormente, fue ligado al vector pQE30 (previamente digerido con *Bam* HI y *Hind* III). El producto de la ligación (plásmido recombinante pQE30:HuGCSFF2) fue transfectado mediante choque térmico en *E. coli* XL1-Blue MRF' y las transformantes estables fueron seleccionadas mediante resistencia a ampicilina. Aleatoriamente, se cultivaron 7 UFC y aisló el plásmido que portaban; el cual, enseguida, fue caracterizado mediante un análisis de restricción con las endonucleasas *Eco* RI y *Hind* III. Como se observa en la Figura 9, sólo las clonas 1, 3, 4, 5 y 7 muestran el patrón de migración esperado (3461 y 587 pb), las cuales fueron consideradas como candidatas para un amplio análisis restricción. Cabe

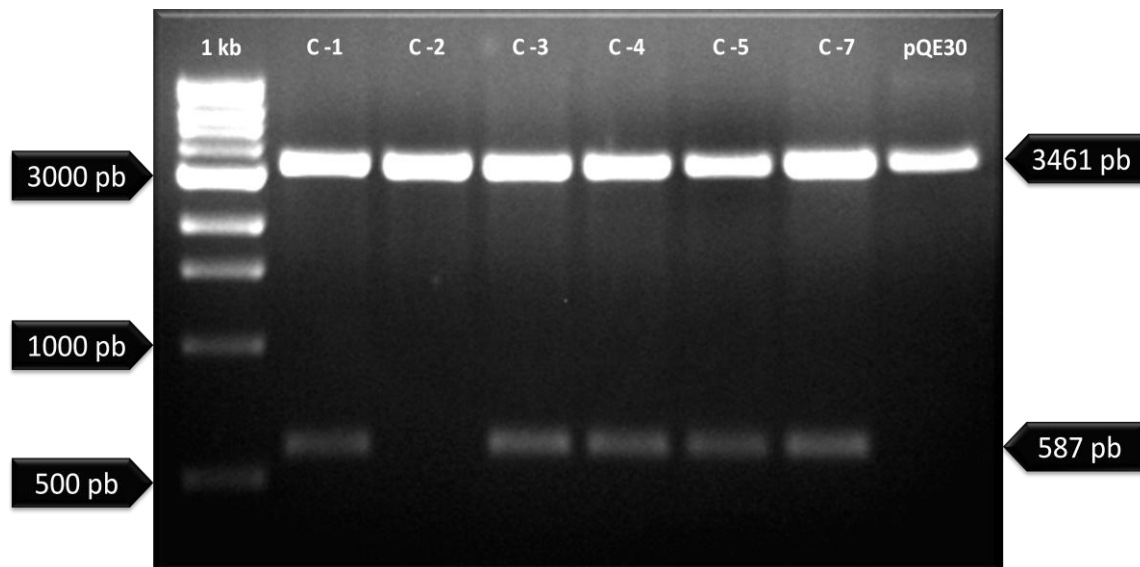


Figura 9. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) de los productos de la digestión de las clonas pQE30-HuGCSFF2 con las endonucleasas *Eco* RI y *Hind* III.

mencionar que la UFC C-6 no creció y la clona 2 fue descartada por no presentar el fragmento esperado (producto de auto-ligación).

IV.4. Caracterización del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2

Con el fin de realizar un análisis más amplio del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2, la clona C1 fue sometida a un grupo de reacciones de digestión: *Ava* I, *Hind* III – *Ava* I, *Hind* III – *Bam* HI, y *Hind* III – *Bst* XI. En la Tabla 3 se muestran los fragmentos esperados; específicamente, el fragmento de digestión con las endonucleasas *Hind* III – *Bam* HI de 3949 pb indicó la pérdida del sitio *Bam* HI del plásmido, ya que ambos extremos compatibles *Bam* HI – *Bgl* II se pierden.

Tabla 3. Fragmentos de restricción esperados de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.

Endonucleasa	Fragmentos (pb)
<i>Ava</i> I	3511, 279 y 159
<i>Ava</i> I – <i>Hind</i> III	3275, 279, 236 y 159
<i>Hind</i> III – <i>Bam</i> HI	3949
<i>Bst</i> XI – <i>Hind</i> III	3503 y 446

Mediante un análisis comparativo, se observó (Figura 10) que los fragmentos de restricción corresponden con el patrón de migración esperado. Ante estos resultados, se decidió utilizar las clona C1, C3, C5 y C7, portadoras del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2, para realizar un análisis de expresión de la proteína HuG-CSF recombinante.

IV.5. Análisis de expresión de la proteína HuG-CSF recombinante

El vector de expresión citosólica pQE30-HuGCSFF2 contiene el gen HuGCSF bajo control del promotor T5/*Lac*O, el cual permite la inducción de la expresión proteica mediante la adición de IPTG, un análogo de galactosa no metabolizable.

Después de 4 horas de inducción, los lisados bacterianos totales de las clonas C1, C3, C5 y C7, que portan el plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2, fueron obtenidos a partir de la pastilla celular de 1 mL de cultivo, mediante lisis por calor en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Posteriormente, las proteínas fueron separadas con base a su talla molecular mediante SDS-PAGE al 15%. Como se puede observar en la Figura 11, el lisado total bacteriano de las clonas C1, C3, C5 y C7 inducidas con IPTG muestran una banda cuyo patrón de migración es muy semejante al peso molecular calculado de aproximadamente 20 KDa, concordante con la talla molecular esperada para la proteína recombinante HuG-CSF (20.07 KDa). Contrariamente, no se observa expresión en aquellos cultivos no inducidos, evidenciado la acción del inductor sobre la expresión proteica.

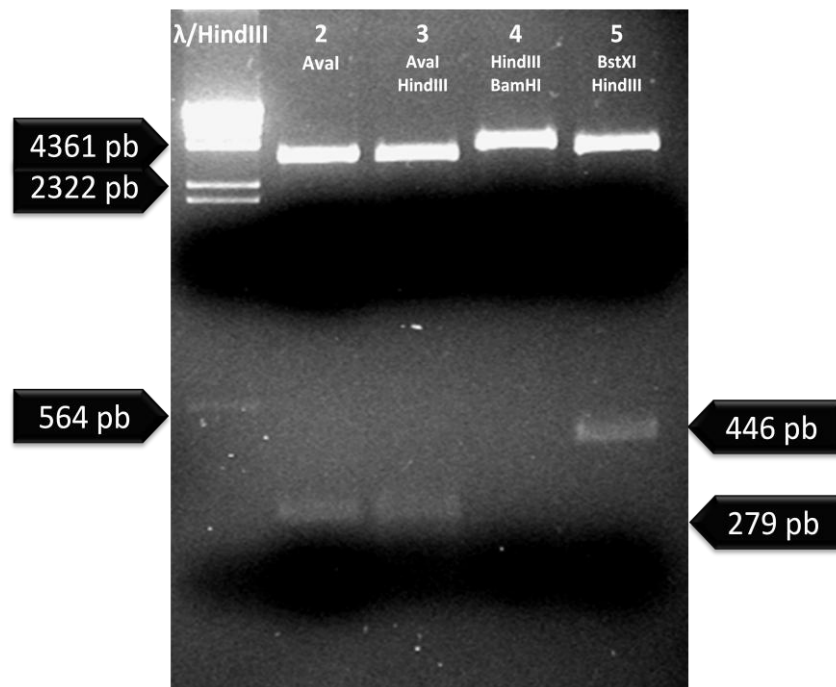


Figura 10. Separación electroforética (gel de agarosa al 1%) de los fragmentos de restricción obtenidos de la caracterización molecular del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.

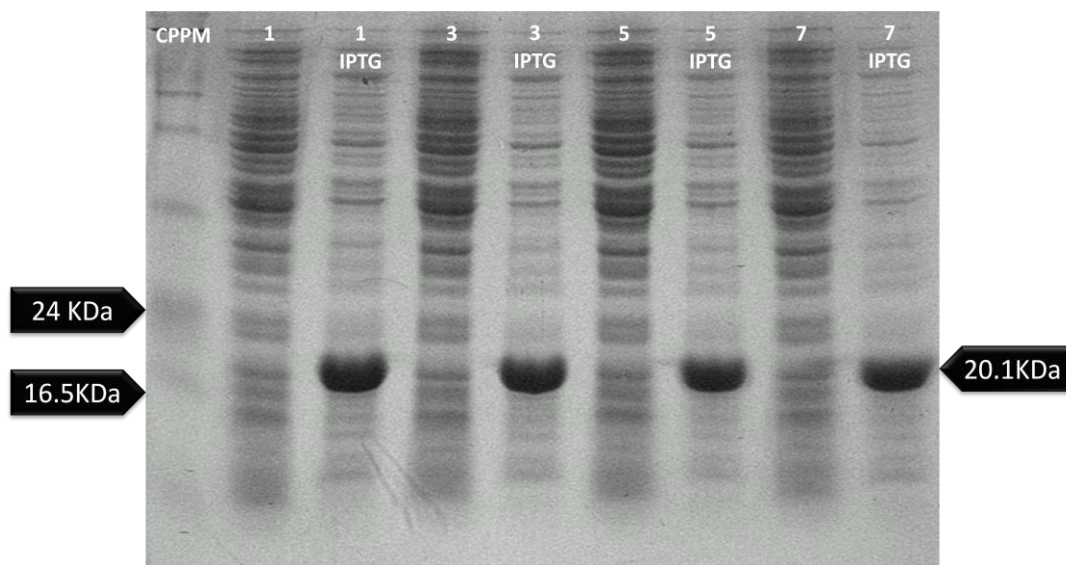


Figura 11. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 15%) de los lisados bacterianos totales de las clonas C1, C3, C5 y C7 que portan el plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2.

En dos condiciones de expresión proteica: ausencia y presencia de inductor (1 mM de IPTG).

Adicionalmente, como la proteína recombinante HuG-CSF se expresa etiquetada con un hexámero de histidinas en el extremo N-terminal, se realizó un análisis tipo *western blot*, utilizando como moléculas de reconocimiento un anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli-histidinas (primario) y un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG(ratón) acoplado a fosfatasa alcalina producido.

Previo al ensayo de reconocimiento, las fracciones proteicas de los lisados bacterianos totales fueron separados mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% y, posteriormente, fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Como se observa en la Figura 12, es evidente el reconocimiento de una proteína de peso molecular calculado de 20 KDa, concordante con el peso molecular esperado para la proteína recombinante HuG-CSF (20.1 KDa).

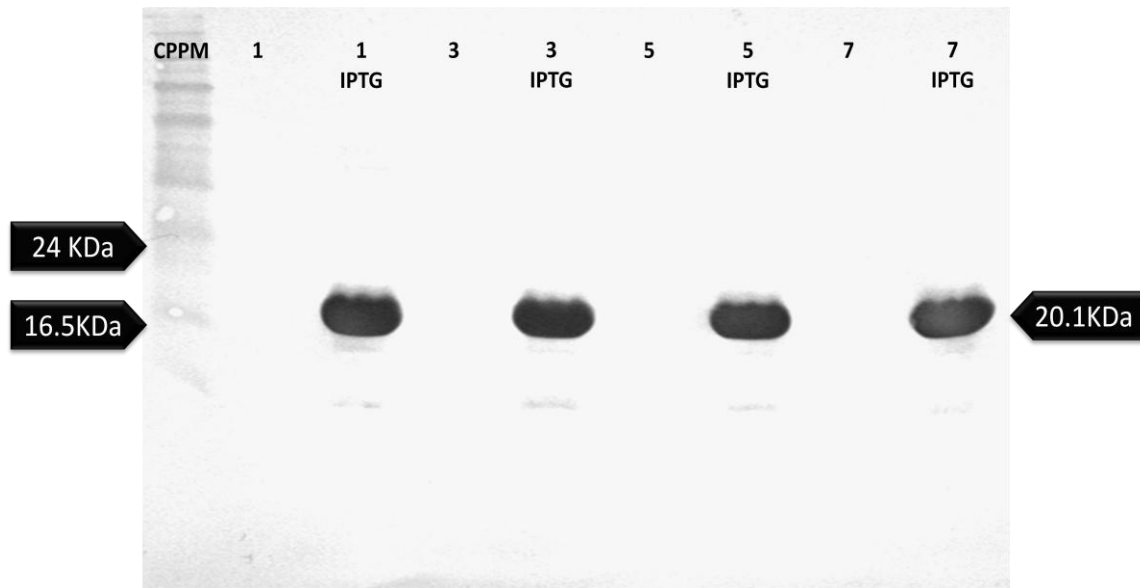


Figura 12. Reconocimiento e inmunodetección de la proteína recombinante HuG-CSF mediante western blot, usando anticuerpos anti-polihistidinas.

Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12%) de los lisados bacterianos totales de las clonas C1, C3, C5 y C7 que portan el plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2, en dos condiciones de expresión proteica: ausencia y presencia de inductor (1 mM de IPTG).

IV.6. Lisis celular y fraccionamiento en condiciones nativas

Con el propósito de identificar la solubilidad de la proteína HuG-CSF recombinante, soluble o insoluble, se realizó una lisis bacteriana en condiciones nativas utilizando el reactivo comercial *CellLytic® B*. Los lisados bacterianos, obtenidos siguiendo las especificaciones del proveedor, muestran que la proteína HuG-CSF se expresa de manera soluble en condiciones nativas (resultado no mostrado). Ante este resultado, se procedió a obtener pastillas celulares provenientes de cultivos bacterianos de 100 mL y proceder a la obtención de fracciones solubles a partir de lisados bacterianos totales.

IV.7. Purificación de la proteína HuG-CSF recombinante

Inicialmente, se realizaron 4 lotes de 100 mL de cultivo de bacterias de *E. coli* portadoras del plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2 (clona C1) y se realizó una inducción durante 4 h (0.1 mM de IPTG). La pastilla celular fue colectada mediante centrifugación y congelada (-12 °C) durante la noche.

Posteriormente, el lisado bacteriano total fue preparado usando el reactivo *CellLytic® B Plus* siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Enseguida, la fracción soluble fue separada mediante centrifugación y sometida a una cromatografía de afinidad a níquel, con el fin de purificar la proteína recombinante.

Las fracciones colectadas durante la purificación muestran el proceso de separación

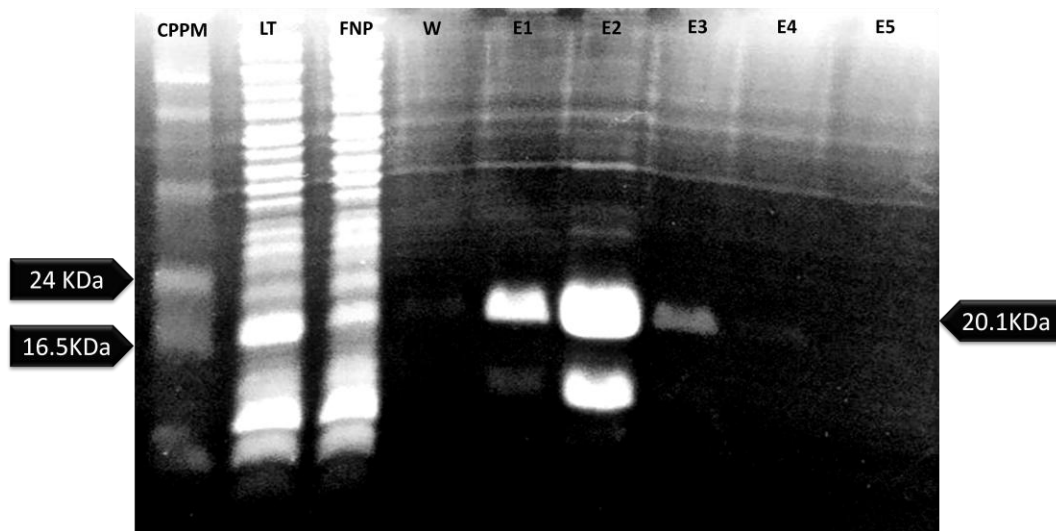


Figura 13. Separación electroforética (gel SDS-PAGE al 12%) de las fracciones proteicas colectadas durante la cromatografía de afinidad a níquel para purificar la proteína HuG-CSF recombinante.

de la proteína HuG-CSF recombinante (Figura 13). El gel muestra un patrón de purificación típico; sin embargo, en el carril “E2” correspondiente a la fracción “elución 2” se observan dos bandas: una alta concentración, de aprox. 20 KDa, que coincide con la talla molecular esperada para la proteína HuG-CSF recombinante; y, una segunda banda, de aprox. 10 KDa, que se co-purifica con la proteína de interés. Es importante mencionar que ésta se observó solo en un lote, por lo que fue descartada.

Aún cuando la lisis celular es en presencia de inhibidores de proteasas, es probable que sea un producto de degradación y, que incluso, conserve el extremo N-terminal. Por otro lado, el análisis de proteínas muestra que la sobre-expresión de la proteína HuG-CSF recombinante alcanza los niveles de 9% del total de proteína (Tabla 4). Además, mediante el procedimiento de purificación subsecuente mediante cromatografía de exclusión molecular fue posible obtener

valores de pureza mayores a 95%. Finalmente, el nivel de producción de la proteína recombinante es de 10 mg/L.

Tabla 4. Análisis de expresión y purificación de la proteína HuG-CSF recombinante mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y exclusión molecular (PD-10).

Muestra (100 mL)	Proteína Total (mg)	IMAC (mg)	PD-10 (mg)
Media (DE)	10.08 (0.4)	0.92 (0.3)	1.07

DE: Desviación estándar.

IV.8. Estado de oxidación de la proteína HuG-CSF recombinante

La proteína HuG-CSF posee 5 cisteínas, de las cuales cuatro se encuentran formando puentes disulfuro intermoleculares, importantes para adquirir su estructura terciara y actividad biológica. Como criterio predictivo de la actividad biológica, se titularon los tioles libres presentes en la proteína HuG-CSF recombinante, usando el reactivo 4-ditiodipiridina. Los resultados mostraron que la proteína HuG-CSF recombinante

posee 3 tioles libres; este resultado puede tener dos significados: (1) solo 1 par de cisteínas se encuentran formando un enlace disulfuro y tres tioles libres; o (2) existe una mezcla de proteínas conteniendo 0, 1 o 2 enlaces disulfuro y lo que se observa es el promedio de éstas.

De cualquier manera, este valor sugiere que la oxidación no es completa en todas las moléculas de la proteína Hu-G-CSF recombinante y se requiere una etapa de oxidación y formación de enlaces disulfuro. A pesar de este valor, se procedió a determinar la actividad biológica de la proteína recombinante.

IV.9. Actividad biológica de la proteína HuG-CSF recombinante

La actividad biológica de la proteína HuG-CSF recombinante fue determinada mediante la evaluación de la estimulación de la diferenciación y proliferación de células madre de medula ósea murina. Utilizando un micro-ensayo, diferentes concentraciones de la proteína recombinante fueron utilizadas y comparadas contra *Filgrastim*®.

Después de tres días de estimulación de la proliferación celular, el número de células viables fue determinado de manera indirecta utilizando una sal de tretazolio [MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]. El MTS, estabilizado por el reactivo etosulfato de fenazina, es biorreducido, a un producto de formazan colorido soluble, por las células viables. Se piensa que la reacción está acoplada a la producción de NADPH o NADH por las deshidrogenasas de las células metabólicamente activas.

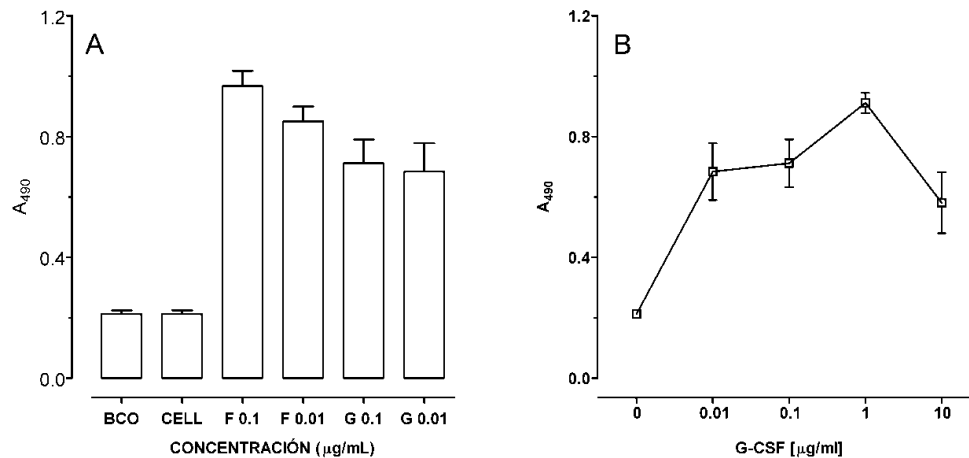


Figura 14. Estimulación de la proliferación y diferenciación celular inducidas por la proteína HuG-CSF recombinante.

(A) Efecto de las concentraciones de 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$ de Filgrastim® (F) y HuG-CSF recombinante sobre la proliferación y diferenciación de las células madre de médula ósea murina.

(B) Efecto de diferentes concentraciones de la proteína HuG-CSF recombinante sobre la proliferación y diferenciación de las células madre de médula ósea murina.

Como se observa en la Figura 14A, las concentraciones de la proteína HuG-CSF recombinante estimulan la proliferación celular en un rango de 66 – 73%, en comparación con las mismas concentraciones de la proteína comercial (*Filgrastim*®). Además, en otro experimento se observó que la estimulación de la proliferación celular exhibe una dependencia a la dosis de la proteína HuG-CSF recombinante (Figura 14B). Por otro lado, el análisis microscópico demuestra que esta proteína es capaz de promover la formación de colonias (Figura 15). Independientemente de reconocer la necesidad de afinar detalles en el proceso de purificación y ampliar los bioensayos, estos resultados demuestran que la proteína HuG-CSF recombinante producida en este proyecto presenta las características

bioquímicas y fisiológicas necesarias para ser considerada como un biofármaco con potencial terapéutico.

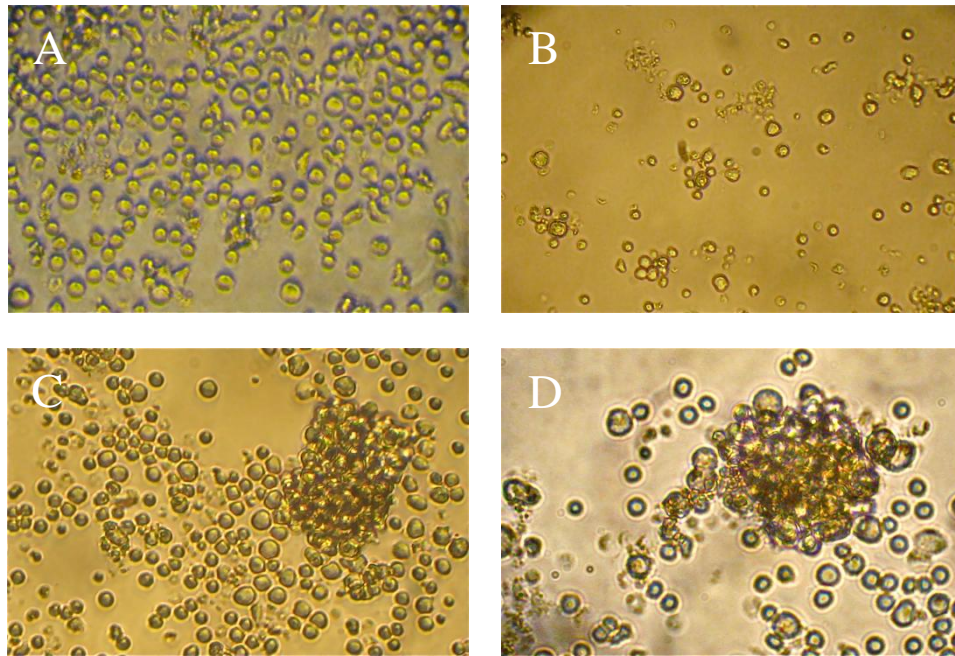


Figura 15. Análisis microscópico de la diferenciación, proliferación y formación de colonias de células de médula ósea murina estimuladas por la proteína HuG-CSF recombinante.

Células de médula ósea murina en medio carente de factor estimulante de crecimiento a las (A) 0 h; y (B) 72 h de incubación. Células de médula ósea murina a las 72 h de incubación en medio suplementado con (C) 0.1 µg/mL de *Filgrastim*®; y (D) 0.1 µg/mL de HuG-CSF recombinante.

V. CONCLUSIONES

Utilizando protocolos estándar de biología molecular, la secuencia nucleotídica codificante para el polipéptido maduro de la proteína HuG-CSF amplificada y exitosamente utilizada para construir el plásmido recombinante pQE30-HuGCSFF2, el cual expresa a niveles de 10 mg/L la proteína HuG-CSF recombinante en el citosol de *E. coli*.

Gracias a la presencia de un hexámero de histidinas en el extremo N-terminal, la proteína HuG-CSF recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel en niveles mayores a 80%; además, mediante cromatografía de exclusión molecular, la proteína recombinante fue estabilizada y purificada en niveles mayores a 90%.

Por otro lado, mediante ensayo de estimulación de la diferenciación y proliferación de células de médula ósea murina fue posible demostrar que la proteína HuG-CSF recombinante producida en este proyecto es activa.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Asano Y, Numata A, Takase K, Shimoda K, Gondo H, *et al.* G-CSF does not stimulate leukemic stem cells *in vivo*. *J Clin Exp Hematopathol.* 2003; 43(2): 49-52.
- Bolivar Zapata FG (Coordinador general). Recomendaciones para el desarrollo y consolidación de la biotecnología en México. CONACyT/AMC. 1ra. Edición 2003.
- Bronchud MH, Potter MR, Morgenstern G, Blasco MJ, Scarffe JH, *et al.* *In vitro* and *in vivo* analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients. *Br J Cancer.* 1988; 58(1): 64-9.
- Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, *et al.* Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung. *Cancer Br J Cancer.* 1987; 56: 809-13.
- Callahan KS. Cap. 67: Sangre, líquidos, electrolitos y drogas hematológicas. En Reminton. Farmacia. Gennaro AR (Editor). Editorial Panamericana, 20a. Edición. 2003.
- Dale DC. Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients. *Drugs.* 2002; 62(1): 1-15.
- Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, *et al.* A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (*Filgrastim*®) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood.* 1993; 81(10): 2496-502.
- Demetri G, Griffin J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 1991; 78(11): 2791-808.
- Devlin PE, Drummond RJ, Toy P, Mark DF, Wattb KWK, Devlin JJ. Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows efficient processing by methionine aminopeptidase in *Escherichia coli*. *Gene.* 1988; 65: 13-22.
- Florensa L, Woessner S. Cap. 1: Hematopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. En Hematología clínica. Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL (Editores). Editorial Elsevier, 5ta. Edición. 2006.
- Flórez J. Cap. 46: Fármacos antianémicos y factores de crecimiento hematopoyético. En Farmacología Humana. Florez J, Armijo JA, Mediavilla A (Editores). Editorial Elsevier, 5ta. Edición. 2008.

- Gabrilove JL, Jakubowski A, Fain K, Grous J, Scher H, *et al.* Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest.* 1988; 82(4): 1454-61.
- García-Roldán JL. Cap. 39: Factores hematopoyéticos. En *Farmacología fundamental.* Velasco A, San Roman L, Serrano J, Matinez R, Cadavid I (Editores). Editorial McGraw Hill. 2003.
- González-Llaven J, Gaytán-Martínez J, Sánchez-Cortés E. Neutropenia e infección. *Gac Méd Méx.* 2000; 136(2): 67-70.
- Gutiérrez M. Cap. 5: Antineoplásicos. En *Farmacología clínica.* Rodríguez C, Rodríguez A, Servin D (Editores). Editorial McGraw Hill, 1ra. Edición. 2005.
- Holland SM, Gallin JI. Cap. 55: Trastornos de los granulocitos y monocitos. En *Harrison - principios de medicina interna.* Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Editores). Editorial McGraw Hill, 16va. Edición. 2006.
- Jeong KJ, Lee SY. Secretory production of human granulocyte colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif.* 2001; 23: 311-8.
- Kaushansky K, Kipps TJ. Cap. 53: Fármacos Hematopoyéticos. En *Goodman & Gilman - las bases farmacológicas de la terapéutica.* Bruton LL, Lazo JS, Parker KL (Editores). Editorial McGraw Hill, 11va. Edición. 2007.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(259): 680-5
- Lilienfeld-Toal MV, Hahn-Ast C, Kirchner H, Flieger D, Dölken G, Glasmacher A. A randomized comparison of immediate versus delayed application of G-CSF in induction therapy for patients with acute myeloid leukemia unfit for intensive chemotherapy. *Haematologica.* 2007; 92: 1719-20.
- Barrows LR. Cap. 86: Drogas antineoplásicas e inmunoactivas. En *Remington – Farmacia.* Gennaro AR. Editorial Panamericana, 20va. Edición. 2003.
- Masters SB. Cap. 33: Antianémicos; factores de crecimiento hematopoyéticos. En *Farmacología básica y clínica.* Katzung BG (Editor). Editorial Manual Moderno, 10va. Edición. 2007.
- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Chavez-Gonzalez A. Hematopoyesis. *Cancerología* 2007; 2: 95-107.
- Ramírez M, Cornejo AM. Fisiología de la hematopoyesis. *Pediatría Integral.* 2004; 8(5): 377-82.
- Rodríguez R, *et al.* Estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos. En *Vademecum - académico de medicamentos.* Editorial McGraw Hill, 4ta Edición. 2005.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Silva L, Beyer N. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *British J Haematology*. 2003; 123: 702–11.
- Socie G, Jean-Yves M, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, *et al*. Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the european group for blood and marrow transplantation. *Blood*. 109(7): 4589-90.
- Soo-Hyung K, Kyu-Heum N, Jang-Hyeon P, Choong-II P, Se-Yong L, Young-Ik L. High level expression and simple purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *E. coli*. *Biotechnology Letters*. 1995; 17(7): 687-92.
- Torres-Hernández JD. Uso clínico de los factores de crecimiento hematopoyético. *IATREIA*. 1994; 7(4): 173-80.
- Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*. 2008; 7: 13.
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks, *Nat Biotechnology*. 2000; 18(8): 831-3.
- Walsh G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions, *Trends Biotechnol*. 2005;23(11) :553-8.
- Welte K, Gabrilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. *Filgrastim*® (r-metHuG-CSF): The First 10 Years. *Blood*. 1996;88(6): 1907-29.