



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO e ENSAIO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Mestranda: Raquel Cristina Schwanke
Orientadores: Luiz Augusto Basso
Diógenes Santiago Santos

Raquel Cristina Schwanke

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO e ENSAIO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências na
Pontifícia Universidade Católica do Rio do Sul como requisito
para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e
Molecular.

Orientadores: Luiz Augusto Basso
Diógenes Santiago Santos

Porto alegre
Fevereiro, 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores orientadores Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos e Prof. Dr. Luiz Augusto Basso pela fundamental oportunidade, confiança depositada, aprendizado e apoio durante todo trabalho.

Aos doutores Jocelei Maria Chies, Gaby Renard, Cláudia Paiva Nunes, Eraldo Batista Júnior e Maria Martha Campos pela ajuda essencial no desenvolvimento deste trabalho através de compreensão, apoio, conhecimento e amizade.

A todos os colegas do laboratório que de alguma maneira me ajudaram a executar este trabalho, seja no trabalho de bancada em uma ou outra troca de diálise, pela companhia nas madrugadas de trabalho e até mesmo nos momentos de descontração, hora fundamental de aliviar a tensão. O apoio de vocês foi indispensável e nunca esquecerei isso. Amo cada um de vocês de um jeitinho especial.

Aos meus pais, Rudi e Ingrid pelo apoio, incentivo e o colo nos momentos difíceis durante todos esses anos e principalmente pelo exemplo pessoal a ser seguido; e à minha irmã Rúbia, pela troca de idéias, palavras de otimismo e paciência nos momentos de maior nervosismo. Vocês são a minha base forte! Amo vocês!

Às minhas amigas, que eu amo tanto e que estiveram do meu lado em todos os momentos, dos mais difíceis, cedendo o ombro amigo para um desabafo, aos mais felizes, como na comemoração de um resultado positivo.

Por fim, agradeço ao meu namorado Rafael, pela compreensão, carinho, apoio e muita paciência durante todos esses anos. Mesmo longe, você esteve sempre perto, pois conseguia me acalantar com palavras de carinho e conforto! Te amo!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIACÕES	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF)	1
1.1.1 Características Biológicas e Estruturais do GM-CSF	1
1.1.2 Receptores do GM-CSF	6
1.1.3 Rota de Sinalização: Receptores de Citocina Ativam JAK-STAT	6
1.1.4 Regulação da Expressão do Gene	8
1.1.5 Expressão da Proteína em Corpos de Inclusão e Suas Vantagens	8
1.2 Biofármacos	9
1.2.1 Aplicação Terapêutica e Importância Clínica	10
1.3 Produção Industrial da Proteína GM-CSF	11
1.3.1 Custos	11
1.4 Estudos Recentes do GM-CSF	11
1.5 Histórico das Ações Desenvolvidas pelo Governo na Área da Assistência Farmacêutica	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Gerais e Justificativa	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	17
Abstract	19
Introduction	20
Material and Methods	22
Results	26

Discussion	28
Acknowledgments	33
References	34
Figure Legends	40
Figures	42
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
ANEXO I	49
ANEXO II	51
ANEXO III	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIÇÕES

Å – Ângstrom

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

ARE – Elementos ricos em aminoácidos A e U

BPA – Boletim de Procedimento Ambulatorial

CEME – Central de Medicamentos

CFU - Unidades Formadoras de Colônias

CSFs - Fatores Estimuladores de Colônias

CYS – Cisteína

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

EMEA – Agência Européia de Medicamentos

E. coli – *Escherichia coli*

FDA - Departamento de controle de drogas e alimentos dos EUA

FPLC - Cromatografia Líquida de Rápido Desempenho

GAPs – Guia de Autorização de Pagamento

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GMP – Boas Práticas de Produção

hGM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos de humanos

IBs – Corpos de Inclusão (do inglês, *inclusion bodies*)

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IPTG - isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

JAKs – cinases do tipo “*Janus*”

Kb – quilo bases

kDa – quilo dalton

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

MAPK – Quinases do tipo “*MAP*”

MS – Ministério da Saúde

MPAS – Ministério da Previdência e da Assistência Social

NFKB – Fator Nuclear Kapa B

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PDB – Banco de Dados de Proteínas

rhGM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos recombinante humano

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro

SAS – Secretaria de Assistência à Saúde

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

STATs – Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

3D – Tridimensional

RESUMO

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma citocina pertencente a um grupo de glicoproteínas que regula a proliferação e a diferenciação de células hematopoiéticas, mais especificamente macrófagos e granulócitos. O GM-CSF humano é uma proteína de 14,5 kDa constituída de 127 aminoácidos e possui 52% de similaridade com a proteína de rato. A proteína humana possui 4 resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto, porém apenas as cisteínas 54 e 96 são requeridas para a atividade biológica da mesma. Este biofármaco tem sido usado em pacientes neutropênicos que receberam altas doses de quimioterapia ou transplantados. Além disso, GM-CSF é usado para restabelecer disfunções hematopoiéticas, estimular a hiper-produção de células efectoras pré-induzidas (“primed”) funcionalmente e promover a defesa do hospedeiro contra doenças infecciosas e malignas. O uso dos mesmos está relacionado à redução no número de infecções associadas à quimioterapia, no uso de antibióticos e no tempo total de internação do paciente bem como no número de mortes. A patente internacional do biofármaco Molgramostima (nome genérico) expirou em 2006 e, além disso, tornou-se um interessante produto para indústrias farmacêuticas, inclusive para aquelas estabelecidas no Brasil. Molgramostima é vendida no Brasil como um biofármaco importado, o qual, desta forma, torna-se muito custoso para o governo brasileiro. Contudo, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia para a posterior produção industrial de uma molgramostima a nível nacional. Neste trabalho, o gene para o hGM-CSF foi construído por PCR, clonado no vetor de expressão pET30a(+) e expresso na cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* na sua forma insolúvel. Para o isolamento e solubilização dos corpos de inclusão um eficiente protocolo foi desenvolvido utilizando múltiplos passos de lavagem e um método de purificação usando somente duas colunas cromatográficas de troca catiônica e aniônica, respectivamente. O teste de atividade biológica *in vitro* demonstrou que o rhGM-CSF produzido tem potencial equivalente ao padrão internacional utilizado. A proteína foi obtida por meio de um processo simples e econômico, sendo de extrema importância em procedimento industrial e para saúde da população.

ABSTRACT

The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that belongs to a group of glycoprotein that regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic cells, more specifically granulocytes and macrophages. The human GM-CSF is a 14.4 kDa protein consisting of 127 amino acid polypeptide chain and shares 52% of similarities with murine protein. The human protein has 4 cysteine residues that forms two disulphide bonds; only the Cysteine 54 and 96 are required for the biologic activity of it. This biopharmaceutical has been widely used in neutropenic patients who receive high-dose chemotherapy or were transplanted. Therefore, GM-CSF is used to restore hematopoietic dysfunctions, to stimulate the hyper-production of functionally primed effectors cells and to augment host defense against infection and malignant diseases. Its use is associated with significant decreases in chemotherapy-associated infections, antibiotic use, length of hospital day and mortality. The international patent of the biopharmaceutical Molgramostim (generic name) expired in 2006, and thus became an interesting product to pharmaceutical industries, including those settled in Brazil. Presently, Molgramostim is sold in Brazil as an imported biopharmaceutical, which, in turn becomes very costly to the Brazilian government. Therefore, the aim of this work is to develop a methodology for subsequent production of a national Molgramostim. In this work the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene was assembled by PCR. It was cloned into pET30a(+) expression vector and the best condition for expression of the protein was in the BL21(DE3) strain from *Escherichia coli*. To the isolation of inclusion bodies an efficient protocol was developed using multi step washing procedure and purification method of the recombinant protein from inclusion bodies using only a cationic and then an anionic exchange column. The immunoassay and N-terminal sequencing confirmed the identity of rhGM-CSF. The result of the biological activity assay, *in vitro*, showed that the rhGM-CSF produced has an equivalent biological potential to the standard reference. The protein rhGM-CSF was produced through simple, cost effective and economically feasible process and is extremely important to the industrial procedure and healthcare community.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF)

1.1.1 Características Biológicas e Estruturais do GM-CSF

Além do nome genérico Molgramostima a proteína GM-CSF também é denominada fator de crescimento estimulador de macrófagos e granulócitos. Este fator de crescimento da linhagem mielóide faz parte da família de citocinas reguladoras da proliferação, da diferenciação e da ativação funcional das células hematopoiéticas mielóides como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos e megacariócitos (1).

Essas células hematopoiéticas são derivadas de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que têm a capacidade de gerar certo número de tipos celulares diferentes, mas não todos. Células-tronco são células com alto poder de auto-renovação, ou seja, são capazes de dar origem a novas células-tronco indefinidamente, e, além disso, possuem a capacidade de se dividir assimetricamente para formar uma célula-tronco filha idêntica a ela própria e outra célula filha que é diferenciada e com potencial restrito. Esta última, por sua vez, inicia uma via para produção de células mais diferenciadas e, quando se divide, uma de suas células filhas será do mesmo tipo que a célula-tronco com potencial restrito que aquela que lhe deu origem, e a outra será uma célula progenitora de um tipo de célula diferenciada. As células progenitoras podem então se dividir para dar origem a novas células progenitoras, e quando recebem um sinal apropriado, podem se diferenciar em células definitivamente diferenciadas que não se dividem mais. O processo de divisão de uma célula-tronco está representado no esquema abaixo (Figura 1):

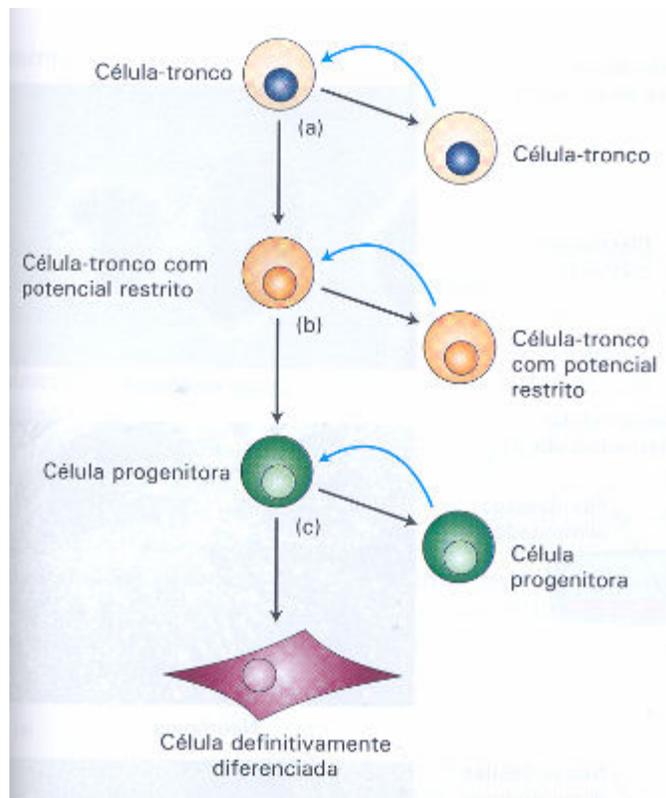


Figura 1 – Padrões de divisão de célula-tronco

(a) a divisão de uma célula-tronco produz duas células, uma das quais é uma célula tronco semelhante à célula-mãe. Dessa maneira, a população de células-tronco é mantida. (b) A outra célula-filha – uma célula-tronco de potencial mais restrito – inicia uma via para produzir células mais diferenciadas. Quando ela se divide, uma de suas células filhas será do mesmo tipo de célula-tronco com potencial mais restrito que sua mãe, e a outra será uma célula progenitora de certo tipo de célula diferenciada. As células progenitoras podem se dividir para dar origem as novas células progenitoras e, (c) em resposta a sinais apropriados, podem se diferenciar em células definitivamente diferenciadas que não se dividem.

Fonte: Lodish H. *et al.*, 2005. (2)

Conforme mencionado antes, os vários tipos de células sangüíneas são derivados de células-tronco hematopoiéticas que dão origem a células-tronco mielóides e linfóides com potencial mais restrito. Dependendo dos tipos e da quantidade de citocinas (fatores de crescimento extracelular que regulam a proliferação e diferenciação das células precursoras de várias linhagens de células sangüíneas), as células-tronco mielóides e linfóides dão origem a tipos diferentes de células precursoras

que são incapazes de auto-renovação. Essas células precursoras são identificadas por sua capacidade de formar colônias, contendo os tipos celulares diferenciados, denominados unidades formadoras de colônia (CFUs). Após a proliferação induzida por diferentes citocinas como granulócito-macrófago, eosinófilo, eritrócito, célula T, célula B, fator estimulante de formação de colônia (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) entre outras, o comprometimento e a diferenciação das células precursoras dão origem aos vários tipos de células sangüneas (Figura 2), (2).

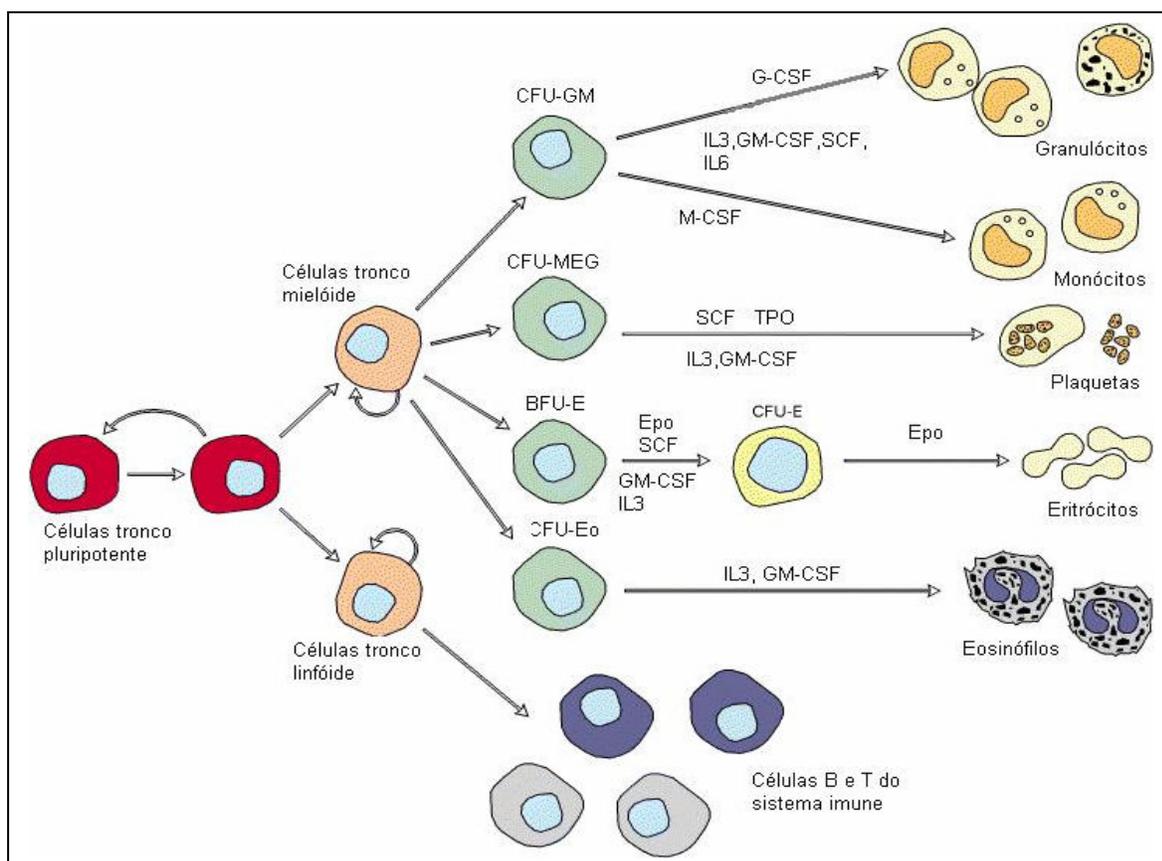


Figura 2 – Formação de células sangüneas diferenciadas a partir de célula-tronco hematopoiética na medula óssea. CFCs = Células Formadoras de Colônias; CFU = Unidade Formadora de Colônias; GM = granulócito-macrófago; Eo = eosinófilo; E = eritrócito; mega = megacariócito; T = célula T; B = célula B; CSF = fator estimulador de formação de colônia; IL = interleucina; SCF = Fator célula-tronco; Epo = eritropoetina; Tpo = trombopoetina; TNF = fator de necrose tumoral; TGF = fator de crescimento transformante; SDC = fator derivado de células do estroma; ligante FTL-3 = ligante para o receptor 3 tirosino-quinase semelhante a fms. Fonte: Lodish H. *et al.*, 2005 (2).

Portanto, a partir da diferenciação das células-tronco, são produzidos os diversos tipos de células sanguíneas, vermelhas e brancas. Dentre as células brancas, podemos citar os granulócitos, que se subdividem em três classes: neutrófilos (fagocitam e destroem microrganismos; controlam as infecções); basófilos (secretam histamina auxiliando na reação inflamatória) e eosinófilos (possuem função de controlar a infecção e auxiliam nos processos inflamatórios). Outra célula proveniente de células brancas são os monócitos que dão origem aos macrófagos que fazem o reconhecimento e remoção de células senescentes ou mortas dos tecidos, são os únicos a englobar microrganismos grandes; e originam também as células dendríticas que são apresentadoras de antígenos estranhos aos linfócitos desencadeando resposta imune. Os linfócitos, também produzidos a partir das células brancas, estão diretamente envolvidos com a resposta imune, e se subdividem em duas classes: células B que produzem anticorpos e células T que matam células infectadas por vírus e controlam a atividade de outras células brancas (3).

O transporte das células brancas até a região afetada é mediado por inúmeras moléculas sinalizadoras, sendo que a regulação do processo tende a ser específica para cada tipo celular, ou seja, o aumento de determinadas células brancas no sangue indica o tipo de infecção e de outros distúrbios inflamatórios que estão ocorrendo (3).

A proteína GM-CSF foi primeiramente identificada em células pulmonares de ratos (4); células do tecido pulmonar recebem atenção especial, pois contêm altos níveis de atividade estimuladora de produção de GM-CSF (5). Além disso, também está presente, tanto em humano como em ratos, no soro, na maioria dos tecidos e ainda é encontrada associada com a matriz extracelular como uma proteína integral de membrana (6). As proteínas GM-CSF humana e de rato, possuem apenas 52% de similaridade nos aminoácidos sendo que a proteína de rato tem 124 resíduos de aminoácidos enquanto a humana possui 127, ambas derivadas de um precursor contendo um sinal peptídico (7). O gene GM-CSF humano está localizado no braço longo do cromossomo 5 na posição q23-q31 e contém 4 éxons e 3 íntrons compreendendo uma área de 2,5 kb (8).

O GM-CSF de humanos é uma glicoproteína que pode ser produzida por técnica de DNA recombinante pela *E. coli* porém, no sistema procariótico a citocina apresenta-se na forma não-glicosilada, diferente da forma nativa (forma humana) produzida

naturalmente que é glicosilada, porém tanto a forma nativa quanto a não-glicosilada apresentam atividade biológica (9). O GM-CSF é uma proteína monomérica de 14 kDa e a análise da estrutura 3D da proteína não-glicosilada, numa resolução de 2.4 Å (Figura 3), indica que a proteína possui 2 folhas β antiparalelas com um leque de 4 hélices α (10;11). Inúmeras técnicas para resolver a estrutura da proteína foram utilizadas e demonstraram que apenas os resíduos 21-31 na hélice A e 78-94 na hélice C são essenciais tanto para a ligação com alta afinidade aos receptores, assim como para atividade biológica (7). Da mesma forma, estudos demonstraram que a estrutura terciária da proteína é estabilizada por pontes de dissulfeto intramoleculares, porém apenas as pontes de dissulfeto entre Cys54-96 são requeridas para a atividade biológica da mesma (7;12;13).

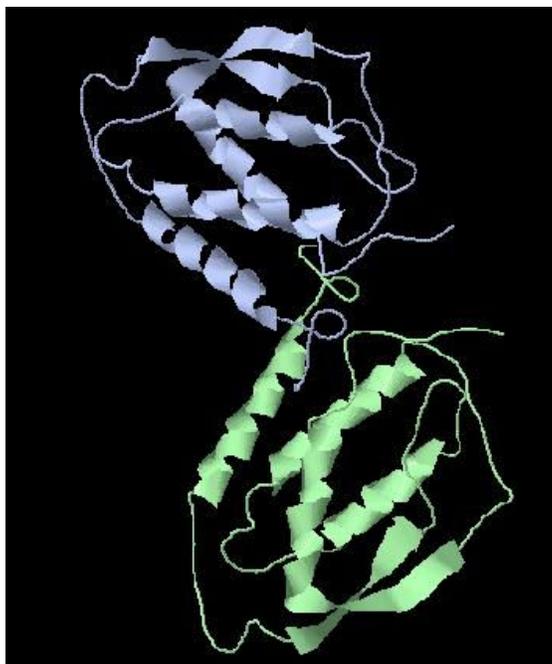


Figura 3. Imagem da estrutura 3D do GM-CSF não-glicosilado. Resolução de 2.4 Å. Depositado no PDB: 1CSG (11).

GM-CSF é produzido por diversos tipos celulares incluindo macrófagos, células de mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais (4;14; 15) geralmente em

resposta à ativação imunológica e citocinas mediadoras da inflamação: IL-1, IL-6 e TNF- α (16; 17). Sob condições normais, sem que haja alguma alteração na produção da proteína GM-CSF, o mesmo pode ser detectado no soro em uma concentração que varia entre 20 a 100 pg/mL. Em alguns casos, a produção de GM-CSF é constitutiva assim como em inúmeras linhagens de células tumorais. Entretanto, na maioria dos casos, sua produção requer a estimulação das células com outras citocinas, antígenos ou agentes inflamatórios (18).

1.1.2 Receptores do GM-CSF

As atividades da proteína GM-CSF são exercidas quando as mesmas encontram-se ligadas a receptores de superfície heteroméricos que são expressos em monócitos, macrófagos, granulócitos, linfócitos e células endoteliais e epiteliais alveolares (19). Os receptores da GM-CFS possuem cadeias α e β . A primeira cadeia a se ligar é a α que se associa ao GM-CSF com baixa afinidade e possui constante de velocidade de dissociação rápida (18; 20). A cadeia β não possui afinidade de ligação sozinha, mas é necessária para a transdução do sinal e faz a mediação da alta afinidade de ligação junto com o receptor α cujo complexo possui baixa constante de dissociação (21; 22; 23; 24).

1.1.3 Rota de Sinalização: Receptores de Citocina ativam Jak-STAT

A rota de sinalização Jak-STAT promove um caminho direto de sinalização. Quando as citocinas são secretadas pelas células em resposta a estímulos gerado por outras citocinas do sistema imune, antígenos ou agentes inflamatórios, estas se ligam a à superfície celular das células e induzem a oligomerização e reorientação das cadeias do receptor em um oligômero. Quando o receptor específico é ativado, estes ativam uma classe de tirosina quinase citoplasmáticas chamadas quinases do tipo “Janus” (Jaks). A ligação promove a associação das Jaks, próximas o suficiente para fosforilação cruzada uma da outra, aumentando a atividade dos seus domínios de tirosina cinase. Quando ativadas, as Jaks fosforilam e ativam proteínas reguladoras do gene latente, STATS (transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição) as quais

possuem domínio SH2 que reconhece apenas o sítio fosfotirosina-específico nos receptores e fazem a mediação da ligação da proteína STAT a um sítio de fosfotirosina em um receptor de citocina ativado (as Jaks fosforilam as STATs em tirosinas e causam suas dissociações do receptor). O domínio SH2 na STAT que foi liberada faz a mediação da sua ligação a uma fosfotirosina em outra molécula de STAT, formando um dímero. O dímero de STAT move-se em direção ao núcleo onde, em combinação com outros genes de proteínas reguladoras, ligam-se a DNA específico e estimulam sua transcrição (3).

O fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos associa-se a Jak2 que no caso ativa STAT5 e desta forma, estimula a produção de granulócitos e macrófagos (3). A figura abaixo representa um modelo de rota de sinalização Jak-STAT realizada por outra citocina, Interferon α ou β (3) mas que segue o mesmo padrão da rota de sinalização da citocina GM-CSF.

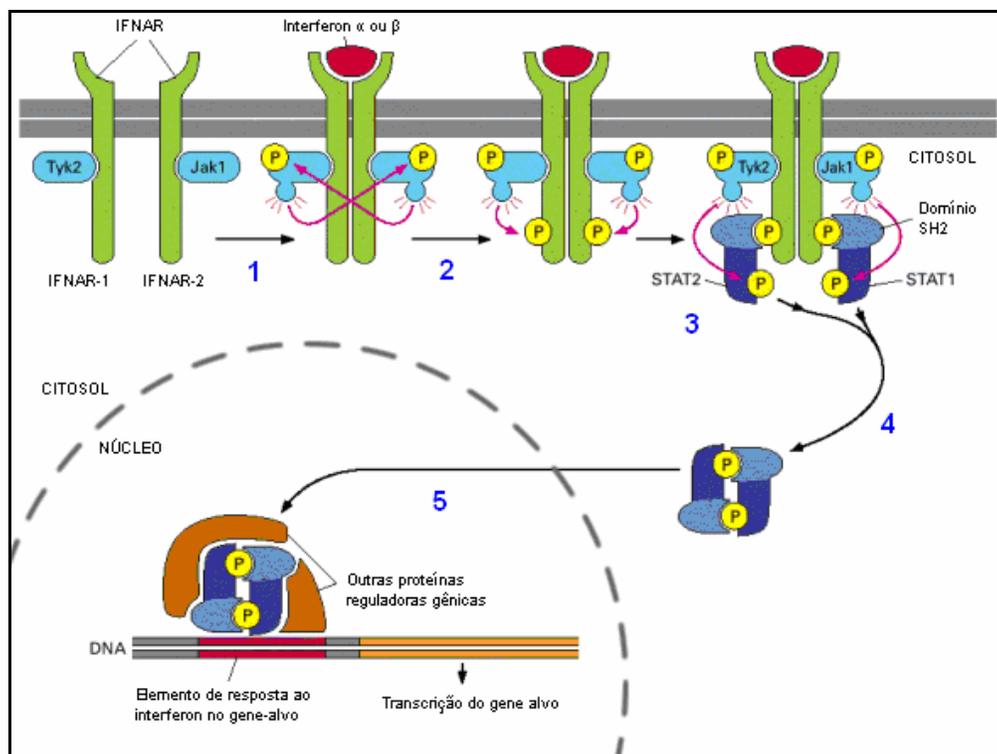


Figura 4: Rota de sinalização Jak-STAT ativada por Interferon α ou β . 1- Ligação do Interferon provoca a dimerização do receptor e as Jaks fosforilam suas tirosinas

reciprocamente. **2-** Jaks ativadas fosforilam as tirosinas do receptor. **3-** STATs ancoram nas fosfotirosinas do receptor e são fosforiladas pelas Jaks. **4-** STATs dissociam-se do receptor e dimerizam, por meio do seu domínio SH2. **5-** STATs migram para o núcleo, ligam-se ao DNA e a outras proteínas reguladoras gênicas. Fonte: (3)

1.1.4 Regulação da Expressão do Gene que codifica para o GM-CSF

A regulação da expressão do gene codificador do GM-CSF ocorre tanto em nível transcricional como pós transcricional (26; 27; 28; 29; 30). Em nível transcricional, o gene GM-CSF é modulado por promotores e elementos ativadores (31), como: região rica em GC (responsável pela expressão constitutiva de GM-CSF), sítio ligador de NF-KB e dois elementos-consenso conservados de citocinas, CK-1 e CK-2, que se ligam a fatores de indução (32; 33). A regulação pós-transcricional do gene é mediada pela presença de seqüências ricas em AU no RNAm para GM-CSF (região 3' não-codificada) causando uma instabilidade na transcrição como resultado do reconhecimento e ligação de proteínas específicas que se ligam a ARE (elementos ricos em AU), como por exemplo a proteína tristetrapolina. O controle de ligação dessa proteína pode ser exercido pela presença de MAPK (p38 mitogênica ativada) que fosforila a tristetrapolina e diminui a ligação desta seqüência AU aumentando a estabilidade do RNAm para GM-CSF (34). Dessa forma, a produção da proteína não depende apenas de um aumento da taxa de transcrição, mas também da ativação de mecanismos concomitantes que promovam a estabilidade do RNAm (7). A região promotora do gene contém inúmeras regiões reguladoras, tanto positivas como negativas (35). Além do controle transcricional e pós-transcricional, existem alguns agentes farmacológicos inibidores da expressão da GM-CSF como a ciclosporina A (36; 37; 38) e glicocorticóides (39; 40).

1.1.5 Expressão da Proteína GM-CSF em Corpos de Inclusão e suas Vantagens

E. coli é muito utilizada para a produção de proteínas que não requerem modificação pós-transducional para sua bioatividade. Porém, a expressão de proteínas recombinantes geralmente resulta no acúmulo das mesmas em agregados insolúveis, chamados de corpos de inclusão (IBs).

A formação dos IBs é considerada vantajosa uma vez que o isolamento de células homogêneas (que contêm praticamente só a proteína de interesse) é uma maneira conveniente e efetiva de purificar proteínas de interesse. Além disso, a formação de IBs possui outras vantagens como: expressão de alto nível de proteínas, fácil isolamento de corpos de inclusão a partir das células devido às diferenças no tamanho e densidade em relação aos contaminantes, baixa degradação das proteínas expressas, resistência ao ataque proteolítico por proteases celulares e menor número de contaminantes reduzindo assim, os passos dos processos de purificação para a obtenção da proteína na sua forma pura e ativa (41).

Considerando as inúmeras vantagens supracitadas, proteínas recombinantes expressas na forma de corpos de inclusão em *E. coli* têm sido freqüentemente usadas para produção comercial de proteínas com finalidades terapêuticas.

1.2 Biofármacos

As proteínas que são produzidas pelo organismo humano, quando geradas por clonagem molecular e expressas em células bacterianas ou células de mamíferos em cultivo, são chamadas de biofármacos. Essas proteínas recombinantes são moléculas muito mais complexas do que as drogas tradicionais quimicamente produzidas. Elas requerem um processo de produção altamente elaborado e sofisticado e suas propriedades são altamente dependentes do processo utilizado. Os GM-CSfs são proteínas terapêuticas produzidas por técnicas modernas de biotecnologia. O desenvolvimento de biofármacos permitiu encontrar opções de tratamento para algumas das doenças mais complexas e de grande incidência. Devido a tal importância, a indústria da biotecnologia converteu-se em uma das fontes mais importante de novos medicamentos levando em consideração o ponto de vista estratégico social e econômico. Com a expiração da patente de alguns desses biofármacos, é possível a produção de biossimilares, ou seja, cópias dos biofármacos inovadores e que devem

apresentar todos os ensaios clínicos necessários para demonstrar a “similaridade”, eficácia e segurança quando comparados com os biofármacos originais (42). A patente da Molgramostima expirou em 2006 tornando possível a produção de um produto biossimilar, até mesmo em nível nacional, gerando assim uma alternativa para redução dos custos com a importação destes medicamentos.

1.2.1 Aplicação Terapêutica e Importância Clínica

A Molgramostima (GM-CSF) é hoje utilizada nos casos de transplante de medula óssea e neutropenias associadas aos casos de transplantes, quimioterapia e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A neutropenia existe quando a contagem de neutrófilos é inferior a $1.500/\text{mm}^3$, tornando o paciente neutropênico constantemente vulnerável à infecção por bactérias gram-negativas ou fungos. O uso de drogas como sulfonamidas, clorpromazina, procainamida, penicilina, cefalosporina, cimetidina, metimazole, fenitoína, clorpropamida e antiretrovirais podem causar neutropenia no indivíduo (43).

Conforme o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas da portaria SAS/MS número 862, podem ser incluídos no tratamento com Molgramostima todos os pacientes que apresentarem algumas das seguintes situações: para a mobilização de células progenitoras no transplante de medula óssea, uma vez que GM-CSF mobiliza grande quantidade de células progenitoras hematopoiéticas para o sangue periférico, possibilitando sua coleta para uso posterior em transplante; em casos de neutropenia associada ao transplante de medula óssea quando o número de neutrófilos for igual ou inferior a $500/\text{mm}^3$ 21 dias após o transplante; utilizada também em casos de neutropenia induzida por quimioterapia, pois diminui o tempo de neutropenia febril em pacientes que recebem quimioterapia mielossupressiva anticâncer e também para reduzir o tempo de recuperação neutrocitária e a duração da febre após a indução da quimioterapia de leucemia mielóide aguda; em casos de neutropenia crônica grave (congenita, cíclica ou idiopática); utilizada também em casos de SIDA associada a neutropenia afim de reduzir os riscos de infecção bacteriana grave nesses pacientes; anemia aplásica grave em terapia com tripla imunossupressão e em casos de mielodisplasia com neutropenia grave e infecção de repetição. Não devem ser incluídos

nesse tratamento terapêutico, pacientes portadores de hipersensibilidade à proteína, gestantes ou mães que estejam amamentando ou ainda que discordem dos termos do Consentimento Informado (é obrigatório que se faça a conscientização do paciente, ou responsável legal, frente a assinatura de um termo no qual o indivíduo se diz ciente dos potenciais de risco e efeitos colaterais relacionados ao uso dos medicamentos descritos no protocolo). As formas de tratamento (dose total, posologia e vias de administração) diferem para cada caso em questão.

1.3 Produção Industrial da Proteína GM-CSF

Um dos medicamentos que consta na lista desses medicamentos excepcionais é a Molgramostima (nome genérico) produzido e vendido atualmente com os nomes comerciais LEUKINE[®] pela indústria BERLEX[®] (produzida a partir de extrato de levedura), LEUCOMAX pela indústria SCHERING PLOUGH e LEUCOCITIM[®] produzida pela indústria BLAUSLEGEL. Estes dois últimos são produzidos por técnica de DNA recombinante em *E. coli* (44).

1.3.1 Custos

As formulações de GM-CSF não são produzidas no Brasil, o que resulta em um alto custo na importação desses medicamentos. O Ministério da Saúde, que compra esse medicamento para suprir o Sistema Único de Saúde (SUS), gastou aproximadamente 2 milhões de dólares no ano de 2006 com a aquisição desse biofármaco GM-CSF e o mercado global para este produto neste mesmo ano foi de 73 milhões de dólares americanos (45).

1.4 Estudos Recentes do GM-CSF e suas Possíveis Ações Terapêuticas

As vacinas contendo DNA plasmidial que codificam antígenos de patógenos infecciosos e tumores têm sido muito estudadas nos últimos anos levando em

consideração que estas são uma forma profilática e de tratamento potencialmente não-tóxica para doenças infecciosas e, até mesmo, para o câncer. Recentes estudos sustentam a idéia do uso concomitante de transfecção direta de células apresentadoras de antígenos (APC) e vacinas de DNA. Baseados nesses estudos, o grupo de Yoon *et al.*, 2006 (46), realizou uma pesquisa utilizando o GM-CSF como adjuvante para uma vacina de DNA, considerando a potente ação desta citocina no recrutamento de APC até o sítio de síntese de antígenos e estimulação da maturação de células dendríticas promovendo assim, aumento da resposta as vacinas. A ativação dessas células produz a internalização, o processamento e a apresentação dos antígenos aos linfócitos. Contudo, o objetivo do grupo em questão era utilizar cDNA de GM-CSF como adjuvante de uma vacina de DNA em ratos para a glicoproteína B de vírus pseudorabies (PrV), um alfa herpes vírus que causa doença letal em suínos. O estudo comprovou que a co-inoculação de GM-CSF com o vetor de expressão GM-CSF aumenta a proteção imune contra uma infecção com PrV causada pela indução de aumento da resposta humoral e imunidade celular em resposta ao antígeno PrV. (46). Outro estudo relacionando o uso de GM-CSF como adjuvante da vacina de DNA foi realizado pelo grupo de Mario Cruciani *et al.*, 2006 (47). Eles comprovaram a eficácia do GM-CSF no aumento da resposta imune à vacina contra o vírus da hepatite B. Para tanto, realizaram um estudo comparativo com pacientes que recebiam concomitantemente GM-CSF com a vacina e pacientes do grupo controle, os quais recebiam apenas a vacina, e demonstraram um efeito dose/resposta significativo no primeiro grupo. Esse efeito foi também visualizado em pacientes com insuficiência renal os quais normalmente apresentam baixa resposta ao tratamento com anticorpos (vacinas). Portanto, as evidências comprovaram que GM-CSF aumenta a resposta de anticorpos e estimula a resposta proliferativa de células T (47).

A imunização por DNA oferece inúmeras vantagens quando comparada com outros tipos de vacinas como, por exemplo, a produção intracelular de imunógenos, induzindo células mediadoras de imunidade por longos períodos. Isso explica o alto grau de interesse dos grupos de pesquisa nessa área nos dias atuais (47).

A importância da produção de GM-CSF e seu papel fundamental no sistema imune foram demonstrados pelo grupo de Mercedes Gonzalez-Juarrero. O grupo realizou testes *in vivo* demonstrando que o rompimento da produção do GM-CSF nos

pulmões de ratos afeta a habilidade destes de controlar a infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* provocando a morte dos ratos por necrose pulmonar(48).

1.5 Histórico das Ações Desenvolvidas pelo Governo brasileiro na Área da Assistência Farmacêutica

No ano de 1923, conforme Decreto nº 4.682, instituiu-se a chamada Lei Eloy Chaves, na qual foram criadas as Caixas de Aposentadorias e Pensões que tratavam da assistência farmacêutica entre seus beneficiários e criaram mecanismos destinados a vender a seus usuários e dependentes, medicamentos a preços especiais. Já em 1974, foi criada a CEME (Central de Medicamentos) que, no ano seguinte vinculou-se ao Ministério da Previdência e da Assistência Social (MPAS) e, juntas, tinham a função de coordenar a política de assistência farmacêutica a ser desenvolvida pelo governo federal. Neste plano, estava prevista a manutenção de estoques de medicamentos importados e utilizados em doenças cuja incidência no país era rara. No próximo ano, a CEME passou a assumir a responsabilidade pela aquisição e distribuição de medicamentos a serem utilizados pelas instituições vinculadas ou conveniadas ao MPAS, permitindo a aquisição de medicamentos fora da padronização quando houvesse uma justificativa adequada.

A partir das inúmeras ações desenvolvidas pela CEME no âmbito da assistência farmacêutica, abriu-se espaço para entrada de medicamentos que passariam a ser denominados **excepcionais** e, desta forma, no ano de 1982 a Portaria MPAS/MS/MEC nº 03, que possuía a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) abriu-se espaço para a normatização dos medicamentos então considerados de aquisição e dispensação excepcionais. Introduziu-se então o conceito de medicamento excepcional que consta no subitem 3.2 desta Portaria: “em caráter excepcional, os serviços, prestadores de assistência médica e farmacêutica poderão adquirir e utilizar medicamentos não-constantemente na RENAME, quando a natureza ou a gravidade da doença e das condições peculiares do paciente o exigirem e desde que não haja, na RENAME, medicamento substitutivo aplicável ao caso”. Esta mesma portaria define 15% do valor global dos recursos financeiros de cada ministério destinados à compra de medicamentos da RENAME à compra direta dos chamados excepcionais. Em 1993,

com a extinção do INAMPS, a responsabilidade pelos programas de assistência, em nível federal, passa a ser do Ministério da Saúde (MS) e as despesas passam a ser realizadas por meio de Guias de Autorização de Pagamento (GAPs). Em 1995, a SAS (Secretaria de Assistência à Saúde) inclui novos medicamentos na relação dos excepcionais, perfazendo um total de 22 substâncias e 33 apresentações. No ano seguinte, por meio da portaria MS/SAS nº 204, são estabelecidas medidas para o maior controle dos gastos com medicamentos excepcionais e para tanto, criaram códigos na tabela SUS, determinaram a obrigatoriedade de dispensação no serviço público, instituíram o formulário de Solicitação de Medicamentos Excepcionais (SME) e determinaram a mudança do sistema de cobrança, extinguindo a GAP e criando o Boletim de Procedimento Ambulatorial (BPA). Dois anos mais tarde, a Política Nacional de Medicamentos é aprovada e estabelece a reorientação da assistência farmacêutica, garantindo o acesso da população aos medicamentos de custo elevado.

No ano de 1999, o MS determina para que os gestores do SUS elaborem programação físico-financeira anual de medicamentos, para cobertura de demanda gerando um avanço importante no controle dos gastos. Neste mesmo ano é criada a Comissão de Assessoria Farmacêutica, com a finalidade de estabelecer critérios para medicamentos excepcionais na tabela SAI/SUS (tabela de procedimentos criada neste mesmo ano) (49; 50).

De 1997 a 2001, muitos medicamentos foram incluídos no Programa bem como muitas doenças passaram a ser atendidas e um grande incremento no número de pacientes foi verificado. Em 2002, o Programa foi significativamente incrementado, garantindo, hoje, o financiamento para compra e distribuição gratuita, pelos Estados, de 92 medicamentos ditos excepcionais, em 208 apresentações diversas. O crescimento também se deu nos investimentos realizados no Programa, que somaram, em 2002, R\$ 483 milhões, e no número de pacientes atendidos – cerca de 129 mil pacientes (51).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral e Justificativa

Este trabalho faz parte de um projeto maior que visa a produção nacional da proteína recombinante “Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos” (GM-CSF), utilizando ferramentas da engenharia genética. Esse biofármaco faz parte da lista de medicamentos EXCEPCIONAIS cuja distribuição é realizada gratuitamente pelo Ministério da Saúde. Como este medicamento é produzido apenas no mercado internacional, a importação do mesmo gera grandes gastos para o governo. Sendo assim, a produção desse biossimilar seria uma importante alternativa para a redução dos custos gerados com a aquisição deste biofármaco e mais do que isto, garantiria um maior acesso da população que necessita do tratamento. Pelo presente trabalho, temos como objetivo o desenvolvimento de um protocolo para a produção, em nível de laboratório, do GM-CSF, onde foram estabelecidas as condições de multiplicação das células, meio de cultura e purificação da proteína de interesse.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Construção da seqüência do GM-CSF pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos;
- 2) Subclonagem dos produtos da PCR em vetor de clonagem pCR-Blunt® e posterior inserção dos amplicons em vetor de expressão pET30a(+);

- 3) Superexpressão da proteína recombinante em *E. coli*;
- 4) Otimização do processo de purificação da proteína recombinante pelo emprego de Cromatografia Líquida de rápido desempenho (FPLC);
- 5) Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal da proteína purificada;
- 6) Análise da identidade por espectrometria de massas;
- 7) Determinação da atividade biológica do biofármaco.

3 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Human Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor: synthesis of coding DNA sequence, heterologous expression in *Escherichia coli*, and purification of the bioactive recombinant protein

Raquel Cristina Schwanke^{1,2,3}; Gaby Renard³; Jocelei Maria Chies³; Maria Martha Campos⁴; Eraldo Luiz Batista Junior^{2,4}; Diógenes Santiago Santos^{1,2*}, Luiz Augusto Basso^{1,2*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PUCRS. Av. Ipiranga, 6690 – Partenon – Porto Alegre, 90610000 / Phone +55 51 33203318 – Brazil.

²Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas - PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 – Tecnopuc - Prédio 92A - Partenon - Porto Alegre, ZIP CODE 90610000 / Phone +55 51 33203629 – Brazil.

³Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA. Av. Ipiranga, 6681 – Tecnopuc - Prédio 92A - Partenon - Porto Alegre, ZIP CODE 90610000 / Phone +55 51 33526560 – Brazil.

⁴School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – Partenon – Porto Alegre, RS, 90610000, Brazil.

*Corresponding authors

E-mails addresses:

Raquel Cristina Schwanke: raquelschwanke@hotmail.com

Gaby Renard: gaby.renard@pucrs.br

Jocelei Maria Chies: joceleichies@terra.com.br

Maria Martha Campos: camposmmartha@yahoo.com

Eraldo Luiz Batista Junior: eraldo.junior@puers.br

Diógenes Santiago Santos: diogenes@puers.br

Luiz Augusto Basso: luiz.basso@puers.br

Abstract

According to the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), biopharmaceuticals are medicinal products comprising biotechnology-derived recombinant proteins as active substances. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is one of this biopharmaceuticals, whose patent expired in 2006 and is a research target of many pharmaceutical industries. Human GM-CSF specifically stimulates the proliferation of cells of the macrophage and granulocyte lineages. It activates and enhances the differentiation and survival of neutrophils, eosinophils and macrophages, which play a key role in the innate immune response. GM-CSF is thus used to restore hematopoietic dysfunctions, to stimulate the hyper-production of functionally primed effector cells and to augment host defense against infection and malignant diseases. Here we describe the construction of the GM-CSF encoding gene, cloning it into the pET 30a(+) expression vector, expression in *Escherichia coli* strains, purification and biological assays. The recombinant human GM-CSF protein was purified to homogeneity using only two purification steps and the resulting factor showed similar biological activity as the reference standard. The results here presented describe a process that is cost-effective and allows scaling-up production of biosimilar hGM-CSF.

Keywords: Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; *Escherichia coli*; Inclusion bodies; Purification; Biological assay; Biosimilar.

1. Introduction

Biopharmaceuticals are medicinal products comprising biotechnology-derived recombinant proteins as active substances. Like all other medicines, they are regulated by the U.S. agency FDA (Food & Drugs Administration) and the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), which create and establish standards and scientific mechanisms that ensure safety, efficacy and quality of biopharmaceutical drugs. EMA has approved the first biosimilar (Sandoz's Omnitrope, somatropin, somatrophin) in April 2006 whereas the FDA has not approved any yet (Pisani and Bonduelle, 2006). Although the regulatory pathway for approval of biosimilars has not been completely finalized yet, these follow-on protein products should at least shown to be pharmaceutically equivalent (that is, it contains the same active ingredient in the same strength, dosage form and route of administration) and bioequivalent (Woodcock et al., 2007). Recombinant Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor (rGM-CSF) has been produced by Schering-Plough in *Escherichia coli* (Leucomax®, Molgramostim) and by Berlex in *Saccharomyces cerevisiae* (Leukine®, Sargramostim), the former had its patent expired in 2006. Leucomax® was co-developed by Novartis and Schering-Plough and has been co-marketed by the two companies in various countries since 1991 with the approval of EMA. However, the FDA has only approved Leukine® for commercialization in USA. Sales in 2006 of hGM-CSF, in USA alone, were of US\$ 73 million (www.imshealth.com).

The colony-stimulating factors (CSFs) are a group of glycoproteins that regulate the proliferation and differentiation of hematopoietic cells. The classification is based on the stimulatory effects that they exert on various bone marrow progenitor cell lineages. GM-CSF is expressed in response to inflammatory stimuli by various cell

types including T lymphocytes, macrophages, fibroblasts and endothelial cells (Burgess et al., 1977; Gasson, 1991; Holloway et al., 2003) and stimulates specifically the proliferation of cells of macrophage and granulocyte lineages (Burgess et al., 1977; Nicola et al., 1979). GM-CSF enhances the production and survival of neutrophils, eosinophils and macrophages (Barreda et al., 2004), which play a key role in the innate immune response. Accordingly, GM-CSF is used to restore hematopoietic dysfunctions, to stimulate the hyper-production of functionally primed effectors cells and to augment host defense against infection and malignant diseases (Clark and Kamen., 1987). Endogenous myeloid colony-stimulating factors (CSFs), such as GM-CSF, have been used to enhance the clinical management of immunosuppressed patients with cancer. These agents are associated with significant decreases in chemotherapy-associated infections, antibiotic use, length of hospital stay and mortality (Buchsel et al., 2002).

The natural human GM-CSF is composed of 127 amino acids and shares fifty-two percent of similarity with murine GM-CSF (Barreda et al., 2004). Human GM-CSF has four cysteine residues which form two disulphide linkages but only the disulphide bond between Cys⁵⁴ and Cys⁹⁶ is required for biologic activity of the protein (Barreda et al., 2004). Analysis of the three-dimensional structure of the non-glycosylated form of the protein (PDB code 1CSG) shows that GM-CSF has two-stranded antiparallel β -sheet with an open bundle of four α -helices (Diederichs et al., 1991; Walter et al., 1992). The characterization of the structural elements of GM-CSF responsible for binding to its receptor and necessary for biological activity showed that residues 21-31 in helix A and 78-94 in helix C are essential for high affinity receptor binding and biological activity, whereas helix B does not appear to be essential (Barreda et al., 2004). In addition, Glu-21 of helix A has also been implicated in high affinity binding of the GM-CSF receptor (Shanafelt et al., 1992; Meropol et al., 1992).

Here we describe the synthesis of the coding DNA sequence of human GM-CSF without the signal peptide region, the cloning of it into an expression vector, and the recombinant protein expression in *Escherichia coli* host cells. We also present an optimized downstream purification procedure for rhGM-CSF expressed by *E. coli* in inclusion bodies. Homogeneous rhGM-CSF showed biological activity which was found to be similar to the control (commercially available product). We hope that the experimental results described here will contribute to improving the production process of rhGM-CSF and thereby lower costs to healthcare payers and consumers.

2. Materials and Methods

2.1. Construction and cloning of hGM-CSF

Oligonucleotides were manually designed and synthesized, in even numbers, based on the nucleotide sequence of the GM-CSF gene (Accession Number NM_000758 version 2). The synthesis of human GM-CSF coding DNA sequence was carried out as described elsewhere (Renard et al., 2007). The DNA sequence that codes for the peptide signal was removed and *Nde*I (5'-end) and *Bam*HI (3'-end) restriction sites were included in flanking primers. Briefly, the 400-bp coding sequence of human GM-CSF was divided into 12 shorter sequences of approximately 50 bp each. The 12 designed sequences overlapped the ends of the immediately adjacent oligonucleotide at least 10 bases over the adjacent ends. These fragments were then assembled by PCR amplification. The final PCR product was gel-purified, cloned into pCR[®]-Blunt vector (Invitrogen) and subcloned into pET30a(+) expression vector (Novagen). Nucleotide sequence of rhGM-CSF was determined by automated sequencing in order to confirm the correct assembly of the coding sequence and ensure that no mutations were introduced by the PCR amplification.

2.2. Expression of Human GM-CSF in *E. coli*

Escherichia coli BL21(DE3) (Novagen) electrocompetent cells were transformed with recombinant pET 30a(+):hGM-CSF plasmid. As negative control the cells were transformed with pET 30a(+) vector without insert. A single colony was inoculated into 100 mL of LB medium containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin, and grown overnight at 37°C. This culture was used to inoculate (1:100) 5.5 L of 4YT medium (32 g bacto tryptone, 20 g yeast extract, and 5 g NaCl per liter, pH 7.2) and grown in shaker flasks at 180 rpm, 37°C. After reaching OD₆₀₀ 0.4-0.6 the cultures were grown for further 24 hours with no IPTG induction. Cells were harvested by centrifugation at 15,900 x g for 30 minutes at 4°C and stored at -20°C.

2.3. Isolation of Inclusion Bodies

A strategy that involves inclusion body (IB) isolation and washing, solubilization of the aggregated protein, and refolding of the solubilized G-CSF protein (Komath et al., 2003) was employed to recover active rhGM-CSF from IBs. The frozen cell paste was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1:10 w/v). The cell suspension was submitted to a French press (Constant Systems LTD) under 137.9 MPa. The inclusion bodies (IBs) were separated from the cell debris and intact cells by centrifugation at 15,900 x g for 45 minutes at 4°C). The pellet was washed in three steps. At the first step IB pellet was resuspended in 2% Triton X-100 in 50 mM Tris HCl, pH 8.0 and 5 mM EDTA at a pellet to buffer ratio of 1:40 (w/v). This solution was stirred at room temperature (RT) for 60 minutes and centrifuged at 15,900 x g for 30 minutes. This step was repeated once. At the second step of washing, the pellet was resuspended in 1% sodium

deoxycholate in 50 mM Tris HCl pH 8.0 and 0.5 mM EDTA buffer (ratio of 1:40 w/v). This solution was stirred at RT for 1 hour and centrifuged at 15,900 x g for 30 minutes. For the last step of washing the buffer 50mM Tris HCl pH 8.0 containing 1 M NaCl and 0.5 mM EDTA was used to resuspend the pellet. The solution was stirred and centrifuged as before.

2.4. IB Solubilization and Refolding

IB pellet was resuspended in 2 M urea up to a final protein concentration of 2 mg mL⁻¹. The pH of the solution was adjusted to 11-12.5 with NaOH 1 M and stirred for 30 minutes at RT. The pH was then reduced with acetic acid to 8.0 and the protein solution diluted 10-fold with 0.1% polysorbate 20 for refolding. The solubilized solution was dialysed twice against Tris HCl 50 mM pH 8.0 buffer and then twice against 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 (buffer A).

2.5. Purification of rhGM-CSF

The dialysed solution was clarified by centrifugation at 15.900 x g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was loaded on a HiPrep Resource S column (GeHealthcare/Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A and proteins were eluted with 0-1M Tris HCl linear gradient (buffer B, 1 M Tris HCl, pH 8.0) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The eluted fractions were pooled and dialysed against Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (Buffer C) and loaded on a MonoQ HR10/10 column (GeHealthcare /Amersham Biosciences) equilibrated with buffer C. The bound proteins were eluted with 0-1 M NaCl linear gradient (Buffer D, Tris HCl 50 mM and 1 M NaCl, pH 8.0) at 1 mL min⁻¹ flow rate. All purification steps were analyzed by SDS-PAGE 12%

(Laemmli, 1970), and the protein concentration was determined by the Bradford's method (Bradford et al., 1976), using a Bio-Rad Laboratories protein assay kit.

2.6. *N-terminal amino acid sequencing*

The N-terminal amino acid residues of homogeneous rhGM-CSF were identified by the automated Edman degradation method on a PPSQ-23 protein peptide sequencer (Shimadzu Co., Japan) as described elsewhere (Brand et al., 2006).

2.7. *Proliferation Assays*

The bioassay of rhGM-CSF was performed with TF-1 cells (ATCC[®] number CRL-2003[™]) cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (Gibco) and GM-CSF (2 ng mL⁻¹) as previously reported (Kitamura et al., 1989). The culture was maintained at 37°C in humid air containing 5% CO₂. To properly test the functional properties of the newly synthesized GM-CSF, TF-1 cells were initially subjected to a 24-hour starving period in RPMI 1640 medium containing only 1% of FBS and no GM-CSF. Cells were then washed in sterile Mg/Ca-free PBS and divided into three aliquots (6 x 10⁵ cells each) to be subjected to different culturing conditions. The first group comprised a negative control, in which TF-1 cells were cultured in medium containing only 10% FBS but no GM-CSF. Group 2 received GM-CSF purified by the MonoQ HR 10/10 and Group 3 received a commercially available human recombinant GM-CSF used as a positive control (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.). The same GM-CSF protein concentration (2 ng mL⁻¹) was added to the culturing medium of groups 2 and 3. Each cell aliquot was plated in 6-well plates and analysed in triplicates. Changes in cell numbers were evaluated after 24 hours by direct counting of cells using a hemocytometer under a light microscope by the same observer.

Live and dead cells were counted based on selective staining with trypan blue solution (0.4%) (Sigma-Aldrich Chemical Company, St Louis, MO, U.S.A.). To confirm the changes in cell numbers obtained by direct counting, the method based on the mitochondrial reduction of a tetrazolium bromide salt (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) was employed. For this purpose, cells were plated in a 96-well plate at a 2×10^3 per well density (divided into 3 groups) and subjected to the same schedules of incubation described above. Subsequently, a MTT solution (5 mg mL^{-1}) was added to the culture wells and incubated for 3 hours at 37°C , in CO_2 incubator. Following the addition of dimethyl sulfoxide, the absorbance was assessed by a plate reader at 595 nm. The absorbance values were linearly proportional to the number of live cells with active mitochondria.

Statistical analysis

Data regarding the biological activity of rhGM-CSF are presented as the mean \pm SEM of 2 independent experiments, performed in triplicate. The statistical comparison among the groups was accomplished by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

3. Results

3.1. Construction, amplification and cloning of hGM-CSF

The 400-bp DNA fragment of the human GM-CSF open reading frame was synthesized. The amplified fragment was cloned into an expression vector to produce the recombinant pET30a (+)::hGM-CSF vector (Fig.1). DNA sequence analysis showed identity between the cloned fragment and the hGM-CSF gene. These results showed

that the methods employed here allowed the correct synthesis of the gene, cloning and insertion into the vector.

3.2. Expression of rhGM-CSF

The recombinant plasmid was used to transform *E. coli* BL21(DE3) host cells by electroporation and single colonies were used to inoculate 4YT medium. Recombinant hGM-CSF (~ 14.5 kDa) was expressed in the insoluble form (Fig. 2) and the best conditions for rhGM-CSF expression in BL21(DE3) strain were reached 24 hours after reaching the logarithmic phase, in the absence of IPTG induction. Expression of rhGM-CSF protein was not observed in the soluble fraction of BL21(DE3) strain (data not shown).

3.3. Purification of hGM-CSF expressed in *E. coli*

The rhGM-CSF protein expressed as IBs was recovered by IB isolation and washing, solubilization of the aggregated protein, and refolding of the solubilized protein. The recombinant protein was purified using only two chromatographic columns, the first was a cationic exchange column followed by an anionic exchange column. Fractions eluted from the HiPrep Resource S cationic exchange column at 10-12% of buffer B were pooled and loaded on a MonoQ column. Fractions corresponding to 29-33% of buffer D were pooled. SDS-PAGE analysis (Fig. 3) shows that the purification protocol yielded homogeneous rhGM-CSF. The concentration of the homogeneous rhGM-CS was $88.7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4. N-Terminal sequence of hGM-CSF

The first 24 amino-terminal amino acid residues of purified rhGM-CSF protein were determined to be MAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEAR by mass spectrometry.

3.5. *Biological activity of rhGM-CSF*

To verify whether the homogeneous recombinant hGM-CSF protein expressed in *E. coli* has biological activity, bioassays using TF-1 cells were carried out. The samples were divided into three groups: negative and positive controls, and rhGM-CSF purified by the protocol described here. The groups were assayed in triplicates. The results showed that the protein purified using just two chromatographic columns showed activity when compared with negative control (FBS only). No significant differences were observed between the protein obtained by the process herein described and the commercially available human GM-CSF. However, when these two groups were compared with the negative control regarding changes in total cell number, percentage of dead cells or the MTT assay, significant differences were observed. The tested rhGM-CSF yielded higher cell proliferation rates (Fig. 4A) and less dead cells (Fig. 4B) than the batches of cell cultures with media containing FBS only. Furthermore, the MTT assay confirmed the results of change in cell numbers, showing a significant increase in cell proliferation after the addition of both GM-CSF preparations; likewise, the difference between rhGM-CSF and the commercial human GM-CSF positive control was not statistically significant (Fig. 4C).

4. Discussion

The high clinical demand for recombinant therapeutic proteins led to a series of clinical studies on the benefits of using myeloid growth factors in treating immune suppressed patients. To construct the entire human GM-CSF open reading frame, a

method based on a step-by-step assembly of oligonucleotides was employed as described elsewhere (Renard et al., 2007). The oligonucleotides (in pairs) were elongated by PCR amplification to yield a single DNA fragment comprising the hGM-CSF coding sequence. This method has some advantages when compared with others, which usually require a template DNA. For instance, synthesis of long deoxyribonucleotides (oligonucleotides) requires hundreds of cycles of chemical reactions that increase the mutation rate per nucleotide, which thus implies that mutations rates for long oligonucleotides are higher than for short oligonucleotides (Au et al., 1998). Thus the method used to construct the hGM-CSF coding sequence employed short oligonucleotides (~50 bp) to provide minimum sequence errors in gene assembly, which was, in turn, based on reported DNA synthesis capability (Jayaraman et al., 1991; Smith et al., 2003). Restriction sites were added to the ends of the gene in order to enable for cloning of the fragment into an expression vector, which carries the selective marker for kanamycin, preferably used for protein expression requiring Good Manufacturing Practice standards.

rhGM-CSF proteins have been expressed in different systems as CHO, bacterial and yeast cells. The rhGM-CSF expressed in CHO cells is biologically active but when the carbohydrate residues are removed this activity enhance 20-fold indicating that the deglycosylated form may be superior for clinical use (Wong et al., 1985; Kaushansky et al., 1986 and 1987; Moonem et al., 1987). When GM-CSF is expressed in *Saccharomyces cerevisiae* the protein is secreted as a heterogenous mixture of glycoproteins due to varying degree of glycosylation in the yeast cells. This heterogeneity poses several problems for therapeutic applications of this cytokine. Besides the excess amounts of different carbohydrate in the recombinant GM-CSF results in more complex purification procedures resulting in low yields (Miyajima et al.,

1986). hGM-CSF produced by recombinant DNA technology in *E. coli* (non-glycosylated form) has been shown to be similar to the glycosylated native protein in its therapeutic action (Burgess et al., 1987). Bacteria such as *E. coli* are widely used for the expression of rDNA products. They offer several advantages due to high level of recombinant protein expression, rapid growth of cell and simple media requirement (Hockney 1994). Accordingly, *E. coli* BL21(DE3) electrocompetent cells were transformed with the recombinant pET 30a (+)::hGM-CSF plasmid. SDS-PAGE analysis (Fig. 2) showed the expression of an insoluble protein as inclusion bodies with a molecular mass of ~15 kDa, consistent with that expected for rhGM-CSF (14.5 kDa). The recovery of biologically active protein from inclusion bodies has several advantages: large amounts of highly enriched protein in the inclusion bodies; these aggregates are resistant to proteolysis by *E. coli* proteases, allowing high-yield protein production and facilitating production of proteins that can be toxic or lethal to the host cell due to the fact that inclusion bodies have no biological activity (Misawa and Kumagai, 1999). Noteworthy, they can be isolated, simplifying the downstream processes of purification (Singh and Panda 2005; Choi et al., 2006). Recovery of active protein from inclusion bodies need, after cell lysis, elaborate steps of inclusion body isolation and washing, solubilization of the aggregated protein, refolding of the solubilized protein and purification procedures (Komath et al., 2003; Krishna Rao et al., 2007). In order to remove endotoxins, host DNA and host cell proteins, and to obtain the inclusion bodies with high recovery and purity, cell lysates were submitted to a number of washing steps with buffers containing different detergents (Singh and Panda., 2005). The buffer employed in the first step contains Triton X (non-ionic detergent), used to solubilize the bacterial cell wall components that contaminate the inclusion body preparation, and EDTA (divalent metal ions chelating agents) which helps to maintain

the structural integrity of the cell membrane and to prevent metal-catalyzed air oxidation of cysteines. The next washing buffer used contained sodium deoxycholate to strip away any residual cell debris particles, especially lipopolysaccharides units that contribute to the unacceptable levels of endotoxins in protein preparations from *E. coli*. The last step of washing enabled the elution of nucleic acids or other contaminants that are non-specifically bound to the GM-CSF protein inside the inclusion bodies by ionic interactions through the use of a buffer with sodium chloride. For protein solubilization, a combination of denaturant and high alkaline pH was used. Complete solubilization was achieved by using a sub-denaturant concentration of urea (2 M) and by shifting the pH of the IB pellet to pH values ranging from 11 to 12.5. The pH was then lowered to 8.0 with acetic acid and the solution diluted 20-fold with 0.1% of Tween 20 before protein refolding. Proteins that have disulphide bonds need a more elaborate refolding process. Refolding of the protein was carried out by dialysis for 12-16 hours to allow the formation of the disulphide bonds. The last dialysis buffer was sodium acetate pH 4.5 in order to prepare the recombinant protein to be loaded on a cationic exchange column. This first step of purification was used to separate some of the contaminants that remained, resulting in a high recovery of the active protein. Many protocols to purify the rhGM-CSF have been established. A purification procedure has been described for rhGM-CSF expressed in *E. coli* as inclusion bodies using a three-step chromatographic protocol (Belew et al., 1994): hydrophobic interaction, ion exchange and gel filtration. rhGM-CSF was purified using ion exchange chromatography and then the purified processed form of the protein was recovered after a reverse phase or hydrophobic interaction chromatography. As the number of chromatographic steps increases there is a reduction in protein yield because the recovery is rarely 100 %. In order to test different chromatographic conditions, reducing the number of

chromatographic columns and increasing the amount of rhGM-CSF, the pool of fractions from the cationic exchange column was loaded on an anionic exchange column, yielding a homogeneous protein with the expected molecular mass as demonstrated by SDS-PAGE analysis. N-terminal sequencing confirmed the identity of the purified protein as rhGM-CSF and that the N-terminal methionine was not removed by post-translational processing.

Proliferation of most human leukemic cells seems to be independent of normal regulation by hematopoietic growth factors but they usually fail to proliferate autonomously *in vitro* (Kitamura et al., 1989). TF-1 is a human cell line from an erythroleukemic patient that proliferates in the presence of GM-CSF, IL-3 and erythropoietin in a synergistic way. (Kitamura et al., 1989). Therefore these cells were employed to evaluate the biological activity of purified rhGM-CSF. The results showed that there was no significant difference in the activity of the samples as compared to the standard positive control. Similarly to Kitamura et al., (1989) that employed TF-1 cells in a biological assay with cytokines, difference in the activity between two or more samples can be seen as early as after 24 hours of incubation with the cytokine. Our results showed a positive effect of the rhGM-CSF over cell proliferation and a marked reduction in the number of dead cells, which corroborated the aforementioned findings.

In summary, here we describe an efficient protocol for cloning, expression and purification of rhGM-CSF. The recombinant protein was expressed in the absence of IPTG induction that may be advantageous since cost should be reduced. In addition, the protein purification protocol by liquid chromatography using only two straightforward chromatographic steps may be a valuable and cost-effective approach to large scale production. The biological analysis showed that this protocol can be useful to develop therapeutic rhGM-CSF. Public and private sectors of a number of countries have been

encouraged to share staff, funding and facilities to increase technology transfers between universities and the industry. The data presented here may be of interest to researchers and biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, which offer a great opportunity to scientific, biotechnological, economical and industrial growth.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by FARMASA (Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.) to QuatroG P & D. Financial support was also provided by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health-Department of Science and Technology and PRONEX/CNPq/FAPERGS (Brazil) to DSS. and LAB. DSS and LAB. DSS (CNPq, 304051/1975-06), LAB (CNPq, 5201182/99-5), MMC (CNPq, 306836/2007-6) and ELBJ (CNPq, 305420/2006-2) are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

References

- Au, L.C., Yang, F.Y., Yang, W.J., Lo, S.H. and Kao CF. (1998) Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin-L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 200-203.
- Barreda. D.R., Hanington, P.C. and Belosevic, M. (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 509-554.
- Belew, M., Wang, S., Nyström, L.E. and Janson, J.C. (1994) Purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from the inclusion bodies produced by transformed *Escherichia coli* cells. *J. Chromatogr. A.* 679, 67-83.
- Bradford M.M., Merorie, R.A. and Williams W.L. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brand G.D., Krause, F.C., Silva, L.P., Leite, J.R.S.A., Melo, J.A.T., Prates, M.V., Pesquero, J.B., Santos, E.L., Nakaie, C.R., Costa-Neto, C.M. and Bloch, C.Jr. (2006) Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27, 2137-2146.

Buchsel, P.C., Forgey, A., Grape, F.B. and Hamann, S.S. (2002) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches. Clin. J. Oncol. Nurs. 6, 198-205.

Burgess, A.W., Camakaris, J. and Metcalf, D. (1977) Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. J. Biol. Chem. 252, 1998-2003.

Burgess, A.W., Begley, C.G., Johnson, G.R., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Mermod, J.J., Simpson, R.J., Schmitz, A. and DeLamarter, J.F. (1987) Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood 69, 43-51.

Choi, J., Keum, K. and Lee, S. (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science 61, 876-885.

Clark, S.C. and Kamen, R. (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. Science 236, 1229-1237.

Diederichs, K., Boone, T. and Karplus, P.A. (1991) Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Science 254, 1779-1782.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Guideline
EMA/CHMP/BWP/49348/2005 Guideline on similar biological medicinal products

containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues

[www.emea.eu.int]

FDA (U.S Food & Drug Administration.) U.S Department of Health and Human Services. Therapeutic Biological Products Approvals.

[<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/druglist.cfm>]

Gasson, J.C. (1991) Molecular physiology of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77, 1131-1145.

Hockney, R.C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 12, 456-463.

Holloway, A.F., Rao, S., Chen, X. and Shannon, F.C. (2003) Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor κ B proteins. *J. Exp. Med.* 197, 413-423.

Jayaraman, K., Fingar, S.A., Shah, J. and Fyles, J. (1991) Polymerase chain reaction-mediated gene synthesis: synthesis of a gene coding for isozyme c of horseradish peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4084-4088.

Kaushansky, K., O'Hara, P.J., Berkner, K., Segal, J.M., Hagen, F.S. and Adamson, J.W. (1986) Genomic cloning, characterization, and multilineage growth-promoting activity of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3101-3105.

Kaushansky, K., O'Hara, P.J., Hart, C.E., Forstrom, J.W. and Hagen, F.S. (1987) Role of carbohydrate in the function of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Biochemistry* 26, 4861-4867.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A. and Takaku, F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or Erythropoietin. *J. Cell Physiol.* 140, 323-334.

Komath, U.D., Lodha, S. and Chigurupati, J. (2003) Process for preparing G-CSF. Patent WO2004/001056.

Krishna Rao D.V., Narasu, M.L. and Bhujanga Rao A.K. (2007) Purification method for improving process yield and quality of rhG-CSF expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (Epub ahead of print.)

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Meropol, N.J., Altmann, S.W., Shanafelt, A.B., Kastelein, R.A., Johnson, G.D. and Prystowsky, M.B. (1992) Requirement of hydrophilic amino-terminal residues for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor bioactivity and receptor binding. *J. Biol. Chem.* 267, 14266-14269.

Misawa, S. and Kumagai, I. (1999) Refolding of therapeutic protein produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers* 51, 297-307.

Miyajima, A., Otsu, K., Schreurs, J., Bond, M.W., Abrams, J.S. and Arai, K. (1986) Expression of murine and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in *S. cerevisiae*: mutagenesis of the potential glycosylation sites. *EMBO J.* 5, 1193-1197.

Moonen, P., Mermod, J.J., Ernst, J.F., Hirschi, M. and DeLamarter, J.F. (1987) Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4428-4431.

Nicola, N.A., Burgess, W.A. and Metcalf, D. (1979) Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 254, 5290-5299.

Pisani, J. and Bonduelle, Y. (2006) Opportunities and barriers in the biosimilar market: evolution or revolution for generics companies?

[<http://www.ableindia.org/biosimilars.pdf>]

Renard, G., Fonseca, I.O., Chies, J.M., Basso, L.A. and Santos, D.S. (2007) Method for obtention of Chimeric Nucleotide Sequences and Chimeric Nucleotide Sequence.

WO2007/068068 A2.

Shanafelt, A.B. and Kastelein, R.A. (1992) High affinity ligand binding is not essential for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 267, 25466-25472.

Singh, S.M. and Panda, A.K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 303-310.

Smith, H.O., Hutchison, C.A., Pfannkoch, C. and Venter, J.C: (2003) Generating a synthetic genome by whole genome assembly. ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 15440-15445.

Walter, M.R., Cook, W.J., Ealick, S.E., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P. and Bug, C.E. (1992) Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Mol. Biol.* 224, 1075-1085.

Wong, G.G., Witek, J.S., Temple, P.A., Wilkens, K.M., Leary, A.C., Luxenberg, D.P., Jones, S.S., Brown, E.L., Kay, R.M. and Orr, E.C. (1985) Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228, 810–815.

Woodcock, J., Griffin, J., Behrman R., Cherney B., Crescenzi T., Fraser B., Hixon D., Joneckis, C., Kozlowski, S., Rosenberg A., Schragar, L. Shacter, E., Temple, R., Webber, K. and Winkle, H. (2007) The FDA's assessment of follow-on protein products: a historical perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 437-442.

Figure legends

Fig 1. Agarose gel (1 %) of hGM-CSF DNA cloned into expression vector pET 30a(+). M, DNA molecular size marker (1Kb Plus Ladder, Invitrogen®); lane 1, recombinant plasmid after digestion with *NdeI* and *BamHI* restriction enzymes. The arrow indicates the size of the DNA fragment of the marker, which is consistent with 400 bp of hGM-CSF coding sequence.

Fig. 2. SDS-PAGE (12%) analysis of the rhGM-CSF protein expression.

Insoluble fractions of the superexpression experiment of rhGM-CSF in the *E. coli* strain BL21(DE3) transformed with either pET30a(+), as control, or pET30a(+):hG-CSF, as sample. The cells were grown for 24 hours after reaching the OD₆₀₀ 0.4-0.6. Lane M, molecular weight marker (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen); lane 1, control without IPTG induction; lane 2, sample without IPTG induction; lane 3, control induced with 1mM IPTG at OD₆₀₀ 0.4; lane 4, sample induced with 1mM IPTG at OD₆₀₀ 0.4.

Fig. 3. Purification of rhGM-CSF from *Escherichia coli* by SDS-PAGE 12% analysis. Lane 1, molecular weight marker (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen); Lane 2, sample purified by HiPrep Resource S cationic exchange column followed by MonoQ anionic exchange column.

Fig. 4. Functional assays of rhGM-CSF activity determination.

TF-1 cells were grown according to the conditions described in material & methods and analyzed for changes in cell numbers, percentage of dead cells and the MTT proliferation assay after 24 hours of culturing. (A) Addition of the rhGM-CSF or the

positive control GM-CSF yielded a greater number of cells compared to the group that received medium containing 10% FBS only; the difference observed between the GM-CSF and the positive control GM-CSF was found to be not significant ($P>0.05$). (B) The positive effects of both growth factors were also depicted by a significant reduction in the number of dead cells compared to FBS only. (C) The MTT assay confirmed the results of change in cell numbers, showing a significant increase in cell proliferation after the addition of both GM-CSF preparations (results are presented as means and standard errors of the mean of two assays run in triplicates; $**P<0.01$).

Figure 1

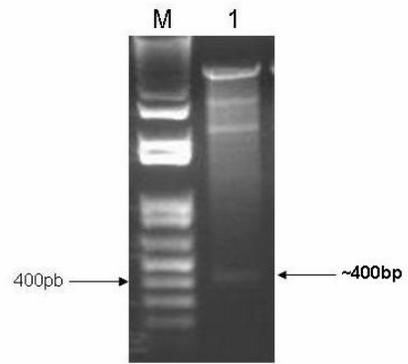


Figure 2

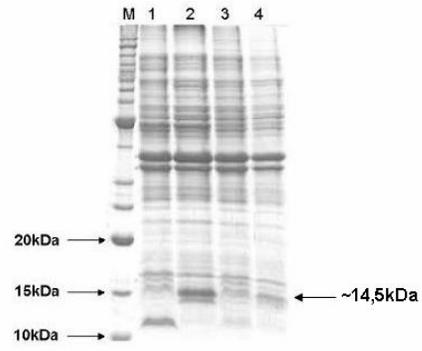
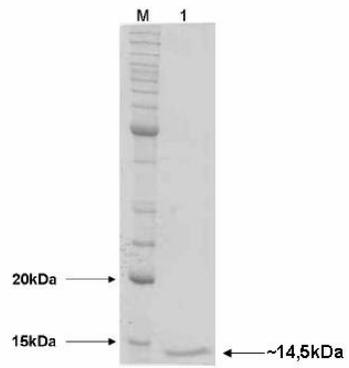
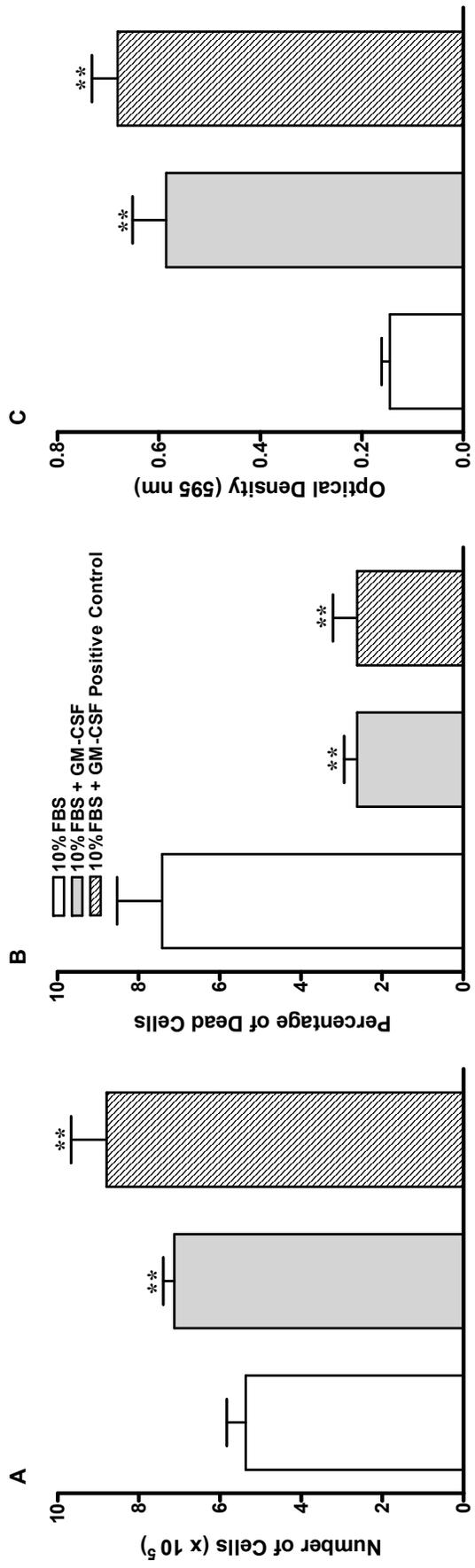


Figure 3





4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a descoberta das tecnologias recombinantes de DNA e anticorpos monoclonais, na década de 70, surge a indústria biotecnológica. Atualmente, mais de 350 medicamentos elaborados por meio da biotecnologia estão sendo aprovados para o tratamento de mais de 150 doenças, desta forma, o desenvolvimento de biofármacos representa hoje uma opção para doenças crônicas e pouco freqüentes que não possuíam terapia ou não eram suficientemente bem-sucedidas para todo tipo de paciente. Além disso, a indústria biotecnológica é a fonte mais importante de novos medicamentos, não apenas pelo ponto de vista terapêutico, mas também econômico e social.

Dentre as vantagens das proteínas terapêuticas obtidas por biotecnologia em relação aos medicamentos desenvolvidos por síntese química podemos citar: dificuldade de mimetizar as proteínas por síntese química devido à enorme complexidade das mesmas gera menos efeitos adversos devido a sua alta especificidade e ainda por serem moléculas naturais do nosso organismo são bem toleradas por gerarem pouca resposta imune, e por fim, a biotecnologia permite a produção em grande escala dos biofármacos. (Roche. Medicamentos biológicos).

Uma vez que a patente dos produtos biológicos de referência tenha expirado, é possível o desenvolvimento e produção de biossimilares os quais são aceitos pela Agência Européia de Avaliação de Produtos Médicos (EMA, sigla em inglês) e devem comprovar sua eficácia e segurança mediante ensaios clínicos. Neste trabalho nos baseamos na expiração da patente do biofármaco Molgramostima que ocorreu no ano de 2006 cujo uso é de extrema importância para o tratamento de inúmeras doenças, como nos casos de transplante de medula óssea e neutropenias associadas aos casos

de transplantes, quimioterapia e AIDS. Para tanto o gene que codifica para a proteína foi construído e clonado no vetor de expressão pET30a(+). A proteína foi expressa em células procarióticas, *E. coli*, e purificada.

Foram realizados inúmeros testes de expressão, utilizando diferentes condições como: temperatura, meios, indução de expressão com e sem IPTG e diferentes cepas de *E. coli*. Mas a melhor condição para expressão da proteína foi observada na cepa BL21(DE3) sem a indução por IPTG na forma insolúvel, como corpos de inclusão. Para solubilizar a proteína para sua posterior purificação, foram testados diferentes agentes solubilizantes em diferentes concentrações (**Anexo I**). Foram testados também diferentes protocolos de preparação da amostra e purificação (no **Anexo II** é apresentado um segundo protocolo de purificação da proteína, diferente do citado no artigo o qual foi submetido). O protocolo de purificação é baseado na lavagem dos corpos de inclusão, solubilização e desnaturação destes, *refolding* e uso de apenas duas colunas cromatográficas (troca catiônica e aniônica) para finalizar a purificação da proteína.

A atividade biológica da proteína recombinante GM-CSF *in vitro*, apresentou-se equivalente ao padrão internacional utilizado como controle positivo, comprovando a eficiência e qualidade do protocolo estabelecido.

A nível industrial a produção de um biossimilar exige não só a reprodutibilidade do processo mas também deve gerar o menor custo possível para a indústria viabilizando então, a produção do mesmo. No protocolo estabelecido alguns processos que poderiam aumentar os custos de produção foram superados como, por exemplo: expressão da proteína sem indução com IPTG e redução no número de passos durante

a purificação da proteína que não somente adiciona custos no produto final como também pode provocar perda na produção da proteína recombinante.

A metodologia desenvolvida é simples, prática, econômica e reprodutível e está sendo direcionada para o escalonamento da proteína a nível industrial. Este projeto de caráter tecnológico da produção industrial de biossimilares no Brasil é extremamente relevante, pois visa não apenas a redução dos gastos com a importação desse medicamento, mas também maior acesso da população a esses medicamentos.

ANEXO I

Testes de solubilização

1 Agentes solubilizantes

Para estabelecer o protocolo de solubilização da proteína rhGM-CSF cuja expressão em BL21(DE3) a 37°C, ocorre em corpos de inclusão foram testados diferentes agentes solubilizantes. As células foram rompidas por sonicação e a fração insolúvel separada para posterior tentativa de solubilização. A amostra foi separada em 5 tubos de polipropileno (1,5 mL) e ressuspensa com 1 mL de cada agente solubilizante (Uréia 8 M, 6 M e 4 M e Cloreto de Guanidina 6 M e 4 M). Após 1 hora de agitação em temperatura ambiente, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação sob 48 000 x *g* a 4 °C por 30 min. Os agentes solubilizantes foram retirados da fração solúvel por meio de diálise contra o tampão Tris/HCl 50mM pH 8,0. As frações solúvel e insolúvel foram novamente separadas como descrito acima e analisadas em SDS-PAGE (**Figura 1**).

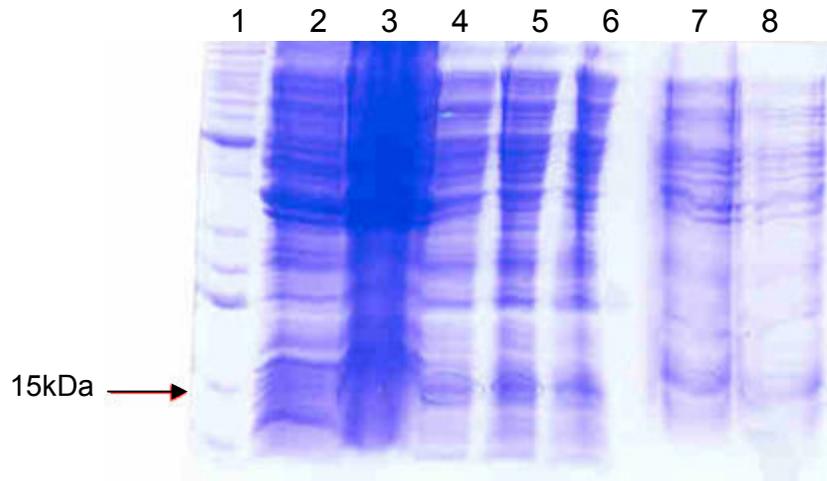


Figura 1. Análise da fração solúvel do rhGM-CSF em SDS-PAGE 12% após teste de solubilização com diferentes agentes solubilizantes. Canaleta 1: marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen); canaleta 2: pET30a(+) controle; canaleta 3: GM-CSF::pET30a(+); canaleta 4: uréia 8 M; canaleta 5: uréia 6 M; canaleta 6: uréia 4 M; canaleta 7: GndCl 6 M; canaleta 8: GndCl 4 M.

Como pode ser visto na **Figura 1** a solubilização de rhGM-CSF foi eficiente com os dois agentes solubilizantes (uréia e cloreto de guanidina) nas diferentes concentrações. Por meio deste experimento foi possível estabelecer os agentes que serão utilizados para solubilizar a proteína, neste caso optou-se por uréia a 4 M. A retirada de toda uréia é realizada por meio de diálise e a fração solúvel é separada para purificação.

Anexo II

Testes de purificação

A seguir está apresentado outro protocolo de purificação da proteína rhGM-CSF além daquele mencionado no artigo submetido. Este segundo protocolo também apresentou se mostrou eficaz e, por esta razão, está anexado à dissertação.

1) Este protocolo de purificação foi adaptado a partir do artigo de Belew et al., publicado no periódico "*Journal of Chromatography*" A, 679 (1994) 67-83, intitulado: "Purification of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from inclusion bodies produced by transformed *Escherichia coli* cells".

Seguem a seguir os sete passos para a preparação da amostra antes de purificá-la:

Primeiro a fração insolúvel contendo a proteína expressa de forma insolúvel na cepa de *E. coli* BL21(DE3) é ressuspensa em tampão A (20 mM fosfato de sódio + 0,125M NaCl + 5 mM EDTA pH7,6) na razão de 1g de célula para 10 mL de tampão e então as células foram rompidas na prensa de French (50 MPa). Após centrifugação (por 30 minutos, a 4°C e 48.000 x g) a fração insolúvel foi ressuspensa com metade do volume anterior com tampão B (tampão A + 5% Zwittergent 3-14 pH 7,5). A solução foi agitada por 5 minutos e centrifugada da mesma forma que anteriormente. Os próximos passos de lavagem do pellet (fração insolúvel) são: lavagem com tampão C (tampão A + 0,5 M uréia pH 8,1) no mesmo volume do passo anterior e por fim lavagem com tampão A novamente. Entre os passos de lavagem foram seguidos o mesmo protocolo de agitação e centrifugação descritas anteriormente. A próxima etapa é a solubilização

do pellet com o agente solubilizante cloreto de guanidina 7 M (para cada grama de proteína foram usados 4 ml de tampão). A amostra ficou agitando por 3 horas a 4°C e novamente centrifugada. A fração solúvel foi submetida ao processo de *refolding* com tampão E (20 mM trisHCl, 1 mM glutathiona reduzida, 0,1 mM glutathiona oxidada, 0,1% zwittergent 3-14, pH 8.0). O processo de *refolding* foi realizado a 4°C sendo que a concentração do cloreto de guanidina foi sendo baixado aos poucos adicionando quantidade suficiente de tampão E na amostra sob constante agitação. Para retirar completamente o agente solubilizante a amostra foi dializada contra volume suficiente de tampão E. A amostra foi centrifugada e o resultado de cada etapa foi visualizado em gel SDS-PAGE 12%.

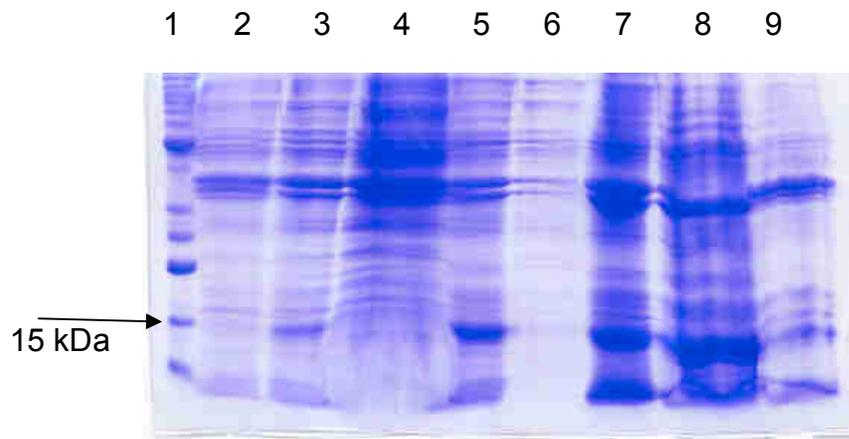
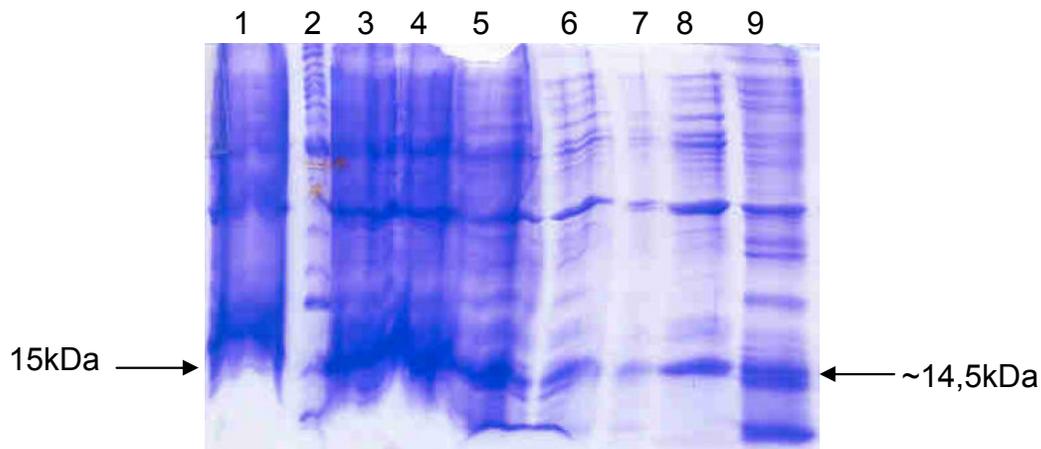


Figura 1. Análise das etapas de solubilização do rhGM-CSF em SDS-PAGE a 12%.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (Low Range, Invitrogen); canaleta 2: pET30a(+) controle; canaleta 3: GM-CSF::pET30a(+); canaleta 4: pós zwittergent – solúvel; canaleta 5: pós zwittergent – insolúvel; canaleta 6: pós uréia 0,5 M – solúvel; canaleta 7: pós uréia 0,5 M – insolúvel; canaleta 8: pós GCl 7 M – solúvel; canaleta 9: pós GCl 7 M – insolúvel.



Figura

2: Análise das etapas de *refolding* do rhGM-CSF em SDS-PAGE 12%. Canaleta 1: GCI 6 M solúvel; canaleta 2: marcador de peso molecular (Low Range, Invitrogen); canaleta 3: GCI 5 M solúvel ; canaleta 4: GCI 4 M solúvel; canaleta 5: GCI 3 M solúvel; canaleta 6: GCI 2 M solúvel ; canaleta 7: GCI 1 M solúvel; canaleta 8: pós diálise – solúvel ; canaleta 9: pós diálise – insolúvel.

1.B) Purificação da proteína utilizando FPLC:

Conforme o protocolo de purificação estabelecido por Belew *et al* (1994), três colunas cromatográficas foram utilizadas:

- Interação hidrofóbica: Phenyl Sepharose FF;
- Troca iônica: Q Sepharose FF;
- Exclusão por tamanho: Sephacryl S200

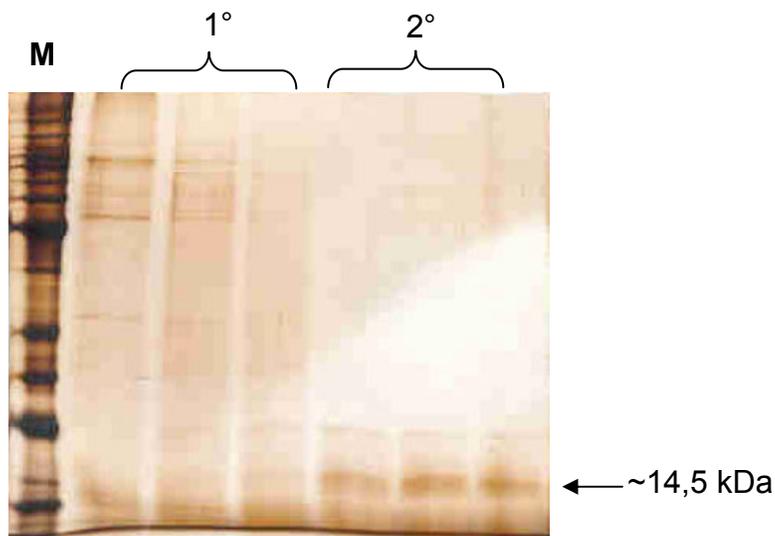


Figura 3. Análise das etapas de purificação na coluna Sephacryl S200, em SDS-PAGE 12% corado com prata. M: marcador de peso molecular (Low Range, Invitrogen); 1°: frações do primeiro pico eluído da coluna: proteínas contaminantes eluídas; 2°: frações do segundo pico eluído da coluna mostrando o rhGM-CSF (~14,5 kDa).

Conforme os resultados apresentados nas figuras 1, 2 e 3, tanto a solubilização e o *refolding* como a purificação da proteína utilizando o processo descrito no trabalho de Belew *et al* (1994) foram eficazes, entretanto a concentração final obtida da proteína pura foi muito baixa. Para tanto foi testado outro protocolo de purificação que se baseou na patente da proteína G-CSF número PCT/US2002/019945, descrito no manuscrito submetido.

Os dois protocolos de purificação da proteína, descritos anteriormente, foram eficientes para purificar a proteína recombinante humana GM-CSF expressa em *E. coli*, porém apenas por meio do segundo protocolo obteve-se uma quantidade significativa de proteína. Esta amostra da proteína rhGM-CSF purificada foi então submetida a ensaio biológico conforme descrito no manuscrito presente neste trabalho (A Figura 3 do manuscrito, apresenta a proteína pura analisada em SDS-PAGE 12% e a Figura 4

apresenta os resultados obtidos do ensaio biológico que estão descritos na seção de resultados e discussão do mesmo).

ANEXO III

From: Journal of Biotechnology [mailto:jbiotech@genetik.uni-bielefeld.de]
Sent: Fri 2/29/2008 10:42 AM
To: Luiz Augusto Basso
Subject: Submission Confirmation

Dear Basso,

Your submission entitled "Human Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor: synthesis of coding DNA sequence, heterologous expression in Escherichia coli, and purification of bioactive recombinant protein." has been received by Journal of Biotechnology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Biotechnology

Referências

1. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980;56(6):947-58.
2. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M et al. *Biologia Celular e Molecular*. 5ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2005.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002.
4. Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.* 1977;252:1998-2003.
5. Sheridan JW, Metcalf D. A low molecular weight factor in lung-conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation *in vitro*. *J. Cell Physiol.* 1973;81(1):11-23.
6. Farrar WL, Brini AT, Harel-Bellan A, Korner M, Ferris DK. Hematopoietic growth-factor signal transduction and regulation of gene expression. *Immunol. Ser.* 1990;49:179-410.
7. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of Myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 2004;28:509-554.

8. Miyatake S, Otsuka T, Yokota T, Lee F, Arai K. Structure of the chromosomal gene for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparison of the mouse and human genes. *EMBO J.* 1985;4(10):1561-2568.
9. Burgess AW, Begley CG, Johnson GR, Lopez AF, Williamson DJ., Mermod, J.J, Simpson RJ, Schmitz A, DeLamarter JF. Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1986;69:43-51.
10. Diederichs K, Boone T, Karplus PA. Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 1991;254(5039):1779-1782.
11. Walter MR, Cook WJ, Ealick SE, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bug CE. Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Mol. Biol.* 1992;224(4),1075-85.
12. Shanafelt AB, Kastelein RA. Identification of critical regions in mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by scanning-deletion analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86(13):4872-6.
13. Nicola NA, Burgess WA, Metcalf D. Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *JBC* 1979;254(12),5290-9.

14. Gasson JC. Molecular physiology of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991;77:1131-1145.

15. Holloway AF, Rao S, Chen X, Shannon MF. Changes in Chromatin Accessibility Across the GM-CSF Promoter upon T cell Activation Are Dependent on Nuclear κ B Proteins. *J. Exp. Med.* 2003;197(4):413-423.

16. Schwager I, Jungi TW. Effect of human recombinant cytokines on the induction of granulocyte-macrophage procoagulant activity. *Blood* 1994;83:152-160.

17. Huleihel M, Douvdevani A, Segal S, Apte RN. Different regulatory levels are involved in the generation of hematopoietic cytokines (CSFs and IL-6) in fibroblasts stimulate by inflammatory products. *Cytokine* 1993;5:47-56.

18. Rasko JEJ, Gough NM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The cytokine handbook*, 2nd ed. London: Academic Press, 1994;343-369.

19. Griffin JD., Cannistra SA, Sullivan R, Demetri GD, Ernest TJ, Kanakura Y. The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptors. *Int. J. Cell. Cloning.* 1990;8(1):35-44; discussion 44-45.

20. Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA. Expression cloning of a receptor form human Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J.* 1989;8(12):3667-3676.

21. Park LS, Martim U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, Larsen A. Cloning of the low affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992;89(10):4295-9.
22. Gorman DM, Itoh N, Kitamura T, Schreurs J, Yonehara S, Yahara I, Arai K, Miyajima A. Cloning and expression of a gene encoding an interleukine 3 receptor-like protein: identification of another member of the cytokine receptor gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990;87(14):5459-5463.
23. Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Koyota T, Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990;87:9655-9659.
24. Chiba S, Shibuya K, Piao YF, Tojo A, Sasaki N, Matsuki S, Miyagawa K, Miyazono K, Takaku F. Identification and cellular distribution of distinct proteins forming human GM-CSF receptor. Cell. Regul. 1990;1(4):327-335.
25. Griffin JD., Spertini O, Ernest TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. J. Immunol. 1990;145:576-584.

26. Nimer SD, Uchida H. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukine 3 expression. *Stem Cells*. 1995;13(4):324-335.
27. Winstall E, Gamache M, Raymond V. Rapid mRNA degradation Mediated by the c-fos 3' AU-Rich Element and that mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 3' Au-Rich Element Occur through Similar Polysome-Associated Mechanism. *Mol. Cel. Biol*. 1995;15:3796-3804
28. Ernst TJ, Ritchie AR, Demetri GD, Griffin JD. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J. Biol. Chem*. 1989;264:5700-5703.
29. Ernst TJ, Ritchie AR, O'Rourke R, Griffin JD. Colony stimulating-factor gene expression in human acute myeloblastic leukemia cells in posttranscriptionally regulated. *Leukemia* 1989;3:620-625.
30. Metcalf D, Nicola NA. The hemopoietic colony-stimulating factors: from Biological to clinical applications. NY: Cambridge University Press: New York, 1995.
31. Arai N, Naito Y, Watanabe M, Masuda ES, Yamaguchi IY, Tbusoi A, Heike T, Matsuda I, Yokota K, Koyano-Nakagawa N. Activation of lymphokine genes in T cells: role of cis-acting DNA elements that respond to T cell activation signals. *Pharmacol Ther* 1992;55(3):303-318.

32. Shannon MF, Gamble JR, Vadas MA. Nuclear proteins interacting with the promoter region of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85(3):674-678.
33. Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS. ARED: human AURich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* 2004;29(1):246-254.
34. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenem DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:5830-5845.
35. Shang C, Attema J, Cakouros D, Cockerill PN, Shannon MF. Nuclear factor of activated T cells contributes to the function of the CD28 response region of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter. *Int. Immunol.* 1999;11:1945-1956.
36. Tsuboi A, Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Arai K, Arai N. Calcineurin potentiates activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in T cells: involvement of the conserved lymphokine element. *Mol. Biol. Cell* 1994;5:119-128.
37. Hatfield SM, Roehm NW. Cyclosporine and FK506 inhibition of murine mast cell cytokine production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992;260:680-688.

38. Yoshikawa H, Tasaka K. Supression of mast cell activation by glucocorticoid. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 2000;48:487-495.
39. Brattsand F, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. Aliment. Pharmacol. Ther. 1996;2:81-90; discussion 91-92.
40. Singh SM, Panda AK.. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J. Biosci. Bioeng. 2005;99(4):303-10.
41. Roche. Medicamentos biológicos. Disponível em:
<http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD28951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>
42. Imunohematologia. Disponível em: [<http://ioh.medstudents.com.br>].
43. Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets. Disponível em: [<http://www.biopharma.com>]
44. IMS. INTELLIGENCE APPLIED. Disponível em: [[http:// www.imshealth.com](http://www.imshealth.com)]
45. Yoon HA, Aleyas AG, Geroge JA, Park SO, Han YW, Lee JH, Cho JG, Eo SK. Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylatic DNA vaccine against Pseudorabies virus through enhanced immune responses. Microbiol. Immunol. 2006;50(2):83-92.

46. Cruciani M, Mengoli C, Serpelloni G, Mazzi R, Bosco O, Malena M. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as an adjuvant for hepatitis B vaccination: A meta analysis. *Vaccine* 2007;25(4):709-18.

47. Gonzales-Juarrero M, Hattle JM, Izzo A, Kipnis APJ, Shim TS, Trapnell BC, Cooper AM, Orme IM. Disruption of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77:914-922.

48. BRASIL. Ministério da Saúde. Programa de medicamentos excepcionais. Disponível em: [http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/do_m27_01.pdf]

49. Beltrame A. Ampliação do acesso a medicamentos de alto custo: uma análise da política brasileira. Rio de Janeiro, 2002. 103p. Dissertação (Mestrado em Administração de Saúde) – Instituto de Medicina Social: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2002.

50. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 862, de 04 de novembro de 2002. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Neutropenia: tratamento com estimuladores de colônias das células progenitoras da medula óssea. Disponível em: [http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/do_m27_01.pdf]