



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

NATASHA KUNIECHICK

**PRODUÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE  
GRANULÓCITOS HUMANO RECOMBINANTE (rhG-CSF) EM BIORREATOR**

Porto Alegre

2013

NATASHA KUNIECHICK

**PRODUÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE  
GRANULÓCITOS HUMANO RECOMBINANTE (rhG-CSF) EM BIORREATOR**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio  
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre

2013

NATASHA KUNIECHICK

**PRODUÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE  
GRANULÓCITOS HUMANO RECOMBINANTE (rhG-CSF) EM BIORREATOR**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio  
Grande do Sul.

Aprovado em 27 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Cristiano Valim Bizarro – PUCRS (Relator)

Dr. Spartaco Astolfi Filho - UFAM

Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Porto Alegre

2013

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao Dr. Diógenes Santiago Santos e à Dra. Jocelei Maria Chies pela confiança depositada e pelas oportunidades oferecidas que, sem dúvida, contribuíram muito para meu crescimento profissional.

A todos amigos da Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, pela dedicação e esforços prestados durante os experimentos. Agradeço também por toda amizade e momentos de alegria compartilhados, assim como a ajuda e força nos momentos difíceis, que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, pelo apoio, incentivo e amizade.

Um agradecimento especial à minha família e namorado, pelo carinho, conforto e motivação em todos os momentos.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. <b>Atividade biológica da G-CSF</b> .....	<b>11</b>
1.2. <b>Caracterização molecular do G-CSF</b> .....	<b>12</b>
1.3. <b>Interação com o receptor</b> .....	<b>13</b>
1.4. <b>Uso clínico do G-CSF</b> .....	<b>15</b>
1.5. <b>Biofármacos</b> .....	<b>15</b>
1.6. <b>Importância social e econômica</b> .....	<b>16</b>
1.7. <b>Cultivos de altas densidades celulares</b> .....	<b>17</b>
1.8. <b>Produção do G-CSF na forma de corpos de inclusão</b> .....	<b>18</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>20</b>
3.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>4. MANUSCRITO</b> .....	<b>21</b>
4.1. <b>Bioreactor production of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF)</b> .....	<b>21</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>53</b>
7.1. <b>ANEXO A</b> .....	<b>53</b>
7.2. <b>ANEXO B</b> .....	<b>54</b>
7.3. <b>ANEXO C</b> .....	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática da hematopoiese com indicação dos sítios de ação do G-CSF .....	12
Fonte: Adaptado de Bishop <i>et al.</i> , 2001 .....	12
Figura 2: Estrutura tridimensional da proteína G-CSF .....	13
Figura 3: Rota de sinalização Jak-STAT ativada por citocina.....	14

## LISTA DE ABREVIÇÕES

**4YT** - Meio de cultura 4YT

**AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CFU** - Unidades formadoras de colônias

**CSFs** - Fatores estimuladores de colônia

**CTFAR** - Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos

**DO** – Oxigênio dissolvido

**DOC** – Concentração de oxigênio dissolvido (do inglês, *dissolved oxygen concentration*)

**DO-stat** - Controle pelo suprimento de oxigênio dissolvido

***E. coli*** – *Escherichia coli*

**ESI-MS** – Espectrometria de massa por ionização tipo electrospray

**FPLC** - Cromatografia líquida de rápida performance

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta performance

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**JAKS** - Janus Cinases

**kDa** – quilo Dalton

**LB** – Meio de cultura Luria Bertani

**LC-MS/MS** - Espectrometria de massas com fragmentação induzida por colisão

**M9**- Meio de cultura mínimo M9

**MCB** – Banco de células mãe (do inglês, *Master cell bank*)

**OD<sub>600</sub>** – Densidade óptica a 600 nm

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**pH-stat** – Controle por meio do pH

**G-CSF**- Fator estimulador de colônias de granulócitos

**rhG-CSF** – Fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante

**RP-HPLC** - Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

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

**SEC-HPLC** – Cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho

**STATs** – Transdutores de sinal e ativadores da transcrição

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**TB** – Meio de cultura *Terrific Broth*



## RESUMO

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma das principais citocinas hematopoiéticas envolvidas na defesa do sistema imune contra agentes infecciosos, estimulando e regulando a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos na medula óssea. É uma molécula que possui uma sequência de 174 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. Como estratégia de prevenção da neutropenia, o G-CSF (ou filgrastima) é utilizado clinicamente com sucesso em pacientes com câncer, cujo tratamento requer altas doses de quimioterapia, tanto em adultos como em crianças. Além disso, o G-CSF pode ser utilizado para reforçar o sistema imunológico em pacientes com HIV, pneumonia, infecções decorrentes da diabetes, leucemia e neutropenia febril. Atualmente, a filgrastima não é produzida no Brasil, conseqüentemente, todo medicamento adquirido pelo governo é importado. Tendo em vista sua ampla aplicação clínica, a produção em larga escala do G-CSF se faz necessária para suprir a demanda do mercado nacional e diminuir os custos com importação desse biofármaco. Neste trabalho um protocolo para a produção desta proteína foi desenvolvido, utilizando técnicas de DNA recombinante por meio de experimentos de superexpressão e cultivo em biorreator, solubilização e purificação da G-CSF recombinante. A proteína foi expressa em células *Escherichia coli* C41(DE3) em cultivos de batelada alimentada em biorreator, utilizando indução com IPTG e uma estratégia de alimentação linear ascendente, que nos permitiu obter um alto percentual de estabilidade plasmidial, baixo acúmulo de acetato no meio de cultivo, uma biomassa de aproximadamente 31 g/ L e elevados níveis de expressão da proteína em forma de corpos de inclusão, que foram solubilizados utilizando ureia 2 M e pH alcalino. A proteína recombinante foi purificada obtendo-se aproximadamente 1,22 mg de proteína recombinante homogênea por grama de células úmida, correspondendo a um rendimento volumétrico de 151,5 mg de rhG-CSF por litro de meio de cultura. Uma análise por espectrometria de massa também foi realizada, confirmando a identidade da proteína recombinante. Nosso trabalho mostra uma estratégia simples e eficaz para obter hG-CSF recombinante, contribuindo e estimulando a futura produção de um biossimilar nacional.

**Palavras-chave:** Biorreator; batelada alimentada; proteína recombinante; G-CSF; *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a major hematopoietic cytokine involved in the immune defense against infectious agents, stimulating and regulating the proliferation, survival and differentiation of neutrophils precursor cells in the bone marrow. The G-CSF molecule has a 174 amino acids sequence, with a molecular weight of approximately 18.8 kDa. As a strategy for neutropenia prevention, G-CSF (or filgrastim) has been successfully used in cancer patients whose treatment requires high doses of chemotherapy, in both adults and children. Moreover, this biopharmaceutical may be used to strengthen the immune system in patients with HIV, pneumonia, infections resulting from diabetes, leukemia and febrile neutropenia. Currently, filgrastim is not produced in Brazil, which obligates the government to import this medicine. Due to its wide clinical application, the large scale production of G-CSF is required to supply the demand of national market. In this work, a protocol to obtain this protein was developed using overexpression and cultivation in a bioreactor, solubilization and purification of recombinant G-CSF. The protein was expressed in *Escherichia coli* host cells C41(DE3) cultures grown in bioreactor using a fed-batch strategy. The expression of the recombinant protein was induced by IPTG. A linear ascending feeding strategy permitted high plasmid stability, low accumulation of acetate in the culture medium, a biomass of approximately 31 g/ L and high expression levels of the protein in the form of inclusion bodies which were solubilized using 2 M urea and alkaline pH. The recombinant protein was purified and yielded approximately 1.22 mg of homogeneous recombinant protein per gram of wet cells, corresponding to a volumetric yield of 151.5 mg of rhG-CSF per liter of culture medium. A mass spectrometry analysis was performed, confirming the identity of the recombinant protein. Our work shows a simple and effective strategy to obtain recombinant hG-CSF, stimulating and encouraging a future production of a national biosimilar.

**Keywords:** Bioreactor; feed-batch; recombinant protein; G-CSF; *Escherichia coli*.

## 1. INTRODUÇÃO

O sangue contém muitos tipos de células com funções variadas. Todas elas têm um tempo de vida limitado e são produzidas a partir de uma célula-tronco comum, multipotente, na medula óssea, chamada célula-tronco hematopoiética. O processo de diferenciação celular inicia-se a partir de células-tronco pluripotentes, as quais se dividem, gerando mais células-tronco (auto-renovação) e várias células progenitoras comprometidas, geralmente designadas como unidades formadoras de colônias (CFU), que são capazes de originar apenas alguns tipos celulares específicos [1].

As células progenitoras comprometidas diferenciam-se em células sanguíneas maduras (um único progenitor de neutrófilo comprometido, por exemplo, pode dar origem a um clone de milhares de neutrófilos) sob a influência de moléculas sinalizadoras. Tais moléculas são glicoproteínas e normalmente são chamadas de fatores estimuladores de colônia (CSFs). Entre elas, está o G-CSF, o fator estimulador de colônias de granulócitos (Figura 1) [2], uma citocina hematopoiética que atua, mais diretamente, na maturação dos neutrófilos sendo assim, de extrema importância na defesa imunológica do organismo [3].

### 1.1. Atividade biológica da G-CSF

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma das principais citocinas hematopoiéticas envolvidas na defesa pelo sistema imune [4], que tem função de estimular e regular a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos na medula óssea [5], as quais atuam na primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos [4,6].

O G-CSF atua principalmente promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dos neutrófilos maduros. O G-CSF também atua em outras linhagens celulares, com um papel importante na mobilização de células-tronco hematopoiéticas da

medula óssea para a circulação [3]. Também é capaz de modular a resposta inflamatória, reduzindo a liberação as citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos ativados [7].

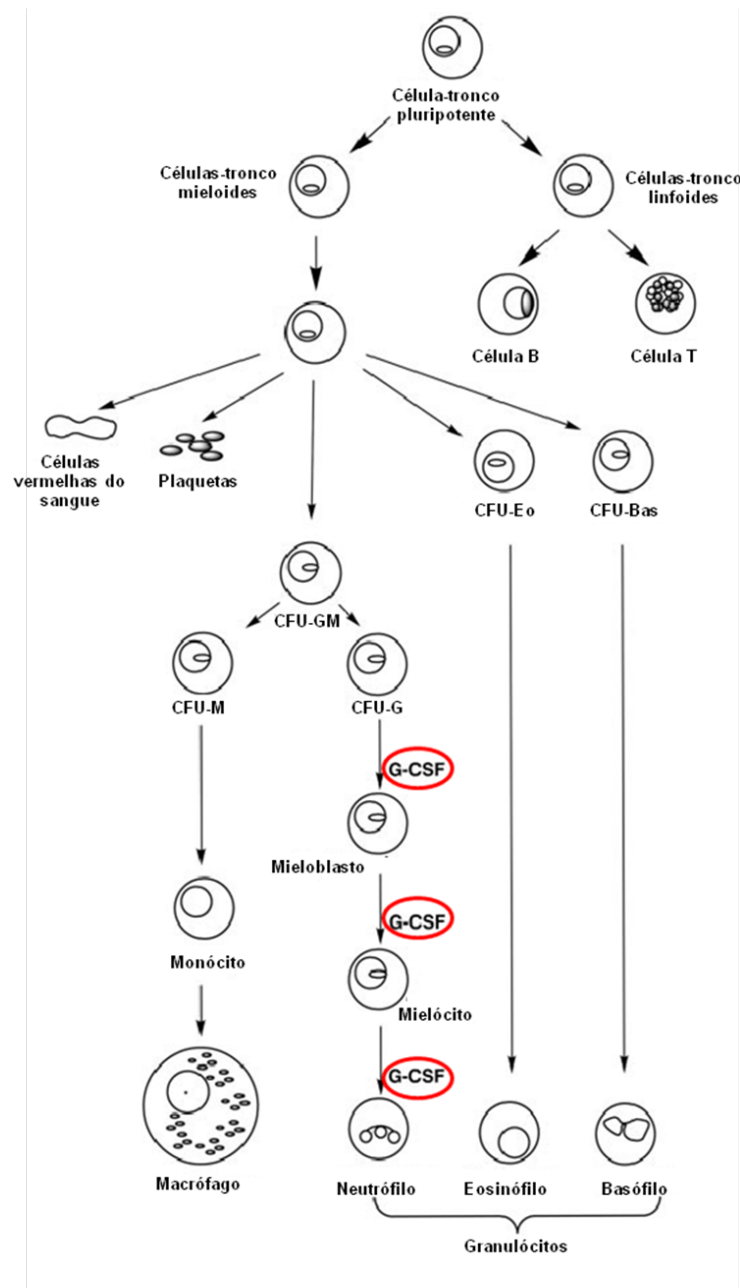


Figura 1: Ilustração esquemática da hematopoiese com indicação dos sítios de ação do G-CSF

Fonte: Adaptado de Bishop *et al.*, 2001

## 1.2. Caracterização molecular do G-CSF

A filgrastima (nome genérico da proteína G-CSF não glicosilada) é uma molécula monomérica em solução que possui uma sequência de 174 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 18,8 kDa. Esta molécula contém um resíduo de cisteína livre na posição

17 e duas pontes dissulfeto, Cys(36)-Cys(42) e Cys(64)-Cys(74), que são importantes para a estabilidade estrutural da proteína e dobramento correto da longa cadeia de aminoácidos [8]. A estrutura secundária da molécula contém aproximadamente 69% de  $\alpha$ -hélice, 4% de folha- $\beta$  e 5% de  $\beta$ -curvatura. A molécula é composta por quatro hélices, denominadas A, B, C e D, (Figura 2). A hélice A forma-se entre os resíduos 11-39, a B entre 71-91, a C entre 100-123 e a D entre 143-172 [9].

O gene que codifica para o G-CSF em humanos está localizado no cromossomo 17 q21-22[10]. A forma nativa da proteína, produzida naturalmente, é glicosilada, o que confere resistência à degradação por proteases e pode influenciar toda a estrutura proteica. A glicosilação também parece prevenir a agregação da proteína pelo aumento da solubilidade e estabilidade desta molécula que é bastante hidrofóbica em pH neutro. Porém, tanto a forma nativa quanto a não-glicosilada apresentam atividade biológica[11].



Figura 2: Estrutura tridimensional da proteína G-CSF

Fonte: Hill *et al.*, 1993

### 1.3. Interação com o receptor

Os efeitos biológicos do hG-CSF são mediados via ativação do receptor G-CSF (G-CSFR), um membro da superfamília de receptores de citocinas tipo 1 [3]. Este receptor é expresso em progenitores neutrofílicos e em neutrófilos maduros, e tem a função de transmitir sinais de proliferação, diferenciação e sobrevivência destas células. Tais receptores também podem ser encontrados em monócitos, atenuando a liberação de citocinas pró-inflamatórias quando estas se encontram inativadas.

A maioria das citocinas, incluindo o G-CSF, liga-se a receptores que podem ativar as proteínas de regulação gênica mantidas em estado latente na membrana plasmática. Os receptores de G-CSF estão associados a tirosinas cinases citoplasmáticas chamadas Jaks (Janus cinases), JAK1, JAK2 e TYK2, que são ativadas quando esta citocina liga-se ao receptor. Após a ligação, as duas cadeias e o receptor ficam próximas e as Jaks se fosforilam reciprocamente ativando-se e, por sua vez, fosforilam as tirosinas do receptor, criando um local para ligação das proteínas reguladoras gênicas citoplasmáticas STATs (do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription*) - STAT1, STAT 3 e STAT 5. Estas possuem o domínio SH2, que se liga ao receptor. Depois da ligação, as Jaks fosforilam ativando estas proteínas regulatórias causando assim a dissociação do receptor. Por meio do domínio SH2, ocorre a formação de dímeros pelas duas STATs. Estas proteínas direcionam-se ao núcleo, onde estimulam a transcrição de genes-alvo específicos (Figura 3). A resposta mediada por STATs é frequentemente regulada por mecanismo de retroalimentação negativa. Os dímeros de STAT também podem ativar genes que codificam proteínas inibitórias. Estas se ligam tanto ao receptor de citocina como na própria STAT, bloqueando a cascata de sinalização. Entretanto, este mecanismo pode não ser suficiente para bloquear totalmente a cascata, ocorrendo uma inativação das Jaks e STATs por desfosforilação, através de enzimas específicas [1].

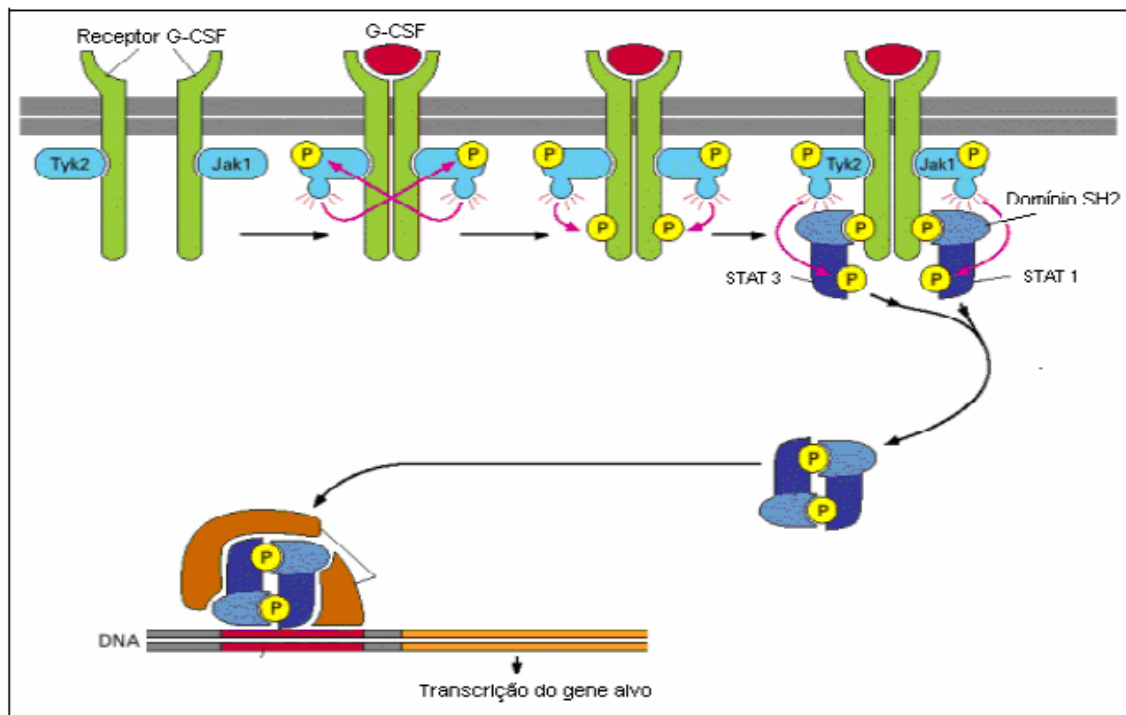


Figura 3: Rota de sinalização Jak-STAT ativada por citocina

#### 1.4. Uso clínico do G-CSF

Pacientes em tratamento quimioterápico tem as células brancas suprimidas, ficando vulneráveis a infecções e sepse. Como estratégia para prevenção da neutropenia, o G-CSF pode ser utilizado em pacientes com câncer, cujo tratamento requer doses altas de quimioterapia, reduzindo ainda o tempo de internação, os custos associados com esta condição e a mortalidade, quando utilizado profilaticamente, tanto em adultos como em crianças [12,13]. Além disso, estudos demonstram que o G-CSF pode ser utilizado com sucesso para reforçar o sistema imunológico em pacientes com HIV, pneumonia, infecções decorrentes da diabetes, leucemia e neutropenia febril [14–18].

Outros alvos para o uso de G-CSF já foram relatados, como no tratamento de infecções em pacientes não neutropênicos, a fim de melhorar sua defesa imune, bem como medida preventiva. Entre eles, há relatos de benefícios durante o tratamento de peritonites e infecção tecidual em ratos e camundongos [4,6].

Devido ao aumento do número de pacientes com problemas no coração nos últimos 40 anos, se fazem necessárias novas estratégias para o tratamento. Um estudo feito por Harada e colaboradores sugere que citocinas hematopoiéticas, como G-CSF, podem ser capazes de melhorar a função cardíaca e reduzir a taxa de mortalidade após infarto no miocárdio em camundongos. Essa ação se dá possivelmente pelo efeito protetor sobre os cardiomiócitos, a promoção da angiogênese e a prevenção da remodelação cardíaca do ventrículo esquerdo após infarto [19].

#### 1.5. Biofármacos

A filgrastima utilizada clinicamente é produzida por meio de técnicas modernas de biotecnologia, especificamente por engenharia genética. 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 [20].

*Escherichia coli* é um dos microrganismos mais utilizados como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas por ser um dos organismos com condições de cultivo, organização genética e fisiologia, mais bem caracterizado e explorado até hoje. Tais características permitiram que fossem aprimoradas técnicas para sua manipulação gênica [21]. Sendo assim, já que algumas proteínas não glicosiladas são biologicamente ativas, os sistemas

de expressão procarióticos são os preferidos para sua produção, pela simplicidade e baixo custo [22].

Os biofármacos têm revolucionado as opções de tratamento para muitas doenças. A primeira geração de medicamentos biotecnológicos data por volta dos anos 80, por isso a maioria das patentes destes medicamentos estão expiradas, como é o caso da filgrastima, na época produzida pelo laboratório Amgem Inc, que perdeu sua proteção de patente em 2006, tornando-se alvo das indústrias farmacêuticas.

A segunda geração de produtos biológicos não pode ser considerada como “genérico”, pois os testes exigidos para desenvolver estes produtos são muito mais rigorosos que os realizados para um genérico tradicional produzido por síntese química. Por esta razão, o termo usado para se referir ao biofármaco não inovador na Europa é “biossimilar” e nos EUA “*Follow on proteins*” [23]. Esta segunda geração de produtos biológicos, representa uma alternativa de menor custo para os biofármacos originais. Entretanto, a segurança e a eficácia dos biossimilares devem ser comprovadas e devem equivaler ao produto original [24,25].

### 1.6. Importância social e econômica

A garantia de acesso a medicamentos é parte integrante e essencial de uma adequada política assistencial em saúde. Em 1993, o país criou o Programa de Medicamentos Excepcionais, que é gerenciado pela Secretaria de Assistência à Saúde. São abrangidos pelo programa aqueles medicamentos de alto valor unitário e/ou usados para tratamentos crônicos, os quais se tornam excessivamente caros para serem adquiridos pela população [26]. Utilizados a nível ambulatorial, a maioria deles é de uso prolongado e parte deles integra tratamentos que duram a vida toda de um paciente. Essa política tem enorme alcance em todas as classes sociais, uma vez que, se não fossem distribuídos gratuitamente, tais medicamentos seriam acessíveis a poucas pessoas em função do alto custo. Dentre estes medicamentos, encontra-se o biofármaco filgrastima. Em novembro de 2002, o Ministério da Saúde redigiu um protocolo clínico considerando os seguintes critérios de inclusão de pacientes para o tratamento com G-CSF:

- mobilização de células progenitoras para transplante de medula óssea;
- neutropenia associada ao transplante de medula óssea (contagem de neutrófilos igual ou abaixo de 500/mm<sup>3</sup>, 21 dias após o transplante);



- neutropenia induzida por quimioterapia (período mínimo de neutropenia de 10 -14 dias com contagem de neutrófilos abaixo de  $500/\text{mm}^3$ );
- neutropenia crônica grave (contagem de neutrófilos igual ou abaixo de  $500/\text{mm}^3$ );
- Aids com neutropenia (com contagem de neutrófilos abaixo de  $1.000/\text{mm}^3$ );
- anemia aplásica grave em terapia com tripla imunossupressão (contagem de neutrófilos igual ou abaixo de  $200/\text{mm}^3$ );
- mielodisplasia com neutropenia grave e infecção de repetição (adultos com anemia refratária, com ou sem sideroblastos em anel, com contagem de neutrófilos abaixo de  $500/\text{mm}^3$  e infecções de repetição necessitando de hospitalizações [27]).

Atualmente, o biofármaco filgrastima não é produzido no Brasil, conseqüentemente, todo medicamento adquirido pelo governo é importado. Durante o ano de 2011 o SUS (Sistema Único de Saúde) gastou o equivalente a R\$ 1.357.762,56 e, até outubro de 2012, a quantia de R\$ 1.129.592,64 com as importações deste medicamento [28]

### 1.7. Cultivos de altas densidades celulares

Crescer células de *E. coli* até altas densidades é o método atualmente escolhido para a produção de proteínas recombinantes, principalmente porque o sistema permite atingir uma alta produtividade volumétrica através do aumento de biomassa e conseqüente formação de produto [29,30].

A densidade elevada dos cultivos celulares pode gerar a formação de acetato, sendo que concentrações relativamente baixas como 5 g/ L podem inibir o crescimento de *E. coli* [21]. Para contornar este problema, diversas estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas para controlar a velocidade específica de crescimento, limitando os nutrientes essenciais como fontes de carbono e nitrogênio do meio. As metodologias utilizadas sem controle *feedback* determinam a vazão de alimentação independente do andamento do cultivo e não requerem nenhum tipo especial de controlador, são elas: vazão constante, vazão elevada continuamente (linear ascendente) e alimentação exponencial. Já as alimentações com controle *feedback* são mais sofisticadas e se baseiam no controle de parâmetros físicos do cultivo, utilizando medidas *on-line* de variáveis essenciais para o processo, como oxigênio dissolvido (DO), pH e velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  para alterar a vazão de alimentação. Por exemplo, o método *DO-stat* é baseado no fato de que o oxigênio dissolvido no meio

aumenta rapidamente quando há escassez de substrato e a alimentação é adicionada quando o oxigênio dissolvido ultrapassa um valor pré-determinado. Já o método *pH-stat* se baseia na observação de que o pH se eleva quando acaba a fonte de carbono, como resultado do aumento da concentração de íons amônio excretados pela célula [21,29].

### 1.8. Produção do G-CSF na forma de corpos de inclusão

Um problema frequente durante a produção da G-CSF recombinante é a purificação da molécula solúvel biologicamente ativa [31]. Em muitos casos, os altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em células de *E. coli* resultam no acúmulo destas proteínas como agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão [32]. Estes agregados são desprovidos de atividade biológica, sendo necessário solubilizá-los e fazer sua renaturação *in vitro* para purificação da proteína em sua conformação ativa [33]. Porém, geralmente, a renaturação dos corpos de inclusão requer muitos passos operacionais resultando em um baixo rendimento de proteína ativa ao final do processo [31,34], inviabilizando seu escalonamento industrial.

No entanto, a expressão de proteínas recombinantes na forma de corpos de inclusão pode ser favorável, já que estes podem se acumular no citoplasma em altos níveis, muitas vezes ultrapassando 30% do total de proteínas expressas pela célula. Por não possuírem atividade biológica, facilitam a produção de proteínas tóxicas para a bactéria e são, na maior parte, protegidos de degradação por proteases celulares. Os corpos de inclusão também são fáceis de isolar, devido a diferenças no tamanho e densidade quando comparados às proteínas celulares [34].

As estratégias mais utilizadas para recuperação de proteínas ativas a partir de corpos de inclusão envolvem o isolamento e lavagem dos mesmos, solubilização das proteínas agregadas utilizando agentes desnaturantes como, por exemplo, ureia e guanidina, e a renaturação da proteína através da diluição do agente desnaturante.

## 2. JUSTIFICATIVA

O avanço científico tem permitido o emprego industrial de microrganismos ou células modificadas geneticamente, objetivando a produção de proteínas recombinantes em diversas áreas e, em especial, na saúde humana.

Patentes de diversos biofármacos vêm expirando, possibilitando a produção de biossimilares nacionais por meio de técnicas de DNA recombinante, através de experimentos de superexpressão, purificação e escalonamento de proteínas, tendo como consequência uma diminuição dos custos do governo com as importações dos medicamentos e evitando que seu preço varie conforme a oscilação do mercado internacional [35]. Além disso, políticas nacionais e o crescimento econômico têm estimulado a inovação e as empresas biofarmacêuticas em países emergentes [36].

O biofármaco filgrastima vem sendo empregado com sucesso durante o tratamento de pacientes com câncer, com a finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas com a neutropenia induzida por quimioterapia. Além disso, o G-CSF pode ser utilizado para reforçar o sistema imunológico em pacientes com HIV, pneumonia, infecções decorrentes da diabetes, leucemia e neutropenia febril.

Tendo em vista sua ampla aplicação clínica, a produção em larga escala do G-CSF se faz necessária para suprir a demanda do mercado nacional. A filgrastima teve sua patente expirada em 2006, tornando-se alvo das indústrias farmacêuticas. Atualmente este medicamento não é produzido no Brasil, sendo importado e acarretando um aumento nos custos públicos, já que o mesmo se encontra no Programa de Medicamentos Excepcionais [26] do governo. Portanto, a fabricação desta proteína, no mercado nacional, provocaria uma diminuição nos gastos do governo com as importações desse biofármaco de origem bacteriana, além de estimular e contribuir com a pesquisa biofarmacêutica no país.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estabelecer um protocolo para produção da proteína recombinante filgrastima em biorreator.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Estabelecer condições de expressão da proteína filgrastima recombinante em *shaker* (estufa incubadora rotatória);
2. Cultivar o clone produtor de G-CSF em biorreator BIOFLO<sup>®</sup> 410 (New Brunswick Scientific Co. Inc);
3. Obter preparação homogênea da proteína G-CSF;
4. Determinação da massa intacta da rhG-CSF para confirmação da identidade da proteína;

## **4. MANUSCRITO**

### **4.1. Bioreactor production of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF)**

**Periódico: Process Biochemistry**

**Bioreactor production of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor  
(hG-CSF)**

Natasha Kuniechick<sup>a,b,c\*</sup>, Gaby Renard<sup>a</sup>, Cláudia Paiva Nunes<sup>a</sup>, José Eduardo Sacconi Nunes<sup>a</sup>,  
Rafael Munareto<sup>a,b,c</sup>, Paula Eichler<sup>b</sup>, Joicelei Maria Chies<sup>a</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>a,b,c</sup>, Diógenes  
Santiago Santos<sup>a,b,c</sup>.

<sup>a</sup>Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA – Tecnopuc, Porto Alegre – RS, 90619-900,  
Brazil.

<sup>b</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto Nacional de Ciência e  
Tecnologia em Tuberculose, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
(PUCRS), Porto Alegre – RS, 90619-900

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PUCRS – Porto Alegre –  
RS, 90610-000, Brazil.

\*Corresponding author:

Natasha Kuniechick ([natashakuniechick@hotmail.com](mailto:natashakuniechick@hotmail.com))

Av. Ipiranga 6681, Prédio 92A CEP 90619-900, Porto Alegre – RS

Phone: +55 51 3352 6560

## ABSTRACT

The human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) have been successfully employed clinically in cases of neutropenia prevention in cancer patients whose treatment requires high doses of chemotherapy, as in patients with HIV, pneumonia, infections resulting from diabetes, leukemia and febrile neutropenia. In this work, a protocol to produce homogeneous rhG-CSF was developed. The recombinant protein was expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* C41(DE3) host cells in a fed-batch bioreactor cultivation, using a linear ascending feeding strategy which provides high plasmid stability, low acetate accumulation and high levels of protein expression. Solubilization of inclusion bodies was accomplished by employing 2 M urea and high alkaline pH. The recombinant protein was purified by one chromatography step, yielding approximately 1.22 mg g<sup>-1</sup> of homogeneous recombinant protein (wet weight), corresponding to a volumetric yield of 151.5 mg L<sup>-1</sup> of rhG-CSF. Mass spectrometry analysis confirmed recombinant protein identity. Our work shows a simple and effective strategy to obtain rhG-CSF protein, contributing and stimulating for the future production of a national biosimilar.

**Keywords:** Bioreactor; fed-batch; recombinant protein; G-CSF; *Escherichia coli*.

## INTRODUCTION

Therapeutic proteins, used in the treatment of various diseases, when generated by genetic engineering, are called biopharmaceuticals [1]. Patents of several biopharmaceuticals have expired over the years allowing the production of national biosimilars by recombinant DNA techniques, thus leading to a reduction in costs with drug importation and preventing variation on expenses due to price oscillation of the international market [2]. Furthermore, national policies and economic growth have stimulated growth and innovation of biopharmaceutical enterprises in emerging markets [3].

Currently, there is no production of Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) or filgrastim, in Brazil, which obligates the government to import this medicine. During the year of 2011, the Sistema Único de Saúde (SUS) spent the equivalent to US\$ 678,881.28 with importation of this product and, up to October 2012, this amount attained US\$ 564,796.32 [4]

The hG-CSF is one of the major hematopoietic cytokines involved in defense of the immune system [5], stimulating and regulating the proliferation, survival and differentiation of neutrophil precursors in the bone marrow [6] and acting in the first line of defense against infectious agents [5, 7].

As a strategy for neutropenia prevention, rhG-CSF is widely employed clinically in cancer patients, whose treatment requires high doses of chemotherapy, reducing the hospitalization, antibiotic use, mortality and costs associated with this condition, when used prophylactically in both adults and children [8, 9]. Moreover, rhG-CSF showed ample clinical



application being used to reinforce the immune system in patients with HIV, pneumonia, infections resulting from diabetes, leukemia and febrile neutropenia [10–14].

The G-CSF molecule sequence consists in 174 amino acids with a molecular weight of approximately 18.8 kDa [15]. In its native form, the G-CSF is naturally glycosylated, which confers resistance to degradation by proteases and can affect the entire structure of the protein, nevertheless the native form as well as the unglycosylated form has similar biological activity [16]. Structurally, it is composed of four helices connected by amino acid loops, which contribute to the molecule three-dimensional structure [17].

The clinically used filgrastim is produced by engineered biological systems, expressed by molecular cloning in bacterial or mammalian cell cultures. *Escherichia coli* is the most widely used microorganism as host for producing heterologous proteins. To date, it is the well-characterized organism with explored growth conditions, genetic organization and physiology allowing improved techniques for gene manipulation and cultivation [18].

Since some glycosylated proteins maintain their biological activity even when expressed by prokaryotic expression systems, it is a good choice for host organism, due to its simplicity and low cost [19]. Moreover, growing *E. coli* cells in high-cell-density cultivation is the method employed for industrial-scale production of recombinant proteins, mainly; because the system achieves high volumetric productivity by improving microbial biomass and product formation [20, 21].

A frequently occurring problem in production of recombinant G-CSF is the purification of a biologically active molecule [22]. In some cases, high-level expression of recombinant proteins in *E. coli* results in their accumulation as insoluble aggregates, known as inclusion bodies (IBs) [23]. These IBs are devoid of biological activity and it is necessary to solubilized the protein aggregates, refold and purify the protein to its native and active form [24].

In a previous study, developed by our group, recombinant hG-CSF was cloned into pET23a(+), and expressed by *E. coli* BL21 (DE3) in shaker. The resulting protein showed similar activity to the international standard, using a simple and economical protocol [25]. In this work, we sub cloned the gene into pET9a(+) aiming to adapt to international standards, and focused its expression in *E. coli* C41(DE3) using bioreactor fed-batch cultivation. The protein was over-expressed in the form of insoluble inclusion bodies and a solubilization process was employed. A simple one-step chromatographic purification protocol was established to ensure homogeneous protein production.

## MATERIAL AND METHODS

### *Bacterial strain and plasmid*

The hG-CSF gene, previously synthesized by Vans *et al* [25], was subcloned into pET9a(+) expression vector (Novagen) using *NdeI* and *BamHI* restriction sites. The construction (pET9a(+):G-CSF) was transformed into *E. coli* C41(DE3) cells (Novagen) by electroporation. A Master Cell Bank (MCB) was prepared with cells transformed with the recombinant plasmid stocked in 50% glycerol, at – 80 °C.

### *Shaker cultivation*

The recombinant protein expression was tested in different culture media and temperatures by shaker cultivation. Samples were harvested and disrupted by sonication to analyze the expression of rhG-CSF, soluble and insoluble fractions, by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.

### ***Bioreactor cultivation***

The cultivation of recombinant *E. coli* strains containing the G-CSF gene was done under optimized conditions for maximum expression.

The pre-inoculum medium was prepared with 500 mL of LB containing 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of kanamycin added by 300  $\mu\text{L}$  of Working Cell Bank, previously prepared from the MCB and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The culture was grown overnight in rotatory shaker at 180 rpm,  $37^{\circ}\text{C}$ . This culture was used to inoculate the bioreactor at  $\text{OD}_{600} = 0.1$ .

The batch and fed-batch culture experiments were conducted in a BIOFLO<sup>®</sup> 410 (New Brunswick Scientific Co., Inc) with a stirred tank, filled with 5 L of 4YT culture medium (32  $\text{g L}^{-1}$  tryptone, 10  $\text{g L}^{-1}$  NaCl, 20  $\text{g L}^{-1}$  yeast extract), supplemented with 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of kanamycin, at  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7.2. For pH control, 12% (v/v) ammonium hydroxide and 10% (v/v) phosphoric acid were used. The bioreactor was equipped with one Rushton impeller and one CD-6 impeller, agitation, aeration, temperature and pH controllers. A polarographic electrode was used to measure the percentage of dissolved oxygen concentration (DOC). Culture samples were collected to determine the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ , glucose, acetic acid and dry cell weight. The DOC, pH, stirrer speed, base and acid consumption, and aeration rate were measured online and were recorded by an external data acquisition and control system BioComand Plus version 3.30 (New Brunswick Scientific Co., Inc).

In the batch culture the dissolved oxygen concentration was maintained at 30% by varying agitation rate (400-1000 rpm) with constant aeration (12 Lpm). Growth profile was analyzed to determine fed-batch starting point and the process was finished when the biomass culture reached stationary phase.

Fed-batch cultivations were started as batch cultures, and the feeding solution (1X 4YT, 300 g L<sup>-1</sup> glucose, 40 mM MgSO<sub>4</sub> and 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin) was added at 5 hours (approximately OD<sub>600</sub> 5.0). DOC was maintained in cascade with agitation and aeration at 1 vvm.

The linear ascending feeding strategy was used with a profile form of

$$F = at + b$$

Where  $F$  is the feeding rate (mL min<sup>-1</sup>),  $t$  the cultivation time after initiation of the fed-batch culture (min),  $a$  and  $b$  the feeding constants. The  $b$  constant was defined as 0.256 mL min<sup>-1</sup> and the  $a$  constant was 0.00068 mL min<sup>-1</sup>.

Expression of the rhG-CSF was induced by adding 3 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30 h of culture.

### ***Washing of inclusion bodies, solubilization and refolding***

The procedure of washing inclusion bodies and solubilization was described in a previous study by Vans *et al.* [25]. In brief, the cell paste was resuspended in 50 mM Tris buffer pH 8.0 at a pellet:buffer ratio of 1:10 (w/v) and disrupted using a TS Series Bench Top (Constant Systems Ltd) at 30 kpsi. The lysate solution was centrifuged at 48,000 ×  $g$  for 30 minutes at 4°C and the supernatant was discarded. The pellet containing the inclusion bodies was subjected to a three-step wash procedure in order to eliminate endotoxins, proteins and DNA of the host cells, in a 1:40 (w/v) ratio with specific buffers, at room temperature, and centrifuged for 30 min at 4 °C between each step. The first buffer used contained 50 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA and 2% Triton X-100. The pellet obtained from previous step was resuspended in the second buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% sodium

deoxycholate) and in the third wash step, the buffer containing 50 mM Tris buffer, pH 8.0, 5 mM EDTA, and 1 M NaCl was used, proceeding as in the previous wash steps.

The solubilization and denaturation of inclusion bodies was performed using 2 M urea as solubilization agent and high alkaline pH. The sample was centrifuged at  $48,000 \times g$  for 30 minutes at 4°C and the soluble fraction was dialyzed against 50 mM Tris buffer pH 8.0 and after this, against 25 mM Sodium Acetate pH 4.5 (buffer A).

### ***Purification of rhG-CSF protein***

An HPLC Äkta System (GE Healthcare) was employed in the purification protocol. The soluble protein was purified on a cation exchange column, HiPrep SP XL 16/10 (GE Healthcare), at 4°C, preequilibrated with buffer A and monitoring was carried out by measuring the UV absorbance at 215, 254, and 280 nm simultaneously. The column was washed with 5 volumes of buffer A and adsorbed protein elution was performed using a salt gradient of 0–1 M NaCl in buffer A.

The recombinant hG-CSF eluted with approximately 250 mM of NaCl concentration at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Fractions of the eluted sample were then pooled, dialyzed against buffer A and stored at -80°C.

### ***Mass spectrometry analysis***

Purified rhG-CSF samples were desalted, reconstituted in methanol 50% /formic acid 1% and directly injected into an IonMax electrospray ion source. The electrospray source parameters were as follows: positive ion mode, 5 kV of applied tension to the electrospray source, 40 V of capillary tension, 200°C of capillary temperature, and 100 V of tube lens tension. Full spectra (600–2000 m/z range) were collected during 20 min on a Thermo

Orbitrap Discovery XL (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA) in profile mode at a nominal resolution  $r=30,000$  at  $m/z$  400 using FT automatic gain control target value of 1,000,000 charges. The average of 1000 spectra was processed with the software MagTran [26] for charge state deconvolution for average molecular mass determination. Monoisotopic molecular mass determination was obtained with the software Xtract (Thermo Fisher Scientific Corp.).

### ***Analytical Methods***

Samples were periodically collected for quantitative analysis during the cultivation in bioreactor. The protein expression was analyzed by SDS-PAGE 15% and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Biomass concentration was determined as optical density (OD) at 600 nm (Ultrospec 3100 *pro*, GE Healthcare) and converted to dry cell weight using a standard curve calibration. Plasmid stability of cultures was determined by replica plating method [27] where the percentage of viable colonies resistant to kanamycin was calculated. Glucose concentration in the medium was measured with an YSI glucose analyzer (2700 Select, Yellow Springs Instruments). Acetate concentration was determined by high performance liquid chromatography (Äkta Purifier, GE Healthcare) with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories) at 25°C using 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> and monitored by UV detector at 210 nm. All the experiments were performed in duplicate.

Protein purification was analyzed by 15 % SDS-PAGE and stained with Silver Stain Kit (Bio-Rad). The protein concentrations were determined by the method of Bradford *et al.* [28] using a commercial assay kit with bovine serum albumin standards (Bio-Rad Laboratories).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Bioreactor cultivation*

EMEA guide for Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology states that it is undesirable, during the production of therapeutic proteins, to use agents which are known to provoke sensitivity in certain individuals, such as penicillin or other  $\beta$ -lactam antibiotics [29], therefore the pET9a(+) vector, which harbors the gene that confers resistance to kanamycin instead ampicillin, was chosen for expression.

The optimized expression conditions from the shaker cultivations were applied to bioreactor batch and fed-batch cultures, employing 4YT culture medium, at 37°C, in all experiments (data not shown).

In batch cultivation, the maximum biomass production was approximately 3 g L<sup>-1</sup> at 5 h of cultivation, thereafter the culture entered the stationary phase. Therefore, this stage was selected to start the fed-batch phase, where a linear ascending feeding profile was applied to enhance the biomass and subsequent production of rhG-CSF protein.

In fed-batch culture, the expression of rhG-CSF was induced by addition of IPTG at 3.0 mM final concentration (Figure 1) and the maximum biomass level achieved was approximately 31 g L<sup>-1</sup> at 50h of cultivation.

Scale-up strategy consists of a comprehensive and detailed process characterization to identify stress factors and parameters influencing product yield and quality, which have been optimized beforehand. In industrial scale, closed-loop feeding controls are very rare, due to

unviability of use robust on-line measurements of essential process variables. Therefore, feeding rates have been controlled, preferentially, by off-line measurement of essential state variables [20, 30]. The feeding strategy used in this work is very simple and does not require a special type of parameter-adaptive controller.

The plasmid maintenance is an essential prerequisite to obtain high product yields, and it is usually affected by culture conditions like aeration, pH control, induction time, temperature [31]. Our results show that plasmid stability remained in 100% of viable cells, throughout the cultivation.

When *E. coli* cells are grown anaerobically, in presence of excess of glucose, acetate accumulation can occur [32, 33]. The maximum acetate concentration obtained in the fed-batch cultures was lower than  $1 \text{ g L}^{-1}$ , which is much lower than the growth-inhibitory concentration reported by Lee [18], where values above  $5 \text{ g L}^{-1}$  at pH 7.0 can reduce biomass yield and product formation.

Figure 2 shows the time course of biomass production, acetate formation and plasmid stability of *E. coli* C41(DE3) cells in bioreactor fed-batch cultivation.

### ***Washing of inclusion bodies, solubilization and refolding***

TS Series Bench Top system disrupt cells by forcing them into a small aperture, provoking high shear forces, leading cells to another chamber with much lower pressure, causing them to grow in size and finally by hitting a target at high speed, making it an effective and economical technique for cell extract preparation. After this, washings procedures were performed, using nonionic detergents such Triton X, EDTA, sodium deoxycholate and sodium chloride. These detergents were employed to promote the solubilization of the bacterial cell wall components, remove metal ions and any residual cell



debris particles (especially lipopolysaccharides that are responsible to the unacceptable levels of endotoxins in preparations derived from *E. coli*) and displace nucleic acids or other contaminants that are non-specifically bound to the G-CSF protein in the inclusion bodies by ionic interactions.

Generally, refolding of IBs proteins into bioactive forms requires many operational steps and typically results in very low recovery of refolded protein [22, 34], being unviable at industrial scale. On the other hand, protein aggregates in the form of inclusion bodies may be favorable because it represents, in many cases, a highly enriched form of the expressed protein. To solubilize the inclusion bodies, it is necessary to use denaturing agents in high concentrations and the denatured proteins are then refolded [35]. Wang *et al.* [36] studied pH and urea concentration effects of on the solubilization of rhG-CSF inclusion bodies in detail. Their results showed that pH had very important effect on the solubilization of rhG-CSF inclusion bodies and low concentration of urea has synergetic function with high pH on the solubilization. Our protocol employed a low concentration of denaturing agent associated with high alkaline pH. As anteriorly reported by our group, the use of this procedure was able to generate a bioactive protein, in an *in vivo* model where neutropenia was induced in mice by a single dose of ifosfamine [25].

### ***Purification of rhG-CSF protein***

The soluble rhG-CSF protein was purified to homogeneity using a HiPrep 16/10 SP XL cation exchange column. No contaminants were detected on SDS-PAGE, stained with Silver Stain Kit (Bio-Rad), from the final step of purification (Figure 3).

The established purification protocol yielded approximately 1.22 mg g<sup>-1</sup> of homogeneous recombinant (wet cell weight), corresponding to a volumetric yield of 151.5 mg L<sup>-1</sup> of rhG-CSF.

Dehaghani *et al.* [37] have reported a protocol for *E. coli* batch cultivation production of 720 mg L<sup>-1</sup> homogeneous rhG-CSF. However, the concentration of urea used by the authors to solubilize IB is higher compared with our protocol and the chromatographic column Mono Q employed by them is unviable to be used industrially. Moreover, the *E. coli* strain used for protein expression in their work was transformed with a pET23a plasmid, which implies use of  $\beta$ -lactam antibiotics, unwelcome during production of therapeutic proteins [29].

The purification protocol here described represents an efficient and scalable method to obtain homogeneous rhG-CSF protein, using only one cation exchange chromatography step, different from other reported studies, where more than one chromatographic step was required or where a size exclusion chromatography was used, the latter being less suitable at industrial scale [38–40].

### ***Mass spectrometry analysis***

Deconvolution of the data from ESI-MS revealed one major peak of 18,798.7478 Da, which corresponds to the expected mass for G-CSF subunit with a methionine residue added in the N-terminal position (18,798.6583 Da), as shown in Figure 4A. The average spectrum of the 1000 scans used for deconvolution of the mass/charge state is shown in Figure 4B. The identity of the protein was then confirmed with a difference of 0.0895 Da.

## CONCLUSION

In this work, rhG-CSF was expressed in *E. coli*, in the form of inclusion bodies, by a fed-batch cultivation using a linear ascending strategy. The cultivation resulted in high plasmid stability, low acetate accumulation and high levels of protein expression. The IBs solubilization in 2 M urea at pH 12 was successfully achieved and the purification protocol here described, using only one chromatographic column, is simple, economical and efficient to obtain homogeneous rhG-CSF protein. The results reported represent a promising and effective strategy to rhG-CSF production, being the first steps to the scale-up and development of a national biosimilar, reducing government expenses with importation of this medicine and stimulating biopharmaceuticals research in the country.

## ACKNOWLEDGMENTS

The financial support for this work was provided by FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda.

## REFERENCES

- [1] Walsh G *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, 2006
- [2] Riché M (2006) Opportunities for UK Companies in Biopharmaceuticals and Biotechnology in Brazil. UK Trade and Investment.
- [3] Rezaie R, McGahan AM, Frew SE, Daar AS, Singer PA (2012) Emergence of biopharmaceutical innovators in China, India, Brazil, and South Africa as global competitors and collaborators. *Health Res Policy Syst* 10:18
- [4] DATA SUS. at <[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)>
- [5] Hartung T, Aulock S von, Wendel A (1998) Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. *Med Microbiol Immunol* 187(2):61–69
- [6] Metcalf D (1986) The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67(2):257–267
- [7] Hübel K, Engert A (2003) Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary. *Ann. Hematol.* 82(4):207–213
- [8] Bhana N (2007) Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review. *Curr Opin Oncol* 19(4):328–335

- [9] Wittman B, Horan J, Lyman GH (2006) Prophylactic colony-stimulating factors in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat. Rev.* 32(4):289–303
- [10] Kuritzkes DR, Parenti D, Ward DJ, Rachlis A, Wong RJ, Mallon KP, Rich WJ, Jacobson MA (1998) Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial. G-CSF 930101 Study Group. *AIDS* 12(1):65–74
- [11] Babalola CP, Nightingale CH, Nicolau DP (2004) Adjunctive efficacy of granulocyte colony-stimulating factor on treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in neutropenic and non-neutropenic hosts. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(6):1098–1100
- [12] Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AV, Philpott-Howard J, Edmonds ME (1997) Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 350(9081):855–859
- [13] Harousseau JL, Witz B, Lioure B, Hunault-Berger M, Desablens B, Delain M, Guilhot F, Le Prise PY, Abgrall JF, et al. (2000) Granulocyte colony-stimulating factor after intensive consolidation chemotherapy in acute myeloid leukemia: results of a randomized trial of the Groupe Ouest-Est Leucémies Aigues Myeloblastiques. *J. Clin. Oncol.* 18(4):780–787
- [14] García-Carbonero R, Mayordomo JI, Tornamira MV, López-Brea M, Rueda A, Guillem V, Arcediano A, Yubero A, Ribera F, et al. (2001) Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 93(1):31–38

- [15] Lu HS, Boone TC, Souza LM, Lai P-H (1989) Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 268(1):81–92
- [16] Oh-eda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, Kojima T, Orita T, Tomonou K, Yamazaki T, Ochi N (1990) O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.* 265(20):11432–11435
- [17] Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D (1993) The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *PNAS* 90(11):5167–5171
- [18] Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14(3):98–105
- [19] Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, Baba H, Oishi T, Ohtsuka E, et al. (1987) Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene* 54(2-3):197–202
- [20] Riesenber D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(4):422–430
- [21] Shiloach J, Fass R (2005) Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* 23(5):345–357
- [22] Tiwari K, Shebannavar S, Kattavarapu K, Pokalwar S, Mishra MK, Chauhan UK (2012) Refolding of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: effect of cysteine/cystine redox system. *Indian J. Biochem. Biophys.* 49(4):285–288

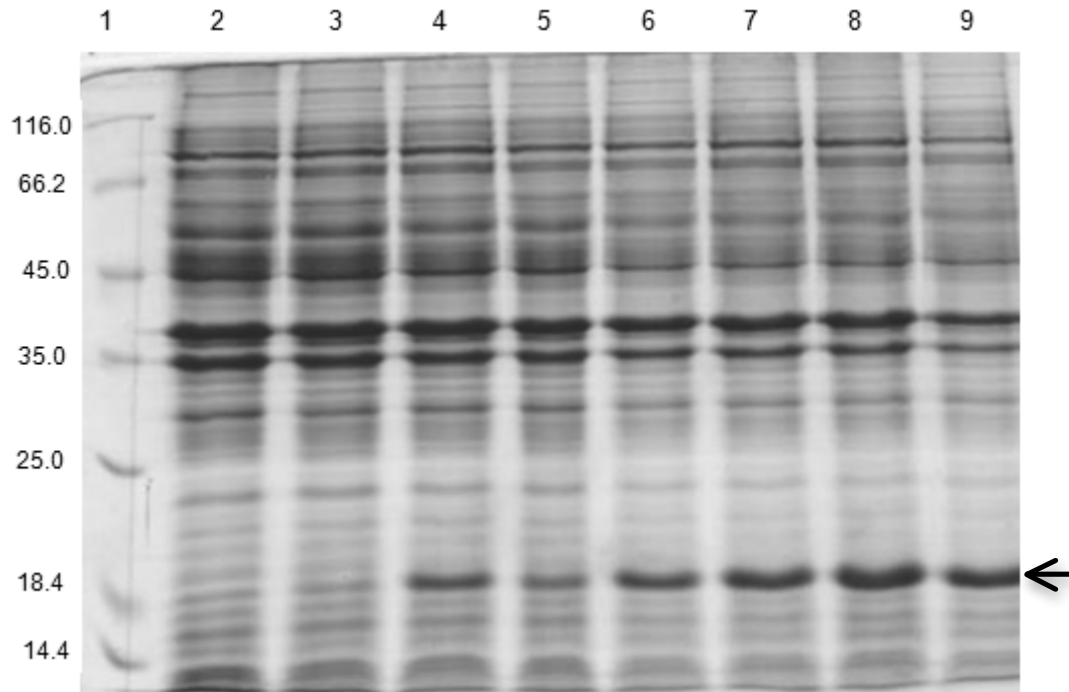
- [23] Kane JF, Hartley DL (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 6(5):95–101
- [24] Vallejo LF, Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* 3(1):11
- [25] Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, Santos DS (2008) Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories* 7(1):13
- [26] Zhang Z, Marshall AG (1998) A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9(3):225–233
- [27] Lederberg J, Lederberg EM (1952) REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS. *J Bacteriol* 63(3):399–406
- [28] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- [29] European Medicines Agency (EMA) (1987) EUDRALEX Volume 3 - Medicinal Products for Human Use : Guidelines. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant dna Technology.
- [30] Luttmann R (n.d.) Mathematical modelling, parameter identification and adaptive control of single cell protein processes in tower loop bioreactors. *Advances in biochemical engineering, biotechnology* 32:95–205

- [31] Friehs K (1991) Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.
- [32] Vollbrecht D, Nawawy MAE (1980) Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9(1):1–8
- [33] Varma A, Boesch BW, Palsson BO (1993) Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8):2465–2473
- [34] Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(4):303–310
- [35] Wang C, Wang L, Geng X (2007) [Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Escherichia coli* by using protein folding liquid chromatography]. *Se Pu* 25(4):514–517
- [36] Li M, Fan H, Liu J, Wang M, Wang L, Wang C (2012) High pH Solubilization and Chromatography-Based Renaturation and Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor from Inclusion Bodies. *Appl Biochem Biotechnol* 166(5):1264–1274
- [37] Dehaghani S, Babaeipour V, Mofid M, Divsalar A, Faraji F (2010) An efficient method for high recovery of recombinant human granulocyte colony stimulating factor from recombinant *E. coli*. *International Journal of Environmental Science and Development* 1(2):111–114
- [38] Khalilzadeh R, Mohammadian-Mosaabadi J, Bahrami A, Nazak-Tabbar A, Nasiri-Khalili MA, Amouheidari A (2008) Process development for production of human

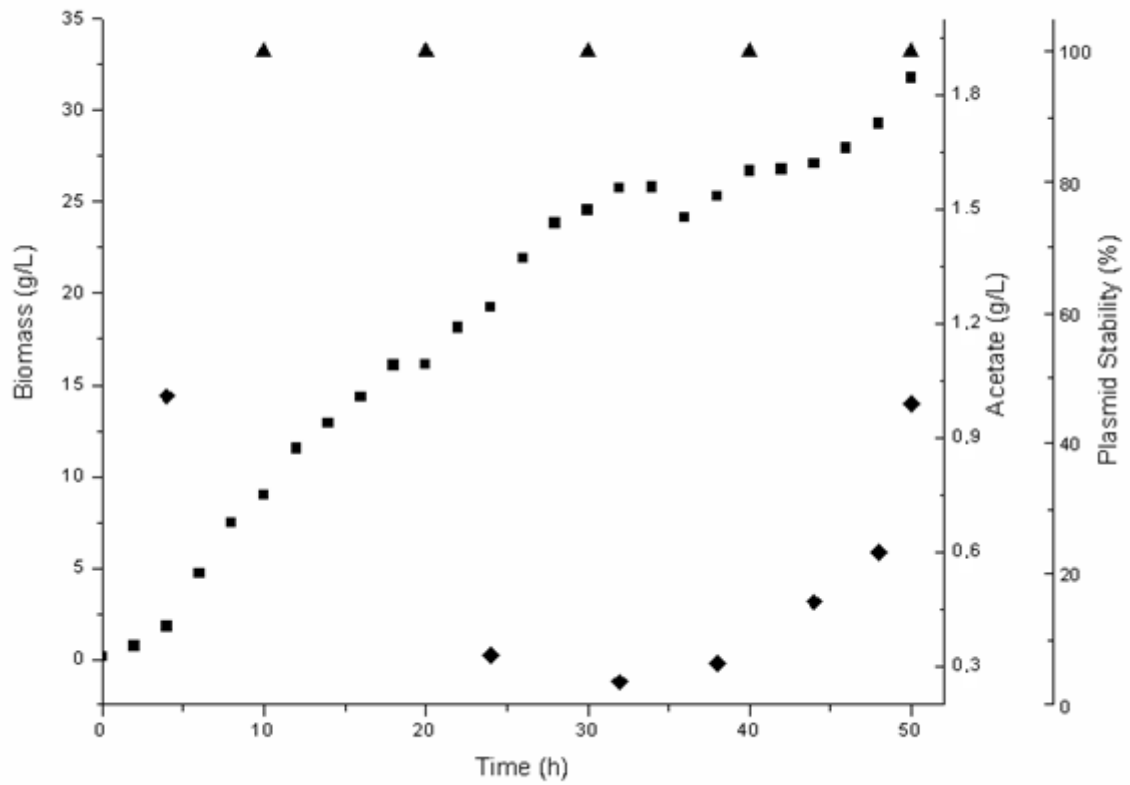


granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(12):1643–1650

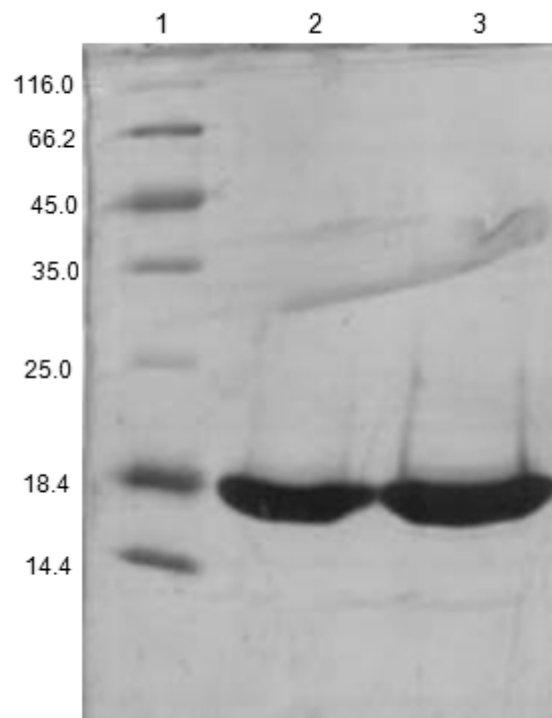
- [39] Wang C, Wang L, Geng X (2006) Renaturation of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Produced from *Escherichia coli* Using Size Exclusion Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 29:203–216
- [40] Wang C, Wang L, Geng X (2008) High Recovery Refolding of rhG-CSF from *Escherichia coli* , Using Urea Gradient Size Exclusion Chromatography. *Biotechnol. Prog.* 24:209–213

**Figures:**

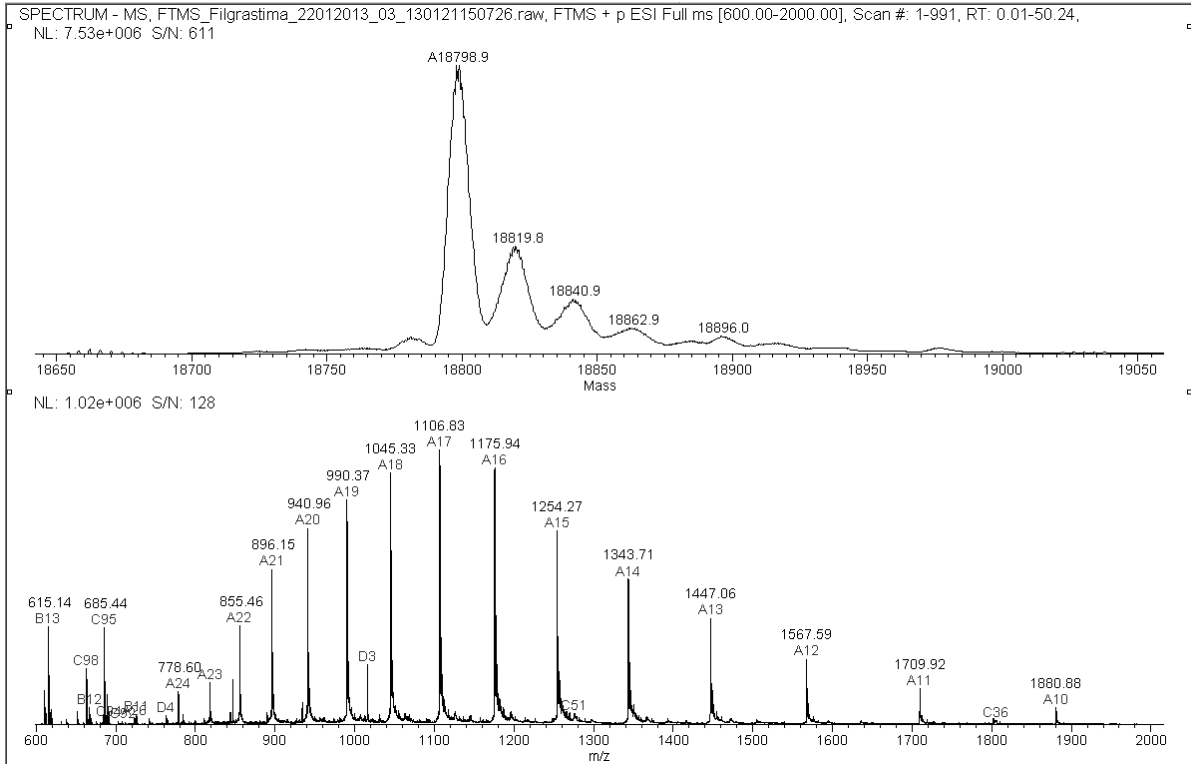
**Figure 1 - SDS-PAGE analysis of rhG-CSF bioreactor expression in the form of insoluble inclusion bodies.** Lane 1: molecular marker Protein weight marker (Fermentas); lanes 2: sample with 28h without induction, lanes 3-9: samples with 32h, 36h, 40h, 44h, 48h, 50h and 52h respectively, after induction with IPTG. The predicted molecular mass of G-CSF is 18,8 kDa as indicated by the arrow.



**Figure 2 - Biomass, plasmid stability and acetate formation data per cultivation time.**  
 Biomass (■); Acetate formation (◆); Plasmid stability (▲).



**Figure 3 - SDS-PAGE of rhG-CSF purification stained with silver.** Lane 1: molecular marker Protein weight marker (Fermentas); lane 2: soluble sample after denaturation of IBs procedure and refolding; lane 3: homogeneous rhG-CSF eluted from HiPrep SP XL 16/10 (GE Healthcare) column. Lanes 2 and 3 contain 4  $\mu$ g of total protein each. The predicted molecular mass of rhG-CSF is 18,8 kDa.



**Figure 4 – A.** deconvolution of data using magTran showing mass peaks. Peak indicated with A is correspondent to the rhG-CSF expected molecular mass (18798.9); **B.** ESI-MS average spectrum from 1000 scans of rhG-CSF with peaks indicating mass/charge ratio at different charge states (A10 to A24, from right to left).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biofármaco filgrastima, ou G-CSF, vem sendo empregado com sucesso durante o tratamento de pacientes com câncer, com a finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas com a neutropenia induzida por quimioterapia. Além disso, o G-CSF pode ser utilizado para reforçar o sistema imunológico em pacientes com HIV, pneumonia, infecções decorrentes da diabetes, leucemia e neutropenia febril. Tendo em vista sua ampla aplicação clínica, a produção em larga escala do G-CSF se faz necessária para suprir a demanda do mercado nacional, já que toda filgrastima utilizada no Brasil é importada. Neste trabalho um protocolo para a produção desta proteína foi desenvolvido, utilizando técnicas de DNA recombinante.

O gene que codifica para o G-CSF humano foi construído [37] e clonado em vetor de expressão pET9a(+). A proteína foi expressa em células de *E. coli* C41(DE3) na forma de corpos de inclusão, com aparente massa molecular de 18,8 kDa a 37°C em meio 4YT em agitador orbital (*shaker*) conforme descrito no ANEXO I. O vetor pET9a(+) foi escolhido devido a presença do gene que confere resistência à canamicina ao invés de ampicilina, tendo em vista que é indesejável durante a produção de proteínas terapêuticas, a utilização de agentes que possam provocar sensibilidade em certos indivíduos, como a penicilina ou outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos [38]. Estas condições, previamente otimizadas em *shaker*, foram utilizadas durante os cultivos em biorreator de 2 L (ANEXO II), onde foram testadas diferentes estratégias de batelada alimentada, com controle *feedback* (DO-*stat* e pH-*stat*) e sem controle *feedback* (lineares) visando maior produção de biomassa e expressão da proteína. Além disso, foram analisadas durante todos os cultivos realizados, diferentes variáveis, dentre elas o tempo de indução e concentração de IPTG, consumo de glicose, formação de acetato e estabilidade plasmidial, parâmetros importantes de serem monitorados e utilizados em um posterior escalonamento.

Os experimentos prévios em biorreator de 2 L nos permitiram obter resultados mais rápidos, já que o mesmo possui duas dornas acopladas, além da economia no que diz respeito

ao seu menor volume de trabalho. Os parâmetros pré-determinados em biorreatores de 2 L (estratégia de alimentação, tempo de indução, concentração de IPTG e oxigênio dissolvido) foram reproduzidos com sucesso em cultivos em biorreator de 5 L.

Os melhores resultados foram alcançados utilizando uma estratégia simples de alimentação linear ascendente, com 5 h de cultivo, que não requer nenhum tipo especial de controlador robusto de parâmetros adaptativos, o que é preferido para um posterior escalonamento industrial [29].

A indução foi realizada pela adição de 3 mM de IPTG ao meio de cultura com 30h de cultivo, após testes variando o horário e as concentrações do indutor. A indução de genes localizados no plasmídeo com o uso de IPTG pode originar um efeito tóxico para as células, diminuindo sua estabilidade [39]. Provavelmente por esta razão, induzindo a cultura somente após 30h, a expressão da proteína mostrou-se ligeiramente elevada quando analisada em SDS-PAGE. Além disso, foram alcançados valores de biomassa de 31 g/ L e 100% das células viáveis testadas continham o plasmídeo recombinante até o final do cultivo. A estabilidade plasmidial é um requisito de extrema importância para se obter alto rendimento quando se trabalha com proteínas recombinantes, e pode ser afetado por inúmeras condições de cultivo, tais como aeração, pH, indução, temperatura, dentre outras [39]. Este resultado também pode estar relacionado com o uso de um vetor de expressão que contém um gene de resistência a canamicina, já que outros autores descreveram a provável ligação da instabilidade plasmidial com a rápida degradação da ampicilina em culturas de batelada alimentada, onde há diminuição da pressão seletiva do meio de cultivo [40].

Outro problema muito comum encontrado em cultivos de alta densidade celular é a formação de acetato. Quando células de *E. coli* são crescidas em condições anaeróbias, na presença de excesso de glicose, o acetato é produzido [41,42]. A máxima produção de acetato durante nossos cultivos foi menor que 1 g/ L. Já foi descrito em literatura que valores de aproximadamente 5 g/ L em pH 7,0 podem reduzir a taxa de crescimento, biomassa e densidade celular [21]. Sendo assim, em nosso trabalho, a produção de acetato não foi significativa.

A formação de agregados de proteínas na forma de corpos de inclusão, como é o caso da G-CSF, pode ser favorável porque representa em muitos casos, uma alta expressão da proteína. Para solubilizar estes agregados, é necessário o uso de agentes desnaturantes em altas concentrações e estas proteínas devem ser renaturadas para sua conformação original [42]. O protocolo utilizado neste trabalho para solubilização dos corpos de inclusão já havia

sido demonstrado anteriormente pelo nosso grupo [37]. Utilizamos ureia como agente desnaturante na concentração de 2 M e pH alcalino, um método eficiente e econômico que nos permitiu solubilizar os agregados de proteína com sucesso.

O protocolo de purificação estabelecido, utilizando apenas uma coluna cromatográfica, rendeu aproximadamente 1,22 mg de proteína homogênea por grama de célula úmida, o que corresponde a uma produtividade volumétrica de 151,5 mg de rhG-CSF por litro de meio de cultura. O protocolo de purificação aqui descrito não requer múltiplos passos de cromatografia e representa um método eficiente e escalonável para obter a proteína rhG-CSF homogênea, utilizando apenas uma coluna catiônica. Após isto, a identidade da proteína homogênea foi confirmada por análise em espectrometria de massa.

Amostras da rhG-CSF homogênea foram enviadas ao Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR) situado no Centro de Ciências da Saúde do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), credenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob coordenação do professor Dr. Sérgio Dalmora para realização dos ensaios biofísicos por RP-HPLC (cromatografia líquida de fase reversa) e SEC-HPLC (cromatografia por exclusão de tamanho) e ainda análises para determinação e comparação da atividade biológica em roedores.

Os resultados apresentados neste trabalho, demonstram uma estratégia promissora e efetiva para posterior escalonamento e produção de rhG-CSF industrialmente, de forma simples e econômica. É importante ressaltar que estes são os primeiros passos para o desenvolvimento de uma filgrastima nacional, reduzindo os gastos do governo com as importações deste biofármaco e estimulando a pesquisa com biossimilares no país.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alberts. Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos. In: *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- [2] Bishop B, Koay DC, Sartorelli AC, Regan L. Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability. *J. Biol. Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33465–33470.
- [3] Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 2004 May 3;28(5):509–554.
- [4] Hartung T, Aulock S von, Wendel A. Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. *Med Microbiol Immunol.* 1998 Oct 1;187(2):61–69.
- [5] Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood.* 1986 Feb 1;67(2):257–267.
- [6] Hübel K, Engert A. Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary. *Ann. Hematol.* 2003 Apr;82(4):207–213.
- [7] Boneberg EM, Hartung T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm. Res.* 2002 Mar;51(3):119–128.
- [8] Lu HS, Boone TC, Souza LM, Lai P-H. Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1989 Jan;268(1):81–92.
- [9] Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *PNAS.* 1993 Jun 1;90(11):5167–5171.
- [10] Simmers RN, Webber LM, Shannon MF, Garson OM, Wong G, Vadas MA, et al. Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1987 Jul;70(1):330–332.
- [11] Oh-eda M, Hasegawa M, Hattori K, Kuboniwa H, Kojima T, Orita T, et al. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.* 1990 Jul 15;265(20):11432–11435.
- [12] Bhana N. Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review. *Curr Opin Oncol.* 2007 Jul;19(4):328–335.

- [13] Wittman B, Horan J, Lyman GH. Prophylactic colony-stimulating factors in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat. Rev.* 2006 Jun;32(4):289–303.
- [14] Kuritzkes DR, Parenti D, Ward DJ, Rachlis A, Wong RJ, Mallon KP, et al. Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial. G-CSF 930101 Study Group. *AIDS.* 1998 Jan 1;12(1):65–74.
- [15] Babalola CP, Nightingale CH, Nicolau DP. Adjunctive efficacy of granulocyte colony-stimulating factor on treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in neutropenic and non-neutropenic hosts. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004 Jun;53(6):1098–1100.
- [16] Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AV, Philpott-Howard J, Edmonds ME. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet.* 1997 Sep 20;350(9081):855–859.
- [17] Harousseau JL, Witz B, Lioure B, Hunault-Berger M, Desablens B, Delain M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor after intensive consolidation chemotherapy in acute myeloid leukemia: results of a randomized trial of the Groupe Ouest-Est Leucémies Aigues Myeloblastiques. *J. Clin. Oncol.* 2000 Feb;18(4):780–787.
- [18] García-Carbonero R, Mayordomo JI, Tornamira MV, López-Brea M, Rueda A, Guillem V, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001 Jan 3;93(1):31–38.
- [19] Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 2005 Mar;11(3):305–311.
- [20] Spada S, Walsh DG. *Directory of Approved Biopharmaceutical Products.* CRC Press; 2005.
- [21] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1996 Mar;14(3):98–105.
- [22] Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, et al. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene.* 1987;54(2-3):197–202.
- [23] Rader RA. What Is a Generic Biopharmaceutical? Biogeneric? Follow-On Protein? Biosimilar? Follow-On Biologic? *BioProcess International.* 2007 Mar;5(3):20–28.
- [24] Covic A, Kuhlmann MK. Biosimilars: recent developments. *Int Urol Nephrol.* 2007;39(1):261–266.
- [25] Schellekens H. How similar do “biosimilars” need to be? *Nat Biotech.* 2004 Nov;22(11):1357–1359.

- [26] BRASIL. Ministerio da Saude. Programa de Medicamentos Excepcionais. [Internet]. [cited 2011 Aug 17]; Available from: [http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/04\\_programa.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/04_programa.pdf)
- [27] BRASIL. Ministerio da Saude. Portaria SAS/MS n° 862, de 04 de novembro de 2002. Protocolo Clinico e Diretrizes Terapeuticas. Neutropenia: tratamento com estimuladores de colonias das celulas progenitoras da medula ossea. [Internet]. [cited 2011 Aug 18]; Available from: [http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/do\\_n27\\_03.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/pcdt/do_n27_03.pdf)
- [28] DATA SUS [Internet]. [cited 2013 Oct 1]; Available from: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)
- [29] Riesenber g D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999 Apr;51(4):422–430.
- [30] Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* 2005 Jul;23(5):345–357.
- [31] Tiwari K, Shebannavar S, Kattavarapu K, Pokalwar S, Mishra MK, Chauhan UK. Refolding of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: effect of cysteine/cystine redox system. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2012 Aug;49(4):285–288.
- [32] Kane JF, Hartley DL. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology.* 1988 Maio;6(5):95–101.
- [33] Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories.* 2004 Sep 2;3(1):11.
- [34] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2005 Abril;99(4):303–310.
- [35] Riché M. Opportunities for UK Companies in Biopharmaceuticals and Biotechnology in Brazil. UK Trade and Investment. [Internet]. 2006; Available from: <http://www.uktradeinvest.gov.uk/ukti/biotechnology>
- [36] Rezaie R, McGahan AM, Frew SE, Daar AS, Singer PA. Emergence of biopharmaceutical innovators in China, India, Brazil, and South Africa as global competitors and collaborators. *Health Res Policy Syst.* 2012;10:18.
- [37] Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories.* 2008 Apr 4;7(1):13.
- [38] European Medicines Agency (EMA). EUDRALEX Volume 3 - Medicinal Products for Human Use : Guidelines. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant dna Technology. [Internet]. 1987 Dec [cited 2013 Feb 25]; Available from: <http://dg3.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab1aen.pdf>
- [39] Friehs K. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. 1991 Aug;
- [40] Ensley BD. Stability of Recombinant Plasmids in Industrial Microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology.* 1986 Jan;4(3):263–277.

- [41] Vollbrecht D, Nawawy MAE. Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1980 Mar 1;9(1):1–8.
- [42] Varma A, Boesch BW, Palsson BO. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993 Aug 1;59(8):2465–2473.

## 7. ANEXOS

### 7.1. ANEXO A

#### **Testes de expressão da proteína rh-GCSF clonada no vetor pET9a(+)**

A otimização da produção de uma proteína recombinante passa por algumas etapas antes dos testes em biorreator. É importante que alguns parâmetros como a escolha do microrganismo, temperatura e meio de cultivo tenham sido estudados e determinados previamente em *shaker*, economizando tempo devido ao maior número de experimentos que pode ser realizado ao mesmo tempo nesse tipo de equipamento. A superexpressão da proteína G-CSF recombinante humana foi comparada em diferentes cepas de *E. coli*, como C41(DE3), BL21(DE3) NH, BL21(DE3) Star, Rosetta gami 2(DE3) e C43(DE3). Estas cepas foram transformadas por eletroporação, com o plasmídeo recombinante pET9a(+) contendo o gene que codifica a proteína G-CSF, previamente sintetizado por Vans e colaboradores[37] e incubadas em *shaker*, sob agitação constante de 180 rpm, com e sem indução por IPTG. Muitas das condições testadas não apresentaram expressão da proteína alvo, e por isso foi necessário testar diferentes meios de cultura (LB, TB, M9 e 4YT) e temperaturas (30 e 37°C). As melhores condições de expressão da proteína rhG-CSF, foram observadas quando utilizada a cepa C41(DE3) em meio 4YT, após indução por IPTG, à temperatura de 37°C. Estas condições foram utilizadas durante todos os experimentos em biorreator.

## 7.2. ANEXO B

### **Experimentos em biorreator de 2L (BIOSTAT® B Plus, Sartorius Stedim Biotech)**

Após escolhida a cepa a ser utilizada, assim como a temperatura e o meio de cultivo, durante testes de superexpressão da proteína em *shaker*, partimos para otimização das condições de crescimento da bactéria em biorreator de 2 L. Este biorreator possui duas dornas acopladas, o que nos permitiu acelerar os experimentos, já que eram realizados dois cultivos simultaneamente, e economizar materiais de consumo, por seu menor volume de trabalho comparado com o biorreator com dorna de 10 L.

Todos os cultivos foram realizados a partir de um MCB, que continha a linhagem recombinante estocada em meio LB na proporção de 50% de glicerol, à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este estoque foi previamente testado quanto à viabilidade de suas células ( $1,7 \times 10^{10}$  células/mL). A partir do WCB foi crescido um pré-inóculo para iniciar os cultivos no biorreator de 2 L (BIOSTAT® B Plus, Sartorius Stedim Biotech,), na  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  inicial = 0,1 em meio 4YT com canamicina.

O biorreator possui controle automático de temperatura, agitação, aeração e pH. O oxigênio dissolvido do cultivo pode ser medido diretamente com o auxílio de um eletrodo polarográfico. Além disso, o biorreator possui três bombas peristálticas acopladas na unidade de controle para adição de ácido e álcali, sendo que o uso da outra bomba fica a critério do operador e, no nosso caso, foram conectadas às alimentações dos cultivos, durante bateladas alimentadas.

Durante o curso dos cultivos, a taxa de aeração foi mantida em 1 vvm. O pH do meio foi mantido em 7,2 automaticamente pela adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A temperatura foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  por meio de uma jaqueta de circulação de água na dorna, controlada

automaticamente. A taxa de oxigênio dissolvido foi variada, durante os experimentos, em 10, 20 e 30% do ar saturado, por ajuste automático da velocidade de agitação.

Primeiramente foram realizadas bateladas não alimentadas para determinar o momento em que iniciariamos a alimentação do cultivo. Nas bateladas alimentadas, estratégias de alimentação com controle indireto de *feedback* foram testadas, como *DO-Stat* e *pH-Stat*, assim como alimentações sem controle *feedback*: 2 estratégias com aumento linear da vazão (atingindo ao final do cultivo 3 e 5% da capacidade da bomba de alimentação). A solução de alimentação utilizada é composta de uma mistura do meio 4YT com 300 g/ L de glicose e  $\text{MgSO}_4$  1 mM.

Uma vez determinada a melhor estratégia de alimentação, diferentes concentrações de IPTG foram testadas durante os cultivos (1, 3 e 5 mM), e ainda diferentes horários de indução (12, 18 e 30h), visando melhorar a expressão da proteína.

Amostras foram coletadas em todos os experimentos para posterior análise da expressão da proteína por SDS-PAGE e quantificação de glicose no meio de cultivo. Além disso, a  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  foi medida em duplicata, a cada coleta, para acompanhamento do crescimento dos microrganismos e a biomassa foi calculada assim como a velocidade específica de crescimento celular.

Foram escolhidas a estratégia de alimentação linear ascendente (utilizando 5% da capacidade da bomba) e uma taxa de oxigênio dissolvido em 30%, estratégias que nos permitiram obter uma maior densidade celular (Tabela B1). Após isto, foram testadas as diferentes concentrações de IPTG na indução dos cultivos. Optamos por usar a concentração de 3 mM, que mostrou uma melhor expressão da proteína quando comparada com os experimentos induzidos com 1 e 5 mM. Em seguida, testamos diferentes tempos para que ocorresse a indução, procurando manter os níveis de biomassa e otimizando a expressão da

proteína (Tabela B2). Foi verificado que a indução com 30 h de cultivo apresentou melhores resultados.



**Tabela B1. Diferentes estratégias de alimentação e concentrações de oxigênio dissolvido testadas.**

<b>Estratégia</b>	<b>IPTG<sup>1</sup> (h)</b>	<b>DOC (%)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></b>	<b>Expressão</b>
Batelada não alimentada	não	30	3,1464	1,2927	não
DO-Stat (agit. 800 rpm)	não	10	8,3958	0,8506	não
DO-Stat (agit. 800 rpm)	12	20	8,5857	0,8243	não
DO-Stat (agit. 400 rpm)	12	10	4,9875	0,8733	sim
DO-Stat (agit. 600 rpm)	12	30	10,005	0,86455	sim
DO-Stat (agit. 800 rpm)	não	30	17,1114	0,7991	não
DO-Stat (agit. 800 rpm)	12	30	14,5327	0,9779	sim
pH- Stat	não	30	12,6336	0,8783	não
Linear 5%	12	10	19,7301	0,889	sim
Linear 5%	12	30	30,5847	0,939	sim
Linear 5%	não	30	25,6071	0,9542	não
Linear 3%	não	30	18,3308	0,8929	não
Linear 3%	12	30	22,5887	0,7982	sim

<sup>1</sup> - Indução com IPTG 1 mM

<sup>2</sup> - Velocidade específica de crescimento celular

**Tabela B2. Diferentes horários de indução e concentrações de IPTG testadas.**

<b>Tempo<sup>1</sup> (h)</b>	<b>[IPTG]<sup>2</sup></b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b><math>\mu</math> (h-1)<sup>3</sup></b>	<b>Expressão</b>
12	3mM	22,4487	0,7672	sim
12	5mM	24,7076	0,7079	sim
18	3mM	25,6851	0,7602	sim
30	3mM	31,5842	0,933	sim

<sup>1</sup> - Tempo de cultivo em que foi realizada a indução com IPTG

<sup>2</sup> - Concentrações de IPTG utilizadas

<sup>3</sup> - Velocidade específica de crescimento celular

### 7.3. ANEXO C

## Carta de submissão à revista *Process Biochemistry*

Mensagem de Impressão do Outlook

<https://blu159.mail.live.com/mail/PrintMessages.aspx?cpids=23e6c1ee..>

### Submission Confirmation

---

De: **ees.prbi.0.2292b0.9d3c4e4c@eesmail.elsevier.com** em nome de **Process Biochemistry**  
(prbi@elsevier.com)

Enviada: segunda-feira, 15 de julho de 2013 23:42:04

Para: **natashakuniechick@hotmail.com**

Dear Natasha Kuniechick Natasha Kuniechick,

Your submission entitled "Bioreactor production of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF)" has been received by Process Biochemistry

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/prbi/>.

Your username is: nkuniechick  
If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/prbi/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/prbi/automail_query.asp)

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  
Process Biochemistry