

CAMILLA MOTA MENDES

**Produção de eritropoietina recombinante humana no
leite de camundongas transgênicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2009

RESUMO

MENDES, C. M. **Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongas transgênicas** [Production of recombinant human erythropoietin in transgenic mice milk]. 2009. 49 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Proteínas recombinantes simples, como a insulina e o hormônio de crescimento humano, podem ser produzidas em microorganismos como bactérias. Entretanto, para a produção de proteínas que precisam de modificações pós-traducionais, que não se consegue em microorganismos, torna-se importante o uso de biorreatores com culturas de células eucarióticas. Este sistema de produção é caro e a quantidade de proteína produzida é pequena. Como alternativa surgiu o uso de animais transgênicos para reduzir os custos de produção. A Eritropoietina humana é uma proteína glicosilada e representa um dos maiores gastos para tratamento de doenças humanas. Já foi produzida em camundongos, coelhos e suínos transgênicos, com problemas na glicosilação ou alteração da higidez do animal pela falha da região promotora do vetor de transgene em limitar a expressão para a glândula mamária. Este estudo teve como objetivo a produção de (rhEPO) no leite de camundongas transgênicas sob ação de dois diferentes vetores, nunca utilizados na sua produção. Os vetores com os promotores da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina bovinos tiveram o gene da eritropoietina humana inserido entre as regiões promotora e codificadora do leite, num processo trabalhoso e pouco eficiente. Não foi possível inserir os vetores serão nas células tronco-embrionárias (CTE) de camundongos (USP-1) por eletroporação, mas as condições (390V por 80µs) foram testadas com vetor de fluorescência. Futuramente as CTE transgênicas serão agregadas aos embriões colhidos de camundongas superovuladas e após 24 horas de cultivo *in vitro* serão transferidos para camundongas pseudo-gestantes. Os animais nascidos (quimeras) serão acasalados e seus descendentes terão o DNA analisado para verificar a presença do gene da eritropoietina humana. Os animais positivos (fundadores) serão acasalados e as fêmeas positivas nascidas serão acompanhadas quanto à produção da eritropoietina humana no leite. Será purificada do leite, quantificada e avaliada quanto a glicosilação por Western Blottin.

Palavras-chave: Transgênicos. Camundongos. Eritropoietina. Humana. Leite.

ABSTRACT

MENDES, C. M. Production of recombinant human erythropoietin in transgenic mice Milk [Produção de eritropoietina recombinante humana no leite de camundongas transgênicas] 2009. 49 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Recombinant proteins such as insulin and human growth hormone can be produced by microorganisms. Although, to produce proteins that need post-translational modifications that can not be done by microorganisms, and a eucariotic cell bioreactor is needed. This production system is expensive and the amount of protein produced is low. As an alternative, the transgenic animal technology came up to reduce production fees. The human erythropoietin is a glycosylated protein and it is one of the most expensive to human treatment. It was already produced in transgenic mice, rabbit and swine but with glycosylation problems or health alterations by transgene vector's promoter region failure that limits the expression on mammary gland. This study aimed to produce recombinant human erythropoietin (rhEPO) in transgenic mice milk by two different vectors, never had been used to produce it before. Vectors with bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin promoters had the human erythropoietin gene inserted between promoter and milk coding regions by a hard working and low efficiency technique. It was not possible to insert our vectors on mice embryonic stem cells (ESC) (USP-1) by electroporation but its conditions (390V, 80µs) were tested with fluorescent vector. In the future, transgenic ESC will be aggregated into mice embryos and after 24 hours of *in vitro* culture will be transferred to pseudo-pregnant mice. The new borns (chimera) will be mated and its offspring will have their DNA evaluated to verify the human erythropoietin gene occurrence. The founder animals will be also mated and the positive female borned will be evaluated for human erythropoietin production on milk. It will be purified, quantified and evaluated for glycosylation by western blotting technique.

Keywords: Transgenesis. Mice. Erythropoietin. Human. Milk.

1 INTRODUÇÃO

A produção de biofármacos protéicos por microorganismos geneticamente modificados, como bactérias ou leveduras foi estabelecida como um processo barato e inócuo para proteínas recombinantes, como a insulina e o hormônio de crescimento. Entretanto, para proteínas que precisam de modificações pós-traducionais, como glicosilação, este sistema é falho, pois a atividade biológica é baixa. Como alternativa surgiram os sistemas de produção em cultura de células eucarióticas, que são capazes de produzir proteínas com corretas motificações pós traducionais, mas o rendimento é baixo e o custo elevado. Como outra alternativa foram desenvolvidos animais geneticamente modificados (transgênicos), capazes de produzir proteínas recombinantes em seus tecidos e seus fluídos, sendo a glândula mamária o principal tecido alvo. Isolando as proteínas do leite de animais livres de patógenos, elimina-se a possibilidade de contaminação e aumenta-se a quantidade do produto. Dentre as várias proteínas humanas utilizadas como biofármacos, a eritropoietina (EPO) é uma das mais importantes. A EPO é um hormônio glicoprotéico ácido que está envolvido no processo de diferenciação de células progenitoras de eritrócitos na medula óssea vermelha, sendo produzida pelo rim sob diferentes estímulos como hipóxia ou anóxia. A EPO ativa dos humanos (hEPO) é uma proteína simples composta de 165 aminoácidos com três a quatro sítios de glicosilação. Desde a purificação em 1977, vem sendo utilizada para propósitos terapêuticos como o tratamento de falência renal que culmina com um quadro de anemia. Como bactérias e leveduras não possuem enzimas adequadas para glicosilação, vários sistemas de bioreatores vêm sendo testados para a síntese de, como o cultivo *in vitro* de células de ovários de Hamster Chinês (CHO) e células de rim de filhotes de hamster (BHK). No entanto, as formas farmacêuticas de rhEPO produzidas nos dois cultivos apresentam diferentes modificações pós-transducionais quando comparadas com hEPO (um resíduo de ácido siálico na estrutura oligossacarídica da recombinante a torna mais ácida que a hEPO sérica). Estas rhEPO apresentam a glicosilação necessária para funções terapêuticas, mas como o resíduo siálico tem meia vida curta e é rapidamente metabolizada pelo fígado. A meia vida curta faz com que o tratamento necessite de mais aplicações, que têm alto custo de produção. Em 2007, estimou-se o faturamento com a produção de

proteínas de uso terapêutico da ordem de 47.2 bilhões de dólares, sendo aproximadamente 12 bilhões com a rhEPO. Segundo o Ministério da Saúde, o Governo teve em 2006 gastos de R\$ 4,2 bilhões na compra de medicamentos, sendo 500 milhões investidos na importação da EPO e de um interferon (11% do orçamento da saúde). O medicamento Epgen (Amgien, Sankio), uma das formas comerciais da rhEPO, gerou vendas globais de U\$ 5,7 bilhões no ano de 2001. Inúmeras proteínas já foram expressas na glândula mamária de animais transgênicos, sendo a hEPO expressa em camundongos, coelhos e suínos transgênicos, apresentando a correta glicosilação somente em suínos. O objetivo deste trabalho foi testar dois diferentes vetores de expressão em camundongos, para futuramente produzir bovinos transgênicos capazes de sintetizar grandes quantidades de rhEPO, seguindo o exemplo do GH humano, que já foi expresso na glândula mamária de bovinos e estimado que vinte animais seriam suficientes para suprir toda a demanda mundial deste hormônio.

7 CONCLUSÕES

Foi possível construir os vetores com os promotores alfa-lactalbumina e BGL para expressão da hrEPO no leite.

As CTE foram cultivadas e mantidas indiferenciadas ao longo das passagens e foi estabelecido o protocolo para eletroporação destas células, utilizando plasmídeo com fluorescência.

Não foram obtidas CTE positivas para os vetores, pois as células não foram eletroporadas.

A técnica de agregação de quimeras para a produção de animais transgênicos foi padronizada, no entanto os animais transgênicos não foram gerados pela falta das CTE positivas.

A análise da hrEPO no leite não foi realizada pela ausência da produção dos animais transgênicos.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A.; CASTRO-PALOMINO, N.; LA FUENTE, J.; CASTRO, F. O. Expression of human erythropoietin transgene and of the endogenous WAP gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. **Transgenic Research**, v. 7, p. 311-317, 1998.

CHO, S.K.; HWANG, K.C.; CHOI, Y.J.; BUI, H.T.; NGUYEN, V.T.; PARK, C.; KIM, J.H.; ; KIM, J.H. Production of transgenic pigs harboring the human erythropoietin (hEPO) gene using somatic cell nuclear transfer. **Journal of Reproduction and Development**, in press, 2008.

CLARK, A. J. The mammary gland as a bioreactor: Expression processing and production of recombinant proteins. **Journal of Mammary Gland and Neoplasia**, v. 3, n. 3, 1998

CHEN, C.M.; WANG, C.H.; WU, S.C.; LIN, C.C.; LIN, S.H.; CHENG, W.T. Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine alpha-lactalbumin regulation sequences_ **Transgenic Research**, v. 11, issue 3, p. 257-268, 2002.

FAN, J.; WATANABE, T.; Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, issue. 3 , p. 261-282, 2003.

GORDON, M.F.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J.; BARBOSA, J.A.; RUDDLE, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 77, p. 7380-7384, 1980.

GRIFFITHS, Betting on biogenics. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3 p.197-198, 2004.

HODGES, C.A.; STICE, S.L. Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 81, 2003.

HOUEBINE, L.M. Relations between animal transgenesis and reproduction. **Reprod. Nutr. Dev.** v. 45, n.3, p.363-376 , 2005.

HOUEBINE, L.M. Transgenic Animals bioreactor. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4-5, 305-320, 2000.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

JELKMANN, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. **European Journal of Haematology**, v. 69, Issue 5-6, p. 265-274, 2008.

JELKMANN, W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. **Methods Enzymol.** v. 435, p. 179-197, 2007.

KEEFER, C.L. Production of bioproducts through the use of transgenic animals models. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 5-12, 2004.

LEE, C.S.; FANG, D.B.; LEE, Y.S.; ZHENG, G.D.; OH, K.B.; YOUN, W.S.; HAN, Y.M.; KIM, S.J.; LIM, J.H.; SHIN, S.T.; JIN, S.W. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus*. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 57-63, 2000.

LIPPIN, Y.; DRANITZKI-ELHALEL, M.; BRUKK-ALMON, E.; MEI-ZAHAV, C.; MIZRACHI, S.; LIBERMAN, Y.; TAINA, A.; KAPLAN, E.; PODJARNY, E.; ZEIRA, E.; HARATI, M. CASADEVALL, N.; SHANI, N.; GALLUN, E. Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2280-2286, 2005

LYNCH, T.J. Biotechnology: alternatives to human plasma derived therapeutic proteins. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 13, n. 4, p. 669-688, 2000.

MAGA, E.A. The use of recombinase proteins to generate transgenic large animals. **Cloning And Stem Cells**, v.3, n. 4, p. 233-241, 2001.

MASSOUD, M.; ATTAL, J.; THEPOT, D.; POINTU, H.; STINNAKRE, M.G.; THERON, M.C.; LOPEZ, C.; HOUDEBINE, L.M. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. **Reproduction Nutrition Development**; v.36; p.553–563, 1996.

MCCREAT, K.J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K.H.S.; COLMAN, A.; SCHNLEKE, A.E.; KIND, A.J. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1066-1069, 2000.

MIKUS, T.; POLPSTEIN, M. ; SEDLAKOVÁ, J.; JENIKOVÉ, G.; TREFIL, P.; LIDICKY, J.; MALU, P. Generation and phenotypic analysis of a transgenic line of rabbits secreting active recombinant human erythropoietin in the milk. **Transgenic Research**, v. 13, p. 487-498, 2004.

MIKUS, T.; MALY, P.; POPLSTEIN, M.; LANDA, V.; TREFIL, P.; LIDICKY, J. Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. **Folia Biology**, v. 47, n.6, p.187-95, 2001

NIEMANN, H.; KUES, W. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 297-317, 2003.

NIEMANN, H; HALTER, R.; CARNWATH, J.W.; HERRMANN, D.; LEMME, E.; PAUL, D. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. **Transgenic Research**, v.8, n. 3, p. 237-247, 1999.

PARK, J.K.; LEE, Y.K.; LEE, P.; CHUNG, H.J.; KIM, S.; LEE, H.G.; SEO, M.K.; HAN, J.H.; PARK, C.G.; KIM, H.T.; KIM, Y.K.; MIN, K.S.; KIM, J.H.; LEE, H.T.; CHANG, W.K. Recombinant human erythropoietin produced in milk of transgenic pigs. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 362-371, 2006

RIJNKELS, M.; KOOIMAN, P.M.; PLATENBURG, G.J.; VAN DIXHOORN, M.; NUIJENS, J.H.; de BOER, H.A.; PIEPER, F.R. High-level expression of bovine alpha s1-casein in milk of transgenic mice. **Transgenic Research**, v. 7, issue 1, p. 5-14, 1998.

RUDOLPH, N. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. **Reviews, Trend in Biotechnology**, v. 17, p. 367-374, 1999.

SUKAOKAR, M.; BRADLEY, A. Targeting sheep. **Nature**, n. 6790, v. 405, p. 1004-1005, 2000.

SPERB, F. **Expressão Gênica da Eritropoietina humana em plantas**. Dissertação. 2008. 70f (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,.

SOLER, E.; LE SAUX, A.; GUINUT, F.; PASSET, B.; COHEN, R.; MERLE, C.; CHARPILLENNE, A.; FOURGEUX, C.; SOREL, V.; PIRIOU, A.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; COHEN, J.; HOUDEBINE, L.M. Production of Two Vaccinating Recombinant Rotavirus Proteins in the Milk of Transgenic Rabbits, **Transgenic Research**, v. 14, n. 6, p. 833-844, 2005

SUKOYAN, M.A.; KERKIS, A.Y.; MELLO, M.R.B.; KERKIS, I.E.; VISINTIN, J.A.; PEREIRA, L.V. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 535-542, 2002.

TOLEDO, J.R.; SÁNCHEZ, O.; SEGUÍ, R.M.; GARCIA, Y.F.; RODRIGUEZ, M.P.; CREMATA, J.A. Differential in vitro and in vivo glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1726, p. 48-56, 2005

TOLEDO, J.R.; SÁNCHEZ, O.; SEGUÍ, R.M.; GARCIA, Y.F.; MONTAÑEZ, M.; RODRIGUEZ, M.P.; CREMATA, J.A. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 225-235, 2006

UUSI-OUKARI, M.; HYTTNEN, J.M.; KORHONEN, V.P.; VASTI, A. ALHONEN, L. JANNE, O.A., JANNE, J. Bovine α S1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. **Transgenic Research**, v.6, p. 75-84, 1996.

WALL, R.; KERR, D.; BONDIOLI, K. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 2213-2224, 1997.

WHEELER, M.B.; CHOI, S.J. Embryonic stem cells and transgenics: recent advances. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 25, p. 64-83, 1997.

WHEELER, M.B. Production of transgenic livestock: Promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, v. 81, sup. 3, p. 32-37, 2003.

WHEELER, M.B.; WALTERS, E.M.; CLARK, S.G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 265-289, 2003.

VAN REENEN, C.G.; MEUWISSEN, T.H.E.; HOPSTER H.; OLDENBROEK, K.; KRUIP, T.A.M.; BLOKHUIS H.J. Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. **Journal of Animal Sciences**, v. 79, p. 1763-1779, 2001.

VAZQUEZ, K.M.; MALBURGUER, K.; INTODY, Z.; WILSON, J.H. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination, **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 98, n. 15, p. 8403-8410, 2001.