RESUMO

Coelho, T.M. Comparação da atividade biológica e glicosilação da Gonadotrofia Coriônica equina recombinante (reCG $\beta\alpha$) expressa em duas linhagens celulares de mamíferos visando à geração de um biofármaco. 2014. 143 páginas. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Atualmente, o Brasil encontra-se na privilegiada posição de maior produtor e exportador mundial de carne bovina, tornando a pecuária uma das atividades nacionais mais importantes e rentáveis. Este dado enfatiza a importância de pesquisa e desenvolvimento em reprodução bovina, sendo os custos com a importação de hormônios estimuladores da ovulação, como a gonadotrofina coriônica equina (eCG) uma barreira importante neste cenário. Os produtos comerciais utilizados atualmente são purificados a partir do sangue de éguas gestantes, apresentando variabilidade de lote para lote e presença de contaminantes. As células de mamíferos são capazes de processar pós-traducionalmente as cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas de forma correta, o que é essencial para o correto dobramento, maturação e montagem das duas subunidades. Além disso, a glicosilação interfere diretamente com a meia-vida, o reconhecimento do receptor, a solubilidade e a atividade biológica das proteínas. No entanto, mesmo entre os sistemas de expressão heteróloga em células de mamífero, encontra-se muita variabilidade nos padrões de glicosilação, visto que a maquinaria enzimática de adição de oligossacarídeos às proteínas difere de uma célula para outra, gerando glicofomas específicas de acordo com a linhagem celular escolhida. Um dos sistemas de expressão mais populares, que vem sendo amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas, é a linhagem celular CHO (Chinese Hamster Ovary), que possui uma gama variada de glicosiltransferases, sendo capaz de adicionar N-glicanos bi e tri-antênários do tipo complexo e sializados às cadeias polipeptídicas produzidas. Comparativamente, a linhagem celular HEK293 (Human Embryonic Kidney) e as linhagens derivadas desta, como a 293T, são capazes de produzir glicoproteínas carregando oligossacarídeos complexos e completos, com a presença de sializações do tipo $\alpha 2,6$, que podem ser importantes na manutenção da meia-vida de eCG. No presente trabalho, foi realizado um estudo comparativo através da clonagem, expressão e purificação de uma forma fusionada de eCG, na qual as cadeias α e β foram co-expressas (reCG $\beta \alpha$) em duas linhagens celulares diferentes (293T e CHO-DG44) e seus produtos foram caracterizados quanto à relação entre sua estrutura (glicosilação) e função (atividade biológica *in vitro* e *in vivo*).

Palavras-Chave: 1. Biotecnologia Molecular; 2. Expressão e purificação de proteínas recombinantes; 3. Hormônios reprodutivos veterinários; 4. Produção de gonadotrofina coriônica equina recombinante; 5. Sistemas de expressão heteróloga em células de mamíferos (CHO-DG44 e 293T).

ABSTRACT

Coelho, T.M. Comparision of the biological activity and glicosilation of recombinant Chorionic Gonadotropin (reCG $\beta\alpha$) expressed in two mammalian cell lines, aiming at generating a biopharmaceutical.

Brazil is currently the major beef producer and exporter, rendering livestock one of the country's most important activities most from the economical point of view. This emphasizes the importance of research and development in bovine reproduction. The costs involved in acquirement of ovulation-stimulatory hormones, such as equine gonadotropin (eCG), greatly hampers advances in this field. The currently used products are purified from blood of pregnant heifers, presenting batch-to-batch variability and the presence of contaminants. Mammalian cells are capable of post-translational processing of newly synthesized polypeptide chains in a proper manner, which is essential for the correct folding, maturation and assembly of both eCG subunits. In addition, glycosylation directly interferes with the protein half-life, receptor recognition, solubility and biological activity. Variability in glycosylation patterns is found in different mammalian expression systems, since the enzymatic machinery which adds oligosaccharides to proteins differs from one cell type to another, generating distinct glycoforms. One of the most popular expression systems, widely used by pharmaceutical companies is the CHO (*Chinese Hamster Ovary*) cell lineage, which has a wide range of glycosyltransferases, which are capable of adding complex-type, di or tri-branched sialylated N-glycans to polypeptide chains. On the other hand, HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) derived cell lineages, such as 293T, are capable of producing glycoproteins bearing complex-type and complete N-glycans, with sialylations at position $\alpha 2,6$, which may be important for maintenance of eCG's half-life. In the present work, a comparative study was carried out by cloning, expressing and purifying a fused form of eCG, in which the α and β chains are co-expressed (reCG $\beta\alpha$) in two different cell lines (293T and CHO-DG44) and their products are characterized with respect to the relationship between their structure (glycosylation) and biological activity both *in vitro* and *in vivo*.

Key Words: 1. Molecular Biotechnology; 2. Expression and purification of recombinant Proteins; 3. Veterinary reproductive hormones 4. Production of recombinant equine chorionic gonadotropin; 5. Heterologous expression system in mammalian cells (CHO-DG44 and 293T).