AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Caracterização da estrutura oligossacarídica de prolactina glicosilada
humana (G-hPRL) nativa e recombinante**

Marcos Vinicius Nucci Capone

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo
2013**

Dedico este trabalho:

Ao meu pai **Fiore** que é um grande homem e me ensinou como ser homem também. A minha mãe **Yandra** uma mulher maravilhosa, que sempre fez de tudo para eu ter a oportunidade de estar vivendo esse momento. Aos melhores pais do mundo, obrigado, eu amo vocês!

Aos meus **padrinhos** que sempre me deram muito amor e incentivo. Sozinho eu não ia conseguir, vocês mostraram o caminho por onde dava pra ir.

A minha **família** e meus **amigos**, que são parte da minha história. Felicidade é poder estar com quem você gosta em algum lugar.

Ao amor da minha vida, minha noiva **Caroline** por todo o incentivo, amor e carinho. Eu te amo mais que tudo! Se eu não puder fazer você a pessoa mais feliz, eu chego o mais perto disso possível!

“Para quem tem o pensamento forte, o impossível é só questão de opinião.
Existe sempre um outro jeito de se poder chegar!”

(Alexandre Magno Abrão)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pela oportunidade, orientação, confiança, ensino, paciência e apoio.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela confiança, orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

A toda minha família pela compreensão, carinho, ajuda, amor e incentivo.

Ao meu primo Vitor (Lau), que tenho um carinho todo especial, pois crescemos juntos.

Ao meu grande amigo Rodrigo, que me ensinou o verdadeiro sentido de uma amizade: companheirismo e honestidade.

Aos amigos e parceiros Flavio e Roberto, que desde os tempos de faculdade vêm juntos comigo na caminhada da vida.

À Família Carlos e Elias pelos bons momentos que compartilhamos.

Ao Dr. Paulo Cardoso, que acreditou em mim e me deu a minha primeira oportunidade.

Ao Dr. Herbert, quem me ensinou os primeiros passos.

Ao Dr. João Ezequiel (Johnny), quem muito me ensinou e ajudou quando precisei.

Aos amigos do centro de biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Nélío, Renata, Eliza, Beatriz, Fernanda, Miriam, Claudia, Flávia, Néia, Tais, Eliana, Junqueira, Rute, Arlete, Rosângela, Neide, Ivete, José Maria, Dra. Maria Teresa, Dra. Cibebe, Dra. Kayo, Dr. Daniel Peres, Dra. Regina, Dra. Olga, Dra. Nanci, Dr. Patrick por toda a ajuda na realização deste trabalho, colaboração, amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários do Instituto Butantan - Leme, Aline, Wagner,

Sidnéia, Maicon, Liliane, Natalina, Mary, Adriana, Eva, Erica, Liliana, Perpétua e ao Dr. Celso Caricati pela grande oportunidade.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao IPEN, FAPESP, CNPq, CAPES pelo apoio financeiro e técnico.

A luz do sol chegou a me cegar
Depois de tanto tempo sem sair pra andar
Na rua em que eu cresci.

Tem cantos que eu não consegui rever
Impressos na memória, lembrando por que
Eu tive que partir dali.

Desde a infância eu precisei lutar
São monstros que eu sempre tento exorcizar
Eles estão aqui... em mim.

E a cada derrota, levantar, pra recomeçar
A minha resposta vai chegar numa música
São milhões de almas a cantar em uma só voz
E ao final de tudo você vai ouvir falar de nós.

Sobreviver e acreditar, que no final a verdade vai prevalecer
E ninguém vai me derrubar, nem todo o mal desse mundo vai me enfraquecer.

(Lucas Silveira)

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA OLIGOSSACARÍDICA DE PROLACTINA GLICOSILADA HUMANA (G-hPRL) NATIVA E RECOMBINANTE

Marcos Vinicius Nucci Capone

Resumo

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio polipeptídico secretado pela hipófise anterior sob regulação do hipotálamo, envolvido em uma variedade de processos biológicos como o desenvolvimento da glândula mamária e lactação. O produto recombinante é importante no diagnóstico médico e no tratamento de insuficiência da lactação. Este hormônio pode ocorrer sob a forma de proteína não glicosilada (NG-hPRL) e glicosilada (G-hPRL), com pesos moleculares de aproximadamente 23 e 25 kilodalton (kDa), respectivamente; possui um único sítio de N-glicosilação localizado na asparagina (Asn) posição 31, que é parcialmente ocupado, representando assim um modelo particularmente interessante de glicosilação. A atividade biológica da G-hPRL é muito menor comparada à NG-hPRL (~4 vezes) e sua função fisiológica ainda não é bem definida: a porção de carboidrato parece ter um importante papel na biossíntese, secreção, atividade biológica, e sobrevivência plasmática do hormônio. O objetivo principal desse trabalho foi comparar as estruturas dos N-glicanos presentes na prolactina glicosilada hipofisária (G-hPRL-NHPP) com a recombinante. Para obter a G-hPRL recombinante foi realizada uma produção em escala laboratorial a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) geneticamente modificadas e adaptadas ao crescimento em suspensão. Foi adicionada, ao meio de cultura cicloheximida (CHX), cujo efeito principal foi aumentar a relação G-hPRL/NG-hPRL que passou de 5% para 38%, facilitando assim a purificação da G-hPRL. A G-hPRL foi purificada em duas etapas, uma troca catiônica seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) que se demonstrou eficiente na separação das duas isoformas de hPRL. A G-hPRL recombinante IPEN foi assim analisada por diversas técnicas confirmando a sua pureza e atividade biológica, incluindo comparações com outras amostras de referências de origem hipofisária adquirida junto ao "National Hormone & Peptide Program (NHPP-E.U.A.)". Foi realizada também a determinação inédita de N-glicanos presentes na G-hPRL produzida por células CHO e na G-hPRL nativa,

produzida pela hipófise humana, possibilitando comparar as duas estruturas de carboidratos e alcançando assim uma das principais metas desse projeto. Entre as principais diferenças encontradas nas estruturas dos dois N-glicanos, destacam-se a baixa quantidade de ácido siálico (NeuAc), a alta porcentagem de glicanos sulfatos (74,0%) e com fucose (Fuc) (93,3%) presentes na amostra hipofisária e a tendência da preparação recombinante de apresentar glicanos com maior peso molecular e com uma menor variação nas isoformas.

CHARACTERIZATION OF THE OLIGOSACCHARIDE STRUCTURE OF HUMAN GLYCOSYLATED PROLACTIN (G-hPRL) NATIVE AND RECOMBINANT

Marcos Vinicius Nucci Capone

Abstract

Human prolactin (hPRL) is a polypeptide hormone secreted by the anterior pituitary under the regulation of the hypothalamus, involved in a variety of biological processes such as mammary gland development and lactation. The recombinant product is important in medical diagnosis and treatment of failure of lactation. This hormone may occur in the form of non-glycosylated protein (NG-hPRL) and glycosylated (G-hPRL) with molecular weights of approximately 23 and 25 kilodalton (kDa), respectively; has a single N-glycosylation site located at asparagine (Asn) position 31, which is partially occupied, thus being a particularly interesting model of glycosylation. The biological activity of G-hPRL is lower compared to NG-hPRL (~4 times) and its physiological function is not well defined: the portion of carbohydrate appears to have an important role in the hormone biosynthesis, secretion, biological activity, and plasma survival of the hormone. The main objective of this study was to compare the structures of N-glycans present in glycosylated pituitary prolactin (G-hPRL-NHPP) with those present in the recombinant. To obtain the recombinant G-hPRL the production was performed in laboratory scale from Chinese hamster ovary cells (CHO), genetically modified and adapted to growth in suspension. Cycloheximide (CHX), whose main effect was to increase the ratio G-hPRL/NG-hPRL from 5% to 38% was added to the culture medium, thereby facilitating the purification of G-hPRL. The G-hPRL was purified in two steps, a cation exchanger followed by a purification by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) which demonstrated the efficient separation of the two isoforms of hPRL. Recombinant G-hPRL-IPEN was well characterized by several techniques confirming its purity and biological activity, including comparisons with other reference preparation of pituitary origin purchased from the "National Hormone & Peptide Program (NHPP-U.S.)". The composition of N-glycans present in the G-hPRL, produced by CHO

cells, and that of native G-hPRL, produced by the human pituitary gland, were also determined for the first time, allowing the two structures of carbohydrates to be compared and thus, achieving one of the main goals of this project. Among the main differences in N-glycan structures, we highlight the low presence of sialic acid (NeuAc) and the high percentage of sulfated glycans (74.0%) and of fucose (Fuc) (93.3%) in the pituitary sample and the tendency of the recombinant preparation to present glycans with higher molecular weight and less isoforms variation.

Lista de Abreviaturas

Asn – asparagina

CHX – cicloheximida

CHO – células de ovário de hamster chinês

CRS – Chemical Reference Standard

Da – Dalton

Fuc – fucose

Gal – galactose

Gal NAc – N-acetil galactosamina

G-hPRL – prolactina humana glicosilada

G-hPRL-NHPP – prolactina glicosilada hipofisária obtida do National Hormone & Peptide Program (NHPP) – Harbor-UCLA Medical Center do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK).

Glc NAc – N-acetil glucosamina

hPRL – prolactina humana

HPSEC – cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular

hTSH – tireotrofina humana

kDa – kilodalton

MALDI-TOF-MS – matrix assisted laser desorption ionization - time-of-flight - mass spectrometry

Man – manose

NeuAc – ácido siálico

NG-hPRL – prolactina humana não glicosilada

PI-hPRL – preparação de referência interna de hPRL recombinante purificada produzida no espaço periplásmico bacteriano.

PBS – tampão fosfato salina

PRL – prolactina

Pro – prolina

RP-HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

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

Ser – serina

WB – western blotting

Thr – treonina

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Material	10
3.1.1 Material utilizado no cultivo celular.....	10
3.1.1.1 Linhagem celular.....	10
3.1.1.2 Material plástico	10
3.1.1.3 Reagentes utilizados na cultura celular.....	10
3.1.2 Preparações hormonais utilizadas	11
3.1.3 Material utilizado no processo de purificação e análise da hPRL	11
3.1.3.1 Colunas cromatográficas	11
3.1.3.2 Resinas cromatográficas.....	12
3.1.3.3 Antissoro e outros reagentes para WB	12
3.1.4 Material radioativo.....	12
3.1.5 Proteína total.....	12
3.1.6 Reagentes para marcação de Proteína A para WB	12
3.1.7 Outros reagentes	12
3.1.8 Equipamentos e acessórios principais	13
3.1.9 Materiais diversos	15
3.2 Métodos	15
3.2.1 Cultura de células	15
3.2.2 Células aderidas	16
3.2.3 Células em suspensão.....	16
3.2.4 Influência da concentração de CHX.....	17
3.2.5 Produção laboratorial da G-hPRL	17
3.2.6 Purificação da G-hPRL	17
3.2.7 Caracterização físico-química.....	18
3.2.7.1 Análise por SDS-PAGE.....	18
3.2.7.1.1 Revelação com <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	19
3.2.7.1.2 Revelação com nitrato de prata	19
3.2.8 Análise por Western Blotting.....	20

3.2.9	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	20
3.2.10	Determinação de proteína total	21
3.2.11	Ensaio Biológico	21
3.2.11.1	Bioensaio com células Ba/F3-LLP	21
3.2.11.2	Bioensaio com células Nb2	22
3.2.12	Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF)	22
3.2.13	Análise de carboidratos.....	23
3.2.13.1	Análise estrutural	23
3.2.13.2	Análise composicional.....	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Produção de hPRL em frascos <i>spinner</i>	25
4.2	Efeitos da CHX na expressão da G-hPRL	27
4.3	Ação da CHX no crescimento celular durante a produção.....	28
4.4	Purificação da G-hPRL	29
4.4.1	Primeira etapa: Troca Catiônica com a resina SP-Sepharose	29
4.4.1.1	Primeira etapa de purificação da hPRL (cultivo controle).....	30
4.4.1.2	Primeira etapa de purificação da hPRL (cultivo com adição de CHX)..	34
4.4.2	Segunda etapa: RP-HPLC	39
4.4.2.1	Segunda etapa de purificação da hPRL (cultivo controle)	39
4.4.2.2	Segunda etapa de purificação da hPRL (cultivo com adição de CHX).	42
4.4.3	Otimização da purificação de G-hPRL	44
4.5	Padronização da liofilização.....	46
4.6	Caracterização da G-hPRL	49
4.6.1	Análises por HPLC.....	49
4.6.2	Análises por SDS e WB	51
4.6.3	Atividade Biológica.....	52
4.6.4	Determinação da porcentagem de N-glicanos por MALDI-TOF-MS	54
4.6.5	Análise dos carboidratos.....	56
4.6.5.1	Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL-NHPP (nativa).....	56
4.6.5.2	Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL recombinante	60
4.6.5.3	Análise composicional dos N-glicanos da G-hPRL	63
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio polipeptídico que apresenta três pontes dissulfeto intra-moleculares, secretada pela hipófise anterior sendo regulada pelo hipotálamo. Além da secreção hipofisária, a hPRL também é sintetizada em outros órgãos como, próstata, glândulas mamárias e aparelho reprodutivo feminino, e parece regular localmente o crescimento e diferenciação celular (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; 2002; Tettamanzi, *et al.*, 2008). O gene que codifica a hPRL está localizado no cromossomo 6, sendo ele único e encontrado em todos os vertebrados (Ormandy *et al.*, 1997). A molécula de PRL, de forma geral, está envolvida em uma variedade de processos biológicos como proliferação celular, crescimento e desenvolvimento, balanço hidroeletrolítico e especialmente exerce influência sobre a fisiologia e aspectos comportamentais durante o período reprodutivo de mamíferos, pássaros e répteis (Goodman *et al.*, 2008). Desde que níveis anormais de hPRL foram relacionados a inúmeras desordens na função hipofisária e de reprodução (hiperprolactemia, galactorréia, infertilidade, etc) é um hormônio frequentemente determinado na rotina de ensaios clínicos (Morganti *et al.*, 1996; Glezer *et al.*, 2006).

Inicialmente, considerou-se que esta proteína apresentava apenas a forma não glicosilada (NG-hPRL), com massa molecular de aproximadamente 23 kDa. Porém, estudos com glândula hipofisária ovina estabeleceram que a hPRL ocorre também sob a forma glicosilada (G-hPRL), com massa molecular de aproximadamente 25 kDa (Lewis *et al.*, 1984).

A glicosilação de proteínas é um dos mais importantes processos de modificação pós-traducional: estima-se que aproximadamente 50% de todas as proteínas são glicosiladas. O processo de glicosilação consiste de múltiplas etapas envolvendo centenas de enzimas (Gu *et al.*, 2004; Wong, 2005). Dois tipos de glicosilação de proteínas são as mais comuns: a) N-glicosilação, formando uma cadeia oligossacarídica que é posteriormente transferida à proteína através de uma ligação covalente a uma asparagina (Asn), localizada na sequência do tripeptídeo Asn-X-Ser/Thr sendo que X pode ser qualquer aminoácido, exceto

prolina (Pro) e b) O-glicosilação, formando uma cadeia oligossacarídica que é transferida à serina (Ser) ou treonina (Thr). A glicosilação tem grande importância sobre as funções celulares como adesão celular, migração, angiogênese e transdução de sinais (Isaji *et al.*, 2004), portanto, a N- e O-glicosilação de proteínas se faz necessária para a execução destes processos biológicos.

A composição dos oligossacarídeos assim como o número e tamanho dos ramos das suas árvores (antenaridade) variam entre os diferentes glicanos ligados a uma certa proteína, entre glicoproteínas, entre tipos de células, tecidos e espécies. No entanto, quando adicionados inicialmente no retículo endoplasmático, os glicanos não exibem essa heterogeneidade. O "núcleo dos glicanos" é homogêneo e relativamente simples, consistindo de dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man) (Figura 1) (Helenius *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2006).

Figura 1. Núcleo pentassacarídico de um N-glicano (Butler *et al.*, 2006).

Os glicanos sofrem cortes e processamentos quando a glicoproteína ainda está no retículo endoplasmático, mas introduzem apenas uma diversidade adicional limitada, devido ao pequeno número de enzimas e substratos que existem nessa organela. Assim, o espectro de glicoformas mantém-se bastante uniforme até as glicoproteínas alcançarem o complexo de golgi, onde a diversificação estrutural é introduzida através de uma série de modificações não-uniformes (Figura 2).

Figura 2. Biossíntese do N-glicano (Helenius *et al.*, 2001).

A cadeia oligossacarídica possui um papel importante na correta biossíntese, secreção, atividade biológica e sobrevivência plasmática das glicoproteínas, sendo crítica em relação à síntese de biofármacos, uma vez que uma glicosilação ineficiente pode afetar a farmacocinética e a resposta imunológica da proteína (Sinha, 1995; Soares, *et al.*, 2000). Os N-glicanos são responsáveis pela solubilidade, inibindo a agregação proteica, promovendo a proteção contra ataque de enzimas proteolíticas no meio extracelular, enquanto que tanto a N-glicosilação quanto a O-glicosilação facilitam o processo de enovelamento da molécula (*folding*), junção das subunidades e secreção da própria glicoproteína. Em alguns casos a remoção parcial ou completa dos oligossacarídeos aumenta a suscetibilidade à denaturação térmica (Goochee *et al.*, 1991) e pequenas alterações na glicosilação, como por exemplo, a presença de um açúcar com carga negativa, pode acarretar alterações em sua bioatividade (Hoffmann *et al.*, 1993). No retículo endoplasmático a transferência da cadeia oligossacarídica à hPRL ocorre na forma de N-glicosilação (Asn, na posição 31) (Sinha, 1995).

Com base na natureza e localização dos resíduos de açúcares adicionados ao núcleo pentassacarídeo, os glicanos podem ser classificados em três subgrupos: os glicanos do tipo alta manose, nos quais há a ligação de múltiplos resíduos de Man à estrutura do núcleo; glicanos do tipo complexo, onde existe a ligação de resíduos de GlcNAc na região da antena e glicanos do tipo híbrido, que contém ambos os resíduos, Man e GlcNAc, ligados ao núcleo (Figura 3).

Figura 3. Tipos de N-glicanos (Morelle *et al.*, 2006).

Price e colaboradores (1995) descreveram a síntese de hPRL e observaram que as formas predominantes identificadas tanto por SDS-PAGE quanto por imunoblot, também foram as de 23 e 25 kDa. A digestão com glicosidase e neuraminidase indicaram que a isoforma de 25 kDa é N-glicosilada e sialilada, uma vez que a isoforma de 23 kDa da hPRL não apresenta cadeia oligossacarídica. Determinações por focalização isoelétrica demonstraram que ambas as isoformas de hPRL apresentam isômeros com múltiplas cargas, sendo que a G-hPRL possui uma heterogeneidade maior de cargas, provavelmente, devido aos carboidratos e aos diferentes padrões de sialilação. Ambas as isoformas de hPRL foram biologicamente ativas quando submetidas ao bioensaio em células de linfoma de rato (Nb2), no entanto, a NG-hPRL foi aproximadamente 4 vezes mais potente que a G-hPRL (Heller *et al.*, 2010).

A determinação da proporção entre as duas isoformas na circulação é geradora de grandes controvérsias. Enquanto para alguns autores a forma NG-hPRL é predominante, variando de 76 a 84% em mulheres normais, grávidas ou em período de amamentação (Fonseca *et al.*, 1991; Sinha, 1995), para outros a forma G-hPRL é predominante (Markoff *et al.*, 1987; Markoff, *et al.*, 1988; Hashim *et al.*, 1990), podendo atingir mais de 70% da hPRL circulante (Price *et al.*, 1995). Segundo Price *et al.* (1995) a G-PRL é produzida e liberada continuamente,

enquanto que a NG-PRL é liberada somente sob condições de estímulos apropriados.

Em nosso laboratório, o gene da hPRL foi clonado e introduzido em células CHO, sendo a proteína expressa eficientemente nas isoformas G-hPRL e NG-hPRL (Soares, *et al.*, 2000). Devido à complexa estrutura das glicoproteínas, a sua síntese só pode ser obtida em sistemas de células eucariotas. Portanto, a escolha da célula hospedeira é fundamental para o perfil de glicosilação das glicoproteínas (Rudd *et al.*, 1997; Raju *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2006).

As células CHO são amplamente utilizadas para a produção de biofármacos, especialmente na síntese de glicoproteínas terapêuticas (Schmidt, 2004). Uma das principais vantagens destas células é a sua maquinaria de glicosilação, que é muito similar à das células humanas, o que permite a obtenção de uma proteína recombinante com características mais próximas às da proteína nativa (Goochee *et al.*, 1992). Além disso, as células CHO são consideradas geneticamente estáveis e a expressão de proteínas recombinantes heterólogas pode ser obtida com alta reprodutibilidade e altos rendimentos.

Como já mencionado a hPRL é um excelente modelo para estudos de glicosilação, exibindo o mais simples tipo de macro heterogeneidade, a monoglicosilação, ou seja, como possui um único sitio de N-glicosilação, uma parte da população protéica é produzida com e outra sem o N-glicano (Shelikoff *et al.*, 1994).

Alguns autores têm sugerido que a heterogeneidade da cadeia oligossacarídica pode afetar a atividade biológica e a ligação ao receptor. Estes efeitos podem ser devidos às variações na composição, estrutura ou nível de sialilação dos oligossacarídeos (Lewis *et al.*, 1989; Haro *et al.*, 1990; Sinha, *et al.*, 1991). Neste contexto, a natureza e a composição da cadeia oligossacarídica pode influenciar a bioatividade de uma glicoproteína (Goochee *et al.*, 1991). Quando uma glicoproteína é administrada a um paciente, ela pode ser objeto de uma série de respostas geradas pelo hospedeiro, como, por exemplo, denaturação ácida no trato gastrointestinal ou clivagem pelas enzimas hepáticas e renais. Além disso, as glicoproteínas recombinantes podem estimular o sistema imunológico e serem reconhecidas por anticorpos, resultando em uma prematura remoção destas glicoproteínas da circulação (Byrne *et al.*, 2007, Bork *et al.*, 2009). A adição de compostos que aumentam a biossíntese de formas

glicosiladas sobre as não glicosiladas, como a cicloheximida (CHX), poderiam alterar a ocupação dos sítios de glicosilação, assim como a composição de carboidratos (Shelikoff *et al.*, 1994; Heller, *et al.*, 2010).

A CHX foi originalmente isolada de *Streptomyces griseus* e possui um variado espectro de atividade: é utilizada como fungicida e também é tóxica para algas, protozoários, plantas e animais (Abou-Zeid, *et al.*, 1976). Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição de síntese proteica, reduz a taxa de alongamento da proteína no ribossomo, em códons por segundo, durante a decodificação do RNA mensageiro, aumentando assim o tempo de trânsito no retículo endoplasmático, onde acontece a glicosilação (Shelikoff *et al.*, 1994; Paoletti *et al.*, 1994; Schneider-Poetsch *et al.* 2010).

O efeito da CHX na biossíntese e sua influência sobre a glicosilação da hPRL foram descritos por Shelikoff *et al.* (Shelikoff *et al.*, 1994) em células de origem murina C127, e em nosso laboratório em células CHO (Heller *et al.*, 2010). De acordo com Shelikoff *et al.* (1994), a ocupação parcial do sítio de glicosilação da hPRL resulta do pouco tempo que a enzima oligosacariltransferase tem para transferir o núcleo de glicanos para a proteína. A CHX, porém, pode alterar a ocupação dos sítios de glicosilação da hPRL e aumentar a secreção da isoforma glicosilada (Shelikoff *et al.*, 1994). Da mesma forma, Heller e colaboradores (2010) demonstraram que a secreção de G-hPRL após o tratamento de células CHO com CHX aumentou cerca de 4 vezes e a fração de massa dessa isoforma também foi aumentada. Após determinação dos oligossacarídeos por MALDI-TOF a G-hPRL-IPEN apresentou diferentes isoformas, com massas moleculares similares às descritas por Price *et al.* (1995). Os bioensaios em células Ba/F3-LLP (linfócitos pro-B murinos - *Low Low Prolactin*) e/ou Nb2 foram utilizados para avaliar a atividade biológica da G-hPRL, confirmando a potência entre 3 a 5 vezes menor em comparação com a NG-hPRL, como relatado por Rafferty e colaboradores (2001) e Price e colaboradores (1995).

Assim, a utilização de CHX aumentaria a produção de G-hPRL. Por outro lado, a utilização de células em suspensão seria uma alternativa para o aumento de produtividade da hPRL em geral. Originalmente, as células CHO dependem de ancoragem para seu crescimento, mas podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão como descrito por Sinacore e colaboradores (2000). Algumas células têm a capacidade de se multiplicar em suspensão, proporcionando o

estabelecimento de bioprocessos simplificados, mais eficientes e de menor custo. As células cultivadas em suspensão apresentam um grande interesse industrial-farmacêutico, tanto pela facilidade de cultivo e ampliação de escala, como pela produtividade volumétrica, atingindo densidades celulares de até $4,0 \times 10^6$ células/mL. O cultivo de células em suspensão apresenta vantagens econômicas, incluindo a eliminação de reagentes de alto custo como o soro fetal bovino, o qual pode determinar uma composição variável entre os lotes, além de ser um potencial introdutor de agentes não desejados como proteases, vírus e príons (Sinacore *et al.*, 2000). A síntese de hPRL em células CHO em suspensão pode proporcionar uma fácil ampliação de escala de produção com alta densidade celular e consequentemente um maior rendimento volumétrico, reduzindo as limitações relativas à produção da hPRL em células aderidas. Outra vantagem desta metodologia está na produção da proteína recombinante na ausência de soro fetal bovino, o que facilita os processos de purificação pela eliminação de proteínas contaminantes oriundas do soro fetal bovino, fato este particularmente importante para a G-hPRL que está presente somente em pequena quantidade no meio condicionado.

O processo de adaptação das células CHO secretoras de hPRL ao crescimento em suspensão, já é utilizado na rotina de nosso laboratório, e resultados obtidos demonstram que estas células se ajustam facilmente ao cultivo celular em suspensão, na ausência de soro fetal bovino (Arthuso *et al.*, 2012). A metodologia de adaptação das células CHO em suspensão seguiu aproximadamente o protocolo descrito por Sinacore *et al.* (2000). O processo para obtenção de células CHO em suspensão é dividido em três etapas: (1) adaptação das células CHO ao crescimento em meio de cultivo sem soro fetal bovino (2) adaptação ao crescimento em suspensão estática e (3) obtenção de alta densidade celular em frascos *spinner*.

As células adaptadas ao crescimento em suspensão permitiram assim uma produção em escala laboratorial utilizando frascos *spinner*. A finalidade dessa produção foi obter quantidades suficientes de G-hPRL purificada para realizar a sua caracterização físico-química e biológica, incluindo a determinação da estrutura de glicanos, possibilitando sua comparação com padrões internacionais de referência e com a G-hPRL hipofisária obtida da NHPP.

As isoformas G-hPRL e NG-hPRL possuem diferentes propriedades imunológicas, biológicas e de ligação ao receptor (Markoff e Lee, 1987; Markoff *et al.*, 1988; Hashim *et al.*, 1990; Fonseca *et al.*, 1991; Sinha, 1995). De acordo com Heller *et al.* (2010) o tratamento de células CHO produtoras de hPRL com CHX, não afetou a estrutura ou função da proteína, sendo que os efeitos quantitativos e qualitativos destes tratamentos foram avaliados por técnicas físico-químicas e ensaios biológicos, como descrito anteriormente. Espera-se então que a população de moléculas de PRL secretadas pelas células tenha uma maior fração de isoforma glicosilada. No entanto, uma apurada análise dos efeitos do tratamento com CHX na composição dos glicanos da hPRL será necessária, uma vez que a natureza da cadeia oligossacarídica de uma proteína pode alterar sua bioatividade, e um ensaio biológico heterólogo *in vivo* não possui precisão e exatidão suficientes para excluir esta possibilidade.

A influência qualitativa e quantitativa do tratamento com CHX poderia ser estudada também para outros glicohormônios, como a tireotrofina humana (hTSH), a qual também é produzida em nosso laboratório e cuja estrutura oligossacarídica foi caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2009).

A obtenção da G-hPRL, e a respectiva caracterização físico-química e biológica obtida neste estudo são, portanto, úteis para estudar o papel dessa isoforma em aplicações futuras. Foi assim otimizada também uma metodologia para a produção em escala laboratorial a partir de células em suspensão, que poderá ser aplicada ou adaptada para outras células produtoras de outras glicoproteínas de interesse industrial/ farmacêutico.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Investigar a composição das estruturas dos glicanos transferidos à G-hPRL produzida por células CHO geneticamente modificadas e cultivadas em suspensão, em comparação com a G-hPRL natural de origem hipofisária.

Objetivos específicos:

- Analisar o efeito da CHX sobre a produtividade e viabilidade celular de células CHO produtoras de hPRL adaptadas ao crescimento em suspensão, na ausência de soro fetal bovino;
- Produção laboratorial em frascos *spinner* de G-hPRL;
- Padronização da purificação de G-hPRL baseada em RP-HPLC;
- Realizar a caracterização físico-química da isoforma G-hPRL e NG-hPRL, incluindo comparações com padrões internacionais ou amostras de referência interna.
- Análises por MALDI-TOF-MS das duas preparações, pituitária e recombinante, para determinar com alta precisão, suas massas moleculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material utilizado no cultivo celular

3.1.1.1 Linhagem celular

- Células CHO DXB-11 mutantes, deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR⁻), transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL;

3.1.1.2 Material plástico

- Garrafas de 75 cm², Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Sistema de filtração de 500 mL, 0,22µm, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos criogênicos de 2 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL (Hamburgo, Alemanha)

3.1.1.3 Reagentes utilizados na cultura celular

- Anfotericina B, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Cicloheximida, Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Bicarbonato de sódio P.A., Synth (São Paulo, Brasil)
- Gentamicina, Shering-Plougt (Rio de Janeiro, Brasil)
- “Minimum Essential Medium” (α-MEM), Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Meio sem soro, CHO-S-SFM II, com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA)
- Metotrexato, Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- Penicilina – Estreptomicina, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)
- Soro fetal bovino, Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, MD, EUA)

3.1.2 Preparações hormonais utilizadas

- G-hPRL de origem hipofisária obtida do National Hormone and Peptide Program, por meio do Dr. A. F. Parlow - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) (Bethesda, MD, E.U.A.) (G-hPRL-NHPP);
- Chemical Reference Standard (CRS) contendo G-hPRL e NG-hPRL obtido da Organização Mundial de Saúde (WHO) (Londres, Inglaterra) (CRS);
- NG-hPRL derivada de bactérias *E.coli*, produzida no laboratório de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP, utilizado como padrão de referência interno (PI-hPRL);
- G-hPRL e NG-hPRL derivadas de células CHO, produzidas no laboratório de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP e utilizadas como padrões de referência internos.

3.1.3 Material utilizado no processo de purificação e análise da hPRL

3.1.3.1 Colunas cromatográficas

A) Coluna de vidro utilizada em cromatografia clássica

- Coluna XK (20 cm X 16 mm D.I.), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

B) Colunas de aço inoxidável utilizadas em Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

- Coluna TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm X 7,5 mm D.I.), Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular
- Coluna C4 Vydac 214TP54 (25cm x 4,6mm D.I.) acoplada a uma pré-coluna Vydac 214 FSK 54, para HPLC de fase reversa, analítica

3.1.3.2 Resinas cromatográficas

- Resina cromatográfica SP Sepharose Fast Flow (SPFF), GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Sílica gel, grupo funcional Diol, tamanho das partículas 10 µm e poros de 125 Å Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de Exclusão Molecular
- Sílica com grupos de ligação butil alifático, tamanho das partículas de 5 µm e com diâmetro de 300 Å, Vydac Separations Group (Hisperia, CA, EUA) para HPLC de Fase Reversa

3.1.3.3 Antissoro e outros reagentes para WB

- Antissoro anti-prolactina humana, produzido em coelho, do NIDDK (Bethesda, MD, USA)
- Proteína A, Pharmacia (Uppsala, Suécia)

3.1.4 Material radioativo

- Na¹²⁵I comercial, livre de carregador e oxidantes, fornecido pela Nordion Europe S.A. (Ottawa, Canadá) em concentração de aproximadamente 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL) utilizado para marcação de proteína A usada no WB

3.1.5 Proteína total

- Kit micro BCA, Pierce (Rockford, EUA).
- Placas de microtitulação com fundo em “U”, Dynatech (Chantilly, EUA).

3.1.6 Reagentes para marcação de Proteína A para WB

- Cloramina T, P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Iodeto de Potássio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Metabissulfito de Sódio, Carlo Erba (São Paulo, Brasil)

3.1.7 Outros reagentes

- Ácido acético glacial, P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil)

- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Acetato de sódio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil).
- Ácido clorídrico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1 (Tampão HEPES), Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)
- Acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Álcool metílico, Merck (São Paulo, Brasil)
- Bis-acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio, Merck (São Paulo, Brasil)
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Glicerol, Merck (São Paulo, Brasil)
- Glicina, Merck (São Paulo, Brasil)
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).
- Nitrato de prata, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)
- Padrões de massa molecular, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Persulfato de amônio, Merck (São Paulo, Brasil)
- TEMED (N, N, N', N' tetrametetenodina), Sigma (St Louis, EUA)
- Tris, Sigma (St Louis, EUA)
- Leite desnatado em pó Molico, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%)

3.1.8 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético com 5 posições Bell-enniun®, Bellco (Vineland, NJ, EUA)
- Agitador magnético modelo 258, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil)
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), modelo SCL-1GA, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA)

- Autoclave horizontal, modelo speedclave II 12L, Odontobrás (São Paulo, Brasil)
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich. Suíça)
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich. Suíça)
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich. Suíça)
- Banho-maria, modelo 146, Fanen (São Paulo, Brasil)
- Câmara de Neubauer, Boeco (Hamburg, Alemanha)
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super speed RC – 28, Sorvall (Newtown, Connecticut, EUA).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm (São Paulo, Brasil)
- Coletor de frações, modelo Frac-200, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80%, Packard Instrument Company (Illinois, EUA)
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil)
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Fluxo laminar classe II A/B, modelo 1140. Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Frascos com volume nominal de 250 mL, Bellco (Vineland, NJ, EUA)
- Freezer -20°C, modelo 0651, Prosdócimo (São Paulo, Brasil)
- Freezer -40°C, modelo AB240, Metalfrio (São Paulo, Brasil)
- Freezer -80°C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, Ohio, EUA)
- Leitor de microplacas modelo Original Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, EUA)

- Liofilizador, modelo Dura Stop – TDS – 3 DURA DRY, FTS Systems (Stone Ridge, EUA).
- Medidor digital de pH, modelo 420^a, Orion (Boston, MA, EUA)
- Membrana para diálise modelo SnakeSkin, 3.500 MWCO, Pierce (Rockford, IL, EUA).
- Micro-centrífuga, modelo 5415P, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha)
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha)
- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 combicoldrac II, LKB, Bromma, Suécia
- Sistema de eletroforese vertical modelo 220, Bio-Rad (Ca, EUA)
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne. (Dubuque, IA, EUA)
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus, Millipore (Bedford, EUA)
- Sistema de transferência Semi-seco Hoefer TE 70, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

3.1.9 Materiais diversos

- Cilindro de CO₂, tipo 2,8, White Martins (São Paulo, Brasil)
- Filmes de raios-X Kodak X-OMAT (Kodak, Sr Louis, MO, EUA) para radiografias do Western Blot
- Membrana de filtração de 0,22µm, Millipore (Bedford, MA, EUA)
- Membrana de nitrocelulose (Hybond-C), 45 µm, Bio-Rad (Hercules, CA, EUA)
- Dispositivo de Ultrafiltração Amicon Ultra-4. Membrana de Celulose regenerada 3000 Daltons, 4mL. Millipore Corporation (Billerica, MA, EUA)

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura de células

Foram comparados dois meios de cultura e sistemas de cultivo:

- α-MEM (Minimum Essential Medium – Alfa Medium- GIBCO) na produção em células aderidas;

- Meio sem soro, CHO-S-SFM II, com nucleosídeos (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA) na produção em células em suspensão.

3.2.2 Células aderidas

Foram utilizadas células CHO transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL (Soares, *et al.*, 2000) com um inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ células, cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ em placa de cultura de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium – Alfa Medium- GIBCO), gentamicina 40 μ g/mL, soro fetal bovino 10%, 100 nM de metotrexato, (cuja função principal é manter a pressão de seleção, estimulando dessa forma a produção de hPRL pelo mecanismo da amplificação gênica), 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina, 40 μ g/mL de gentamicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B. Após as células atingirem confluência, o meio de cultura foi substituído pelo de interesse contendo 0,6 μ g/mL da droga CHX.

3.2.3 Células em suspensão

Para a produção de G-hPRL foram utilizadas células CHO transfectadas com o vetor pEDdc-hPRL (Soares *et al.*, 2000) adaptadas para o crescimento em suspensão na ausência de soro fetal bovino (Arthuso *et al.*, 2012). Criamos um *Seed Bank* de células CHO-hPRL adaptadas ao crescimento em suspensão, cada criotubo contendo $12,5 \times 10^6$ células em 1,6 mL de meio, com SFB 30% e dimetil sulfoxido 10%. Realizamos os estudos de crescimento e expressão em frascos *spinner*, com capacidade nominal de 250 mL. O conteúdo de um criotubo foi ressuspenso em 100 mL de meio CHO-S-SFM II, 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina, 40 μ g/mL de gentamicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B. O cultivo no frasco *spinner* partiu, portanto, com uma concentração celular inicial de aproximadamente 125.000 células/mL. O frasco foi incubado a 37°C, com 5% de CO₂ e agitação de 80 RPM. Quando a concentração celular atingiu o valor de 1×10^6 células/mL teve início a etapa de produção de hPRL, com ou sem adição de CHX.

3.2.4 Influência da concentração de CHX

Com base no trabalho realizado por Shelikoff *et. al.* (1994) e Heller *et. al.* (2010), ambos utilizando células aderidas, avaliamos a influência da CHX, um inibidor de síntese proteica, na expressão das isoformas G-hPRL e NG-hPRL de hPRL recombinante, porém desta vez cultivadas em suspensão. A solução estoque de CHX (100 µg/mL) foi preparada em tampão fosfato salina (PBS), aliquoteada e congelada a -20°C. Foram realizados estudos sobre a influência da CHX, em diferentes concentrações, no intervalo de 0 a 1 µg/mL (0 µg/mL; 0,02 µg/mL ; 0,06 µg/mL ; 0,2 µg/mL ; 0,6 µg/mL e 1 µg/mL).

3.2.5 Produção laboratorial da G-hPRL

Com o objetivo de obter maiores quantidades de G-hPRL para posterior purificação, caracterização físico-química e biológica, foram realizadas produções em frascos *spinner* com volume nominal de trabalho de 250 mL. A produção foi iniciada quando a concentração celular atingiu valor superior a 1×10^6 células/mL. As células foram centrifugadas e o meio condicionado foi totalmente substituído, tendo sido adicionada a quantidade adequada de CHX e a concentração celular, se necessária, ajustada para 1×10^6 células/mL. Esse procedimento foi repetido a cada 24 horas, durante todo o processo de produção, com coletas diárias de 100 mL por frasco *spinner*. Foram separadas amostras de 1 mL de cada coleta para análises por RP-HPLC, HPSEC, SDS-PAGE e WB.

3.2.6 Purificação da G-hPRL

O processo de purificação da G-hPRL presente no meio condicionado é composto basicamente por duas etapas. A primeira etapa consiste na concentração e simultânea purificação utilizando uma resina cromatográfica por troca iônica tipo catiônica, SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, São Paulo, Brasil). Nessa primeira etapa, o pH do meio condicionado foi ajustado para 5,0 utilizando ácido acético glacial. O material foi então aplicado em uma coluna com a resina SP-Sepharose Fast Flow equilibrada com acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A absorbância em luz ultra-violeta foi monitorada a 280 nm. Em seguida, foi aplicado novamente o tampão de equilíbrio até a redução da absorbância aos valores iniciais.

Com o objetivo de eliminar impurezas foi realizada uma lavagem com esse mesmo tampão acrescido de NaCl 90 mM. A eluição da prolactina foi realizada com tampão HEPES 25 mM, pH 8,0. O fluxo utilizado foi de 200 mL/h e as frações coletadas foram de 5 mL.

Diferentes frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE, e as com maior concentração de proteína de interesse foram selecionadas para a segunda etapa de purificação, que utiliza uma coluna de RP-HPLC. Foi obtido um pool das frações escolhidas que foi aplicada a uma coluna C₄ analítica de fase reversa (25cm x 4,6 mm D.I.). A coluna, conectada ao sistema de HPLC, foi mantida a 25°C usando na fase móvel dois tampões A e B (tampão A: fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 e tampão B: Acetonitrila). A eluição das proteínas foi realizada em três fases:

1ª fase (aplicação da amostra e lavagem): 0-45 minutos, 45% tampão B

2ª fase (eluição das isoformas de hPRL): 45-85 minutos: 50% tampão B

3ª fase (restabelecimento da linha de base): 85-105 minutos: 45% tampão B

Foi utilizado um fluxo de trabalho de 0,5 mL/min com detecção por luz ultravioleta no comprimento de onda de 220nm. O pool final foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, contendo 0,15M NaCl e 200µg/mL de glicina. Após a diálise, a G-hPRL foi liofilizada sob vácuo controlado 200 mT (-22°C) na fase primária e sob vácuo máximo (8-9 mT) na fase secundária com a temperatura da prateleira elevada para 20°C, para retirada da umidade residual.

3.2.7 Caracterização físico-química

3.2.7.1 Análise por SDS-PAGE

As amostras do meio de cultura condicionado obtidas durante a produção com células CHO adaptadas para o crescimento em suspensão e das frações obtidas durante as etapas de purificação da hPRL foram analisadas mediante SDS-PAGE. (Bowen *et al.*, 1980; Sambrook *et al.*, 1989).

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de poliacrilamida 15% em condição não redutora. O equipamento utilizado foi o sistema de eletroforese vertical Hoefer mini VE (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia), aplicando-se

uma corrente com intensidade de 35 mA. A duração aproximada da corrida foi de 1 hora.

As amostras foram preparadas adicionando-se o Tampão de amostra (4 vezes concentrado, glicerol 20%; SDS 6%, 0,125 M Tris pH 6,8, azul de bromofenol 0,005%) e em seguida fervidas por aproximadamente 5 minutos.

A fixação foi realizada imergindo o gel em solução fixadora contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água, sob agitação, por 1 hora. Após a fixação, as bandas proteicas foram reveladas por *Coomassie Brilliant Blue* G-250 ou por nitrato de prata.

3.2.7.1.1 Revelação com *Coomassie Brilliant Blue* G-250

O gel é imerso em solução corante composta por 0,25% de azul de Coomassie (“Coomassie Brilliant Blue G-250”), 45% de metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 15 minutos e a seguir, descorado em solução de ácido acético 10%, com troca a cada hora (3-4 vezes). A conservação é feita em solução de ácido acético 1%.

3.2.7.1.2 Revelação com nitrato de prata

A técnica utilizada foi baseada na descrita por Wray *et. al.* (1981). Após a fixação, o gel é submetido a 3 ciclos de lavagem alternando-se água destilada e deionizada com 50% metanol, sob agitação e com duração de 5 a 10 minutos para cada lavagem. Após a última lavagem com água destilada e deionizada o gel é incubado por 15 minutos sob agitação na solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,8%, NaOH 0,2 N, NH₄OH 0,2 N) recém preparada. Ao final da incubação o gel é lavado novamente duas vezes com água destilada e deionizada e em seguida mergulhado na solução reveladora (0,005% ácido cítrico, 0,05% formaldeído) recém preparada. A partir desse momento a agitação passa a ser manual observando-se cuidadosamente as bandas que devem surgir gradativamente (6 a 8 minutos). Quando a intensidade desejada das bandas é atingida o gel é imediatamente mergulhado na solução fixadora para cessar a reação. Após a revelação, o gel é lavado 2 vezes ou mais com solução fixadora e conservado em solução com 40% metanol e 1% glicerol. Caso seja necessário reduzir a coloração de fundo para visualizar melhor as bandas, o gel pode ser

mergulhado por alguns minutos em solução de hipossulfito de sódio 5%, sob leve agitação.

3.2.8 Análise por Western Blotting (WB)

Na análise por WB, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE seguida de transferência semi-seca para membrana de nitrocelulose (45 µm) realizada por eletroeluição e posterior incubação com antissoro anti-prolactina humana do NIDDK (Bethesda, MD, USA) produzido em coelho, como descrito a seguir.

Após a transferência, a membrana foi tratada por 10 minutos com PBS contendo 5% de leite desnatado, sendo incubada por 18h a temperatura ambiente com 50 mL de antissoro diluído (1:2500) em PBS e 5% de leite desnatado e mantida sob agitação. Após a incubação com o antissoro, foram realizadas 5 lavagens com PBS e 5% de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS e 5% de leite contendo 400.000 cpm/mL de proteína A (Pharmacia, Uppsala, Suécia) marcada com ^{125}I (^{125}I -proteína A). Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS por pelo menos 6 vezes. Na sequência, foi colocada na estufa a 37°C até secar, sendo posteriormente envolvida em um filme plástico transparente de PVC, estando assim pronta para a auto-radiografia. A exposição auto-radiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80 °C. O tempo de exposição depende da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da ^{125}I -Prot. A, da afinidade e título dos anticorpos e da quantidade do produto a ser analisado.

3.2.9 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

A avaliação qualitativa e quantitativa da PRL foi realizada por técnica de HPSEC e RP-HPLC (Riggin *et al.*, 1988; Dalmora *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2002). Em ambas, a detecção foi feita mediante luz ultravioleta, no comprimento de onda de 220 nm.

No caso da HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática utilizando como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, sendo o fluxo de trabalho de 1,0 mL/min.

Na RP-HPLC a coluna foi mantida a 42 °C e foi usado na fase móvel um tampão com 71% de Tris 0,05 M, pH 7,5 e 29% de N-propanol, sendo o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min.

Tanto em HPSEC quanto em RP-HPLC a determinação do tempo de retenção e a quantificação se fez comparativamente às preparações recombinantes IPEN (G-hPRL produzida em CHO e NG-hPRL produzida em CHO e/ou *E. coli*) e/ou do padrão internacional de prolactina recombinante da WHO - CRS e/ou G-PRL hipofisária.

3.2.10 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total foi estimada usando o método Micro BCA, que consiste na detecção colorimétrica e quantificação da proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinconínico (BCA). A cada ensaio é realizada uma curva padrão de calibração que relaciona diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA) pura (0,5 - 200 µg/mL) com a absorvância correspondente, no comprimento de onda de 540nm. Os seguintes reagentes foram adicionados simultaneamente em cada poço de placas de 96 poços: 125 µL de amostra; 125 µL de reagente de trabalho. O reagente de trabalho é constituído por: 50% solução A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, tartarato de sódio e hidróxido de sódio); 48% solução B (solução aquosa de ácido bicinconínico 4%) e 2% solução C (sulfato cúprico penta-hidratado 4%).

3.2.11 Ensaio Biológico

Foram realizados estudos para avaliar a potência da prolactina glicosilada em ensaios de proliferação celular com células Nb2 e Ba/F3-LLP, linhagens prolactino-dependentes com receptores de prolactina murino e humanos, respectivamente (Tanaka *et al.*, 1980; Glezer *et al.*, 2006). Foi utilizado como referência o padrão de hPRL recombinante da WHO 97/714.

3.2.11.1 Bioensaio com células Ba/F3-LLP

As células Ba/F3-LLP são mantidas rotineiramente em suspensão em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por aquecimento (20 minutos a 50 °C), 2 mM de glutamina, 50 UI/mL de penicilina, 50

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 700 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina (G418) e 1 ng/mL de hPRL recombinante (rhPRL). Antes de começar o ensaio de proliferação, as células são mantidas em meio sem prolactina e com 1% de SFB inativado, por 4 a 6 horas, depois distribuídas em placa de 96 poços (2×10^4 células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 μL por poço. Depois de 72h de incubação a 37 °C e 5% de CO_2 , o número de células viáveis é avaliado por coloração com MTS (Chen *et al.*, 1998). Brevemente, 2 mg/mL de MTS [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolin (Promega Corp., Madison, WI, USA)] dissolvidos em tampão fosfato-salina (PBS) são misturados na proporção de 20:1 (vol/vol) com fenazina metosulfato (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.92 mg/mL em PBS. Vinte microlitros da mistura são então adicionados a cada poço e após 2h de incubação a 37°C a absorbância é lida no comprimento de onda de 490 nm utilizando um leitor de microplacas (Original Multiskan EX Thermo Electron Corporation, EUA).

3.2.11.2 Bioensaio com células Nb2

As células Nb2 foram mantidas rotineiramente em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de soro de cavalo castrado, penicilina (50 UI/mL), e 2-ME (Betamercaptoetanol) 5 mM em tampão fosfato-salina. Antes de começar o ensaio de proliferação, as células foram mantidas por 8 horas no meio de pré-ensaio, similar ao meio de crescimento, porém com redução do SFB de 10 para 1%. Depois deste período, o meio foi centrifugado e as células foram ressuspensas no meio de ensaio, sem SFB e com adição de HEPES 0,015 M, sendo então distribuídas em placa de 96 poços (20×10^3 células/poço) com um volume final, incluindo a amostra, de 200 μL por poço. Depois de 72h de incubação a 37 °C e 5% de CO_2 , o número de células viáveis foi avaliado por coloração com MTS (Chen *et al.*, 1998), da mesma forma descrita para as células Ba/F3-LLP.

3.2.12 Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Uma amostra da isoforma G-hPRL hipofisária foi enviada para determinação da massa molecular por MALDI-TOF ao American International Biotechnology Laboratory Product Development (Richmond, VA, EUA). A espectrometria de

massa foi realizada em espectrômetro Voyager DE BioSpectrometry Workslation (Applied Biosystem), utilizando uma solução saturada de ácido sinapínico em 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoracético como matriz.

3.2.13 Análise de carboidratos

3.2.13.1 Análise estrutural

A análise das estruturas de carboidratos presentes na G-hPRL recombinante e hipofisária foi realizada após desnaturação em 0,5% SDS e 1% de β -mercaptoetanol (90°C, 10 min) e clivagem dos glicanos pela ação da enzima PNGase F (Roche # 13643021) de *F. meningosepticun* (37°C , 15 horas com 13UI).

A G-hPRL-NHPP liofilizada utilizada nos nossos estudos foi adquirida junto ao Nacional Institute of Diabetes and Kidney Diseases (NIDDK) produzida e fornecida pelo “National Hormone and Peptide Program”. Foram utilizados 4 frascos com o total de 340 μ g de produto liofilizado para obtenção do perfil de N-glicosilação por MALDI-TOF-MS. Outros 3 frascos com 262 μ g foram utilizados para quantificação do ácido siálico e dos monossacarídeos neutros.

A G-hPRL recombinante liofilizada utilizada nos nossos estudos foi produzida no nosso laboratório. Foi utilizado 1 frasco com o total de 450 μ g de produto liofilizado sendo 262 μ g para obtenção do perfil de N-glicosilação por MALDI-TOF-MS e 188 μ g para quantificação dos monossacarídeos neutros. No caso da amostra de G-hPRL recombinante foi realizada a dessalinização.

Após a deglicosilação, a porção de carboidratos (N-glicanos) foi purificada e liofilizada. Para ocorrer uma melhor separação dos N-glicanos foi adotado um protocolo de permetilação, utilizando hidróxido de sódio e dimetil sulfóxido. O produto derivado da reação química foi purificado (C18) e eluído com 25% de acetonitrila, fração contendo os glicanos sulfatados enquanto que os glicanos não sulfatados e fosforilados foram eluídos na fração com 50% de acetonitrila. Cada fração foi liofilizada antes da análise por MALDI-TOF-MS. No caso da G-hPRL recombinante só foi realizada a eluição para proteínas não sulfatadas, pois as células CHO não possuem maquinaria para sulfatar as proteínas.

Os glicanos purificados e permetilados foram solubilizados em 20 μ L de metanol/H₂O 50%. 1 μ L dos N-glicanos foram misturados com 2,5 μ L de ácido

diidroxibenzóico, (DHB, LaserBiolabs) e analisados por espectrometria de massa MALDI no VOYAGER DE PRO (AB Sciex).

A interpretação das estruturas dos glicanos correspondentes às massas monoisotópicas foi realizada usando “EXPAZY Glycomod Tool” e “GlycoWork bench”. As análises foram realizadas na “ZATE Faculté de Médecine et de Pharmacie - PROTEODYNAMICS” (Clermont-Ferrand, França). Informações mais detalhadas podem ser encontradas no site: “www.proteodynamics.com”.

3.2.13.2 Análise composicional

Foram determinados os monossacarídeos neutros: fucose (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactose (Gal), manose (Man) e ácido neuramínico ou siálico (AcNeu).

Os monossacarídeos neutros livres da G-hPRL recombinante e hipofisária foram obtidos por hidrólise com ácido trifluoroacético 2 M, durante 4 h, 100°C. Os ácidos siálicos livres foram obtidos por digestão com neuraminidase de *Clostridium perfringens* (Biolabs, P0720S ref). Foram adicionados 2,5 UI de enzima por µg de amostra e incubou-se a glicoproteína em pH 4,5, durante 16 horas, a 37°C.

Depois, as amostras foram evaporadas por speed-vac, dissolvidas em água ultrapura e analisadas por cromatografia de troca aniônica com pH elevado, com um detector amperométrico por pulsos (HPAEC-PAD). Foi utilizada uma coluna PA20 com pré-coluna aminotrap (sistema Dionex). A glicose foi adicionada como um padrão interno. Cada amostra foi analisada duas vezes, a fim de quantificar o seu conteúdo de monossacarídeos. Estas análises foram realizadas na Université d’Orléans, GLYcoDiag (Orléans, França).

4 RESULTADOS

4.1 Produção de hPRL em frasco *spinner*

Para obtenção de quantidade suficiente (~1mg) de G-hPRL necessária para esse trabalho realizamos estudos visando otimizar a produção dessa isoforma. Partimos de uma metodologia de cultivo já desenvolvida no laboratório utilizando células CHO geneticamente modificadas, adaptadas ao crescimento em suspensão e cultivadas em frascos *spinner*. Nessa condição a produção volumétrica confirmou os valores de 5-7 µg hPRL/mL previamente obtidos por Arthuso *et al.* (2012). Estes valores foram quantificados por RP-HPLC, analisando diretamente 500 µL de meio condicionado, como exemplificado pelos cromatogramas apresentados na Figura 4.

Figura 4. Análises por RP-HPLC **A.** PI-hPRL, 5 μ g; **B.** 500 μ L do meio de cultura condicionado coletado durante a produção. Em hachurado temos a área sob o pico considerada na quantificação da hPRL recombinante.

4.2 Efeitos da CHX na expressão da G-hPRL

Considerando o trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa (Heller *et al.*, 2010) que relata o aumento em valores absolutos e relativos da G-hPRL em relação à NG-hPRL devido aos efeitos da CHX, resolvemos investigar o efeito dessa droga na nossa atual condição de cultivo. Inicialmente testamos os efeitos de diferentes concentrações dessa droga na expressão da hPRL durante a produção em frascos *spinner* (Figura 5).

Figura 5. Análise por Western Blotting comparando amostras do meio de cultura condicionado obtidas de cultivos em frascos *spinner* na presença de diferentes concentrações de CHX (0,06; 0,2; 0,6 e 1µg/mL). Foram analisadas coletas do 2º e 3º dias de produção.

Verificamos que com o aumento da CHX a concentração da G-hPRL apresentou pouca alteração, enquanto ocorreu diminuição acentuada da quantidade da NG-hPRL. A exceção foi o tratamento com 1 µg/mL de CHX, onde observamos um declínio acentuado na expressão das duas isoformas. Portanto a concentração de 0,6 µg/mL foi escolhida para produção de G-hPRL, em conformidade com a concentração utilizada por Heller e col. (2010) em cultivo de células aderidas.

4.3 Ação da CHX no crescimento celular durante a produção

Para avaliar o efeito da CHX sobre o crescimento celular foram realizados dois lotes de produção, um com adição de 0,6µg/mL de CHX, e outro considerado controle, sem adição de CHX. Cada lote de produção foi obtido durante 10 dias consecutivos de coleta, como descrito em material e métodos. A análise do crescimento celular durante a produção é exemplificada na Figura 6.

Figura 6. Análise comparativa do crescimento celular com adição de 0,6µg/mL de CHX ou sem a droga (Controle), durante os dez dias de produção em suspensão (frascos *spinner*).

Observamos que na presença de 0,6µg/mL de CHX as células continuam praticamente dobrando sua população a cada 24h, demonstrando um pequeno declínio (aproximadamente 6,5%) quando comparado com o controle (sem adição de CHX).

A avaliação da produção diária das duas isoformas de hPRL foi realizada por WB, como apresentado na Figura 7. Observamos que durante o cultivo com CHX o aumento na proporção da isoforma glicosilada já foi obtido no primeiro dia de produção e a existência de pelo menos duas variantes principais de G-hPRL. Observamos também uma diminuição visível da prolactina total em relação ao cultivo na ausência de CHX (Figura 7, linha 7).

Figura 7. Western Blotting analisando amostras tratadas com 0,6µg/mL de CHX coletadas durante a produção em suspensão, em meio CHO-S-SFM-II, 37°C, 5% CO₂ em frascos *spinner*. **1 a 6.** coletas do 1º ao 6º dia, respectivamente; **7.** controle, sem adição de CHX, 2º dia.

4.4 Purificação da G-hPRL

A purificação da G-hPRL consistiu de duas etapas. A primeira utilizou uma técnica cromatográfica convencional, em uso rotineiro no laboratório: troca catiônica (Soares et. al., 2000). Já a segunda etapa foi caracterizada pelo desenvolvimento de uma metodologia para separação da G-hPRL da sua isoforma NG-hPRL utilizando HPLC de fase reversa. Essa estratégia foi utilizada para cultivos na presença ou não da CHX.

4.4.1 Primeira etapa: Troca Catiônica com a resina SP-Sepharose

Como primeira etapa de purificação utilizamos a cromatografia de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow, que além de purificar parcialmente a prolactina, serviu principalmente como etapa de concentração, possibilitando a quantificação da hPRL com maior precisão mediante técnicas de HPLC.

Exemplos dessa etapa de purificação e correspondentes cromatogramas e análises por SDS-PAGE, RP-HPLC e HPSEC de lotes de produções com e sem a presença CHX são apresentados a seguir.

4.4.1.1 Primeira etapa de purificação da hPRL (cultivo controle)

O perfil cromatográfico da troca catiônica e o correspondente SDS-PAGE analisando amostras correspondentes ao pico de eluição da hPRL derivada do cultivo sem adição de CHX são apresentados na Figura 8. Observamos novamente que nessa condição a isoforma não glicosilada é a mais abundante (90-95%), o que dificulta a quantificação da isoforma glicosilada (Figura 9 e 10).

Figura 8. **A.** Exemplo de perfil cromatográfico obtido na purificação da hPRL presente em 1 L de meio de cultura de CHO mediante cromatografia com resina SP-Sepharose Fast Flow, cultivo em suspensão na ausência de CHX. **B.** Análise por SDS-PAGE de diferentes frações do pico principal de eluição correspondente à hPRL coletado da cromatografia catiônica. **1.** Marcador de massa molecular; **2.** PI-hPRL, 500ng; **3. a 9.** frações #40 a #46.

A coleta correspondente à eluição da hPRL foi analisada por RP-HPLC e HPSEC, cujos perfis cromatográficos são apresentados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9. Análise por RP-HPLC **A.** PI-hPRL, 5µg; **B.** Pool (500 µL) obtido das frações #42, #43, #44 e #45 coletadas do pico principal da purificação de 1 L de meio condicionado mediante cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultura realizada em meio sem a adição de CHX.

No cromatograma apresentado na figura 9B podemos identificar e quantificar o pico da G-hPRL. A presença dessa isoforma foi confirmada por WB (dados não apresentados).

Figura 10. Análise por HPSEC. **A.** PI-hPRL 5 μ g; **B.** Pool (500 μ L) obtido das frações #42, #43, #44 e #45 coletadas do pico principal da purificação de 1 L de meio condicionado mediante cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultura realizada em meio sem a adição de CHX.

Na análise da coleta por HPSEC (Figura 10B) verificamos vários picos, possivelmente relacionados a outras proteínas que interferem acentuadamente na

análise e quantificação da G-hPRL, com tempo de retenção de 16,75 min. Observamos também um pico correspondente a sais presentes na amostra (21.36 min).

4.4.1.2 Primeira etapa de purificação da hPRL (cultivo com adição de CHX)

O perfil cromatográfico da troca catiônica e o correspondente SDS-PAGE analisando amostras correspondentes ao pico de eluição da hPRL derivada do cultivo com adição de CHX são apresentados na Figura 11.

Durante a purificação confirmou-se que a expressão das duas isoformas ocorre aproximadamente na mesma proporção. A separação bem definida das duas isoformas é bem evidenciada na análise por RP-HPLC (Figura 12). Porém o mesmo não ocorre na análise por HPSEC (Figura 13), possivelmente devido à diminuição da quantidade da prolactina total.

Figura 11. A. Exemplo de Perfil cromatográfico obtido na purificação da hPRL presente em 1 L de meio de cultura de CHO mediante cromatografia com resina SP-Sepharose Fast Flow, cultivo em suspensão na presença de CHX. **B.** Análise por SDS-PAGE de diferentes frações do pico principal de eluição correspondente à hPRL. 1, Marcador de massa molecular; 2. a 9. frações #40 a #47, respectivamente.

Análises por RP-HPLC e HPSEC do pool obtido dessa purificação são apresentadas nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 12. Análise por RP-HPLC **A.** PI-hPRL, 5µg; **B.** Pool (500 µL) obtido das frações #42, #43, #44 e #45 coletadas do pico principal da purificação do meio condicionado mediante cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultura realizada em meio com adição de CHX.

Figura 13. Análise por HPSEC **A.** PI-hPRL, 5 μ g; **B.** Pool (500 μ L) obtido das frações #42, #43 e #44 coletadas do pico principal após purificação do meio condicionado mediante cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultura realizada em meio com adição de CHX.

Após essa primeira etapa de purificação, a hPRL presente em 1 L de meio, além de parcialmente purificada, foi concentrada aproximadamente 50 vezes. Essa concentração foi especialmente importante no caso do cultivo na presença de

CHX, uma vez que a acentuada diminuição da quantidade de prolactina total não permitia a quantificação no meio de cultura, por RP-HPLC, nem mesmo da isoforma NG-hPRL, normalmente com tempo de retenção maior. Análises de alguns lotes de produção (1 L de meio por lote) de hPRL com e sem presença de CHX no meio de cultura são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os rendimentos da primeira etapa de purificação (troca catiônica) realizada com o meio CHO-S-SFM-II obtido do cultivo em frascos *spinner*, com e sem adição de CHX, e produção com células aderidas em placas, meio α -MEM e adição de CHX. A quantificação foi realizada com base nas análises por RP-HPLC.

<i>Meio/ condição de cultivo</i>	<i>CHX ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>n</i>	<i>NG-hPRL ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>G-hPRL ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>% G-hPRL em relação à hPRL total</i>
CHO-S-SFM-II/ Suspensão	0	3	3088 $\pm$ 25,8%	178 $\pm$ 42,3%	5,4 $\pm$ 13,7%
	0,6	3	190 $\pm$ 29,2%	118 $\pm$ 43,8%	38 $\pm$ 17,7%
α MEM/aderida em placas	0,6	1	74	102	57,9

A análise da Tabela 1 possibilita observar que na presença da CHX ocorreu uma diminuição acentuada da isoforma NG-hPRL (~16 vezes), enquanto que a expressão da G-hPRL não apresenta diferença significativa nessas duas condições. Observamos também que nessa etapa a porcentagem da isoforma glicosilada em relação à PRL total passa de 5,4 a 38% com a adição de CHX. Com a diminuição da isoforma não-glicosilada, após tratamento com CHX, é esperado que a purificação da G-hPRL nas etapas seguintes seja facilitada. Na mesma tabela são apresentados dados de produção em placas com células aderidas e meio α -MEM. Observamos que a proporção de G-hPRL é maior (57,9%), entretanto em valor absoluto a concentração de G-hPRL é menor.

4.4.2 Segunda etapa: RP-HPLC

Como segunda etapa de purificação, utilizamos a RP-HPLC com acetonitrila como solvente. Essa metodologia, padronizada nesse trabalho, permitiu o uso dessa coluna como coluna preparativa, resultando em método rápido e eficiente para separação das isoformas G-hPRL e NG-hPRL. Após alguns estudos as condições adequadas para uma separação eficiente das isoformas da hPRL foram a aplicação 6mL do produto coletado da etapa de purificação por troca catiônica (ao contrário dos 2mL iniciais).

Exemplos dessa etapa de purificação e correspondentes cromatogramas e análises por SDS-PAGE, RP-HPLC e HPSEC de lotes de produção com e sem a presença de CHX são apresentados a seguir.

4.4.2.1 Segunda etapa de purificação da hPRL (cultivo controle)

O perfil cromatográfico da RP-HPLC analisando amostras correspondentes ao pico de eluição da hPRL derivada das frações #42 a #45 da cromatografia de troca catiônica sem adição de CHX são apresentados na Figura 14.

Figura 14. RP-HPLC preparativa utilizando acetonitrila na fase móvel. Análise de 500 μ L do pico correspondente à eluição da hPRL do meio condicionado em cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultivo realizado em meio sem a adição de CHX.

Verificamos que a proporção bem maior da NG-hPRL interfere de forma importante no pico correspondente à G-hPRL, o que dificulta a separação adequada da G-hPRL. A isoforma NG-hPRL foi purificada para ser utilizada como padrão de referência: NG-hPRL-IPEN. Foi utilizada também nos estudos para padronizar a liofilização como relatado no capítulo 4.5.

A coleta correspondente à eluição da NG-hPRL foi analisada por RP-HPLC e HPSEC, cujos perfis cromatográficos são apresentados na Figura 15.

Figura 15. Análise por HPLC da NG-hPRL purificada. **A.** Perfil cromatográfico por RP-HPLC analítica (com n-propanol na fase móvel), 100 μ L de amostra. **B.** Perfil cromatográfico por HPSEC, 100 μ L de amostra.

Verificamos nos cromatogramas da Figura 15 que essa isoforma está com bom grau de pureza. No cromatograma B temos um pico na posição de 21,628 min que corresponde à glicina presente no tampão, os picos em 11,022 min e 13,804 min são dímeros e agregados, respectivamente.

4.4.2.2 Segunda etapa de purificação da hPRL (cultivo com adição de CHX).

O perfil cromatográfico da RP-HPLC analisando amostras correspondentes ao pico de eluição da hPRL derivada das frações #42 a #45 da cromatografia de troca catiônica com adição de CHX são apresentados nas Figuras 16 e 17.

Figura 16. RP-HPLC utilizando acetonitrila na fase móvel. **A.** Preparação de NG-hPRL purificada, produzida por células CHO (NG-hPRL-IPEN), 6 µg; **B.** Análise de 2000 µL do pico correspondente à hPRL obtida da purificação do meio condicionado utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. Cultivo em meio com adição de CHX.

Figura 17. A. Perfil cromatográfico esquemático identificando as frações coletadas da RP-HPLC (com acetonitrila), correspondente à aplicação de 2 mL (de um volume total de 15mL) provenientes da cromatografia catiônica. Cultivo com adição de CHX. **B.** Frações coletadas analisadas por SDS-PAGE. 1, PI-hPRL, 500ng; 2 a 8, frações de #8 a #14, respectivamente.

Observamos nas Figuras 16 e 17 que a purificação por RP-HPLC resultou em uma separação bem definida das duas isoformas de hPRL, confirmada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 17B). Analisando o gel fica evidenciada a existência de pelo menos duas variantes principais de G-hPRL.

4.4.3 Otimização da purificação de G-hPRL

Após estabelecermos as condições adequadas de purificação da G-hPRL por RP-HPLC decidimos aplicar volumes maiores do produto coletado na cromatografia de troca catiônica, na busca de um produto final mais concentrado. Foram analisadas aplicações de 2, 4 e 8 mL de um volume total de 15 mL provenientes da purificação por troca catiônica de 1L de meio condicionado, cujos cromatogramas são apresentados na Figura 18.

Figura 18. Cromatogramas sobrepostos, comparando diferentes análises por RP-HPLC preparativa utilizando acetonitrila na fase móvel. As amostras correspondem a hPRL que foi obtida da purificação do meio condicionado após cromatografia catiônica utilizando a resina SP-Sepharose Fast Flow. São comparadas aplicações com quantidade diferente de material: **2 mL** (em preto), **4 mL** (em rosa) e **8 mL** (em azul), da mesma solução. Na análise com quantidade de amostra maior (8 mL) o tempo de aplicação da solução com 45% de acetonitrila foi estendido, para garantir uma melhor separação.

Também foi testada a aplicação de 6 mL, porém derivada desta vez de uma produção de 2L de meio condicionado purificado por cromatografia de troca catiônica. O cromatograma correspondente e a análise por SDS-PAGE são apresentados na Figura 19.

Figura 19. Exemplo do uso do RP-HPLC como coluna preparativa, após a otimização das condições de produção. **A.** perfil cromatográfico correspondente à aplicação de 6 mL (de um volume total de 15mL) obtidos da purificação da hPRL presente em 2L de meio condicionado após cromatografia catiônica, cultivo em meio com adição de CHX. **B.** esquema do perfil cromatográfico apresentado em “A” identificando as frações coletadas. **C.** Frações coletadas analisadas por SDS-PAGE. 1. Marcador de massa molecular. 2 a 6. Frações de #30 a #34, respectivamente; 7. Pool das frações #37 e #38; 8. Pool das frações #39 e #40; 9. G-hPRL hipofisária obtida do NIDDKD, National Hormone & Peptide Program (1µg).

Considerando que no início da otimização dessa etapa de purificação utilizamos 2 mL de solução derivados da purificação de 1L de meio e no final foram aplicados 6 mL provenientes de 2 L de meio, estima-se um aumento da quantidade de material aplicado na coluna de aproximadamente 6 vezes. Os resultados apresentados na Figura 19 mostram que mesmo com esse aumento significativo foi possível obter as duas isoformas bem separadas e com alto grau de pureza. Aplicação de quantidades maiores de material precisam ser melhor avaliadas, pois observamos um aumento significativo no tempo de corrida e a separação das duas isoformas pode ficar comprometida.

4.5 Padronização da liofilização

Uma das etapas desse trabalho foi a obtenção da G-hPRL liofilizada, possibilitando sua apropriada conservação e também facilitando o seu transporte quando do envio das amostras para a análise dos carboidratos. Optamos por realizar alguns estudos de liofilização utilizando a isoforma NG-hPRL purificada por troca catiônica e RP-HPLC. Após a purificação por RP-HPLC é necessário eliminar a acetonitrila para melhorar a eficiência da liofilização, para isso realizamos uma diálise por 12 horas utilizando o tampão fosfato de sódio 0,02M, cloreto de sódio 0,15M, pH= 7,0 com adição de glicina 200ug/mL como agente protetor. Foram realizadas 4 trocas de 1L. Após a liofilização a amostra foi ressuspensa e analisada por HPSEC e RP-HPLC (Figuras 20 e 21, respectivamente).

Figura 20. Análise por HPSEC de amostras de NG-hPRL durante estudos de liofilização. **A.** PI-hPRL, 5 μ g; **B.** Amostra de NG-hPRL purificada logo após diálise, na presença de 200 μ g/mL de glicina. **C.** Amostra de NG-hPRL ressuspensa após liofilização. As setas indicam o pico correspondente à glicina adicionada como fator de proteção durante a diálise.

Observamos na Figura 20, no tempo de corrida de 23,5 minutos um pico correspondente à glicina adicionada para proteção da hPRL presente na liofilização. Esse pico dificulta uma quantificação mais precisa da NG-hPRL por HPSEC, porém não observamos aumento de dímeros e agregados devidos à liofilização.

Figura 21. RP-HPLC analítica (com n-propanol na fase móvel) de amostras de NG-hPRL durante estudos de liofilização. **A.** PI-hPRL, 5µg; **B.** Amostra de NG-hPRL purificada logo após diálise, na presença de 200µg/mL de glicina; **C.** Amostra de NG-hPRL ressuspensa após liofilização.

Utilizando as análises por RP-HPLC (Figura 21), nas quais a glicina não causa interferências, calculamos uma recuperação de 83,7 % da NG-hPRL após a liofilização.

4.6 Caracterização da G-hPRL

4.6.1 Análises por HPLC

Após as etapas de purificação e liofilização analisamos o produto por RP-HPLC e HPSEC em comparação com padrões de referência externos e internos. Os cromatogramas correspondentes são apresentados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22. Análises por RP-HPLC. **A.** Padrão de NG-hPRL IPEN (CHO); **B.** Padrão de G-hPRL IPEN (CHO); **C.** G-hPRL produzida por células CHO e purificada por RP-HPLC; **D.** G-hPRL purificada liofilizada produzida por células CHO; **E.** G-hPRL hipofisária obtida do NIDDKD, National Hormone & Peptide Program; **F.** CRS – WHO, contendo G-hPRL e NG-hPRL recombinantes produzidas em células C-127.

Observamos na Figura 22 que o tempo de retenção (t_R) da NG-hPRL, de aproximadamente 39 min, é bem superior ao da G-hPRL, demonstrando que a NG-hPRL é mais hidrofóbica. A G-hPRL produzida no IPEN (Figura 22 C) apresentou um único pico, bem definido e com t_R de 24,5 min. A G-hPRL hipofisária (Figura 22

E) apresentou um pico principal com t_R de 25 min e um pico secundário com t_R de 22,3. Na análise da hPRL da WHO (Figura 22 F) observamos várias isoformas de G-hPRL, além da NG-hPRL.

Figura 23. Análise por HPSEC. **A.** Padrão de NG-hPRL IPEN (CHO); **B.** Padrão de G-hPRL IPEN (CHO); **C.** G-hPRL produzida por células CHO e purificada por RP-HPLC; **D.** G-hPRL purificada liofilizada produzida por células CHO; **E.** G-hPRL-NHPP; **F.** CRS – WHO, contendo G-hPRL e NG-hPRL recombinantes produzidas em células C-127.

Na Figura 23 todas as amostras de G-hPRL apresenta um pico bem definido e com tempo de retenção de 16,4 min, enquanto, a NG-hPRL apresenta tempo de retenção de aproximadamente 18,5 min.

4.6.2 Análises por SDS e WB

Análises por SDS-PAGE e WB de amostras obtidas durante as diferentes etapas de purificação da G-hPRL-IPEN recombinante são apresentadas nas figuras 24 e 25, respectivamente. São analisadas também amostras de G-hPRL-NHPP e padrões de hPRL recombinante da WHO e também a NG-hPRL-IPEN produzida em CHO e obtida nesse trabalho.

Figura 24. Análise por SDS-PAGE revelado com nitrato de prata (AgNO_3). **1.** Marker; **2.** Pool meio condicionado (10 dias); **3.** Pool das principais frações coletadas SP-Sepharose; **4.** G-hPRL produzida por células CHO e purificada por RP-HPLC; **5.** G-hPRL-IPEN purificada e liofilizada; **6.** G-hPRL-NHPP; **7.** CRS – WHO, contendo G-hPRL e NG-hPRL recombinantes produzidas em células C-127; **8.** Padrão de NG-hPRL IPEN (CHO).

Podemos observar na Figura 24, assim como na Figura 25, que a banda correspondente à G-hPRL hipofisária, além de ser um pouco mais larga, como já mencionado, mostra também que a G-hPRL hipofisária apresenta um tamanho menor com relação às G-hPRL recombinantes IPEN e CRS.

Figura 25. Análise por WB. **1.** G-hPRL-NHPP; **2.** CRS – WHO, contendo G-hPRL e NG-hPRL recombinantes produzidas em células C-127; **3.** Padrão interno de NG-hPRL purificada produzida por células CHO; **4.** PI-hPRL; **5.** Padrão interno de G-hPRL purificada produzida por células CHO.

4.6.3 Atividade Biológica

A atividade biológica de diferentes lotes de produção da G-hPRL-IPEN foram analisadas pelos bioensaios Nb2 e BAF3-LLP (Tanaka *et al.*, 1980; Glezer *et al.*, 2006). Foi utilizado o padrão de hPRL recombinante da Organização Mundial da Saúde (WHO 97/714), com potência declarada de $57,2 \pm 11,4$ UI/mg. A potência da G-hPRL foi de $16,8 \pm 1,2$ UI/mg ($n=3$), no ensaio com células Nb2 e $8,5 \pm 1,3$ UI/mg ($n=3$), no ensaio com células BaF3-LLP a da G-hPRL hipofisária da NIDDK de $4,3 \pm 0,8$ UI/mg ($n=3$), no ensaio com células Nb2 e $2,9 \pm 1,3$ UI/mg ($n=3$), no ensaio com células BaF3-LLP. Curvas representativas dessas análises são apresentadas na Figura 26.

Figura 26: Bioensaio para avaliar a atividade biológica das amostras de prolactina. A. Exemplo de bioensaio proliferativo com células Nb2 comparando a atividade biológica da amostra purificada de G-hPRL (-■-) obtida a partir das células CHO adaptadas em suspensão em comparação com o padrão de hPRL recombinante produzida em células C-127 da Organização Mundial da Saúde (WHO) 97/714 (▲) e a G-hPRL hipofisária (-◆-) obtida do NIDDKD, National Hormone & Peptide Program. B. Exemplo de bioensaio proliferativo com células BAF3 LLP, mesmas amostras utilizadas em A.

Nos dois bioensaios a G-hPRL hipofisária apresentou uma potência bem menor quando comparada com a G-hPRL recombinante: 3,9 e 2,9 vezes menor com relação ao bioensaio com células Nb2 e BAF3 LLP, respectivamente. A potência biológica da G-hPRL obtida a partir das células CHO adaptadas em suspensão, foi similar à potência relatada por Heller *et al.* (2010): $14,7 \pm 5,7$ UI/mg e $11,2 \pm 1,54$ UI/mg no bioensaio com células Nb2 e BAF3 LLP, respectivamente.

4.6.4 Determinação da porcentagem de N-glicanos por MALDI-TOF-MS

Uma amostra contendo G-hPRL pituitária obtida do National Hormone and Peptide Program pelo Dr. A. F. Parlow - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases foi enviada para determinação da massa molecular por MALDI-TOF-MS ao American International Biotechnology Laboratory Product Development (Richmond, VA, EUA). O objetivo dessa análise foi determinar a porcentagem de carboidratos presentes na G-hPRL produzida na hipófise humana. Como a G-hPRL hipofisária apresentou uma massa molecular de 24903,34 Da (Figura 27 C), e sabendo-se que a isoforma não glicosilada de hPRL apresenta massa molecular teórica de 22898 Da (Figura 27A), calculamos que 8,0% da massa dessa proteína corresponde a carboidratos. Este resultado comparado com o encontrado para a G-hPRL-IPEN produzida em células CHO (8,3%) e para a G-hPRL produzida em células C-127 (8,9%), pode representar diferenças qualitativas e quantitativas de glicosilação entre o mesmo produto sintetizado em 3 diferentes organismos.

Figura 27. Análise por MALDI-TOF-MS de diferentes preparações de hPRL. **A.** CRS – WHO, contendo G-hPRL e NG-hPRL; **B.** G-hPRL purificada produzida por células CHO (Heller, 2010); **C.** G-hPRL-NHPP.

4.6.5 Análise dos carboidratos

4.6.5.1 Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL-NHPP (nativa)

Por ser um produto natural, os N-glicanos da G-hPRL hipofisária, após a deglicosilação (Figura 28A), foram permetilados. Esse processo ajuda a estabilizar o ácido siálico e a galactose e é recomendado para análise de estruturas complexas de N-glicanos. As células humanas produzem formas sulfatadas de glicanos que precisam ser analisadas separadamente das formas não sulfatadas. Portanto, no caso da G-hPRL hipofisária (NIDDK) os N-glicanos permetilados foram separados em duas frações, uma contendo os N-glicanos sulfatados e outra com os não sulfatados e fosforilados, conforme descrito em Material e Métodos. Cada fração foi analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF e os espectros correspondentes são apresentados na Figura 28 B e C.

Na Figura 28 A podemos observar a pureza da isoforma G-hPRL hipofisária. Observamos também que a banda correspondente a essa isoforma (linha 1) se apresenta relativamente larga, possível reflexo da presença de glicanos de tamanhos variáveis.

Figura 28. Análise dos N-glicanos da G-hPRL-NHPP. **A.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, gradiente 4-12%, revelado por Coomassie para controle da deglicosilação. M, marcador de massa molecular (Seeplus Blue Invitrogen), 1, G-hPRL hipofisária e 2, G-hPRL hipofisária + PNGase F; **B** e **C.** Cromatogramas correspondentes a análise por espectrometria de massa MALDI-TOF dos N-glicanos permetilados sulfatados e não sulfatados, respectivamente.

Considerando somente essas duas análises independentes não é possível avaliar as intensidades relativas de todos os N-glicanos dessa proteína. Para conseguir o perfil dos 28 N-glicanos encontrados nessa amostra (excluindo os 7 isômeros de massa) foi necessário obter um fator de correlação entre os dois espectros. Para encontrar esse fator foram utilizadas duas estratégias. Na primeira foi empregado um padrão de calibração interno com massa conhecida (m/z 1605) para normalizar a intensidade dos picos dos dois espectros e analisadas por MALDI TOF (dados não apresentados). A normalização foi calculada usando a altura dos picos correspondentes ao padrão e o pico principal presente para cada fração, no caso da fração com 25% de acetonitrila (glicanos sulfatados) obtivemos:

$$m/z\ 2588 / m/z\ 1605 = 8611/6818 = 1,26.$$

Já na fração com 50% de acetonitrila (glicanos não sulfatados) a relação foi:

$$m/z\ 1346 / m/z\ 1605 = 2684/5818 = 0,46.$$

O fator de correlação entre o espectro das duas frações de glicanos corresponde a:

$$m/z\ 1345\ (\text{normalizado}) / m/z\ 2589\ (\text{normalizado}) = 0,46/1,26 = 0,36.$$

A segunda estratégia para obter o fator de correlação foi analisar no mesmo MALDI TOF MS amostras das frações dos glicanos eluídos com 25% e 50% de acetonitrila e comparar a intensidade do pico principal correspondente a cada uma das frações. A correlação entre os dois picos dominantes m/z 1346 e m/z 2589 foi calculada como:

$$m/z\ 1346 / m/z\ 2589 = 2684/3830 = 0,29.$$

Os fatores de correlação calculados pelos dois métodos são próximos. Para estabelecer o perfil de N-glicanos global, para os N-glicanos provenientes das duas frações eluídas com acetonitrila, nós decidimos aplicar um fator de correlação de 0,33 (correspondente ao valor médio de 0,36 e 0,29). Para normalizar o espectro e gerar um perfil de N-glicanos global, as alturas dos picos no espectro de MALDI-TOF da fração com 50% de acetonitrila foram multiplicadas pelo fator de correlação. A Figura 29 mostra as estruturas dos oligossacarídeos identificados na preparação de G-hPRL-NHPP.

Figura 29. Análise dos N-glicanos da G-hPRL-NHPP. **A.** N-glicanos não sulfatados; **B.** N-glicanos sulfatados.

Os N-glicanos identificados são do tipo alta-manose e do tipo complexo, bi-, tri- e tetra-antenários, sendo 71% de glicanos não sulfatados, 23% das estruturas compostas por glicanos sulfatados, e 6% de glicanos fosforilados. As espécies sulfatadas apresentam número variável de sulfatos (um ou dois) sendo a maioria delas (86%) com apenas um sulfato, que aparece ou ligado ao N-acetil galactosamina (GalNAc-SO₄⁻²) ou à galactose (Gal- SO₄⁻²). Entre as espécies que apresentam ácido siálico duas são mono-sialiladas e apenas uma bi-sialilada. A maior parte dos glicanos apresenta fucose (83%). Todas as espécies sulfatadas apresentam resíduos de fucose, (1 ou 2) sendo a maioria (70%) com apenas um resíduo. Já para as espécies não sulfatadas ocorre um número variável de fucose (1 a 3), sendo ~50% com um resíduo e ~50% com dois resíduos. Apenas uma estrutura talvez possua três resíduos.

As glicoformas predominantes para os N-glicanos sulfatados foram N2GN2F2 SO₄⁻ (27,6%) e N2GN2F1(SO₄⁻)₂ (16,4%), enquanto que para os N-glicanos não sulfatados as glicoformas predominantes foram as do núcleo pentassacarídeo com um resíduo de fucose (8,2 %) ou com um resíduo de fosfato (3,1%).

4.6.5.2 Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL recombinante

A G-hPRL recombinante por ser produzida em células CHO não apresenta N-glicanos sulfatados, pois as enzimas N-acetilgalactosamina transferase e sulfotransferase são ausentes nessa célula (Cole *et al.*, 1993). O perfil de N-glicanos nesse caso foi obtido a partir da análise por espectrometria de massa MALDI-TOF de uma fração única, cujos glicanos também sofreram um processo de permetilação. O espectro correspondente a essa análise é apresentado na Figura 30. A Figura 30A confirma que a G-hPRL é totalmente N-glicosilada e com pureza superior a 95%.

Figura 30. Análise dos N-glicanos da G-hPRL recombinante. **A.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, gradiente 4-12%, revelado por Coomassie para controle da deglicosilação. M, marcador de massa molecular (Seeplus Blue Invitrogen), 1, G-hPRL recombinante IPEN e 2, G-hPRL recombinante IPEN + PNGase F. **B.** espectro correspondente à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF dos N-glicanos permetilados não sulfatados.

A Figura 31 mostra as estruturas dos oligossacarídeos identificados na preparação de G-hPRL recombinante.

Figura 31. N-glicanos da preparação de GhPRL recombinante.

Os N-glicanos identificados são do tipo alta-manose, híbrido e do tipo complexo, bi-, tri-antenárias, sendo 64,3% das estruturas com terminação em ácido siálico e o restante, neutras. Entre as espécies que apresentam ácido siálico, cinco são mono-sialiladas, três di-sialiladas e apenas uma tri-sialilada. Dentre o total das estruturas 42,8% apresentam um único resíduo de fucose. As glicoformas predominantes são N2G2S2F1 (56,1%) e N2G2S1F1 (12%).

4.6.5.3 Análise composicional dos N-glicanos da G-hPRL

A análise composicional determina os monossacarídeos por análise química e apresentou valores abaixo do esperado, pois no mínimo cada estrutura deveria apresentar três manoses por glicano ou por molécula de G-hPRL (cada molécula de G-hPRL apresenta um único N-glicano). Para minimizar essa distorção, possível reflexo de perda de material durante a recuperação do produto liofilizado e/ou durante a análise, realizamos uma normalização, considerando 3 manoses por glicano. Esses dados em comparação com a razão molar dos monossacarídeos calculada a partir da estrutura de N-glicanos de cada amostra são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise composicional de monossacarídeos de preparações de G-hPRL hipofisária e recombinante. É apresentada a comparação entre a razão molar (monossacarídeo/G-hPRL) medida por análise química com a obtida após normalização (3 mol de manose/mol G-hPRL) e com a razão molar calculada com base no perfil de N-glicanos.

	G-hPRL							
	Hipofisária (NIDDK)				Recombinante (IPEN)			
	Razão Molar				Razão Molar			
	Medido ^{*1} (ng)	Calculada ^{*2}	x FC ^{*3}	Perfil de glicanos ^{*4}	Medido ^{*1} (ng)	Medida ^{*2}	x FC ^{*3}	Perfil de glicanos ^{*4}
Man	360	1,25	3,0	3,14	630,6	1,94	3	3,35
Gal	63	0,22	0,53	0,12	516,1	1,59	2,46	1,71
Fuc	97,3	0,37	0,89	1,4	100,08	0,767	0,767	0,767
GlcN	333	1,16	2,78	3,67	882,3	3,727	3,727	3,727
GalN	134	0,39	0,94	1,44	--	--	--	--
NeuAc	64,9	0,06	---	0,03	nd	--	--	1,449

^{*1} Massa de monossacarídeo medida por análise química, média de duas análises de duas alíquotas hidrolisadas de forma independentes.

^{*2} Razão molar calculada a partir da quantidade de G-hPRL analisada, sem correções.

^{*3} Razão molar normalizada para 3 resíduos de manose por molécula de G-hPRL. O valor do fator de correção (FC) foi de 2,4 (3/1,25) e 1,55 (3/1,94) para a G-hPRL hipofisária e recombinante, respectivamente.

^{*4} Razão molar calculada por estequiometria com base na estrutura de N-glicanos. nd = não determinado.

Considerando os valores apresentados na Tabela 2 e considerando também que os dados dos monossacarídeos obtidos a partir do perfil de N-glicanos são mais confiáveis, precisos e completos, os dados mais completos para análise da composição dos monossacarídeos são apresentados na Tabela 3, todos baseados no perfil dos N-glicanos.

Tabela 3. Análise composicional de monossacarídeos de preparações de G-hPRL hipofisária e recombinante. Os valores foram calculados com base no perfil de N-glicanos, considerando um N-glicano para cada molécula de G-hPRL (M.M.=25.000 Da).

	G-hPRL			
	Hipofisária (NIDDK)		Recombinante (IPEN)	
	Razão Molar ^{*1}	% G-hPRL	Razão Molar ^{*1}	% G-hPRL
Man	3,14	2,26	3,36	2,41
Gal	0,12	0,08	1,708	1,23
Fuc	1,40	0,93	0,767	0,606
GlcN	3,67	2,62	3,727	2,67
GalN	1,44	1,20	---	---
NeuAc	0,03	0,04	1,449	1,79
NeuAc/Gal	0,25		0,85	
% total de carboidratos	7,13		8,5	
MALDI-TOF-MS	8,0		8,4	

^{*1} Razão molar = mol do resíduo/mol de G-hPRL.

A análise da composição de monossacarídeos das preparações de G-hPRL confirmou as diferenças entre as duas preparações conforme apresentado na Tabela 3. Notadamente a quantidade de ácido siálico (NeuAc) é muito superior na amostra recombinante. A N-acetil galactosamina (GalNAc) apareceu apenas na preparação hipofisária com um conteúdo de 1,44 mol/mol G-hPRL. Isto é consistente com a ausência de N-acetil galactosamina transferase e sulfotransferase nas células CHO (Cole *et al.*, 1993). Também foi observado um maior conteúdo de Galactose (Gal), frequentemente ligado ao ácido siálico e do próprio ácido siálico (NeuAc) na preparação recombinante com relação à preparação hipofisária. A fucose apareceu em quantidade maior na preparação hipofisária. É importante observar que a porcentagem total de carboidratos confirma com boa aproximação os dados do MALDI-TOF-MS, que são possivelmente os mais confiáveis.

5 DISCUSSÃO

Esse trabalho compara pela primeira vez a estrutura de N-glicanos presente na G-hPRL produzida por células CHO com a estrutura da G-hPRL nativa, produzida pela hipófise humana. Para atingir esse objetivo, que representa a principal meta e a maior novidade desse trabalho, foi desenvolvido um processo de produção e purificação de G-hPRL a partir de células CHO modificadas geneticamente.

A obtenção da G-hPRL recombinante foi realizada a partir de células CHO adaptadas à suspensão, cultivadas no meio CHO-S-SFM II, na ausência de SFB, com base em metodologia já desenvolvida em nosso grupo (Arthuso *et al.*, 2012). Nessas condições de cultivo a porcentagem da G-hPRL em relação à prolactina total foi de aproximadamente 5% (Tabela 1), aproximadamente metade do valor obtido com células aderidas utilizando o meio α MEM (Soares *et al.*, 2000; Heller *et al.*, 2010). No entanto, a produção volumétrica obtida no cultivo em suspensão (Figura 4) atingiu valores de 7 μg hPRL/mL, aproximadamente 7 vezes superior ao valor de 1 μg hPRL/mL relativo ao cultivo com células aderidas em placas utilizando o meio de cultura α MEM, sem adição de butirato de sódio (Goulart, *et al.*, 2012).

Para aumentar a relação entre a G-hPRL e a isoforma NG-hPRL optamos por adicionar CHX no meio de cultura. Essa droga inibidora da síntese proteica também demonstrou ser eficiente no aumento da síntese de G-hPRL em relação à isoforma não glicosilada, conforme descrito por Shelikoff *et al.* (1994) e confirmado pelo nosso grupo de pesquisa (Heller *et al.*, 2010), ambos estudos utilizando células aderidas em placas. Os nossos experimentos no início desse trabalho foram no sentido de confirmar os efeitos da CHX nessa nova condição do cultivo em suspensão.

Analisando as Figuras 5 e 7 e a Tabela 1, observamos que diferentemente do relatado por Heller *et al.* (2010) onde foi observado aumento absoluto na síntese da G-hPRL, juntamente com um decréscimo na síntese da NG-hPRL, no

cultivo em suspensão, com a utilização de CHX não foi confirmado aumento absoluto na produção da isoforma glicosilada e sim uma diminuição acentuada na quantidade da NG-hPRL. Confirmamos também que a mesma concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de CHX, como reportado por Shelikoff e colaboradores (1994) e Heller e colaboradores (2010), foi aquela em que obtivemos melhores resultados. Nessa concentração, o impacto sobre o crescimento celular foi mínimo, as células continuaram praticamente dobrando sua população a cada 24h (Figura 6), demonstrando somente um pequeno declínio (cerca de ~6,5%) quando comparado com o controle (sem adição de CHX). A porcentagem da isoforma glicosilada em relação à PRL total passou de 5,4 para 38% com a adição de CHX. Observamos também um aumento definido na proporção da isoforma glicosilada já no primeiro dia de cultivo em suspensão com CHX (Figura 7), enquanto no trabalho de Heller e colaboradores (2010) esse efeito só ocorreu após o terceiro dia de uso da CHX, sugerindo a necessidade, no caso de cultivo em placas, de mais tempo para a ação plena da droga.

Os resultados obtidos com a repetição do cultivo em placas, nas mesmas condições descritas por Heller *et al.* (2010), ou seja, com células aderidas e com meio α -MEM, foram reproduzíveis, pois a proporção de G-hPRL obtida foi de 57,9%, e o valor da concentração de G-hPRL foi de 102 $\mu\text{g/L}$, em comparação com 57% e 113 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, conforme relatado por Heller e colaboradores (2010). Portanto, os resultados obtidos com a diminuição da isoforma não-glicosilada após tratamento com CHX, sem diminuir a concentração da isoforma G-hPRL, justificam o uso dessa droga visando uma maior facilidade na purificação da G-hPRL.

O processo de purificação desenvolvido para a G-hPRL consistiu basicamente de 2 etapas. Na primeira etapa de purificação utilizamos uma cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose Fast Flow), como descrito por Price *et al.* (1995) e Soares *et al.* (2000; 2006). Essa resina além de purificar parcialmente, também apresenta a vantagem de concentrar a hPRL presente no meio de cultura, chegando a um fator de concentração de ~100 vezes (partindo-se de 2 litros de meio condicionado atingido no final o volume médio de 20 mL).

Como segunda etapa de purificação, utilizamos a separação por hidrofobicidade mediante HPLC de fase reversa, com acetonitrila como componente da fase móvel. Essa metodologia permitiu o uso da mesma coluna

analítica como coluna preparativa, o que proporcionou um método eficiente para separação das isoformas de G-hPRL e NG-hPRL. Observamos que durante as análises por RP-HPLC, embora a separação da G-hPRL tenha sido bem eficiente utilizando o N-propanol, esse solvente interfere na estabilidade e facilita a agregação da hPRL. Considerando esse fato, e a nossa experiência na purificação de outras proteínas (Damiani *et. al*, 2009; Suzuki *et. al*, 2012), optamos por padronizar a purificação da G-hPRL por RP-HPLC, utilizando acetonitrila como solvente. Após os primeiros estudos de purificação da G-hPRL, que confirmaram a eficiência da acetonitrila, fomos gradativamente aumentando o volume e consequentemente a quantidade aplicada, chegando a aplicar 6 mL do produto coletado da troca catiônica (Figura 18 e 19). Nessa escala, a metodologia aplicada foi eficiente na separação das duas isoformas e apresentou boa resolução. As frações de G-hPRL obtidas foram praticamente puras (Figura 19). Observamos também a presença de pelo menos duas isoformas de G-hPRL como demonstrado após digestão com PNGase F (Figura 30).

A referida metodologia de purificação mostrou-se rápida e eficiente, permitindo em somente duas etapas obtermos um alto fator de purificação a partir de um material extremamente diluído e impuro, apresentando rendimentos extremamente úteis para os nossos objetivos da ordem de 30%.

É importante ressaltar que, embora a G-hPRL recombinante tenha sido eluída, na segunda etapa de purificação (RP-HPLC), na presença de 50% de acetonitrila, não houve perda da atividade biológica (Figura 26), sendo esta atividade similar à declarada por Heller e colaboradores (2010). Já a preparação hipofisária (NIDDK), purificada mediante outras metodologias, apresentou atividade biológica muito menor (Figura 26). Outros trabalhos mostraram também que o uso da acetonitrila na purificação não comprometeu a atividade biológica da proteína. Como exemplos podemos citar Oliveira *et al*. (2007) no qual o hTSH recombinante foi eluído com gradiente de acetonitrila (12,5 - 50%) e Suzuki e colaboradores (2012) que relata a purificação de prolactina de camundongo (mPRL) eluída com 50% de acetonitrila.

A caracterização e testes de pureza da G-hPRL obtida foram realizadas através das técnicas HPSEC, RP-HPLC, SDS-PAGE e WB, sempre em comparação ao padrão CRS e à G-hPRL hipofisária (Figuras 22 a 24).

No presente trabalho também padronizamos a técnica de liofilização da prolactina, processo necessário para uma adequada conservação e para facilitar o envio das amostras para a realização da análise dos carboidratos. Inicialmente estudamos a liofilização da NG-hPRL mediante análise por HPSEC (Figura 20). Observamos no tempo de corrida de 23,5 minutos um pico correspondente à glicina adicionada à amostra, pico esse, que dificulta uma quantificação mais precisa da NG-hPRL. Não observamos, porém, aumento de dímeros e agregados devidos à liofilização. Utilizando a análise por RP-HPLC (Figura 21), na qual a glicina não causa interferências, calculamos uma recuperação de 83,7 % de NG-hPRL após a liofilização.

Uma ferramenta bastante utilizada para avaliar a identidade de uma proteína recombinante é a espectrometria de massa. Uma amostra contendo G-hPRL pituitária foi enviada para determinação da massa molecular por espectrometria de massa MALDI-TOF. Isto teve por objetivo determinar a porcentagem de carboidratos presentes na G-hPRL produzida pela hipófise humana (Figura 27). O valor foi perfeitamente compatível com aquele encontrado com base na análise do perfil de glicanos (Tabela 3). No caso da G-hPRL-IPEN foi determinado, por MALDI-TOF, que 8,4% da massa total da proteína correspondem à carboidratos, contra 8,5% determinado com base na estrutura dos N-glicanos. No caso da G-hPRL nativa foi determinado um valor de 8,0% (por MALDI-TOF), contra 7,1% (N-glicanos). A determinação das estruturas e percentagens de carboidratos para G-hPRL recombinante e hipofisária constitui um importante parâmetro comparativo entre as preparações recombinantes e o produto natural. No nosso estudo foram identificadas até 28 diferentes estruturas para a G-hPRL hipofisária (excluindo os isômeros de massa), e 14 estruturas para a G-hPRL recombinante, das quais 50% foram comuns para os dois hormônios.

A diferença de carboidratos existente entre as amostras de G-hPRL nativa e recombinante se refletiram numa leve diferença de massa molecular observada na análise por SDS-PAGE (Figura 24) e WB (Figura 25), nas quais a amostra nativa apresentou massa molecular levemente menor e uma banda correspondente à G-hPRL mais larga, possivelmente devida a uma maior diversificação dos N-glicanos presentes na amostra. Apesar dessas diferenças, as duas preparações da G-hPRL (recombinante-IPEN e nativa), quando analisadas por RP-HPLC, apresentam um pico principal com o mesmo tempo de retenção, refletindo uma hidrofobicidade

muito próxima (Figura 22). Observamos nessa mesma figura que o cromatograma da G-hPRL nativa apresenta pelo menos outro pico importante, com tempo de retenção menor, enquanto que a G-hPRL recombinante produzida por células C127 (CRS-WHO) apresentou vários picos na região correspondente ao tempo de retenção da G-hPRL. Já a preparação da G-hPRL-IPEN apresentou um pico único e simétrico. Diferenças na composição de carboidratos entre preparações recombinantes e nativas já foram descritas para o hTSH (Thotokura *et al.*, 1992; Szkudlinski *et al.*, 1993) e podem interferir de alguma forma na interação com colunas de fase reversa (Rossi *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2003).

Considerando, por exemplo, as estruturas dos N-glicanos com massa molecular igual ou superior a 2600 Da (mais frequentes e completas), observamos que a preparação do IPEN possui 76% de seus glicanos nessa situação, em comparação com 37,4% das mesmas estruturas de N-Glicanos sulfatados e 6,2% dos não sulfatados da preparação hipofisária. Essa tendência da preparação do IPEN apresentar glicanos de maior peso molecular é curiosa, e pode ser devida a vários fatores, entre os quais podemos destacar a maior eficiência das células CHO na glicosilação, influenciada também pelas condições de cultivo, perdas diferenciadas de glicanos durante a purificação, influência da CHX resultando numa síntese de N-glicanos mais completa devido ao maior tempo de permanência da prolactina no complexo de Golgi, de acordo com o mecanismo de ação da CHX (Shelikoff *et al.*, 1994). Este último fator também explicaria a maior presença de ácido siálico no produto tratado com CHX. Um experimento que pode ajudar a entender melhor a influência da CHX seria a análise comparativa do perfil de glicanos com outra preparação recombinante de G-hPRL, porém produzida na ausência dessa droga. Nessa condição, onde a alta concentração da isoforma NG-hPRL dificulta a obtenção da G-hPRL pura, é importante lembrar que uma eventual contaminação apenas com a isoforma NG-hPRL não deve interferir na análise de carboidratos, o que facilitaria enormemente esse experimento do ponto de vista técnico.

Os fatores acima mencionados podem também explicar a grande diferença (aproximadamente 40 vezes) encontrada para a quantidade de ácido siálico presente na preparação recombinante em relação à preparação nativa (ver tabela 3). Coerente com essa relação está o fato da menor presença de galactose (~3 vezes) na amostra nativa, já que o ácido siálico se liga a esse açúcar na estrutura

N-glicana. Outra informação importante é a relação NeuAc/Galactose, que reflete a percentagem de ligação do ácido siálico à galactose, também presente na Tabela 3. Podemos verificar que 85% da galactose presente na preparação recombinante liga uma molécula de ácido siálico, contra 25% na preparação nativa. Essa alta percentagem de ocupação é praticamente o dobro da relatada por Price e colaboradores (1995) para a G-hPRL recombinante produzida por células C127 (43%). Nesse mesmo trabalho a razão molar molNeuAC/mol G-hPRL foi de 1,56 (Price *et al.* 1995), confirmada pelo valor de 1,449 obtida nesse estudo (Tabela 3). Price e colaboradores, pelo que é do nosso conhecimento, apresentaram o único trabalho que descreve a composição de monossacarídeos de uma preparação de G-hPRL. Analisando esse trabalho percebemos que em geral a relação mol de monossacarídeo/ mol de G-hPRL foi sempre superior ao da preparação do IPEN, (em média aproximadamente 40% superior). A exceção é a do ácido siálico, que como já mencionado apresentou praticamente a mesma relação nas duas preparações. É interessante observar que para Price e colaboradores (1995). a relação mol de manose/mol G-hPRL foi relativamente alta: 4,48, indicando a possível existência de uma percentagem considerável de estruturas de alta manose.

Como a G-hPRL possui obrigatoriamente seu único sítio de glicosilação ocupado (Asp 31) (Sinha *et.al*, 1995) é possível, conhecendo-se o perfil de N-glicanos, calcular por cálculo estequiométrico a composição de monossacarídeos da amostra de G-hPRL. Podemos assim determinar a quantidade presente de cada monossacarídeo com relação ao carboidrato total. Esse cálculo foi aplicado para a G-hPRL produzida por CHO e hipofisária, gerando os dados da Tabela 3. No caso da análise da G-hPRL nativa, cujo perfil dos N-glicanos sulfatados e não sulfatados foram analisados separadamente, esse método de cálculo só pode ser aplicado, após ser estabelecido um fator de correlação.

A nosso ver, a composição de monossacarídeos obtida a partir das estruturas dos N-glicanos é bem mais precisa e confiável do que a determinação de cada açúcar por análise química (Tabela 2). Nessa última análise em particular, o que observamos foi uma possível perda de material ou durante a suspensão do liofilizado ou durante a análise que se refletiu numa relação mol de monossacarídeo/mol de G-hPRL abaixo do esperado teórico. Por exemplo, no caso da manose, considerando a estrutura básica dos glicanos, a relação molar

esperada é no mínimo 3 (3 moles de manose para cada mol de G-hPRL), na prática o valor medido por análise química dos monossacarídeos correspondeu a uma relação molar bem menor, de 1,25 para a amostra hipofisária e 1,94 para a recombinante. Para corrigir essa distorção foi aplicado um fator de correção para todos os monossacarídeos, com exceção do ácido siálico que foi determinado por outra metodologia. Essa correção dos dados é apresentada na Tabela 2. É claro que esse fator de correção não é ideal, pois existem estruturas de N-glicanos que possuem mais de 3 manoses (alta-manose), embora em baixa porcentagem. Também não leva em consideração a instabilidade de cada açúcar durante a hidrólise, o que pode gerar perdas proporcionalmente diferentes.

Embora a glicosilação realizada pelas células CHO seja próxima da glicosilação humana (Goochee et. al., 1992), esse trabalho mostra que podem existir diferenças importantes entre a glicoproteína recombinante e nativa, que devem ser levadas em consideração quando utilizamos glicoproteínas recombinantes para aplicações farmacológicas, muitas vezes como produto injetável.

A habilidade de controlar a glicosilação é limitada, pois são vários os fatores que afetam a heterogeneidade das estruturas de glicanos, incluindo o repertório de enzimas da célula hospedeira e o tempo de permanência no complexo de Golgi. No desenvolvimento do processo, muitos parâmetros de cultivo podem ser controlados, como glicose ou glutamina, e o acúmulo de subprodutos do metabolismo, para assegurar a consistência do perfil de glicosilação obtido em cada lote de produção. Isso pode ser importante para a integridade estrutural da proteína e deve ser monitorado em um bioprocessos desenvolvido para a produção de um biofármaco, pois pode resultar em uma grande heterogeneidade de glicoformas e em uma variação significativa de lote para lote no processo produtivo (Nyberg et al. 1999; Durocher et al., 2009). O presente trabalho, utilizando a G-hPRL como modelo, abre perspectivas para estudos futuros avaliando os fatores que podem influenciar a glicosilação. Por exemplo, alterações no nível de CO₂, temperatura, estratégia de cultivo celular para obter uma alta produtividade e com ou sem a ação de outras drogas quais CHX e butirato de sódio. Além disso, o método descrito pode ser aplicado para purificação das formas glicosiladas de antagonistas de prolactina, também produzidas em nosso laboratório (Soares et al., 2006) e com potencial ação anti-tumoral e antidiabética. A obtenção de G-hPRL

pura também possibilita os estudos *in vivo* relacionados com biodistribuição e “clearance”, incluindo comparação com a isoforma de hPRL não glicosilada, sempre buscando investigar sua relação estrutura-função.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados mostraram que a adição de CHX na concentração de 0,6 µg/mL durante a produção em frascos *spinner* resultou em aumento da relação G-hPRL sobre hPRL total. A redução significativa da isoforma NG-hPRL com adição de CHX é importante, pois facilita a purificação da forma glicosilada.
- Durante os trabalhos de purificação e caracterização da G-hPRL recombinante foi padronizado um método rápido e eficiente para separação das isoformas G-hPRL e NG-hPRL. O método consiste basicamente em uma RP-HPLC utilizando acetonitrila na composição da fase móvel.
- Pela primeira vez foram determinadas as estruturas de N-glicanos nunca descritas para o hPRL. Diferenças substanciais foram encontradas nas estruturas dos N-glicanos entre o produto recombinante e o hipofisário.
- A porcentagem de carboidratos das preparações de G-hPRL calculadas com base na espectrometria de massa foi confirmada com aquelas determinadas pela respectiva estrutura de N-glicanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABOU-ZEID, A. Z., M. M. ABD EL HAMID; S. H. EL-SHERBINI. Biogenesis and production of cycloheximide by *Streptomyces* species. ***Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg***, v.131, n.5, p.419-87. 1976.
- 2 ARTHUSO F. S., BARTOLINI P., SOARES C. R. Laboratory production of human prolactin from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. ***Appl Biochem Biotechnol***. v.167,n8, p.2212-24. 2012 .
- 3 BEN-JONATHAN, N., K. LIBY, M. MCFARLAND E M. ZINGER. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. ***Trends in Endocrinology and Metabolism***. v.13, n.6, Aug, p.245-50. 2002.
- 4 BEN-JONATHAN, N., J. L. MERSHON, D. L. ALLEN E R. W. Steinmetz. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. ***Endocrine Reviews***, v.17, n.6, Dec, p.639-69. 1996.
- 5 BORK, K.; HORSTKORT, R.; WEIDEMANN, W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. ***J. Pharm. Sci.***, 2009.
- 6 BOWEN, B., J. STEINBERG, U. K. LAEMMLI; H. WEINTRAUB. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. ***Nucleic Acids Res***, v.8, n.1, Jan 11, p.1-20. 1980.
- 7 BUTLER, M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. ***Cytotechnology***, v. 50, p. 57-76, 2006.
- 8 BYRNE, B.; DONOHOE, G.G.; O'KENNEDY, R. Sialic acid: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. ***Drug Discov. Today***, v. 12, p. 319-326, 2007.
- 9 CHEN, T. J., C. B. KUO. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. ***Endocrinology***, v.139, n.2, Feb, p.609-16. 1998.
- 10 DALMORA, S., J. E. OLIVEIRA, R. AFFONSO, E. GIMBO, M. T. RIBELA E P. BARTOLINI. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. ***J Chromatogr A***, v.782, n.2, Oct 10, p.199-210. 1997.
- 11 DAMIANI, R., OLIVEIRA, J.E., VORAUER-UHL, KAROLA, PERONI, C. N., VIANNA, E. G., BARTOLINI, P., RIBELA, M. T. C. P. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase. ***Protein Expression and Purification***. v. 67, p. 7-14, 2009.

- 12 DUROCHER Y., BUTLER M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol.* v.20, p. 700-7, 2009.
- 13 FONSECA, M. E., R. OCHOA, C. MORAN E A. ZARATE. Variations in the molecular forms of prolactin during the menstrual cycle, pregnancy and lactation. *J Endocrinol Invest*, v.14, n.11, Dec, p.907-12. 1991.
- 14 GLEZER, A., C. R. SOARES, J. G. VIEIRA, D. GIANNELLA-NETO, M. T. RIBELA, V. GOFFIN E M. D. BRONSTEIN. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, v.91, n.3, Mar, p.1048-55. 2006.
- 15 GOOCHEE, C. F., M. J. GRAMER, D. C. ANDERSEN, J. B. BAHR E J. R. RASMUSSEN. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology.* v.9, n.12, Dec, p.1347-55. 1991.
- 16 GOODMAN, G. E D. BERCOVICH. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. *Medical Hypotheses*, v.70, n.2, p.244-51. 2008.
- 17 RODRIGUES GOULART, H., ARTHUSO, F. S., CAPONE, M. V. N., OLIVEIRA, T. L., BARTOLINI, P., SOARES, C. R. J. Enhancement of Human Prolactin Synthesis by Sodium Butyrate Addition to Serum-Free CHO Cell Culture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-12, 2010.
- 18 GU, J.; N. TANIGUCHI. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J*, v.21, n.1-2, p.9-15. 2004.
- 19 HARO, L. S., D. W. LEE, R. N. SINGH, G. BEE, E. MARKOFF; U. J. LEWIS. Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab*, v.71, n.2, Aug, p.379-83. 1990.
- 20 HASHIM, I. A., R. ASTON, J. BUTLER, A. M. MCGREGOR, C. R. SMITH; M. NORMAN. The proportion of glycosylated prolactin in serum is decreased in hyperprolactinemic states. *J Clin Endocrinol Metab*, v.71, n.1, Jul, p.111-5. 1990.
- 21 HELENIUS, A., AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, v.291, p.2364-9. 2001.
- 22 HELLER, S. R., H. RODRIGUES GOULART, F. S. ARTHUSO, T. L. OLIVEIRA, P. BARTOLINI E C. R. J. SOARES. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. *Journal of Biotechnology*, v.145, Jan 9, p.334-340. 2010.

- 23 HOFFMANN, T., C. PENEL E C. RONIN. Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *J Endocrinol Invest*, v.16, n.10, Nov, p.807-16. 1993.
- 24 ISAJI, T., J. GU, R. NISHIUCHI, Y. ZHAO, M. TAKAHASHI, E. MIYOSHI, K. HONKE, K. SEKIGUCHI E N. TANIGUCHI. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem*, v.279, n.19, May 7, p.19747-54. 2004.
- 25 LEWIS, U. J., R. N. SINGH E L. J. LEWIS. Two forms of glycosylated human prolactin have different pigeon crop sac-stimulating activities. *Endocrinology*, v.124, n.3, Mar, p.1558-63. 1989.
- 26 LEWIS, U. J., R. N. SINGH, L. J. LEWIS, B. K. SEAVEY E Y. N. SINHA. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci*, v.81, n.2, Jan, p.385-9. 1984.
- 27 MARKOFF, E.; D. W. LEE. Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*, v.65, n.6, Dec, p.1102-6. 1987.
- 28 MARKOFF, E., M. B. SIGEL, N. LACOUR, B. K. SEAVEY, H. G. FRIESEN; U. J. LEWIS. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology*, v.123, n.3, Sep, p.1303-6. 1988.
- 29 MORGANTI, L., M. HUYER, P. W. GOUT; P. BARTOLINI. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)6-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of Escherichia coli. *Biotechnol Appl Biochem*, v.23 (Pt 1), Feb, p.67-75. 1996.
- 30 NYBERG G.B., BALCARCEL R.R., FOLLSTAD B.D., STEPHANOPOULOS G., WANG D.I. Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, v.62, p.336-47. 1999.
- 31 OLIVEIRA, J.E.; MENDONÇA, F.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 787, p. 345-355, 2003.
- 32 OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Pratical reversed-phase high-performance liquid chromatography method for laboratory-scale purification of recombinant human thyrotropin. *J. Chromatogr. A*, v. 1164, p. 206-211, 2007.
- 33 ORMANDY, C. J., A. CAMUS, J. BARRA, D. DAMOTTE, B. LUCAS, H. BUTEAU, M. EDERY, N. BROUSSE, C. BABINET, N. BINART; P. A. KELLY. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, v.11, n.2, Jan 15, p.167-78. 1997.

- 34 PAOLETTI, F., K. AINGER, I. DONATI, R. SCARDIGLI, A. VETERE, A. CATTANEO E C. CAMPA. Novel fluorescent cycloheximide derivatives for the imaging of protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, Apr 22. 1994.
- 35 PRICE, A. E., K. B. LOGVINENKO, E. A. HIGGINS, E. S. COLE; S. M. RICHARDS. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology*, v.136, n.11, Nov, p.4827-33. 1995.
- 36 RAJU, T.S.; BRIGGS, J.B.; BERGE, S.M.; JONES, A.J.S. Species-specific variation in glycosilation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, v. 10, p. 477-486, 2000.
- 37 RAFFERTY, B., P. RIGSBY E R. E. Gaines-Das. Draft report of an international collaborative study of proposed WHO reference reagents for rDNA-derived prolactin and its glycosylated and non-glycosylated componentes. *Technical Report Series*. v.52, n.924. 2001.
- 38 RIGGIN, R. M., C. J. SHAAR, G. K. DORULLA, D. S. LEFEBER; D. J. MINER. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. *J Chromatogr*, v.435, n.2, Jan 8, p.307-18. 1988.
- 39 RUDD, P.M.; DWEK, R.A. Rapid, sensitive sequencing of oligossacharides from glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechno.* v. 8, p. 488-497, 1997.
- 40 SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH; T. MANIATIS. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v.1, 2 ed, p.6.36-6.44. 1989.
- 41 SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.65, n.4, Sep, p.363-72. 2004.
- 42 SCHNEIDER-POETSCH, T., J. JU, D. E. EYLER, Y. DANG, S. BHAT, W. C. MERRICK, R. GREEN, B. SHEN; J. O. LIU. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*, v.6, n.3, Mar, p.209-217. 2010.
- 43 SHELIKOFF, M., A. J. SINSKEY; G. STEPHANOPOULOS. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of recombinant human prolactin. *Cytotechnology*, v.15, n.1-3, p.195-208. 1994.
- 44 SINACORE, M. S., D. DRAPEAU; S. R. ADAMSON. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol*, v.15, n.3, Jul, p.249-57. 2000.
- 45 SINHA, Y. N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, v.16, n.3, Jun, p.354-69. 1995.

- 46 SINHA, Y. N., L. V. DEPAOLO, L. S. HARO, R. N. SINGH, B. P. JACOBSEN, K. E. SCOTT; U. J. LEWIS. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol Cell Endocrinol*, v.80, n.1-3, Sep, p.203-13. 1991.
- 47 SOARES, C. R., I. M. CAMARGO, L. MORGANTI, E. GIMBO, J. EZEQUIEL DE OLIVEIRA, R. LEGOUX, P. FERRARA; P. BARTOLINI. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. *J Chromatogr A*, v.955, n.2, May 10, p.229-36. 2002.
- 48 SOARES, C. R., A. GLEZER, K. OKAZAKI, E. K. UEDA, S. R. HELLER, A. M. WALKER, V. GOFFIN; P. BARTOLINI. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif*, v.48, n.2, Aug, p.182-94. 2006.
- 49 SOARES, C. R., L. MORGANTI, B. MILOUX, J. H. LUPKER, P. FERRARA; P. BARTOLINI. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem*, v.32, Oct, p.127-35. 2000.
- 50 SOARES, C. R., L. MORGANTI, B. MILOUX, J. H. LUPKER, P. FERRARA; P. BARTOLINI. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem*, v.32 (Pt 2), Oct, p.127-35. 2000.
- 51 SOARES, C. R. J., L. MORGANTI, B. MILOUX, J. H. LUPKER, P. FERRARA; P. BARTOLINI. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.32 (Pt 2), Oct, p.127-35. 2000.
- 52 SUZUKI, M. F. , ARTHUSO, F. S. , OLIVEIRA, J. E., OLIVEIRA, N. A. J., GOULART, HERBERT R., CAPONE, M. V. N., RIBELA, M. T. C. P., BARTOLINI, P., SOARES, C. R. J. Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. v. 59, p. 178-185, 2012.
- 53 SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B.D. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by chinese-hamster ovary cells – the role of sialylation and sulfatation in TSH bioactivity. *Endocrinology*, v. 133, p. 1490-1503, 1993.
- 54 TANAKA, T., R. P. SHIU. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*, v.51, n.5, Nov, p.1058-63. 1980.
- 55 TETTAMANZI, M. C., C. KEELER, S. MESHACK; M. E. HODSDON. Analysis of site-specific histidine protonation in human prolactin. *Biochemistry*, v.47, n.33, Aug 19, p.8638-47. 2008.

- 56 THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of the thyrotropin alpha-subunit and beta-subunit in hormone action. *Endocrinology*, v. 131, p. 82-88, 1992.
- 57 VAN WEZEL, A. L. Cultivation of Anchorage-Dependent Cells and Their Applications. *J. Chem. Tech. Biotech*, v.32, n.1, p.318-323. 1982.
- 58 WONG, C. H. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J Org Chem*, v.70, n.11, May 27, p.4219-25. 2005.
- 59 WRAY, W., T. BOULIKAS, V. P. WRAY; R. HANCOCK. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, v.118, n.1, Nov 15, p.197-203. 1981.