AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
INTERFERON- α 2a SECRETADO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia Coli***

PAULO VICTOR SARMENTO DIAS

**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
2017**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
INTERFERON- α 2a SECRETADO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE Escherichia Coli**

PAULO VICTOR SARMENTO DIAS

**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

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2017

DEDICO

Aos meus pais e à minha irmã

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, por me mostrar que sempre posso ser uma pessoa melhor. Pelo amor incondicional.

Aos meus pais e à minha irmã, por todos esses anos de ensinamentos do verdadeiro sentido da palavra amor.

À toda a minha família pelo apoio, conselhos, suporte e carinho.

Ao prof. Carlos pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Por todo o apoio e (muita) paciência.

Aos amigos do IPEN (Rute, Arletosa, Zé, Johnny, Tere, Junqueira, Carol, Plínio, Gustavo, Patrícia, Eliza-bebe, Claudinha, Podé, Cibebe, Paolo, Rosa, Miriam, Felipe, Renan e Marina) pela companhia e pelas boas risadas.

Às meninas do 124D (Kelly, Mariel, Lori e Bebel) por todos os momentos de descontração e reflexão. Por todo o apoio.

Às meninas do 103B (Thaís, Eliana, Flavinha e Renata) pelos desabafos e aventuras. Por sempre me mostrarem que 'não está tão ruim assim'.

A Caio pelos ensinamentos científicos, pelas horas de conversa e pelo apoio. Pelas aventuras e pela companhia nas horas mais difíceis.

A Rafa pelas horas de conversa. Pela sinceridade na hora certa.

A Belle pelo apoio de sempre, pelo carinho e confiança. Por dividir angústias e somar alegrias.

Aos amigos de infância (Ygor, Ramondot e Suzane) pelo suporte e leveza de sempre.

Aos professores e amigos de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba, em especial à professora Sharline, por mostrar que muitas vezes a falta de recursos pode ser suprida pelo esforço na construção do conhecimento.

Ao IPEN pela infraestrutura e verba necessárias para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (projeto nº 2015/10928-6) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A mais bela experiência que podemos ter é o mistério. É a emoção fundamental que está no berço da verdadeira arte e da verdadeira ciência.

- Albert Einstein

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INTERFERON- α 2a SECRETADO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia Coli*

Paulo Victor Sarmento Dias

RESUMO DAS ATIVIDADES

Os IFN- α 2 são atualmente utilizados em terapia de hepatite B e C, leucemia, mieloma múltiplo, leucemia de células pilosas, melanoma, sarcoma de Kaposi, linfoma folicular e carcinoma de células renais, em associação ou não com outras drogas. Este trabalho descreve um processo de produção, purificação e caracterização de interferon- α 2a secretado para o espaço periplasmico de *E. coli* utilizando um vetor baseado no uso constitutivo do promotor lambda P_L. Foi validada também uma análise em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para monitoração do processo. Dessa forma, este trabalho descreve inicialmente um método de RP-HPLC para análise qualitativa e quantitativa de interferon- α 2a e interferon- α 2b. O método foi desenvolvido e validado quanto à recuperação, precisão, linearidade, sensibilidade e especificidade. O teste de recuperação indicou erro menor que 1 % e as determinações quantitativas intra-dia e inter-dia apresentaram desvio padrão relativo sempre menores que 4 %, enquanto a sensibilidade experimental foi de 0,3 μ g (RSD = 5 %). Em relação à linearidade, o coeficiente de correlação assumiu o valor de 0,998 ($p < 0,0001$), para o intervalo de massa analisada de 0,62 a 10 μ g de interferon. Essa metodologia permite a aplicação de RP-HPLC como uma ferramenta poderosa para monitoração de níveis de expressão e qualidade do interferon- α 2 durante ou logo após a fermentação. A temperatura ótima de expressão foi avaliada nos intervalos de 30 a 42 °C, em cultivo em erlenmeyer. As produções volumétrica e específica foram maiores para temperaturas iguais ou superiores a 35 °C. Dessa forma, considerando a potencial degradação da proteína recombinante induzida pela temperatura, a temperatura ótima para a expressão de interferon neste processo foi definida como 35 °C. Os maiores valores de produção específica e volumétrica obtidos, em produção em erlenmeyer, foram 1,04 μ g/mL/A₆₀₀ e 3,45 mg/L, respectivamente. Foi padronizado um método de purificação laboratorial, em duas etapas: uma cromatografia de troca iônica, seguida de uma etapa de cromatografia de exclusão molecular. A pureza final e a recuperação em massa foram de, respectivamente, 95,3 % e 66 %. O produto final também foi caracterizado por meio de análise em SDS-PAGE, western blotting, espectrometria de massas, HPLC de exclusão molecular e HPLC em fase reversa.

DEVELOPMENT OF PRODUCTION PROCESS AND CHARACTERIZATION OF PERIPLASMIC INTERFERON- α 2a EXPRESSED IN *Escherichia Coli*

Paulo Victor Sarmiento Dias

ABSTRACT

IFN- α 2 is currently utilized in hepatitis B and C, leukemia, multiple myeloma, hairy cell leukemia, melanoma, Kaposi's sarcoma, follicular lymphoma, and renal cell carcinoma therapy, with or without other drugs. In this work, a process for *E. coli* periplasmic interferon- α 2a production and purification utilizing a lambda P_L promoter based on constitutive expression was proposed. As a tool for production monitoring, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis directly from periplasmic extract was validated. Thus, initially it was described a RP-HPLC methodology for qualitative and quantitative analysis of recombinant human interferon- α 2a and interferon- α 2b. The method has been set up and validated for accuracy, precision, linearity, sensitivity and specificity. A recovery test indicated a bias of less than 1% and intra-day and inter-day quantitative determinations presented relative standard deviations always < 4 %, while experimental sensitivity was 0.3 μ g (RSD = 5 %). Regarding to linearity, the coefficient of determination was 0.998 ($p < 0.0001$), for a range of analyzed interferon mass from 0,62 to 10 μ g. This rapid methodology allows the application of the RP-HPLC as a powerful tool to monitor the production yield and quality of periplasmic Interferon α 2 right after, or even during the fermentation. The optimum expression temperature was evaluated in flask cultures from 30 to 42 °C. It was observed that the volumetric and specific production were higher for culture temperatures equal or above 35 °C. Thus, considering the potential recombinant protein degradation induced by temperature, 35 °C was well-marked as the optimum temperature for interferon expression. The higher values for specific and volumetric production in culture flasks were 1.04 μ g/mL/A₆₀₀ and 3.45 mg/L respectively. As purification method, it was utilized ionic chromatography followed by size-exclusion chromatography. The final purity and mass recovery was, respectively, 95.3 % and 66 %. The final product was also characterized utilizing SDS-PAGE, western blotting, reversed-phase HPLC, size-exclusion HPLC and mass spectrometry analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. LINHAGEM DE <i>E. coli</i> , PLASMÍDEOS E SEED BANK.....	26
3.2. INÓCULO DOS MEIOS LÍQUIDOS	26
3.3. CHOQUE OSMÓTICO	26
3.4. GEL DE ELETROFORESE, WESTERN BLOTTING E SLOT BLOT	27
3.5. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE HPLC DE FASE REVERSA PARA ANÁLISE DE INTERFERON- α 2a E INTERFERON- α 2b	28
3.5.1. Amostras e Padrões de análise.....	28
3.5.2. Cultivo para obtenção de Interferon- α 2a	28
3.5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC).....	28
3.5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular (HPSEC)	29
3.5.5. Determinação de formas oxidadas.....	29
3.6. ESTUDO DA MELHOR TEMPERATURA DE CULTIVO PARA EXPRESSÃO DE INTERFERON- α 2a.....	30
3.7. PRODUÇÃO DE IFN EM ERLLENMEYER	30
3.8. PURIFICAÇÃO.....	30
3.8.1. Cromatografia de troca iônica	31
3.8.2. Cromatografia em fase reversa em coluna semi-preparativa (HPLC)	31
3.8.3. Cromatografia de exclusão molecular	31
3.9. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE IFN α -2 POR RP-HPLC	34
4.1.1. Validação utilizando o padrão IFN α -2b para análise de IFN α -2a	34
4.1.2. Cromatogramas típicos	35
4.1.3. Confirmação da pureza e identidade do pico de IFN α -2a periplásmico.....	36
4.1.4. Linearidade	37
4.1.5. Sensibilidade	38
4.1.6. Recuperação	39
4.1.7. Precisão (Ensaio Inter-dia e Intra-dia).....	39
4.1.8. Especificidade e identificação de isoformas	40
4.1.9. Comparação da quantificação em RP-HPLC e HPLC por Exclusão Molecular	42
4.2. ESTUDO DA MELHOR TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DE INTERFERON- α 2a	43

4.3.	PRODUÇÃO DE IFN EM ESCALA LABORATORIAL	45
4.4.	PURIFICAÇÃO	45
4.4.1.	Purificação por cromatografia de troca iônica / cromatografia em fase reversa	46
4.4.2.	Cromatografia de troca iônica / cromatografia de exclusão molecular	50
4.5.	ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO PRODUTO PURIFICADO	55
5.	DISCUSSÃO	56
5.1.	VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE RP-HPLC PARA ANÁLISE DE IFN α -2	56
5.2.	DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE IFN EM ESCALA LABORATORIAL	58
5.3.	PURIFICAÇÃO	60
5.4.	CARACTERIZAÇÃO DO IFN PRODUZIDO	61
7.	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição do método de HPLC em fase reversa utilizado na análise de Espectrometria de Massas.....	33
Tabela 2: Massa de interferon e área do pico obtidas para cada ponto do ensaio de linearidade	37
Tabela 3: Ensaio de recuperação de quantidades conhecidas de IFN α -2b adicionadas ao fluido periplásmico obtido por choque osmótico da cepa E. coli W3110 não-transformada..	39
Tabela 4: Determinações intra-dia e inter-dia de IFN α -2 por RP-HPLC	40
Tabela 5: Determinação de IFN α -2 por RP-HPLC em comparação com HPSEC.....	43
Tabela 6: Resumo das etapas do processo de purificação proposto.....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura tridimensional do IFN α -2a. Em laranja, azul e vermelho, são mostradas as estruturas α -hélice, β -sheet e 3_{10} hélice, respectivamente. As pontes dissulfeto são indicadas pelas setas amarelas 17
- Figura 2:** Esquema da construção do plasmídeo λ PL-DsbA-IFN α -2a para expressão constitutiva de IFN α -2a no espaço periplásmico 20
- Figura 3:** Esquema de um biorreator de tanque agitado 22
- Figura 4:** Cromatograma em RP-HPLC de (a) 7,5 μ g de IFN α -2a EP e (b) 2,5 μ g de IFN α -2b EP 34
- Figura 5:** Cromatogramas de RP-HPLC em coluna C4 Vydac de (a) IFN α -2b EP (2,5 μ g) e de diferentes extratos obtidos por choque osmótico de (b) *E. coli* W3110 não transformada (100 μ l), (c) *E. coli* W3110 transformada com vetor da expressão λ PL-DsbA-IFN α -2a (100 μ l) e (d) W3110 não transformada (100 μ l), após adição de 2,5 μ g de IFN α -2b EP. As setas mostram os picos que foram coletados para análise em SDS-PAGE e Western Blotting 35
- Figura 6:** SDS-PAGE (a) e Western-blotting (b), em condições não-redutoras, de picos relevantes presentes nos cromatogramas típicos de RP-HPLC. Amostras aplicadas: M = Marcador de massa molecular; S = IFN α -2b EP (1 μ g); 1 a 6 = picos mostrados na Figura 5 (20 μ l) 36
- Figura 7:** Curva padrão para determinação de Interferon α 2 por RP-HPLC. 38
- Figura 8:** Cromatogramas de RP-HPLC analisando algumas preparações com diferentes isoformas de interferon. A quantidade de proteína aplicada (2,5 μ g) foi baseada no valor nominal. (a) Roferon[®] A, (b) IFN α -2a glicosilado, (c) IFN α -2a expresso em *E. coli*, com N-metionina, e (d) IFN α -2b EP oxidado. As setas indicam o tempo de retenção do IFN α -2b EP (24,74 min). 41
- Figura 9:** Dependência das produções (a) específica e (b) volumétrica em função da temperatura de expressão de Interferon- α 2a. As barras representam o desvio padrão. (*) = $P < 0,05$ e (**) = $P < 0,005$. (para cada temperatura, $n = 2$) 43
- Figura 10:** Cromatogramas por RP-HPLC do produto de choque osmótico de cultivos realizados a: (a) 32 °C, (b) 35 °C e (c) 37 °C. A seta indica o tempo de retenção do IFN α -2b EP..... 44
- Figura 11:** Cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico utilizado na purificação por troca iônica/fase reversa..... 45
- Figura 12:** Purificação por troca iônica / fase reversa: Etapa de troca iônica. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise em gel SDS-PAGE do produto da primeira etapa de purificação (M= marcador de peso molecular, P = IFN α -2b EP, 1 μ g; 1 = Produto da primeira etapa de purificação, 7 μ L), (c) análise de dot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e w: referente aos picos do cromatograma da purificação. w = não

retido da coluna de troca iônica.), (d) cromatograma analítico por RP-HPLC do produto da primeira etapa da purificação (volume aplicado: 50 µL. A seta indica o tempo de retenção do padrão da análise). **47**

Figura 13: Purificação por troca iônica / fase reversa: Etapa de fase reversa. Cromatogramas de (a) IFNα-2b EP e (b) purificação em coluna semi-preparativa de fase reversa (volume de aplicação: 10 mL). (c) Cromatograma analítico por HPLC de exclusão molecular do produto da etapa de purificação por fase reversa (volume aplicado: 100 µL). A seta preta indica o tempo de retenção do IFNα-2b EP analisado no mesmo dia **49**

Figura 14: Cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico utilizado na purificação por troca iônica/exclusão molecular. **50**

Figura 15: Purificação por troca iônica / exclusão molecular: Etapa de troca iônica. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise de slot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e w: referente aos picos do cromatograma da purificação), (c) e (d) análise de pureza do produto da etapa de purificação por troca iônica por HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e por RP-HPLC, respectivamente. Volume aplicado: 50 µL. (As setas indicam o tempo de retenção do padrão da análise)..... **51**

Figura 16: Purificação por troca iônica / exclusão molecular: Etapa de exclusão molecular. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise de slot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado, 1, 2, 3, 4, 5, 6: referente aos picos do cromatograma da purificação. S = IFNα-2b EP, 150 ng), (c) e (d) análise de pureza do produto da etapa de purificação por exclusão molecular por HPSEC e por RP-HPLC, respectivamente. Volume aplicado: 50 µL. (As setas indicam o tempo de retenção do padrão da análise). **52**

Figura 17: SDS-PAGE das principais etapas do processo de purificação proposto. M = marcador de peso molecular; C = fluido periplásmico (15 µL); P = IFNα-2b EP (1 µg); 1 = material não retido da etapa de cromatografia de troca iônica (150 µL); 2 = produto da cromatografia de troca iônica (30 µL); 3 = produto final obtido da cromatografia de exclusão molecular (1 µL)..... **53**

Figura 18: Análise por espectrometria de massas do IFN purificado..... **55**

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrons
A₆₀₀	Absorbância, medida a 600 nm
cDNA	DNA complementar
CEMSA	Centro de Espectrometria de Massas Aplicada
CRS	Do inglês Chemical Reagent Standard (Padrão de reagente químico)
Da	Daltons
DO₆₀₀	Densidade óptica, medida a 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Do inglês Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensaio imunossorvente ligado a enzima)
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
hGH	Hormônio do crescimento humano
HPLC	Do inglês: “High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografia líquida de alta eficiência)
hPRL	Prolactina humana
HPSEC	Do inglês: “High Performance Size-Exclusion Chromatography” (Cromatografia de alta eficiência de exclusão molecular)
I.D.	Do inglês: “Inner Diameter” (Diâmetro interno)
IFN	Interferon humano
IFN-α	Interferon-α humano
IFNα-2	Interferonα-2 humano
IFNα-2a	Interferonα-2a humano

IFNα-2b	Interferon α -2b humano
IFNα-2c	Interferon α -2c humano
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
kDa	quilo Dalton
LB	Luria Bertani
LOQ	Do inglês: “Limit of Quantitation” (Limite de Quantificação)
M	Molar
mA	Miliampère
mAU	Mili unidades de absorbância
mPRL	Prolactina de camundongo
Met-hGH	Hormônio do crescimento humano com N-metionina na porção N-terminal
Met-IFN	Interferon- α 2a humano com N-metionina na porção N-terminal
MS/MS	Tipo de análise em espectrometria de massas caracterizado por dois módulos de espectrômetros de massas acoplados
NaOH	Hidróxido de Sódio
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
STR	Do inglês: “Stirred Tank Reactor” (Reator de tanque agitado)
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Trisaminometano

1. INTRODUÇÃO

Os interferons são citocinas produzidas pelas células em resposta a diferentes estímulos, incluindo ácidos nucléicos virais, células neoplásicas, antígenos de bactérias, protozoários e vírus. Estas citocinas apresentam ação antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa, a qual influencia o metabolismo, crescimento e diferenciação das células (PFEFFER, 1997). Os interferons humanos foram inicialmente classificados como: de leucócito (L), de fibroblasto (F) e imuno (I). Em nomenclatura proposta posteriormente, passaram a ser classificados como α , β e γ , respectivamente (PESTKA, 1983). Os interferons alfa e gama são produzidos sobretudo pelos linfócitos e atuam na circulação, enquanto os interferons beta, produzidos principalmente nos fibroblastos (células do tecido conjuntivo), agem diretamente sobre os tecidos.

Os interferons α -2 (IFN α -2), um subgrupo dos interferons- α (IFN- α), compõem um conjunto de proteínas heterólogas com atividades biológicas semelhantes. Os três principais subtipos de IFN- α 2 são designados IFN α -2a, IFN α -2b e IFN α -2c. A produção de IFN- α pela tecnologia do DNA recombinante tem sido focada no IFN α -2a e no IFN α -2b, os quais possuem estrutura semelhante, diferindo apenas na posição 23 da cadeia de aminoácidos (lisina para IFN α -2a e arginina para IFN α -2b) (GULL et al., 2013; KLAUS et al., 1997; MOHAMMED; EL-BAKY; REDWAN, 2012; SILVA et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2005).

O IFN- α foi o primeiro medicamento a demonstrar efeitos benéficos em pacientes com hepatite C, em 1986. Atualmente, os tratamentos da hepatite C são baseados no uso de preparações de IFN- α combinadas ou não com o fármaco antiviral ribavirina. A terapia resulta em rápido declínio dos níveis do vírus da hepatite C no soro e, a longo prazo, ocorre sua extinção no soro e fígado, ocorrendo a cura da infecção crônica (THITINAN; MCCONVILLE, 2009). Os IFN- α 2, em específico, são atualmente utilizados em terapia de hepatite B e C, leucemia, mieloma múltiplo, leucemia de células pilosas, melanoma, sarcoma de Kaposi, linfoma folicular e carcinoma de células renais, em associação ou não com outras drogas (ARDUINI et al., 2004; CEAGLIO et al., 2016; GLUE et al., 2000; RUIZ et al., 2003).

Na avaliação do total de vendas de Drogas Biológicas nos Estados Unidos, as citocinas renderam US\$ 4,8 bilhões em 2012, o que representou um aumento em vendas de 14,8 %, contra 4,3 % em 2011. Entre estas citocinas, os interferons apresentaram maior índice de vendas, com um total de 79 % das vendas do mercado (AGGARWAL, 2014). No Brasil, medicamentos com princípio ativo IFN recombinante são comercializados por nove empresas, sendo os de princípio ativo IFN α -2a distribuídos pela Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A. e pela Chron Epigen Indústria e Comércio LTDA (ANVISA, 2016).

O IFN α -2a possui 165 aminoácidos, massa de aproximadamente 19 kDa e ponto isoelétrico igual a 6,5 (KUMAR; SHARMA; KALONIA, 2009; LINDENMANN, 1982; NEVES et al., 2004). Como característico dos IFN- α , os IFN α -2a e IFN α -2b possuem duas pontes dissulfeto, que conferem à estrutura terciária sensibilidade a agentes redutores. As pontes dissulfeto ocorrem entre a cisteína 1 e 98, e entre a cisteína 29 e 138 (WETZEL, 1981). A estrutura tridimensional do IFN α -2a é mostrada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura tridimensional do IFN α -2a. Em laranja, azul e vermelho, são mostradas as estruturas α -hélice, β -sheet e 3_{10} hélice, respectivamente. As pontes dissulfeto são indicadas pelas setas amarelas. (CARSON, 1991; KLAUS et al., 1997)

Sistemas de expressão baseados em bactérias, células de inseto, células humanas, leveduras e plantas são utilizados atualmente na produção de produtos biofarmacêuticos pela indústria (BURLAKOVSKIY; YEMELYANOV; LUTOVA, 2016; HUANG; LIN; YANG, 2012; LAMBERTZ et al., 2014; NISHIMIYA, 2014). Ainda que o código genético seja universal, os mecanismos de processamento de RNA e de modificações pós-traducionais inerentes a cada organismo ocasionam diferenças estruturais nas proteínas recombinantes. Essas variações estruturais, das quais se destaca a glicosilação, podem influenciar a atividade biológica, assim como a imunogenicidade do biofármaco. Dessa forma, cada organismo hospedeiro apresenta vantagens e desvantagens diretamente associadas às propriedades da proteína recombinante produzida e aos custos de produção (JOHNSTON et al., 2011). Historicamente, o IFN- α tem sido purificado a partir de culturas de células humanas e de sistemas de expressão em bactérias. Atualmente, os IFN α -2a e IFN α -2b comerciais são majoritariamente produzidos utilizando sistema de expressão em *Escherichia coli* (BIS et al., 2014). Destaca-se, nesse sistema, a baixa complexidade frente aos outros organismos utilizados para expressão de proteínas recombinantes, inexistindo mecanismo de glicosilação. A utilização da *Escherichia coli* na produção industrial de IFN α -2a e IFN α -2b se justifica pelo fato de que, ainda que estas moléculas sejam glicoproteínas (ADOLF et al., 1991), a glicosilação não é essencial para sua atividade biológica (CUETO-ROJAS et al., 2010; PESTKA, 1983). Além disso, estudos recentes mostraram que a glicosilação do IFN α -2b leva à diminuição de sua estabilidade térmica (JOHNSTON et al., 2011).

O Grupo de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN desenvolve pesquisas em produção de hormônios recombinantes humanos, em escala laboratorial, a partir de bactérias (*E. coli*) modificadas geneticamente. Os melhores resultados de expressão em bactéria foram obtidos utilizando o promotor λP_L e o peptídeo sinalizador DsbA, que possibilita que a proteína de interesse seja secretada para o espaço periplásmico bacteriano. Ainda que, na expressão periplásmica, os níveis de expressão sejam menores comparados à expressão no citoplasma, não são formados corpos de inclusão, o que elimina a necessidade de solubilização da proteína agregada. Além disso, na etapa de extração da proteína recombinante do espaço periplásmico, é utilizada a metodologia do choque osmótico, onde não ocorre lise celular. Dessa forma, há uma menor proporção de contaminantes, o que representa um ganho em relação à purificação, que, por sua vez, está associada a

altos custos em processos biotecnológicos. Outra vantagem observada na expressão periplásmica é no transporte da proteína recombinante do citoplasma para o espaço periplásmico, onde ocorre a atuação de enzimas específicas para a retirada do peptídeo sinal. Nesse processo, há também a remoção da metionina inicial do N-terminal. Portanto, como resultado, tem-se a proteína recombinante em sua forma autêntica. (KOSHLAND; BOTSTEIN, 1980; SHIROKOV et al., 2011; SOARES et al., 2003, 2008)

Em estudos recentes, no Grupo de Hormônios, foi avaliada a expressão de diferentes proteínas utilizando esse mesmo sistema de expressão, com e sem o repressor termo-sensível *clts*. Foi observado que, tanto para a expressão de hPRL quanto de hGH, a expressão constitutiva atingiu níveis de expressão maiores em relação à expressão com repressor (ARTHUSO, 2015).

Dessa forma, foi feita a construção para a expressão constitutiva de IFN α -2a utilizando o plasmídeo λ PL-DsbA-IFN α -2a (Figura 2). Inicialmente, o inserto contendo a sequência do cDNA do IFN α -2a foi sintetizado no vetor pUC57. Então, o inserto de 572 pb foi extraído utilizando as enzimas de restrição NdeI e BamHI e foi inserido no vetor λ PL-DsbA na posição onde se encontrava o inserto da mPRL. Como organismo hospedeiro, foi utilizada a *E. coli* da linhagem W3110. (ARTHUSO, 2015; SUZUKI et al., 2012)

A detecção e quantificação de IFN- α 2 é crucial para o controle do processo industrial (SILVA et al., 2009; ZARRIN et al., 2006), especialmente nas etapas de downstream. Uma vez que os produtos recombinantes apresentam diferenças de acordo com as condições de cultivo, é necessário que o produto seja estimado qualitativa e quantitativamente antes das etapas de purificação (SRIVASTAVA et al., 2005; VALENTE et al., 2004).

Uma técnica comumente utilizada para determinar a concentração de IFN- α 2 é o ensaio “Enzyme-linked immunosorbent assay”, ou ELISA (STAEHELIN et al., 1981). Comercializado mundialmente como um kit de ensaio, essa metodologia é baseada na afinidade entre IFN- α 2 e seu anticorpo. Após etapas de lavagem e adição de reagentes, ocorre uma reação colorimétrica resultando na alteração de absorbância para um comprimento de onda específico, proporcional à concentração de IFN.

Figura 2: Esquema da construção do plasmídeo λ P_L-DsbA-IFN α -2a para expressão constitutiva de IFN α -2a no espaço periplásmico. (ARTHUSO, 2015)

A técnica de Ressonância Plasmon de Superfície é atualmente aplicada para quantificação de IFN α -2b em amostras puras (RAMANAN et al., 2010). O ensaio também é baseado na afinidade anticorpo-interferon. Dessa forma, o anticorpo é imobilizado em uma superfície metálica ultrafina, onde a reação imunológica ocorre após injeção da amostra. Do outro lado da superfície ultrafina, um laser de alta energia é constantemente refletido. Conforme a ligação entre antígeno e anticorpo é formada, as propriedades da superfície metálica mudam, o que provoca a deflexão do laser proporcional à quantidade de IFN na amostra.

Recentemente, a técnica de SDS-PAGE foi aplicada para a quantificação de IFN- α 2b extracelular por meio da quantificação densitométrica das bandas (KHAN et al., 2014). Para tanto, a cultura de *Pichia pastoris* foi centrifugada e o sobrenadante foi aplicado no gel de SDS-PAGE. Após coloração com Coomassie, o software Image J (National Institute of Health, USA) foi utilizado para quantificar o IFN- α 2b através da densidade da banda, por meio da versão em escala de cinza da foto do gel e de uma curva padrão com diferentes quantidades de IFN- α 2b, corridas no mesmo gel.

Muitos autores sugerem o uso de técnicas cromatográficas para avaliar concentração, estabilidade e pureza de IFN α -2a e IFN α -2b a partir de preparações farmacêuticas. Zimmermann *et al.* (2013) validaram um método de HPLC de exclusão molecular para determinação de IFN α -2a em formulações farmacêuticas. Foi utilizada uma coluna PhenomenexTM Biosep-Sec-s2000[®] (5 μ m de diâmetro de partícula e 150 Å de diâmetro de poro) e o tempo de retenção do IFN α -2a foi de 17,2 minutos.

Zarrin *et al.* (2006) desenvolveram um método de HPLC de fase reversa para quantificação de IFN α -2b de fármacos, o qual foi posteriormente aplicado no Programa de Controle de Qualidade Pós-Marketing no Irã. Nesse método, foi utilizada uma coluna C₄ e o tempo de retenção foi de 9,2 minutos.

Silva *et al.* (2009) validaram uma técnica de HPLC de fase reversa para análise de IFN α -2a em formulações farmacêuticas. O método também se mostrou aplicável para a quantificação de IFN α -2a em amostras de soro. Foi utilizada uma coluna Jupiter C₄ e o tempo de retenção do IFN α -2a foi de 32,2 minutos.

Cueto-Rojas *et al.* (2010) reportaram uma técnica de cromatografia líquida de ultra performance em fase reversa para análise quantitativa de IFN α -2b recombinante expresso em corpos de inclusão. Nesse método, a amostra precisou ser submetida a processos de secagem, solubilização e filtração antes da análise. Foi utilizada uma coluna C₁₈ e o tempo de retenção foi por volta de 4 minutos.

Para a determinação de IFN α -2a peguado em formulações farmacêuticas, El Ghazaly *et al.* (2013) desenvolveram uma técnica de HPLC de fase reversa, onde o IFN α -2a não-peguido foi validado como padrão de análise quantitativa de IFN α -2a peguido. Foi utilizada uma coluna C₈ e os tempos de retenção do IFN α -2a e do IFN α -2a peguido foram, respectivamente, 21 e 23 minutos.

Para uma análise qualitativa e quantitativa, útil na detecção de formas oxidadas durante o processo de produção e purificação do IFN, seria estratégica a utilização de um método cromatográfico capaz de quantificar o IFN produzido, em sua forma natural e oxidada, diretamente do extrato periplásmico. Porém, um método analítico com essa aplicação ainda não foi descrito na literatura.

No desenvolvimento do processo de produção de proteínas recombinantes, é necessário definir o tipo de biorreator, o regime de operação e as condições de cultivo adequados, de acordo com o sistema de expressão e as propriedades do produto. No caso específico da produção de IFN α -2, com sistema de expressão em *E. coli*, são reportadas majoritariamente produções realizadas em reatores de tanque agitado

(STR) (Figura 3), em regime fed-batch. A produção em regime contínuo também foi descrita. (JUNG, 2006; SRIVASTAVA et al., 2005; TAN et al., 2013, 2011)

Figura 3: Esquema do biorreator de tanque agitado

Srivastava *et al.* (2005) utilizaram um reator de tanque agitado de 2 L, com volume de cultivo de 1 L, para a produção de IFN α -2b em *E. coli*, em corpos de inclusão. No sistema de expressão, foi utilizado um repressor termo-sensível, com expressão no citoplasma. O oxigênio dissolvido foi mantido a 40 %, o pH igual a 7,2 e a temperatura igual a 30 °C. Quando a DO₆₀₀ atingiu o valor de 67 unidades ópticas, foi realizado o choque térmico, durante 5 minutos, a 42 °C. Como resultado, a produção volumétrica foi de 5,2 g/L. Como estratégia para alcançar altos níveis de expressão, o autor mencionou a otimização de códons do cDNA do IFN na construção do plasmídeo.

Jung (2006) reportou a produção de IFN α em regime contínuo. Foi utilizado o sistema de expressão em citoplasma, em *E. coli*. A DO₆₀₀ foi mantida baixa o suficiente a ponto de não esgotar o oxigênio dissolvido, já que, durante toda a fermentação, não houve adição de oxigênio. Foi utilizado um fator de diluição igual a 0,254 L/h, e a

produção volumétrica foi de 39 ± 10 mg/L. A fase em regime contínuo da produção foi mantida durante 51 h.

Tan *et al.* (2011) reportaram a utilização de uma resina de troca iônica *in situ*, dispersa no biorreator, para a remoção de acetato produzido no cultivo durante a expressão de IFN α -2b em periplasma, utilizando *E. coli*. Foi utilizado um biorreator de tanque agitado de 2 L, com volume de cultivo de 1 L, em regime fed-batch, com oxigênio dissolvido mantido a 30 %, sem controle de pH e temperatura de 30 °C. Quando foi atingida a DO₆₀₀ de 6 unidades ópticas, foi feita a ativação a partir da adição de IPTG. A produção volumétrica foi de 578,8 μ g/L.

Um estudo semelhante foi realizado por Tan *et al.* (2013), os quais utilizaram mesmo sistema de expressão e mesma estratégia de cultivo, porém a resina de troca iônica para remoção de acetato, antes dispersa no biorreator, foi acondicionada em um leito, o qual foi acoplado no biorreator de tanque agitado. A produtividade volumétrica obtida foi de 867,4 μ g/L. Ainda que sejam mencionados na literatura vários estudos de produção de IFN em biorreator, não foi descrita ainda a produção de IFN α -2a periplásmico.

Historicamente, o IFN- α 2 tem sido purificado a partir de células humanas e de sistemas de expressão em bactérias. Na elaboração do método de purificação, é necessário considerar as propriedades da proteína de interesse em relação às moléculas contaminantes, assim como a sua solubilidade e a necessidade de utilização de tags de afinidade. Todos esses fatores variam em função da forma que o IFN foi produzido. (BIS et al., 2014)

Cao *et al.* (2006) reportaram a purificação de IFN- α a partir de uma única etapa de cromatografia de afinidade. A purificação foi realizada a partir do lisado do cultivo de *Pseudomonas sp.* e foram utilizadas, como fase estacionária, microesferas magnéticas ligadas ao anticorpo anti-IFN α -2b. A pureza final foi de 92,9 %, e as recuperações em relação à atividade biológica foi igual a 88,5 %. O total de produto obtido foi de 5 μ g.

Para a purificação com apenas uma etapa de troca iônica, Doğan *et al.* (2012) elaboraram uma fase estacionária composta por criogel supermacroporoso encoberto por resina de Cibacron Blue F3GA. A purificação foi feita a partir do lisado da cultura de fibroblastos, com o IFN na forma solúvel. A pureza final e a recuperação em relação à atividade biológica foram de, respectivamente, 97,6 % e 84,6 %. O total de produto obtido foi de 18 μ g.

Srivastava *et al.* (2005) descreveram uma técnica para purificação de IFN α -2b. O produto foi expresso em *E. coli* em corpos de inclusão, ou seja, na forma insolúvel. A primeira etapa da purificação consistiu na lise das células, centrifugação e lavagem do pellet com ácido desoxicólico. A segunda etapa consistiu na cromatografia de troca iônica, a qual resultou em 3 g do produto solúvel com pureza de 99 %. A recuperação em relação à atividade biológica foi de 58 %.

Para a purificação parcial de IFN α -2 periplásmico expresso em *E. coli*, Lin *et al.* (2013) utilizaram um protocolo baseado na adição do produto do choque osmótico a uma mistura bifásica contendo uma fase alcoólica (2-propanol 18 % (w/w)) e uma fase salina (sulfato de amônio 22 % (w/w) e cloreto de sódio 1 % (w/w)). O sistema foi submetido a agitação até a emulsificação das fases, seguido de centrifugação. A recuperação em massa foi de 75 %, com fator de purificação de 12,8.

Na produção de biofármacos por meio de processos biotecnológicos, é essencial a utilização de um método de purificação que resulte em alto grau de pureza do produto. No entanto, um método de purificação eficiente e com altos rendimentos para IFN α -2a a partir do fluido periplásmico ainda não foi descrito.

Partindo de um recém desenvolvido sistema de expressão bacteriano de IFN α -2a, realizado no Laboratório de Hormônios do IPEN, este trabalho tem o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de um processo biotecnológico para a obtenção desse produto, incluindo a otimização da expressão no periplasma e a purificação em escala laboratorial.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é a produção em escala laboratorial e caracterização de IFN α -2a.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de técnica analítica para avaliação qualitativa e quantitativa de IFN α -2a periplásmico aplicável nas diferentes etapas de produção, incluindo no extrato bruto inicial;
- Estudo da melhor temperatura de expressão de IFN α -2a em erlenmeyer;
- Produção de IFN α -2a em escala laboratorial;
- Desenvolvimento de metodologia de purificação eficiente, com pureza final superior a 95 %;
- Caracterização físico-química do produto purificado.

3. METODOLOGIA

3.1. LINHAGEM DE *E. coli*, PLASMÍDEOS E SEED BANK

A linhagem W3110 de *E. coli* transformada com o plasmídeo λ PPL-DsbA-IFN α -2a, que possui o gene de resistência a ampicilina, foi utilizada para produção de IFN α -2a (ARTHUSO, 2015). Também foi utilizada a linhagem W3110 não transformada como controle negativo para a produção de IFN.

O Seed Bank das linhagens foi feito a partir de cultivo em meio LB líquido, utilizando 100 μ g/mL de ampicilina somente para a linhagem W3110 clonada com o vetor λ PPL-DsbA-IFN α -2a. O cultivo foi realizado a 37 °C e 150 rpm até que fosse atingida a DO₆₀₀ de 0,4 unidades ópticas. Em seguida, foi adicionado 15 % de glicerol estéril ao cultivo, que foi imediatamente estocado a -80 °C em alíquotas de 200 μ L.

3.2. INÓCULO DOS MEIOS LÍQUIDOS

Para inocular os meios líquidos, foram preparadas placas com meio LB-Ágar com 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram semeadas com a linhagem W3110 transformada com o plasmídeo λ PPL-DsbA-IFN α -2a e incubadas por 24 h, a 37 °C. No caso da linhagem W3110 não transformada, não foi adicionada ampicilina no meio LB-Ágar.

3.3. CHOQUE OSMÓTICO

O choque osmótico foi utilizado para extrair as proteínas do espaço periplásmico sem o rompimento da célula bacteriana. Foi utilizado o método descrito por Koshland e Botstein (1980) com algumas modificações de acordo com Soares *et al.* (2003). Assim, ao fim do cultivo, o meio foi centrifugado a 4 °C e 4000 g, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em solução Tris-HCl 10 mM a 20 % (w/v) de sacarose, pH 7,5 com adição de EDTA 0,5 M pH 8,0. Após incubação por 10 minutos em gelo, as amostras foram centrifugadas nas mesmas

condições. Logo em seguida, o pellet foi ressuspensionado em solução Tris-HCl 1 mM pH 8,0 e incubado por 10 minutos em gelo. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante (fluido periplásmico) foi estocado a -80 °C. Todas as soluções utilizadas foram previamente resfriadas em gelo, e o volume utilizado das mesmas foi calculado a partir das Equações 1 e 2.

$$V_1 = \frac{DO_{600nm} \times V_m}{100} \quad (1)$$

$$V_2 = \frac{V_1}{30} \quad (2)$$

Onde:

V_1 = volume das soluções de Tris-HCl-sacarose e Tris-HCl, em mL;

DO_{600nm} = Densidade óptica do cultivo medida a 600 nm, em unidades ópticas;

V_m = Volume do meio utilizado no choque osmótico, em mL;

V_2 = Volume de solução de EDTA 0,5 M, em mL.

3.4. GEL DE ELETROFORESE, WESTERN BLOTTING E SLOT BLOT

A análise em gel de SDS-PAGE a 12 % de poliacrilamida foi realizada sob condições não-redutoras (SOARES et al., 2000). As amostras foram fervidas durante 5 minutos no tampão de amostra, e foram aplicados 20 uL em cada poço. A corrida foi realizada com a corrente fixa em 35 mA (voltagem e potência variáveis).

No Western Blotting, foi utilizada a transferência semi-seca (Sistema Multiphor II – Pharmacia LKB Novablot Electrophoretic Transfer Kit), durante uma hora, com corrente, em mA, correspondente à área da membrana, em cm². Foi utilizado como anticorpo primário o antissoro anti-IFN α -2 humano monoclonal produzido em camundongo (9D3) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Como anticorpo secundário, foi utilizado o anticorpo anti-camundongo produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Millipore, Darmstadt, Germany).

Nos ensaios de Slot Blot e Dot Blot, foram utilizados os aparatos PR600 da Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA, EUA) e Bio-Dot Apparatus da Bio-

Rad (Hercules, CA, EUA), respectivamente. Os anticorpos primário e secundário foram os mesmos utilizados no Western Blotting.

3.5. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE HPLC DE FASE REVERSA PARA ANÁLISE DE INTERFERON- α 2a E INTERFERON- α 2b

3.5.1. Amostras e Padrões de análise

Como padrão de análise, foi utilizado o padrão Interferon- α 2b (IFN α -2b EP) “*chemical reagent standard*” (CRS) (European Pharmacopoeia, Strasburgo, França). Foram utilizadas amostras de Interferon- α 2a e Interferon- α 2b produzidas em células humanas HEK-293 e Interferon- α 2a produzido em *E. coli* (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Também foram utilizados o padrão CRS Interferon- α 2a (IFN α -2a EP) (European Pharmacopoeia, Strasburgo, França) e uma formulação farmacêutica de Interferon- α 2a (Roferon[®], Hoffmann-La Roche, Suíça). As amostras de IFN produzido para a validação da técnica de HPLC foram obtidas de acordo com o descrito no item 3.5.2.

3.5.2. Cultivo para obtenção de Interferon- α 2a

O cultivo das linhagens W3110 transformadas ou não com o plasmídeo λ PL-DsbA-IFN α -2a foi realizado em 250 mL de meio Luria-Bertani (LB), em erlenmeyers de 500 mL, a 30 °C e 150 rpm. Apenas no caso da *E. coli* W3110 transformada, foram adicionados 100 μ g/mL de ampicilina ao meio de cultivo. Após 16 horas de cultivo, a cultura foi submetida ao choque osmótico.

3.5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

Foi utilizado o aparato Shimatzu Modelo SPD-20A (Shimadzu, MD, USA), aplicando o software LC solution, também da Shimatzu. A coluna utilizada foi a C₄ Grace 214TP54 (25 cm x 4,6 mm I.D., diâmetro de poro de 300 Å, diâmetro de partícula de 5 μ m) (Grace Discovery Sciences, Hesperia, CA, USA).

O método desenvolvido foi baseado em determinações de IFN em formulações farmacêuticas previamente publicadas (SILVA et al., 2009), com alterações na fase móvel, nos steps e na temperatura da coluna. A fase móvel consistiu em solução 1:1000 de ácido trifluoracético (TFA) em água Mili-Q (Solução A) e solução aquosa a 0,01 % (v/v) de TFA e 90 % (v/v) de acetonitrila (Solução B). A técnica desenvolvida consiste em três fases: um step de 47 % de Solução B por 10 minutos, um gradiente de 47 % a 58 % de Solução B em 25 minutos e um gradiente de 58 % a 47 % de Solução B em 10 minutos. O fluxo foi configurado a 1 mL/min, a detecção UV a 220 nm, e a temperatura da coluna a 30 °C. Foram utilizados volumes de amostra de 10 a 100 µL.

3.5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular (HPSEC)

A HPSEC foi realizada no mesmo equipamento Shimatzu. Para tanto, foi utilizada uma coluna Tosoh Bioscience TSK Gel G2000 SW (60 cm, 7.5 mm I.D., tamanho de partícula de 10 µm e tamanho de poro de 125 Å) (King of Prussia, PA, USA) acoplada a uma pré-coluna TSK Gel SW (7.5 cm, 7.5 mm I.D.). A fase móvel foi fosfato de sódio 0,02 M com NaCl 0,15 M, pH 7,0, com fluxo de 1,0 mL/min (OLIVEIRA et al., 2003).

3.5.5. Determinação de formas oxidadas

Foi adicionado H₂O₂ 30 % a uma solução de 1 mg/mL de IFNα-2b EP a uma proporção de 2:3. A reação foi incubada por 1 h, a temperatura ambiente, e então foi analisada em RP-HPLC. (SILVA et al., 2009)

3.6. ESTUDO DA MELHOR TEMPERATURA DE CULTIVO PARA EXPRESSÃO DE INTERFERON- α 2a

Para determinar a temperatura ótima para a expressão de IFN α -2a no sistema de expressão descrito no item 3.1, foram realizados cultivos em duplicata nas temperaturas de 30, 32, 35, 37 e 42 °C. Cada experimento foi realizado em 100 mL de meio LB com 100 μ g/mL de ampicillina, em erlenmeyers de 250 mL, a 150 rpm. Após 18 horas de cultivo, a cultura foi submetida ao choque osmótico e o fluido periplásmico obtido foi analisado pela técnica de RP-HPLC validada.

O tratamento estatístico foi realizado no software GraphPad Prism® 5.0. Foi utilizado o teste ANOVA de análise de variância seguido do teste de Bonferroni ($p < 0,05$) a fim de comparar, aos pares, a significância da diferença da produção de IFN observada em cada temperatura de cultivo.

3.7. PRODUÇÃO DE IFN EM ERLLENMEYER

Para a produção de IFN em erlenmeyer, foi feito o mesmo procedimento descrito no item 3.5.1, com as seguintes alterações: foram realizados simultaneamente 10 cultivos de 400 mL, em frascos de 1 L, e a temperatura e o tempo de cultivo foram, respectivamente, 35 °C e 18 h.

3.8. PURIFICAÇÃO

O produto do choque osmótico foi dialisado em tampão Tris-HCl pH 8,0, para a remoção de resíduos de EDTA utilizando membrana Dialysis Tubing Cellulose D9402-100 FT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com diâmetro de corte de 10 kDa.

3.8.1. Cromatografia de troca iônica

Nas etapas de purificação por cromatografia de troca iônica, foi utilizado o sistema de purificação ÄKTA purifier (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Foi utilizada uma coluna com resina de troca iônica, com Tris-HCl pH 8,0 a 0,05 M (tampão A) e Tris-HCl pH 8,0 a 0,05 M + NaCl a 2 M (tampão B) (SRIVASTAVA et al., 2005). A resina, do tipo Q Sepharose Fast Flow, foi acondicionada em uma coluna de 25 mL e 12 cm de altura. Antes de injetar a amostra, a resina da coluna foi equilibrada com um volume de coluna do tampão B. A leitura em UV foi feita a 280 nm e a coluna foi mantida a 8 °C.

3.8.2. Cromatografia em fase reversa em coluna semi-preparativa (HPLC)

Foi utilizada a coluna semi-preparativa C₄ Grace 214TP510 (25 cm x 10 mm I.D., diâmetro de poro de 300 Å, diâmetro de partícula de 5 µm) (Grace Discovery Sciences, Hesperia, CA, USA). Antes da purificação, a amostra foi concentrada utilizando tubo Amicon® Ultracel® 3K (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Corrigtwhill, Irlanda), com diâmetro de corte de 3 kDa, resultando no volume de amostra de 10 mL. Foi utilizado o aparato Shimadzu Modelo SPD-20A (Shimadzu, MD, USA), aplicando o software LC solution, também da Shimadzu. O fluxo foi de 2,5 mL/min com loop de 500 µL. A fase móvel e o método foram iguais ao descrito no tópico 3.5.2. Nesse ensaio, a coluna foi mantida em temperatura ambiente.

3.8.3. Cromatografia de exclusão molecular

Nas etapas de purificação por cromatografia de exclusão molecular, foi utilizado o sistema de purificação ÄKTA purifier (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Antes da purificação, a amostra foi concentrada utilizando tubo Amicon® Ultracel® 3K (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Corrigtwhill, Irlanda), com diâmetro de

corde de 3 kDa, resultando no volume de amostra de 5 mL, com concentração 6 vezes maior em relação à amostra não concentrada. Foi utilizada coluna com volume de 200 mL, com resina Sephacryl S100 High Resolution. Como tampão A, foi utilizado fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 + NaCl 0,15 M. O fluxo de entrada da amostra e do tampão A foi de 1 mL/min. A purificação teve a duração de um volume de coluna, a leitura em UV foi feita a 280 nm e a coluna foi mantida a 8 °C.

3.9. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise por Espectrometria de Massas da amostra obtida na etapa de purificação foi realizada pela empresa CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada. Foi utilizado um HPLC com coluna de fase reversa (Jupiter C4, 250 mm x 4,6 mm I.D., 5,0 µm de diâmetro de partícula e 300Å de diâmetro de poro (Phenomenex)) acoplada a um Espectrômetro de Massas Híbrido Triploquadruplo Linear Iontrap (MS/MS) (3200 QTRAP, AB Sciex).

No método cromatográfico, foi utilizada uma solução aquosa de 5 % (v/v) de acetona e 0,1 % (v/v) de TFA (Solução A) e uma solução aquosa de 95 % (v/v) de acetona e 0,1 % (v/v) de TFA (Solução B). O volume de injeção foi de 50 µL, fluxo igual a 0,6 mL/min e temperatura de coluna igual a 60 °C. O método foi executado em steps, mostrados na Tabela 1. O pico coletado, com tempo de retenção de 6 minutos, foi injetado no espectrômetro de massas MS/MS.

Tabela 1: Descrição do método de HPLC em fase reversa utilizado na análise de Espectrometria de Massas.

Etapas	Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0	0	45,6	54,4
1	8,44	45,6	54,4
2	16,0	36,6	63,4
3	28,8	27	73
4	40,93	45,6	54,4
5	52,24	45,6	54,4

4. RESULTADOS

4.1. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE IFN α -2 POR RP-HPLC

4.1.1. Validação utilizando o padrão IFN α -2b para análise de IFN α -2a

A técnica de HPLC validada para análise de IFN α -2a utilizou inicialmente o padrão IFN α -2a EP como referência para quantificação. No entanto, esse padrão recentemente deixou de ser comercializado. Dessa forma, para viabilizar a realização dos estudos, foi utilizado também o IFN α -2b EP que apresenta o aminoácido arginina na posição 23, única diferença em relação ao IFN α -2a, que possui a lisina nessa mesma posição. A Figura 4 mostra o cromatograma dos padrões IFN α -2a e IFN α -2b.

Figura 4: Cromatograma em RP-HPLC de (a) 7,5 μ g de IFN α -2a EP e (b) 2,5 μ g de IFN α -2b EP.

O tempo de retenção dos padrões IFN α -2a e IFN α -2b foram similares, demonstrando que apresentam hidrofobicidade equivalente. Além disso, as áreas obtidas dos picos de IFN α -2a e de IFN α -2b respeitaram a proporção de massa aplicada. Dessa forma, devido à não comercialização do padrão IFN α -2a, assim como a pouca quantidade do mesmo disponível, nas etapas seguintes da validação, foi utilizado o IFN α -2b EP.

4.1.2. Cromatogramas típicos

A Figura 5 mostra os cromatogramas típicos obtidos de amostras de IFN α -2b EP, extrato do choque osmótico da cepa W3110 transformada com vetor da expressão λ PL-DsbA-IFN α -2a e choque osmótico da cepa W3110 sem plasmídeo (controle).

Figura 5: Cromatogramas de RP-HPLC em coluna C4 Vydac de (a) IFN α -2b EP (2,5 μ g) e de diferentes extratos obtidos por choque osmótico de (b) *E. coli* W3110 não transformada (100 μ l), (c) *E. coli* W3110 transformada com vetor da expressão λ PL-DsbA-IFN α -2a (100 μ l) e (d) W3110 não transformada (100 μ l), após adição de 2,5 μ g de IFN α -2b EP. As setas mostram os picos que foram coletados para análise em SDS-PAGE e Western Blotting.

Os cromatogramas mostraram resolução suficiente para a identificação e quantificação de IFN α -2 recombinante em relação às outras proteínas presentes no fluido periplásmico também extraídas durante o choque osmótico.

4.1.3. Confirmação da pureza e identidade do pico de IFN α -2a periplásmico

Para confirmar a pureza e a identidade do pico de IFN α -2a mostrado na Figura 5-c (pico #6), foram coletados os picos principais presentes nos cromatogramas. As coletas foram analisadas em SDS-PAGE e correspondente Western Blotting (Figura 6).

Figura 6: SDS-PAGE (a) e Western-blotting (b), em condições não-redutoras, de picos relevantes presentes nos cromatogramas típicos de RP-HPLC. Amostras aplicadas: M = Marcador de massa molecular; S = IFN α -2b EP (1 μ g); 1 a 6 = picos mostrados na Figura 5 (20 μ l).

Como no SDS-PAGE ocorre a separação das proteínas por bandas de acordo com seu tamanho, a observação de poucas bandas é um bom indicativo da pureza das amostras.

O resultado mais importante mostrado da Figura 6 é a presença de apenas uma banda na corrida 6 do SDS-PAGE. Isso indica a presença de apenas um único tipo de proteína na posição correspondente ao tempo de retenção de 24,27 min (Figura 5-c), pico de eluição do IFN presente no fluido periplásmico, demonstrando a pureza do IFN coletado.

Além disso, é possível confirmar a identidade do IFN produzido no sistema de expressão descrito por Arthuso (2015) através da comparação do seu peso molecular com o padrão CRS, além da sua atividade imunológica específica observada no Western Blotting (Figura 6-b).

Nos poços 2, 3, 4 e 5 da Figura 6-a, observam-se proteínas periplásmicas de peso molecular elevado. De acordo com os cromatogramas, as proteínas presentes no fluido proveniente do choque osmótico possuem hidrofobicidade próxima à do IFN. Ainda assim, confirmou-se que a técnica é capaz de isolar o IFN, validando sua quantificação pelo método proposto.

4.1.4. Linearidade

O ensaio de linearidade foi executado a partir de uma diluição seriada do IFN α -2b EP em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4. As massas de IFN aplicadas, assim como as áreas obtidas, são mostradas na Tabela 2. O volume aplicado em todos os pontos foi constante e igual a 10 μ L. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Tabela 2: Massa de interferon e área do pico obtidas para cada ponto do ensaio de linearidade

Massa de Interferon (μ g)	Área do pico (AU) ¹	RSD %
0,00	1,16 $\pm$ 0,08	6,97
0,62	494,64 $\pm$ 4,56	0,92
1,25	962,05 $\pm$ 3,08	0,32
2,50	2031,58 $\pm$ 7,80	0,38
5,00	4069,17 $\pm$ 5,05	0,12
10,0	7500,65 $\pm$ 245	3,27

¹ Unidades de área expressa em Média $\pm$ SD

RSD = desvio padrão relativo

Os dados da Tabela 2 foram utilizados para construir o gráfico da área dos picos vs. massa de interferon aplicada (Figura 7). A partir do mesmo, foi calculada a linearidade dos dados através do coeficiente de correlação, obtido pela regressão linear por meio do software Graphpad Prism versão 5.0. Como se observa na Figura 7, o coeficiente de correlação assumiu o valor de 0,998 ($p < 0,0001$), validando o método quanto à linearidade, no intervalo de massa aplicada de 0,62 a 10 μ g de IFN.

Figura 7: Curva padrão para determinação de Interferon $\alpha 2$ por RP-HPLC.

4.1.5. Sensibilidade

Para determinar a sensibilidade teórica do método, foi utilizada a formulação de Rodbard (1978):

O limite de quantificação (LOQ) do método foi calculado baseado no desvio padrão da menor dose aplicada na curva de calibração (0,625 μg) e o da dose zero usando o teste *t one sided* ($P=0,05$), de acordo com as Equações 3 e 4.

$$y_{\min} = y_0 + ts_p \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}} \quad (3)$$

$$s_p = \sqrt{\frac{s_0^2(n_0 - 1) + s_1^2(n_1 - 1)}{n_0 + n_1 - 2}} \quad (4)$$

Onde $Y_{\min}$ = mínima resposta detectável (área do pico); Y_0 = Resposta da dose zero; s_0 = desvio padrão da dose zero; n_1 = número de replicatas da menor dose; s_1 = desvio padrão da menor dose; t = valor tabelado do teste *t* de Student.

A menor dose foi de 0,625 μg , e a dose zero foi a solução tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0. A dose mínima detectável ($X_{\min}$) foi então calculada a partir da

equação da curva de calibração (Figura 4). O mínimo detectável teórico foi de 7,5 ng. Experimentalmente, o limite mínimo de quantificação foi de 0,3 µg (Desvio padrão relativo = 5 %, n = 3).

4.1.6. Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado pela adição de quantidades definidas de IFNα-2b EP ao fluido obtido do choque osmótico da cepa W3110 não-transformada. A partir disso, as amostras foram analisadas, e foi definido o percentual de recuperação como a relação entre o valor de IFN determinado pela técnica e o valor nominal de IFN aplicado, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Ensaio de recuperação de quantidades conhecidas de IFNα-2b EP adicionadas ao fluido periplásmico obtido por choque osmótico da cepa *E. coli* W3110 não-transformada

Massa IFN (ug)	Massa determinada de IFN (ug)	% Recuperação
1,25	1,17	93,9
2,50	2,58	103,2
5,00	5,22	104,4
10,0	9,81	98,1
Média ± SD		99,9 ± 8,57

Dessa forma, o valor de percentual de recuperação da técnica (99,9 %) foi definido como a média da recuperação dos quatro pontos avaliados.

4.1.7. Precisão (Ensaio Inter-dia e Intra-dia)

Para verificar a precisão da técnica, foram feitos os ensaios Intra-dia e Inter-dia. Para tanto, foram utilizadas duas amostras: a amostra #1, um choque osmótico realizado em um cultivo de *E. coli* W3110 transformada com o vetor λPL-DsbA-IFNα-2a, e a amostra #2, correspondente a amostra #1 com adição de aproximadamente 0,3 µg do IFNα-2b EP por 100 µL de amostra. O volume de amostra aplicado por análise nesse ensaio foi de 100 µL. Na Tabela 4, são mostrados os valores de massa

de IFN determinados nos ensaios intra-dia e inter-dia, assim como os respectivos desvios-padrão.

Tabela 4: Determinações intra-dia e inter-dia de IFN α -2 por RP-HPLC

Amostra	Massa de IFN ^a (μ g)	
	Intra-dia	Inter-dia
1	1,07 $\pm$ 0,54 %	1,08 $\pm$ 0,92 %
2	4,50 $\pm$ 1,99 %	4,70 $\pm$ 3,32 %

^a Média $\pm$ Desvio Padrão Relativo, n = 3.

Naturalmente, ao comparar o desvio padrão relativo (%) dos ensaios inter-dia e intra-dia, percebe-se que há uma menor variabilidade relativa dos valores das quantificações quando as mesmas são feitas no mesmo dia. Além disso, pode-se observar a alta reprodutibilidade das análises, mesmo quando realizadas em dias diferentes.

4.1.8. Especificidade e identificação de isoformas

A técnica também foi validada em relação à especificidade. O objetivo foi mostrar que, com o método desenvolvido, é possível identificar diferenças estruturais no IFN analisado, as quais podem ser justificadas pelo sistema de expressão no qual foram produzidos, ou até mesmo pelas condições de estoque que favoreçam a degradação do produto. São mostrados, na Figura 8, os cromatogramas obtidos na análise de um produto comercial de IFN α -2a, de IFN α -2a glicosilado e de IFN α -2a expresso no citoplasma de *E. coli*. Além disso, baseado em Silva *et al.*, (2009), foi executado um protocolo para oxidar o IFN- α , o qual consiste na adição de H₂O₂ 30 % a uma solução 1 mg/mL do IFN α -2b EP, na proporção de 2:3. A reação foi incubada por 1 h a temperatura ambiente, e então o produto foi analisado no HPLC.

Figura 8: Cromatogramas de RP-HPLC analisando algumas preparações com diferentes isoformas de interferon. A quantidade de proteína aplicada (2,5 µg) foi baseada no valor nominal. (a) Roferon® A, (b) IFNα-2a glicosilado, (c) IFNα-2a expresso em *E. coli*, com N-metionina na porção N-terminal (Met-IFN), e (d) IFNα-2b EP oxidado. As setas indicam o tempo de retenção do IFNα-2b EP (24,74 min).

O cromatograma da Figura 8-a reitera o resultado observado anteriormente de que a hidrofobicidade entre IFNα-2a e IFNα-2b são tão próximas que este método analítico não diferencia essas amostras.

Os Interferons α2 naturais humanos possuem apenas um sítio de glicosilação, que é do tipo O-linked. A glicosilação ocorre de maneira heterogênea na Treonina-106 (ADOLF et al., 1991). Ou seja, esses sítios são preenchidos com diferentes O-glicanos, o que pode resultar em moléculas de IFN com diferentes hidrofobicidades. Na Figura 8-b, onde é mostrado o cromatograma da análise do IFNα-2a glicosilado, pode-se observar a presença de vários picos, que podem indicar a presença de várias isoformas de IFN devido à sua glicosilação heterogênea. Uma observação importante é que nenhum pico no cromatograma do IFN glicosilado apresenta tempo de retenção correspondente ao do padrão (indicado na seta).

Na Figura 8-c, o cromatograma mostra apenas um pico principal. Além disso, observa-se que o Met-IFN produzido em *E. coli* possui hidrofobicidade bem menor que o padrão CRS. Isso se justifica pela presença de uma metionina na porção N-terminal, característica de proteínas recombinantes expressas no citoplasma de *E. coli*. O sistema de expressão construído no nosso laboratório possibilita a adição de um peptídeo sinal no IFN, o qual é responsável pelo transporte da proteína do citoplasma, onde ocorre a tradução, para o periplasma. Nesse processo de transporte, enzimas específicas atuam na retirada do peptídeo sinal, o que inclui também a retirada da metionina da porção N-terminal. Por esse motivo, o IFN expresso no espaço periplásmico tem estrutura mais próxima do IFN produzido no corpo humano, e possui mesmo tempo de retenção que os Interferons do padrão CRS e do Roferon[®] A (biofármaco comercial).

Por fim, a Figura 8-d mostra a capacidade da técnica de identificar a presença da isoforma oxidada de IFN. Essas isoformas podem surgir devido a alterações na molécula original decorrentes das condições de armazenamento, de produção ou de purificação. Dessa forma, o fato do método detectar a formação de isoformas oxidadas de IFN o torna mais versátil e útil no monitoramento do processo de produção e purificação, assim como no controle de qualidade do biofármaco.

4.1.9. Comparação da quantificação em RP-HPLC e HPLC por Exclusão Molecular

Neste estudo, foram comparadas quantificações por RP-HPLC com quantificações realizadas por HPLC de exclusão molecular. Foram analisadas três preparações puras de interferon: IFN α -2b EP, IFN α -2b glicosilado (Sigma-Aldrich) e IFN α -2a EP. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Determinação de IFN α -2 por RP-HPLC em comparação com HPSEC

	Massa (ug)		
	Valor Nominal (μ g)	RP-HPLC	HPSEC
IFN α -2b EP	2,50	2,50	2,48
IFN α -2b Glicosilado (Sigma-Aldrich)	2,50	2,68	2,53
IFN α -2a EP	7,50	8,79	10,39

A quantificação do IFN α -2b EP e do IFN α -2b glicosilado apresentaram erro menor que 8 % em relação ao valor nominal. Para o padrão IFN α -2a, houve um erro maior tanto na RP-HPLC quanto no HPLC de Exclusão Molecular.

4.2. ESTUDO DA MELHOR TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DE INTERFERON- α 2a

Com o intuito de observar a melhor temperatura de expressão de interferon, na Figura 9, é mostrada a variação dos níveis de expressão de IFN em função da temperatura na qual o cultivo foi realizado.

Figura 9: Dependência das produções (a) específica e (b) volumétrica em função da temperatura de expressão de Interferon- α 2a. As barras representam o desvio padrão. (*) = P < 0,05 e (**) = P < 0,005. (para cada temperatura, n = 2)

A produção específica reflete a quantidade de IFN produzido por bactéria. Dessa forma, a Figura 9-a mostra como a quantidade de IFN contido no fluido periplásmico varia com a temperatura de cultivo. Para as temperaturas de 30 e 32 °C, a quantidade de IFN no fluido periplásmico é significativamente menor.

A produção volumétrica, por sua vez, relaciona diretamente a quantidade de IFN obtido pelo volume de meio utilizado no cultivo. Novamente, neste caso, é possível verificar que, para as temperaturas de 30 e 32 °C, a produtividade é significativamente menor (Figura 9-b). Além disso, a Figura 9 também evidencia que, para as temperaturas maiores ou iguais a 35 °C, não há diferença estatisticamente significativa tanto em relação à produção específica quanto volumétrica.

Outra discussão pertinente é a relação do aumento da temperatura de produção e a degradação do produto, ou até mesmo a formação de outras proteínas em decorrência do metabolismo do hospedeiro. Na Figura 10, são mostrados cromatogramas referentes ao produto do choque osmótico realizado em cultivos a 32 °C, 35 °C e 37 °C. É possível observar que, com o aumento da temperatura de cultivo, aumentam ou surgem novos picos, mais evidentes no cromatograma da análise do produto de choque osmótico do cultivo realizado a 37 °C, em comparação com as análises do produto do choque osmótico de cultivos realizados a temperaturas inferiores. É possível observar também, na figura 10-c, a presença de um pico à esquerda do pico de IFN, em posição similar à posição de formas oxidadas, observada na Figura 8-d. A presença do pico de formas oxidadas pode ser um indício de que temperaturas de cultivo acima de 35 °C podem levar à degradação do interferon.

Figura 10: Cromatogramas por RP-HPLC do produto de choque osmótico de cultivos realizados a: (a) 32 °C, (b) 35 °C e (c) 37 °C. A seta indica o tempo de retenção do IFN α -2b EP

Dessa forma, considerando os resultados mostrados na Figura 10 e resultados anteriores do nosso grupo que relacionam o aumento da temperatura do cultivo com a degradação de proteínas recombinantes (MENEZES et al., 2017;

SOARES et al., 2008; SUZUKI et al., 2012), para os estudos seguintes de purificação, optou-se por utilizar a temperatura de cultivo de 35 °C, a qual, nestas condições estudadas, resultou em uma produção específica de $1,04 \pm 13 \text{ \% } \mu\text{g/ml/A}_{600}$.

4.3. PRODUÇÃO DE IFN EM ESCALA LABORATORIAL

A produção de IFN em escala laboratorial, a partir de cultivo em erlenmeyer, foi submetida à metodologia do choque osmótico e, em seguida, analisada em RP-HPLC. Na Figura 11, é mostrado o cromatograma da análise. A produção específica e a produção volumétrica foram de, respectivamente, $1,04 \mu\text{g/mL/A}_{600}$ e $3,45 \text{ mg/L}$.

Figura 11: Cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico utilizado na purificação por troca iônica/fase reversa. A seta indica o tempo de retenção do IFN α -2b EP.

4.4. PURIFICAÇÃO

No desenvolvimento da metodologia de purificação, foram avaliados dois processos de purificação. O primeiro foi composto de uma etapa de troca iônica seguida de uma etapa de fase reversa, e o segundo de uma etapa de troca iônica seguida de uma etapa de exclusão molecular.

4.4.1. Purificação por cromatografia de troca iônica / cromatografia em fase reversa

É mostrado na Figura 11 o cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico, obtido através de cultivo em erlenmeyer, utilizado nesta purificação. O total de IFN quantificado na amostra foi de 13,8 mg, na concentração de 98,6 µg/mL.

4.4.1.1. Primeira etapa: Cromatografia de troca iônica

Na primeira etapa, o método de purificação foi baseado no descrito por Srivastava *et al.* (2005), com algumas modificações. O fluxo de entrada da amostra e dos tampões A e B foi de 2 mL/min. Após a entrada da amostra, foi feito um step a 0 % de B por 2 volumes de coluna. Em seguida, foi feito outro step a 2 % de B por 5 volumes de coluna. A etapa seguinte foi um step de 10 % de B, por 10 volumes de coluna. Em seguida, foi feito um step de 50 % de B por 5 volumes de coluna. Ao final, foi feito um step a 100 % de B, por 5 volumes de coluna.

Na Figura 12, são mostrados os principais resultados da primeira etapa da purificação por troca iônica / fase reversa. Na Figura 12-a, pode-se observar o pico de IFN hachurado, o qual foi eluído a 10 % de B. A análise do pico por SDS-PAGE e dot-blot, mostrado nas Figuras 12-b e 12-c, confirmam a presença de IFN, além de outras formas de alto peso molecular, em grande quantidade, como produto dessa etapa de purificação. A análise em RP-HPLC do produto desta primeira etapa (Figura 12-d) sugere a grande quantidade de proteínas menos hidrofóbicas que o IFN, mesmo após a primeira etapa de purificação.

Figura 12: Purificação por troca iônica / fase reversa: Etapa de troca iônica. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise em gel SDS-PAGE do produto da primeira etapa de purificação (M= marcador de peso molecular, P = IFN α -2b EP, 1 μ g; 1 = Produto da primeira etapa de purificação (pico 4), 7 μ L), (c) análise de dot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e w: referente aos picos do cromatograma da purificação. w = não retido da coluna de troca iônica.), (d) cromatograma analítico por RP-HPLC do produto da primeira etapa da purificação (volume aplicado: 50 μ L. A seta indica o tempo de retenção do padrão da análise).

4.4.1.2. Segunda etapa: Cromatografia em fase reversa

Na etapa de purificação por fase reversa, partiu-se do produto da primeira etapa. A amostra a ser purificada foi concentrada 2,5 vezes, resultando em um volume de 10 mL. Na Figura 13-a, é mostrado o cromatograma do padrão, utilizado como indicativo do tempo de retenção do IFN na amostra a ser purificada. Na Figura 13-b, o pico hachurado foi coletado e analisado por HPLC de exclusão molecular, cujo cromatograma é mostrado na Figura 13-c. Por meio da análise quantitativa utilizando a análise de HPLC de exclusão molecular, foi possível verificar que, ao final do processo de purificação, apenas 700 µg de IFN foram recuperados. Dessa forma, optou-se por mudar a estratégia de purificação, utilizando, como primeira etapa, uma cromatografia de troca iônica, seguido de uma cromatografia de exclusão molecular.

Figura 13: Purificação por troca iônica / fase reversa: Etapa de fase reversa. Cromatogramas de (a) IFN α -2b EP e (b) purificação em coluna semi-preparativa de fase reversa (volume de aplicação: 10 mL). (c) Cromatograma analítico por HPLC de exclusão molecular do produto da etapa de purificação por fase reversa (volume aplicado: 100 μ L). A seta preta indica o tempo de retenção do IFN α -2b EP analisado no mesmo dia.

4.4.2. Cromatografia de troca iônica / cromatografia de exclusão molecular

Na Figura 14, é mostrado o cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico, obtido por meio de cultivo em erlenmeyer, utilizado nesta purificação. O total de IFN quantificado na amostra foi de 12,85 mg, na concentração de 91,8 $\mu\text{g/mL}$, para um total de 10 L de cultivo. A segunda etapa de purificação, cromatografia em fase reversa, foi substituída por uma etapa de cromatografia de exclusão molecular. Além disso, o método da cromatografia de troca iônica foi otimizado, a fim de aumentar a eficiência dessa primeira etapa da purificação.

Figura 14: Cromatograma de RP-HPLC do produto de choque osmótico utilizado na purificação por troca iônica/exclusão molecular.

4.4.2.1. Primeira etapa: Cromatografia de troca iônica

Na primeira etapa, o fluxo de entrada da amostra e dos tampões A e B foi de 2 mL/min. Após a entrada da amostra, foi feito um step a 0 % de B por 2 volumes de coluna. Em seguida, foi feito outro step a 2 % de B por 6 volumes de coluna. A etapa seguinte foi um gradiente de 2 a 10 % de B, por 15 volumes de coluna. Ao final, foi feito um step a 100 % de B, por 5 volumes de coluna.

Na Figura 15-a, é mostrado o cromatograma da purificação por troca iônica. O pico 6, que de acordo com a Figura 15-b, possui IFN, teve pureza analisada por HPLC de exclusão molecular (Figura 15-c). A partir disso, foi calculada a pureza, relacionando a área do pico de IFN com a área dos picos de outras moléculas. Nessa etapa, a pureza foi de 86 %. Além disso, de acordo com a Figura 15-d, onde é mostrada a análise em RP-HPLC do produto da etapa de purificação por troca iônica, não foi observada a presença de formas oxidadas de IFN.

Figura 15: Purificação por troca iônica / exclusão molecular: Etapa de troca iônica. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise de slot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e w: referente aos picos do cromatograma da purificação), (c) e (d) análise de pureza do produto da etapa de purificação por troca iônica por HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e por RP-HPLC, respectivamente. Volume aplicado: 50 μ L (A seta preta indica o tempo de retenção de IFN α -2b EP analisado no mesmo dia).

4.4.2.2. Segunda etapa: Cromatografia de exclusão molecular

Na Figura 16-a, é mostrado o cromatograma da purificação por cromatografia de exclusão molecular. O pico 2, que de acordo com a Figura 16-b, possui IFN, teve pureza analisada por HPLC de exclusão molecular (Figura 16-c). A partir disso, foi calculada a pureza, relacionando a área do pico de IFN com a área dos picos de outras moléculas. Nessa etapa, a pureza foi de 95,3 %. Além disso, de acordo com a Figura 16-d, onde é mostrada a análise em RP-HPLC do produto da etapa de purificação por troca iônica, não foi observada a presença de formas oxidadas de IFN.

Figura 16: Purificação por troca iônica / exclusão molecular: Etapa de exclusão molecular. (a) Cromatograma da purificação, (b) análise de slot blot (volume aplicado: 0,01 % do volume total do pico coletado, 1, 2, 3, 4, 5, 6: referente aos picos do cromatograma da purificação. S = IFN α -2b EP, 150 ng), (c) e (d) análise de pureza do produto da etapa de purificação por exclusão molecular por HPSEC e por RP-HPLC, respectivamente. Volume aplicado: 50 μ L. (As setas indicam o tempo de retenção do padrão da análise).

A fim de evidenciar a purificação em cada etapa do processo, foi realizada uma análise em SDS-PAGE com amostras do fluido periplásmico, do material não retido e do material eluído na etapa de troca iônica, assim como do produto final da purificação, obtido da etapa de exclusão molecular (Figura 17).

Figura 17: SDS-PAGE das principais etapas do processo de purificação. M = marcador de peso molecular; C = fluido periplásmico (15 μ L); P = IFN α -2b EP (1 μ g); 1 = material não retido da etapa de cromatografia de troca iônica (150 μ L); 2 = produto da cromatografia de troca iônica (30 μ L); 3 = produto final obtido da cromatografia de exclusão molecular (1 μ L).

As principais informações sobre os rendimentos do processo de purificação de IFN periplásmico proposto são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo das etapas do processo de purificação

Amostra	Volume inicial (mL)	IFN injetado (mg)	Volume recuperado (mL)	IFN recuperado (mg)	Pureza (%)	Recuperação em massa (%)
Produto do choque osmótico^a	-	-	240	27,5	4,1	100
Produto da cromatografia de troca iônica^b	130	12,85	60	9,93	86	77
Produto da concentração^b	30	4,96	5	4,96	86	100
Produto da cromatografia de exclusão molecular^b	5	4,96	20	4,20	95,3	85
RECUPERAÇÃO TOTAL						66

^aPureza calculada a partir do valor de proteína total, medido por espectrofotômetro em 280nm (NanoDrop), e da quantificação de IFN por meio de RP-HPLC.

^bPureza obtida por HPLC de exclusão molecular.

De acordo com a Tabela 6, o rendimento do processo de purificação foi de 66 %, considerando o rendimento individual das duas etapas. O produto final apresentou pureza de 95,3 %, com concentração de 0,211 µg/µL.

O fator de purificação, calculado pela relação entre a pureza da amostra bruta e a pureza ao final do processo (LIN et al., 2013), foi de 23,2.

4.5. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO PRODUTO PURIFICADO

Na Figura 18, é mostrado o espectro de massas referente à análise do IFN purificado. O valor de massa obtido foi de 19239 Da, o qual, quando comparado com a massa do IFN α -2a no banco de dados DrugBank (Ref # DB00034), representa um erro de 0,01 %.

Figura 18: Análise por espectrometria de massas do IFN purificado.

5. DISCUSSÃO

5.1. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE RP-HPLC PARA ANÁLISE DE IFN α -2

Uma técnica analítica por RP-HPLC para avaliação qualitativa e quantitativa de IFN α -2 diretamente do extrato do choque osmótico foi validada quanto à linearidade, sensibilidade, precisão, recuperação e especificidade.

Na análise por SDS-PAGE dos picos obtidos do fluido periplásmico após análise por RP-HPLC (Figura 6), é possível observar que o pico correspondente ao IFN tem alto grau de pureza. Isso sugere a possível utilização da técnica para a purificação de IFN em pequena escala. Porém, é necessário considerar o pH do eluente, que tem valor em torno de 2, podendo resultar em degradação e perda da atividade biológica do IFN.

A curva padrão do método foi realizada utilizando massas de 0,625 a 10 μ g de IFN (Figura 7). Considerando que o limite mínimo de quantificação do método foi de 0,3 μ g, é seguro afirmar que a técnica de RP-HPLC foi validada para a análise de amostras com 0,3 a 10 μ g de IFN.

Nos ensaios intra-dia e inter-dia, foi confirmada uma menor variação do desvio padrão relativo (%) dos valores das quantificações quando feitas no mesmo dia. Além disso, pode-se observar a alta reprodutibilidade das análises, mesmo quando realizadas em dias diferentes. Nota-se também que, na análise da amostra mais concentrada, houve maior variação do valor de IFN quantificado, quando comparados os valores intra-dia e inter-dia. Essa variação, que corresponde a um desvio padrão relativo de 3 %, contra 0,7 % no caso da amostra menos concentrada, sugere que a diminuição da precisão da técnica de acordo com o aumento da massa analisada é uma tendência, para massas a partir de 1 μ g.

São descritas na literatura diversas técnicas de análise de IFN a partir de amostras puras, preparações farmacêuticas, e até mesmo de amostras de soro (CUETO-ROJAS et al., 2010; EL GHAZALY et al., 2013; SILVA et al., 2009; ZARRIN et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2013). Porém, ainda não foi descrita uma técnica de RP-HPLC para análise qualitativa e quantitativa de IFN α -2 diretamente do fluido periplásmico. Dessa forma, a técnica proposta tem como principal inovação a

possibilidade de aplicação direta no monitoramento da produção de IFN, de forma rápida e precisa.

A estrutura bastante semelhante do IFN α -2a e IFN α -2b teoricamente confere a essas duas moléculas hidrofobicidade muito próxima. No entanto, a análise desses compostos em uma mesma técnica cromatográfica de fase reversa nunca foi reportada. No método cromatográfico validado, considerando os tempos de retenção obtidos nos ensaios, é possível observar, na prática, o quanto moléculas de IFN α -2a e IFN α -2b são equivalentes, em termo de hidrofobicidade (Figura 4). Também é possível observar que a simples inclusão de uma metionina no N-terminal da cadeia peptídica do IFN α -2a provoca uma mudança significativa na hidrofobicidade da molécula, sugerindo uma alta sensibilidade da técnica em relação à detecção de formas alteradas de IFN (Figura 8-c). A influência da metionina no N-terminal da cadeia polipeptídica na hidrofobicidade de proteínas recombinantes também foi constatada por Riggin, Dorulla e Miner (1987). Nesse trabalho, foi relatada uma diferença significativa na hidrofobicidade entre o hormônio de crescimento humano natural e o recombinante com metionina no N-terminal (Met-hGH) por meio de uma técnica de análise de HPLC em fase reversa.

A aplicação de técnicas analíticas na detecção de formas oxidadas é uma ferramenta importante no controle de qualidade, na avaliação de processos de produção e de purificação e no estudo de estabilidade de biofármacos. Silva *et al.* (2009) desenvolveram uma técnica de RP-HPLC capaz de identificar e quantificar formas oxidadas de IFN α -2a (Figura 8-d). No entanto, ainda não foram descritas técnicas para a detecção de IFN α -2b oxidado. O método de RP-HPLC proposto também foi validado para análise qualitativa e quantitativa de formas oxidadas tanto de IFN α -2a quanto de IFN α -2b.

Mais uma aplicação comprovada da técnica validada é a detecção de formas glicosiladas de IFN (Figura 8-b). A glicosilação de biofármacos pode ser um fator importante em relação à atividade biológica, ao custo de produção e à estabilidade do produto. Além disso, a ativação da resposta imune na utilização de biofármacos é diretamente ligada à glicosilação desses bioprodutos. Dessa forma, a utilização de técnicas analíticas na caracterização do IFN glicosilado é essencial no desenvolvimento de novos produtos.

Na comparação da quantificação realizada pela técnica de RP-HPLC com a quantificação obtida em HPLC de exclusão molecular (Tabela 5), foi possível observar

uma diferença menor que 8 % em relação ao valor nominal das amostras de IFN α -2b. Na análise do IFN α -2a, foram observados valores maiores em relação ao valor nominal, tanto em relação à quantificação em RP-HPLC quanto em HPLC de exclusão molecular. Ainda assim, o valor obtido pela quantificação em RP-HPLC foi mais próximo do valor nominal da amostra, sinalizando alta exatidão da técnica de RP-HPLC.

5.2. DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE IFN EM ESCALA LABORATORIAL

São poucos os trabalhos que descrevem o uso de promotores constitutivos para expressão de proteínas heterólogas em bactérias, e menos ainda os que utilizam o promotor λ P_L (MENART et al., 2003; VALDEZ-CRUZ et al., 2010). Considerando o uso desse promotor, com expressão periplásmica, os trabalhos se restringem basicamente ao nosso grupo de pesquisa (MENEZES et al., 2017; SOARES et al., 2008; SUZUKI et al., 2012). O repressor, derivado do gene *cl857*, presente no plasmídio pRK248clts, é uma proteína termo-sensível que, na temperatura de 42 °C, é inativada, permitindo a ativação do promotor λ P_L. Observou-se que, mesmo na ausência do repressor, a expressão da proteína heteróloga ainda é fortemente influenciada pela temperatura de cultivo.

No estudo da temperatura ótima de expressão de IFN, foi observado que, a 35 °C, há um aumento significativo na produção específica e na produção volumétrica em relação às temperaturas de 30 e 32 °C. No entanto, quando os níveis de expressão a 35 °C são comparados com os de temperaturas mais elevadas, não se observa aumento significativo na produção específica nem da produção volumétrica.

Arthuso (2015) relatou que, para a expressão de hPRL utilizando sistema de expressão constitutivo em *E. coli* W3110, com promotor λ P_L e expressão no periplasma, a maior produção específica foi observada a 35 °C. Em temperaturas superiores, foi observada a redução da produção específica. O mesmo foi observado por Soares *et al.* (2008) para produção de hPRL, utilizando o mesmo sistema de expressão, em biorreator STR. De acordo com Lowman e Bina (1990), os níveis da proteína recombinante acumulada podem ser resultado do equilíbrio entre a taxa de síntese proteica e a taxa de degradação. Dessa forma, foi realizado o estudo de degradação da hPRL por meio de ensaios de western blotting do lisado de células

cultivadas a temperaturas de 30 °C a 37 °C. Confirmou-se que temperaturas de produção superiores a 35 °C favorecem a degradação da hPRL, diminuindo a produção específica (SOARES et al., 2008). No caso da expressão do IFN, os efeitos negativos de temperaturas acima de 37 °C ficam evidentes tanto pela análise da Figura 9, na qual se observa quedas na produção volumétrica, quanto pela Figura 10, onde observa-se o aumento de picos não desejáveis presentes no cromatograma correspondente à análise do fluido periplásmico derivado do cultivo a 37 °C. Assim, visando minimizar a degradação e a possível produção de formas alteradas de IFN optou-se por realizar a produção de IFN na temperatura de 35 °C.

Jung (2006) reportou a produção de IFN em regime contínuo, com expressão em citoplasma. Para tanto, foi utilizado um sistema de expressão cujo repressor era desativado pelo esgotamento de L-triptofan do meio. A produção volumétrica obtida foi cerca de 39 mg/L. Srivastava *et al.* (2005) também utilizaram sistema de expressão em citoplasma, em biorreator em regime *fed-batch*, com repressor termo-sensível. A produção volumétrica alcançada foi de 5,2 g/L. Pontos em comum nos trabalhos desses autores são: a alta produção volumétrica, comparada com sistemas de expressão no periplasma; a necessidade de realizar uma reação enzimática para a retirada da metionina do N-terminal da cadeia de aminoácidos do IFN recombinante; e a necessidade de solubilização da proteína de interesse. Em sistemas de expressão no periplasma, a proteína recombinante extraída não possui a metionina no N-terminal e se encontra na forma solúvel. Isso significa a redução de duas etapas no processo de obtenção do biofármaco, a qual reflete diretamente no custo de produção.

Tan *et al.* (2011) e Tan *et al.* (2013) desenvolveram um processo de produção de IFN recombinante utilizando sistema de expressão em *E. coli*, no periplasma, com ativação por meio da adição de IPTG. Foi utilizada uma resina de troca iônica para remoção de acetato durante o cultivo. O melhor resultado de produção volumétrica do grupo foi de 867,4 µg/L, quando foi utilizada a resina de troca iônica acondicionada a um leito acoplado ao biorreator STR.

No presente trabalho, o processo de produção de IFN consistiu na utilização de erlenmeyers de 1 L contendo 400 mL de cultivo. Foi alcançado o maior valor de produção volumétrica já reportada para expressão de IFN α -2 periplásmico (3,45 mg/L).

Considerando-se a experiência do Grupo de Hormônios do IPEN na produção de proteínas recombinantes em biorreator (DALMORA et al., 1997; SOARES et al.,

2008; UEDA; GOUT; MORGANTI, 2001), a continuação dos estudos de *scale-up* do processo de produção de IFN desenvolvido neste trabalho podem gerar importantes resultados em trabalhos futuros.

5.3. PURIFICAÇÃO

No desenvolvimento do método de purificação, inicialmente pensou-se na utilização de uma etapa de cromatografia de troca iônica seguida de uma etapa de cromatografia em fase reversa. A ideia da utilização da cromatografia em fase reversa na purificação surgiu a partir da construção do método de análise em RP-HPLC do IFN diretamente do fluido periplásmico. Nesse método de análise desenvolvido, foi observada a alta pureza do pico de IFN (Figura 6-a). Dessa forma, como segunda fase de purificação, tentou-se utilizar uma coluna semi-preparativa com resina de fase reversa, com fluxo de 2,5 mL/min, nas mesmas condições do método de análise de IFN. No entanto, a recuperação foi baixa (cerca de 5 %), e decidiu-se substituir a segunda etapa da purificação por uma cromatografia de exclusão molecular. O motivo dessa escolha foi baseado na presença de proteínas de alta massa molecular no produto da etapa de purificação por troca iônica, o que pode ser observado na Figura 12-b.

Na segunda tentativa de desenvolvimento do processo de purificação, além da troca da segunda etapa, optou-se por otimizar as condições cromatográficas da etapa de troca iônica. Essa otimização ocorreu pela substituição do step de 10 % de solução B, que tinha a duração de 10 volumes de coluna, por um gradiente de 2 a 10 % de solução B, com duração de 15 volumes de coluna. Como resultado dessa alteração, ao comparar a Figura 12-d e a Figura 15-d, observa-se a eliminação de picos de proteínas menos hidrofóbicas que o IFN nos cromatogramas de RP-HPLC.

Além disso, na primeira tentativa de desenvolvimento do processo de purificação, no produto da etapa de troca iônica, a quantificação de IFN por RP-HPLC foi de 16 mg. Considerando que a quantidade inicial de IFN na amostra bruta era de apenas 13,8 mg, o aumento da massa de IFN quantificada por RP-HPLC pode ser um indício de agregação do produto. O mesmo não foi observado na segunda tentativa de desenvolvimento do processo de purificação. De acordo com Braun *et al.* (1997), agregados presentes em formulações farmacêuticas de IFN são fatores que

influenciam na indução de resposta imunológica. Dessa forma, a formação de agregados no processo de purificação é um fenômeno que deve ser minimizado.

Como resultado, foi descrito um método de purificação de IFN α -2a periplásmico com rendimento de 66 %, pureza final de 95 %, fator de purificação de 23,2. Uma outra vantagem desse método é a facilidade de aumento de escala, já que essa estratégia de purificação pode ser aplicada para volumes maiores de fluido periplásmico, obtidos, por exemplo, a partir cultivo em biorreatores.

Na literatura, alguns métodos de purificação de IFN em pequena escala são relatados, para um produto com massa final da ordem de 10 μ g (CAO et al., 2006; DOĞAN et al., 2012). Srivastava et al. (2005) descreveram uma técnica de purificação de IFN α -2b utilizando uma etapa de purificação preliminar dos corpos de inclusão, seguido de uma etapa de purificação cromatográfica por troca iônica, resultando em 3 g de IFN, a uma pureza de 99 %.

Para a purificação parcial de IFN α -2 periplásmico expresso em *E. coli*, Lin et al. (2013) propuseram um método não-cromatográfico. O fator de purificação foi de 12,8. No processo de purificação desenvolvido neste trabalho, considerando apenas a primeira etapa, tem-se um fator de purificação de 21. Dessa forma, conclui-se que só essa etapa de purificação, por troca iônica, é cerca de duas vezes mais eficiente que o método completo proposto por LIN et al. (2013).

O método de purificação proposto foi de grande importância para o desenvolvimento do processo de obtenção de IFN α -2a desenvolvido neste trabalho, visto que ainda não havia sido descrita na literatura técnica de purificação de IFN α -2a ou IFN α -2b com alta pureza a partir do fluido periplásmico bacteriano extraído por choque osmótico.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DO IFN PRODUZIDO

O IFN produzido por meio do sistema de expressão constitutivo em *E. coli* W3110 utilizando o plasmídeo λ PL-DsbA-IFN α -2a foi caracterizado por análise em SDS-PAGE, western blotting, espectrometria de massas, HPLC de exclusão molecular e HPLC em fase reversa.

A medida da massa molecular foi inicialmente baseada no gel de SDS-PAGE (Figura 6-a), por comparação com as bandas do IFN α -2b EP e da coleta do

cromatograma referente ao pico de IFN produzido. Uma análise mais precisa foi realizada por espectrometria de massas do produto purificado, a qual confirmou a identidade e a integridade do IFN α -2a produzido. A caracterização imunológica, representada na Figura 6-b, também confirmou a identidade do produto.

7. CONCLUSÕES

- A identidade do IFN produzido por meio do sistema de expressão proposto por Arthuso (2015) foi confirmada por meio de análise em SDS-PAGE, western blotting, espectrometria de massas, HPLC de exclusão molecular e HPLC em fase reversa;
- Foi validada uma técnica de RP-HPLC para análise qualitativa e quantitativa de IFN α -2a e IFN α -2b presente no fluido periplásmico; A metodologia padronizada possibilita identificar e quantificar isoformas de IFN α 2 oxidadas, glicosiladas e contendo metionina na posição N-terminal.
- A temperatura mais indicada para a produção de IFN α -2a utilizando o sistema de expressão periplásmico com o promotor λ P_L constitutivo é 35 °C; com expressão de 1,04 μ g/ml/A₆₀₀.
- Foi desenvolvido um método de purificação de prático escalonamento para o IFN α -2a a partir do extrato bruto obtido por choque osmótico (fluido periplásmico bacteriano). Foram obtidos rendimento de 66 % e pureza final de 95,3 %.
- Foi otimizada uma técnica de HPLC de exclusão molecular para determinar a quantidade e qualidade do interferon em amostras puras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLF, G. R.; KALSNER, I.; AHORN, H.; MAURER-FOGY, I.; CANTELLT, K. Natural human interferon- α 2 is O-glycosylated. **Biochemistry Journal**, v. 276, p. 511–518, 1991.
- AGGARWAL, S. What ' s fueling the biotech engine — 2007. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1227–1234, 2014.
- ANVISA. **PREÇOS MÁXIMOS DE MEDICAMENTOS POR PRINCÍPIO ATIVO**. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/2829072/LISTA+CONFORMIDADE_2016-10-20.pdf/d266d644-2452-4620-8ffc-2d77470023cd>.
- ARDUINI, R. M.; LI, Z.; RAPOZA, A.; GRONKE, R.; HESS, D. M.; WEN, D.; MIATKOWSKI, K.; COOTS, C.; KAFFASHAN, A.; VISEUX, N.; DELANEY, J.; DOMON, B.; YOUNG, C. N.; BOYNTON, R.; CHEN, L. L.; CHEN, L.; BETZENHAUSER, M.; MILLER, S.; GILL, A.; PEPINSKY, R. B.; HOCHMAN, P. S.; BAKER, D. P. Expression, purification, and characterization of rat interferon- β , and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters. **Protein Expression and Purification**, v. 34, n. 2, p. 229–242, 2004.
- ARTHUSO, F. S. **Influência da temperatura de cultivo na expressão de proteínas recombinantes de interesse terapêutico no espaço periplásmico bacteriano, utilizando o promotor lambda PL**. [s.l.] University of São Paulo, 2015.
- BIS, R. L.; STAUFFER, T. M.; SINGH, S. M.; LAVOIE, T. B.; MALLELA, K. M. G. High yield soluble bacterial expression and streamlined purification of recombinant human interferon ??-2a. **Protein Expression and Purification**, v. 99, n. May, p. 138–146, 2014.
- BRAUN, A.; KWEE, L.; LABOW, M. A.; ALSENZ, J. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 10, p. 1472–1478, out. 1997.
- BURLAKOVSKIY, M. S.; YEMELYANOV, V. V.; LUTOVA, L. A. Plant Based Bioreactors of Recombinant Cytokines (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 121–137, 2016.
- CAO, Y.; BAI, G.; CHEN, J.; TIAN, W.; WANG, S.; YANG, W. Preparation and characterization of magnetic microspheres for the purification of interferon alpha-2b. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 833, n. 2, p. 236–44, 2006.
- CARSON, M. Ribbons 2.0. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 5, p. 958–961, 1991.

- CEAGLIO, N.; GUGLIOTTA, A.; BELÉN, M.; CRAVERO, D.; ETCHEVERRIGARAY, M.; KRATJE, R.; OGGERO, M. Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG α -subunit. **Journal of Biotechnology**, v. 221, p. 13–24, 2016.
- CUETO-ROJAS, H. F.; PÉREZ, N. O.; PÉREZ-SÁNCHEZ, G.; OCAMPO-JUÁREZ, I.; MEDINA-RIVERO, E. Interferon-alpha 2b quantification in inclusion bodies using Reversed Phase-Ultra Performance Liquid Chromatography (RP-UPLC). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 13–14, p. 1019–1023, 2010.
- DALMORA, S.; DE OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 782, n. 2, p. 199–210, 1997.
- DOĞAN, A.; ÖZKARA, S.; SARI, M. M.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 893–894, p. 69–76, 2012.
- EL GHAZALY, M.; MEAGER, A.; ZIKRY, H.; EBAED, M.; SHAKER, S.; MUELLER, F.; ROHDE, J. Quantification of a pegylated interferon-alpha2a product by a customised and validated reverse phase-high performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 48–52, 2013.
- GLUE, P.; FANG, J. W. S.; ROUZIER-PANIS, R.; RAFFANEL, C.; SABO, R.; GUPTA, S. K.; SALFI, M.; JACOBS, S. Pegylated interferon- α 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 5, p. 556–567, 2000.
- GULL, I.; SAMRA, Z. Q.; ASLAM, M. S.; ATHAR, M. A. Heterologous expression, immunochemical and computational analysis of recombinant human interferon alpha 2b. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 264, 2013.
- HUANG, C. J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 3, p. 383–399, 2012.
- JOHNSTON, M. J. W.; FRAHM, G.; LI, X.; DUROCHER, Y.; HEFFORD, M. A. O-linked glycosylation leads to decreased thermal stability of interferon alpha 2b as measured by two orthogonal techniques. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 7, p. 1661–1667, 2011.
- JUNG, K. H. Continuous production of recombinant interferon-alpha in *Escherichia coli* via the derepression of trp promoter using casamino acid. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 809–814, 2006.

- KHAN, M. A.; HASSAN, N.; AHMAD, N.; KHAN, M. I.; ZAFAR, A. U.; KHAN, F.; HUSNAIN, T.; HASSAN, N. Studies to analyse the relationship between IFN α 2b gene dosage and its expression, using a *Pichia pastoris*-based expression system. **Yeast**, v. 31, p. 13–28, 2014.
- KLAUS, W.; GSELL, B.; LABHARDT, A. M.; WIPF, B.; SENN, H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 661–675, 1997.
- KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell**, v. 20, n. 3, p. 749–760, 1980.
- KUMAR, V.; SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. In situ precipitation and vacuum drying of interferon alpha-2a: Development of a single-step process for obtaining dry, stable protein formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 88–98, 2009.
- LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2014.
- LIN, Y. K.; OOI, C. W.; TAN, J. S.; SHOW, P. L.; ARIFF, A.; LING, T. C. Recovery of human interferon alpha-2b from recombinant *Escherichia coli* using alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 362–366, 2013.
- LINDENMANN, J. . From Interference to Interferon : A Brief Historical Introduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 299, n. 1094, p. 3–6, 1982.
- LOWMAN, H. B.; BINA, M. Temperature-mediated regulation and downstream inducible selection for controlling gene expression from the bacteriophage λ pL promoter. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 133–136, 1990.
- MENART, V.; JEVSEVAR, S.; VILAR, M.; TROBIS, A.; PAVKO, A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR, PL promoters from phage lambda. **Biotechnol Bioeng**, v. 83, 2003.
- MENEZES, A. C. S. C.; SUZUKI, M. F.; OLIVEIRA, J. E.; RIBELA, M. T. C. P.; FURIGO, I. C.; DONATO, J.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. J. Expression, purification and characterization of the authentic form of human growth hormone receptor antagonist G120R-hGH obtained in *Escherichia coli* periplasmic space. **Protein Expression and Purification**, v. 131, p. 91–100, 2017.
- MOHAMMED, Y.; EL-BAKY, N. A.; REDWAN, E. M. Characterization of Recombinant Human Consensus Interferon- Alpha in *Escherichia Coli* under λ P L Promoter. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 426–447, 2012.
- NEVES, F. O.; HO, P. L.; RAW, I.; PEREIRA, C. A.; MOREIRA, C.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 35, n. 2, p. 353–359, 2004.

- NISHIMIYA, D. Proteins improving recombinant antibody production in mammalian cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1031–1042, 2014.
- OLIVEIRA, J. E.; DE 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. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 787, n. 2, p. 345–355, 2003.
- PESTKA, S. The Human Interferons -From Protein Purification and Sequence to Cloning and Expression in Bacteria: Before, Between and Beyond. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 221, n. 1, p. 1–38, 1983.
- PFEFFER, L. M. Biologic activities of natural and synthetic type I interferons. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 3, p. 63–69, 1997.
- RAMANAN, R. N.; TAN, J. S.; MOHAMED, M. S.; LING, T. C.; TEY, B. T.; ARIFF, A. B. Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- γ 2b from *Escherichia coli* using response surface method. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 196–202, 2010.
- RIGGIN, R. M.; DORULLA, G. K.; MINER, D. J. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Analytical Biochemistry**, v. 167, n. 1, p. 199–209, 1987.
- RUIZ, L.; REYES, N.; DUANY, L.; FRANCO, A.; AROCHE, K.; RANDO, E. H. Long-term stabilization of recombinant human interferon γ 2b in aqueous solution without serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, n. 1–2, p. 57–72, 2003.
- SHIROKOV, D. A.; RYABICHENKO, V. V.; AKISHINA, R. I.; OSPELNIKOVA, T. P.; GLAZUNOV, A. V.; CHESTUKHINA, G. G.; VEIKO, V. P. Development of hybrid human interferon alfa-2 strain-producers and the use of enteropeptidase for production of N-terminal methionine-free interferons. **Molecular Biology**, v. 45, n. 3, p. 466–471, 2011.
- SILVA, L. M.; SOUTO, R. B.; SANGOI, M. S.; ALCORTE, M. D.; DALMORA, S. L. Validation of an RP-LC method for the determination of interferon- α 2a in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 32, n. 3, p. 370–382, 2009.
- SILVA, M. M. C. G.; LAMARRE, B.; CERASOLI, E.; RAKOWSKA, P.; HILLS, A.; BAILEY, M. J. A.; WHEELER, J. X.; BURNS, C. J.; GAINES-DAS, R. E.; JONES, C.; ROBINSON, C. J. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals : Interferon alfa-2 case study. **Biologicals**, v. 36, n. 6, p. 383–392, 2008.
- SOARES, C. R. J.; GOMIDE, F. I. C.; UEDA, E. K. M.; BARTOLINI, P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification. **Protein engineering**, v. 16, n. 12, p. 1131–8, dez. 2003.

- SOARES, C. R. J.; UEDA, E. K. M.; OLIVEIRA, T. L.; GOMIDE, F. I. C.; HELLER, S. R.; BARTOLINI, P. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: Temperature plays a major role in protein yields. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 27–35, 2008.
- SOARES, C. R.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J. H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 32 (Pt 2), p. 127–35, 2000.
- SRIVASTAVA, P.; BHATTACHARAYA, P.; PANDEY, G.; MUKHERJEE, K. J. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 2, p. 313–322, 2005.
- STAEHELIN, T.; STÄHLI, C.; HOBBS, D. S.; PESTKA, S. A rapid quantitative assay of high sensitivity for human leukocyte interferon with monoclonal antibodies. **Methods in Enzymology**, v. 79, p. 589–595, 1981.
- SUZUKI, M. F.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, J. E.; OLIVEIRA, N. A. J.; GOULART, H. 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, n. 3, p. 178–85, jan. 2012.
- TAN, J. S.; LING, T. C.; MUSTAFA, S.; TAM, Y. J.; RAMANAN, R. N.; ARIFF, A. B. An integrated bioreactor-expanded bed adsorption system for the removal of acetate to enhance the production of alpha-interferon-2b by Escherichia coli. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 551–558, 2013.
- TAN, J. S.; RAMANAN, R. N.; LING, T. C.; SHUHAIMI, M.; ARIFF, A. B. Enhanced production of periplasmic interferon alpha-2b by Escherichia coli using ion-exchange resin for in situ removal of acetate in the culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, n. 1, p. 124–132, 2011.
- THITINAN, S.; MCCONVILLE, J. T. Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, n. 1–2, p. 121–135, 2009.
- UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic Escherichia coli extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 922, n. 1–2, p. 165–175, 2001.
- VALDEZ-CRUZ, N. A.; CASPETA, L.; PÉREZ, N. O.; RAMÍREZ, O. T.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A. Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 18, 2010.
- VALENTE, C. A.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S.; MONTEIRO, G. A. Translational features of human alpha 2b interferon production in Escherichia coli. **Applied and**

environmental microbiology, v. 70, n. 8, p. 5033–6, 1 ago. 2004.

WETZEL, R. Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon. **Nature**, v. 289, n. 5798, p. 606–607, 1981.

ZARRIN, A.; FOROOZESH, M.; HAMIDI, M.; MOHAMMADI-SAMANI, S. A simple and rapid HPLC method for quantitation of interferon-alpha2b in dosage forms and delivery systems.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, v. 833, n. 2, p. 199–203, 2006.

ZIMMERMANN, E. S.; SILVA, L. M.; CALEGARI, G. Z.; STAMM, F. P.; SOUTO, R. B.; DALMORA, S. L. Development and Validation of a Stability-Indicating Size-Indicating Size-Exclusion LC Method for the Determination of rhIFN-a2a in Pharmaceutical Formulations.

Journal of AOAC International, v. 96, n. 2, p. 7, 2013.