AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Estudo dos perfis de N-glicosilação da prolactina recombinante humana
expressa em células humanas hek293**

FELIPE DOUGLAS SILVA

**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

2018

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Estudo dos perfis de N-glicosilação da prolactina recombinante humana
expressa em células humanas hek293**

FELIPE DOUGLAS SILVA

**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

2018

“Não foi fácil sintetizar, Clark. Levei anos... e custou uma fortuna.

Por sorte... eu tinha as duas coisas”

Frase de Bruce Wayne (o Batman) para o Superman antes de derrotá-lo

(The Dark knight, Livro 4 de 4, 1986)

Dedico este Trabalho

Aos meus pais, Maria José da Silva Maciel e José Luiz Neto Silva, que sempre estiveram do meu lado e nunca desistiram de mim. Eu amo vocês!!

À minha tia, Maria Aparecida da Silva Maciel, pelo amor e companheirismo!!

À minha avó Salete Maciel da Silva e a memória da minha avó Maria Ferreira da Silva, sem a base de vocês eu nunca estaria aqui. Meu eterno obrigado!

À minha mainha Maria Ivanete Barros, pelos puxões de orelha e o amor de sempre!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, a quem devo a oportunidade de desenvolver esse trabalho, fora claro, a orientação e amizade construída durante esse tempo de mestrado! Obrigado!

À Dra. Miriam Fussae Suzuki, minha orientadora do coração e mãe científica, obrigado por todo o ensinamento, momentos de descontração e pela amizade, você marcou sem dúvidas esse momento ímpar da minha vida. Meu eterno obrigado.

Ao Dr. e parceiro João Oliveira Ezequiel (Johnny), que sempre esteve apto a me ensinar e ajudar, fora todos os momentos de purificação e, claro aos momentos de descontração (aquele brinde com uma cachacinha). Obrigado mesmo.

Ao Prof. Dr. Patrick, pela amizade e sem dúvida pelos conhecimentos passados sempre que foi possível!! Obrigado.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pelas horas dedicadas a me ensinar toda a importância dos N-glicanos, e a oportunidade única de trabalhar ao seu lado na construção de um artigo. Obrigado!

À Prof. Dra. Cibele Nunes Peroni, pelas conversas sempre descontraídas e claro a amizade e estímulos durante essa fase.

Ao meu amigo e IC, Renan Passos Freire, tu és um orgulho para mim, e foi uma das maiores satisfações conhecer um guri com tanto entusiasmo!!! Continue assim!! Sempre que precisar e só chamar.

Aos companheiros de grupo, Thais Sevilhano e Gustavo Jesus, pelo carinho e companheirismo que criamos no decorrer desses mais de 2 anos. Vocês me fizeram uma pessoa melhor e agradeço sempre pela grande amizade formada!!

À amiga e companheira Evelin Caroline, sem você não haveria tantos momentos bons para recordar. Obrigado por sempre estar ao meu lado e pela ajuda na dissertação desse trabalho. Levarei sempre comigo todo o companheirismo, amor, carinho e os momentos de gargalhadas que só você proporcionou. Te amo!

Ao meu grande amigo David, parceiro de mestrado, confiante de todas as possíveis histórias, e que eu tive a honra de ser convidado para o seu casamento. Obrigado e só desejo tudo de bom pra ti!

Ao meu amigo e agora Mestre Julian, que me proporcionou uma grande amizade de irmão, obrigado!!

Ao parceiro José Pedro Prezzoto Neto (Podé), pelas conversas, desabafos e amizade. Você se tornou um grande amigo!! VLW mesmo!

Aos colegas de grupo, Alissandra Moura, Enio e Carol. Obrigado!

Ao meu amigo, José Maria, pelas risadas e presença marcante nesse período tão importante da minha vida! Saudades Zé!

À Sâmara Kyara, pelo amor, amizade e carinho e por ter participado do começo dessa história. Obrigado por sempre estar ao meu lado e me incentivando.

Aos companheiros que passaram pela minha vida nesses dois anos de CB, Fernanda Arthuso (Fehhh), Bruna Fernandes, Tamara, Marcela, Eliza Higuti, Eliana Lima, Renata Damiani, Flávia Valgode (Tampiane), Patricia, Victor, Thomaz, Josias (Jojo), Carlus, Lina, Uanda, Eduardo e Alexandre.

Aos amigos, Profa. Dra. Regina Affonso, Prof. Dr. Daniel Perez, Profa. Dr. Tereza Ribela e Dra. Rosa Maria, pelos incentivos e por sempre ter ajudado quando precisei, obrigado!

Às amigas, Arlete Correia, Rute Batista e Neide Mascarenhas que sempre estiveram presentes e pelo incentivo e puxões de orelha!! Obrigado.

Ao corpo técnico, Antônio Junqueira e Rosângela.

Às pessoas que de alguma forma contribuíram para o resultado desse trabalho, Fernanda Albuquerque, Tácia Albuquerque, Soraya Pinheiro e Anny Buarque. Obrigado!!

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

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro e técnico, sem os quais não seria possível o termino desse trabalho.

ESTUDO DOS PERFIS DE N-GLICOSILAÇÃO DA PROLACTINA RECOMBINANTE HUMANA EXPRESSA EM CÉLULAS HUMANAS HEK293

FELIPE DOUGLAS SILVA

RESUMO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio sintetizado pela hipófise com inúmeras funções tais como: lactação, reprodução e regulação osmótica. Este hormônio é frequentemente dosado em casos de problemas na lactação, infertilidade, além de estudos que elucidam sua ligação em alguns tipos de câncer (mama, próstata e útero). A hPRL é encontrada na forma não glicosilada (NG-hPRL) (23 kDa) e glicosilada (G-hPRL) (25 kDa), sendo a isoforma glicosilada um modelo ideal de análise de perfil de N-glicanos, já que possui um único sítio de glicosilação localizado na Asparagina 31. A glicosilação está relacionada diretamente à solubilidade, à estabilidade, ao enovelamento, à meia-vida e atividade biológica *in vivo*. As células de ovário de hamster chinês (CHO) e as células embrionárias de rim humano (HEK293) são os hospedeiros mais utilizados para expressão de proteínas recombinantes, já que podem ser cultivadas em altas densidades e por possuírem similaridade nas modificações pós-traducionais. O objetivo foi expressar, purificar e realizar uma caracterização físico-química e biológica da hPRL glicosilada de células HEK293, incluindo análise da estrutura de carboidratos. Para tanto, foi realizada uma transfecção em células HEK293T (aderidas) com o vetor pcDNA 3.4-TOPO. Foi obtida uma expressão de $21,26 \pm 8,3$ µg/mL de hPRL no meio condicionado sem soro. A hPRL foi purificada por cromatografia de afinidade a metais imobilizados (IMAC), eluindo 92% da hPRL em uma única fração que, analisada por HPSEC, apresentou pureza de 97%. O perfil de N-glicanos da amostra apresentou seis espécies, todas com terminação em ácido-siálico, do tipo complexo, sendo bi, tri e tetra-antenárias, com relativa predominância da espécie N2G2S1 (29,4%). A bioatividade *in vitro* da G-hPRL HEK293 demonstrou ser $\cong 16$ vezes menor que a G-hPRL produzida em células CHO.

STUDY OF N-GLYCOSYLATE PROFILES OF HUMAN RECOMBINANT PROLACTIN EXPRESSED IN HUMAN CELLS HEK293

FELIPE DOUGLAS SILVA

ABSTRACT

Human prolactin (hPRL) is a hormone synthesized by the pituitary gland with innumerable functions such as lactation, reproduction and osmotic regulation. This hormone is often determined in cases of lactation problems, infertility, and studies that elucidate its connection in some types of cancer (breast, prostate and uterus). The hPRL is found in the non-glycosylated (NG-hPRL) (23 kDa) and glycosylated (G-hPRL) (25 kDa) form, being the glycosylated isoform an ideal model for N-glycan profile analysis, since it has a single glycosylation site located in Asparagine 31. Glycosylation is directly related to solubility, stability, folding, half-life and biological activity *in vivo*. Chinese hamster ovary (CHO) cells and human embryonic kidney (HEK293) cells are the most widely used hosts for expression of recombinant proteins, since they can be grown at high densities and have similarity in post-translational modifications. The objective of this work was to express, purify and perform a physicochemical and biological characterization of the glycosylated hPRL from HEK293 cells, including analysis of the carbohydrate structure. For this purpose, a transfection was performed on HEK293T (adhered) cells with the 3.4-TOPO pcDNA vector. Expression of 21.26 ± 8.3 $\mu\text{g/mL}$ hPRL in the serum free conditioned medium was obtained. The hPRL was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), eluting 92% of the hPRL in a single fraction which analyzed by HPSEC, showed 97% purity. The N-glycans profile of the sample showed six species, all with sialic acid termination, complex type, being bi, tri and tetra antennary, with a relative predominance of N2G2S1 (29.4%). *In vitro* bioactivity of G-hPRL HEK293 demonstrated to be $\cong$ 16-fold lower than G-hPRL produced in CHO cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Prolactina humana	1
1.2 Glicosilação.....	4
1.3 Expressão da Prolactina humana em células de mamíferos.....	8
1.4 Transfecção transiente.....	9
1.5 Células de rim de embrião humano – HEK293.....	10
2 OBJETIVO	12
2.1 Objetivos específicos:.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Obtenção e amplificação dos vetores de expressão.....	13
3.2 Transformação das células competentes pelo método do choque térmico	14
3.3 Seleção dos clones positivos	15
3.4 Transfecção das células HEK293	15
3.5.1 Transfecção das células aderidas com os vetores pEDdc-hPRL, p658-hPRL e pcDNA 3.4-TOPO-hPRL, mediante Lipofectamine®	16
3.5.2 Transfecção das células aderidas com vetor pcDNA 3.4-TOPO usando polímero o Xfect® e com adição dos <i>Enhancers</i> 1 e 2	16
3.5.3 Transfecção das células em suspensão com ExpiFectamine®	17
3.5.4 Delineamento experimental das transfecções	19
3.5 Caracterização físico-química.....	20
3.5.1 SDS-PAGE.....	20
3.5.1.1 Revelação com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> G-250	20
3.5.1.2 Revelação com nitrato de prata.....	21
3.5.2 Western Blotting (WB)	21
3.5.3 Quantificação por técnica de imunoensaio ELISA.....	22
3.5.4 Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.....	22
3.6 Purificação da hPRL	23
3.6.1 Coluna de resina de troca catiônica SP Sepharose Fast Flow (SP-FF)	23
3.6.2 Coluna cromatográfica de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	24
3.6.3 Purificação por RP-HPLC.....	24
3.7 Análise de carboidratos por espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	25
3.8 Bioensaio com células Ba/F3-LLP	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Comparação do nível de expressão dos três plasmídeos em HEK293.....	27

4.2 Purificação por cromatografia de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow.....	29
4.3 Produção em células HEK293T aderidas utilizando polímeros Xfect® com vetor pcDNA 3.4-TOPO e <i>Enhancer</i> 1 e 2.....	30
4.4 Produção em suspensão utilizando o kit <i>Expi293® Expression System</i> e purificação parcial por SP-Sepharose Fast Flow	31
4.5 Purificação por cromatografia de troca catiônica de hPRL produzida em células HEK293F em suspensão, após dialise por sistema de filtração tangencial Labscale TFF System	36
4.6 Purificação por cromatografia de afinidade a metal (IMAC) da hPRL produzida em células HEK293T aderidas	39
4.7 Caracterização da G-hPRL e NG-hPRL	45
4.7.1 Análise por HPLC	45
4.7.2 Separação da G-hPRL por RP-HPLC para estudo de bioatividade	46
4.7.3 Atividade Biológica.....	48
4.7.3 Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL produzida em HEK293T.....	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prolactina humana

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio sintetizado e secretado pelas células lactotróficas da hipófise anterior, sendo conhecida principalmente pela ação lactogênica e pelo crescimento e diferenciação da glândula mamária. Contudo, a ela são atribuídos mais de 300 processos fisiológicos que incluem: a osmorregulação, a modificação do comportamento, o crescimento e maturação de oócitos, a reprodução e a imunorregulação e ainda, a nível celular, atividades mitogênica, morfogênica ou secretória (BEN-JONATHAN *et al.*, 1996, BOLEFEYSOT *et al.*, 1998, BERNICHTEIN *et al.*, 2010). Este hormônio, de importante aplicação diagnóstica, é frequentemente dosado no sangue nos casos de mulheres com problemas de lactação, infertilidade, distúrbios menstruais, hipogonadismo, galactorréia e redução da libido (GLEZER *et al.*, 2006). No entanto, a hPRL, mesmo sem aplicação terapêutica estabelecida, é uma proteína com relevância na área da pesquisa de expressão de proteínas recombinantes em diferentes hospedeiros como mostrado na Tabela 1. Possuindo um alto valor agregado como produto biotecnológico, dependendo da origem e pureza. Como exemplo podemos citar o valor de cerca de R\$ 85.740,00/mg, quando expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*) (>97% grau de pureza) e R\$ 35.920,00/mg, quando expressa em células de rim de embrião humano (HEK293) (≥ 95% grau de pureza) (SIGMA-ALDRICH COMPANY, 2017).

Tabela 1: Histórico na literatura sobre a síntese e formas de expressão da hPRL

Autor	Origem/ Hospedeiro	Método para obtenção de hPRL
HWANG <i>et al.</i> , (1972; 1973; 1975); ROOS <i>et al.</i> , (1979); HODGKINSON <i>et al.</i> , (1981); ELECTRICWALA (1994)	Glândula pituitária	Purificação de extratos pituitários
PARIS <i>et al.</i> , (1990);	<i>E. coli</i>	Síntese de hPRL na forma de corpos de inclusão.
HIRAOKA <i>et al.</i> , (1991); GILBERT <i>et al.</i> , (1991)		Expressão de hPRL como proteína de fusão com a proteína A e β -Galactosidase
MORGANTI <i>et al.</i> , (1996; 1998)		Expressão periplásmica de hPRL com cauda de histidina e periplásmica de hPRL autêntica;
UEDA <i>et al.</i> , (2001)		Expressão periplásmica de hPRL
PRICE <i>et al.</i> , (1995)	Células de Mamíferos	Expressão de hPRL em células C 127
CHEN <i>et al.</i> , (1995)		Expressão de hPRL em β TC-3
SOARES <i>et al.</i> , (2000)		Expressão de hPRL em células CHO (Aderidas)
SOARES <i>et al.</i> , (2006)		Expressão de antagonistas de hPRL em células CHO (Aderidas)
GOULART <i>et al.</i> , (2010)		Expressão de hPRL em células CHO tratadas com Butirato de Sódio (Suspensão)
HELLER <i>et al.</i> , (2010)		Caracterização e expressão de hPRL (Aderida)
ARTHUSO <i>et al.</i> , (2012)		Expressão de hPRL em células CHO (Aderidas e suspensão)
CAPONE <i>et al.</i> , (2015)		Expressão de G-hPRL em células CHO (Suspensão)
DAS <i>et al.</i> , (2000)	Inseto	Expressão de hPRL em células de inseto

A molécula de hPRL mais comum possui peso molecular de 23 kDa e apresenta 199 aminoácidos em sua composição, contendo 6 cisteínas que formam três pontes dissulfeto (4-11, 58-174, 191-199) (SINHA, 1995). Foi descoberto, entretanto, que a hPRL possui um expressivo polimorfismo molecular, resultado de modificações pré e pós-traducionais (LEWIS *et al.*, 1984; SINHA, 1995). A diversidade na atividade biológica, pode ser atribuída aos processos de modificação, gerando várias isoformas (formas clivadas, glicosiladas, fosforiladas, desamidadas, sulfatadas, dimerizadas ou

oligoméricas) e a processos proteolíticos específicos, que promovem alterações na massa molecular, bem como na carga (SINHA, 1995; BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998). São relatadas duas isoformas principais de hPRL: a isoforma de 23 kDa não glicosilada (NG-hPRL) e a de 25 kDa glicosilada (G-hPRL) (PRICE *et al.*, 1995; HELLER *et al.*, 2010; CAPONE *et al.*, 2015). Diversos trabalhos descrevem a avaliação da bioatividade (potência) da prolactina através de bioensaios específicos, como os que utilizam as células de linfoma de rato Nb2 e as células pro-B de camundongos (Ba/F3-LLP) (GOUT *et al.*, 1980; GOFFIN *et al.*, 1996; BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; GOFFIN *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000; GLEZER *et al.*, 2003). O bioensaio com células Nb2 é o mais conhecido. Essa linhagem depende da presença da prolactina (ou hormônios lactogênicos) para sobreviver e a sua proliferação é diretamente proporcional à concentração da hPRL que interage com os receptores murinos, naturalmente presentes nessa linhagem celular (GOUT *et al.*, 1980). Outro bioensaio, também baseado na proliferação celular, utiliza a linhagem Ba/F3-LLP que foi modificada geneticamente para expressar o receptor de prolactina humano, sendo, portanto, um ensaio mais específico para a hPRL, e que apresenta sensibilidade similar ao do ensaio com células Nb2 (GLEZER *et al.*, 2003). O grupo de Hormônios do Centro de Biotecnologia, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é um dos poucos a realizar estudos comparativos avaliando a potência da G-hPRL e NG-hPRL recombinante (CHO) e da prolactina natural humana extraída da hipófise, confirmando que a isoforma G-hPRL possui potência cerca de 4 vezes menor que a NG-hPRL (SOARES *et al.*, 2000; GLEZER *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2010; CAPONE *et al.*, 2015).

1.2 Glicosilação

O processo de glicosilação de proteínas é um dos mais importantes e o mais comum entre as possíveis modificações pós-traducionais, sendo responsável por uma variedade de funções celulares e também distúrbios fisiológicos referentes à deficiência na glicosilação de proteínas (PETRESCU *et al.*, 2004; BARONE *et al.*, 2008; TIAN e ZHANG, 2010; FOGLI *et al.*, 2012; LOSFELD *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2012). Comumente, esse processo ocorre por meio da transferência de uma cadeia oligossacarídica à proteína, contudo, a ocupação do sítio de glicosilação determinará a sua atividade biológica (THOTAKURA *et al.*, 1991; SZKUDLINSKI *et al.*, 1993; DAMIANI *et al.*, 2009; CAPONE *et al.*, 2015; RIBELA *et al.*, 2017). A cadeia de oligossacarídeos pode estar ligada em duas regiões distintas, o que subdivide a glicosilação em N-glicosilação (ligação covalente a uma asparagina determinado pela sequência Asn-X-Ser/Thr, sendo que X não pode ser uma prolina) e O-glicosilação (ligação covalente a uma serina ou treonina (GOOCHEE *et al.*, 1991; PETRESCU *et al.*, 2004; TIAN e ZHANG, 2010).

No caso da N-glicosilação o sítio específico da proteína, também chamado de *sequon*, receberá o núcleo pentassacarídico formado por dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man) como mostrado na Figura 1. A construção da cadeia de N-glicanos inclui múltiplas etapas, inicia-se no retículo endoplasmático, pela formação de dolicol fosfato (lipídio de cadeia longa), a base no qual o núcleo pentassacarídico será construído e processado até ser transferido para a proteína (BUTLER, 2006; BARONE *et al.*, 2008).

Figura 1: Núcleo pentassacarídico de um N-glicano. Esquema da estrutura base dos N-glicanos. (Man = manose; GlcNAc = N-acetilglucosamina)

Fonte: HEBERT *et al.*, 2014

No retículo endoplasmático ocorrem consecutivas reações de adição de monômeros glicosídicos, realizadas pelas enzimas glicosiltransferases (manosídes e glicosídes), que acoplam 6 resíduos de manoses e 3 resíduos de glicoses ao núcleo pentassacarídico, formando assim o precursor dos N-glicanos demonstrado na Figura 2.

Figura 2: Tetradecaoligossacarídeo triantenário. Esquema do precursor de N-glicanos ligada ao sequon (Asn- X- Ser/Thr). (Asn = Asparagina; Ser = Serina; Thr = Treonina)

Fonte: adaptado de FERRIS *et al.*, 2014

Após a formação do precursor dos N-glicanos, a enzima oligossacariltransferase atua transferindo a cadeia de oligossacarídeos do Dolicol fosfato para o *sequon* da proteína (ROTH, 2002; BUTLER, 2006). Os 3 resíduos de glicose e 4 resíduos de manose são retirados do N-glicano precursor por exoglicosidases e então o processamento dos oligossacarídeos é passado para o complexo de Golgi, onde a estrutura do N-glicano sofrerá diversas reações, entre elas a retirada de manoses e adição de dois resíduos de N-acetilglucosamina, seguidas de possíveis transferências de resíduos de galactose, fucose e ácido siálico (Figura 3).

Figura 3: Esquema representativo da síntese de N-glicanos. O precursor dos N-glicanos sendo transferido para a proteína e sofrendo diversas modificações até o N-glicano final

Fonte: ROTH, 2002

Devido à complexidade do processo e à diversidade das reações de adição e remoção de monômeros, o N-glicano final pode não ser totalmente completo, ocasionando a criação de diferentes formas ou tipos de antenas (Figura 4).

Figura 4: Tipos de N-glicanos. Esquema dos três tipos gerais de N-glicanos ligados ao sequon (Asn- X – Ser/Thr).

Fonte: STANLEY *et al.*, 2017

A maior parte das proteínas recombinantes de interesse farmacêutico é glicosilada e possui, portanto, um ou mais sítios de potencial glicosilação, nem sempre ocupados (SZKUDLINSKI *et al.*, 1993; PERONI *et al.*, 2002; BARONE *et al.*, 2008; DAMIANI *et al.*, 2009). A importância da fração de carboidratos de uma glicoproteína já é amplamente conhecida, estando a porção glicídica diretamente ligada à solubilidade, à estabilidade, ao enovelamento, à meia-vida e atividade biológica *in vivo* e, portanto, afetando significativamente a farmacocinética e a resposta imunológica da mesma proteína (SINHA, 1995; SOARES *et al.*, 2000). Além disso, estudos sobre a desordem congênita da glicosilação (CDG – *congenital disorders of glycosylation*) demonstram a

relevância dessa área de pesquisa. A CDG consiste de um grupo heterogêneo de doenças geneticamente autossômicas recessivas, causadas por defeitos enzimáticos na síntese (CDG tipo 1) e/ou processamento (CDG tipo 2) de N-glicanos. (PETRESCU *et al.*, 2004; BARONE *et al.*, 2008; TIAN e ZHANG, 2010; FOGLI *et al.*, 2012; LOSFELD *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2012, FERRIS *et al.*, 2014; HEBERT *et al.*, 2014).

1.3 Expressão da Prolactina humana em células de mamíferos

O Grupo de Hormônios Hipofisários do Centro de Biotecnologia do IPEN possui uma larga experiência na expressão, purificação e caracterização da prolactina recombinante humana (MORGANTI *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; 2006, HELLER *et al.*, 2010, ARTHUSO *et al.*, 2012, CAPONE *et al.*, 2015). Esse grupo desenvolveu uma linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) geneticamente modificada, capaz de sintetizar a prolactina humana (hPRL) (SOARES *et al.*, 2000). Nesse trabalho foi utilizado o vetor de expressão dicistrônico pEDdc-hPRL, gerando clones com altos níveis de expressão, após seleção e amplificação com metotrexato (MTX).

Recentemente o mesmo grupo de pesquisa realizou a caracterização da estrutura oligossacarídica da prolactina glicosilada humana (G-hPRL), recombinante e nativa, demonstrando que existem diferenças importantes entre os produtos sintéticos usados como biofármacos e os produtos naturais humanos (CAPONE *et al.*, 2015).

As células CHO apresentam uma série de vantagens: são consideradas geneticamente estáveis, os produtos sintetizados nessas células possuem um alto grau de similaridade com os equivalentes naturais e podem proporcionar altos níveis de produção. Contudo, existem modificações pós-traducionais realizadas na glicoproteína nativa humana que não ocorrem nas células CHO devido à falta de enzimas específicas. Por exemplo, enzimas que atuam na ligação de resíduos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) (N-acetilgalactosamina transferase) ou para sulfatação do resíduo de GalNAc (Sulfatotransferase) (DAMIANI *et al.*, 2009; CAPONE *et al.*, 2015; RIBELA *et al.*, 2017).

As células hospedeiras de mamífero mais amplamente utilizadas na produção de proteínas recombinantes são as células CHO, embora existam alternativas como as células de mieloma de camundongo (NS0), rim de hamster bebê (BHK) e alternativas celulares humanas, como as células de rim de embrião humano (HEK293) ou de retina (PERC6) (BUTLER, 2005).

Sendo assim, o emprego de uma linhagem celular humana seria mais apropriado para avaliação da glicosilação da hPRL e de outras glicoproteínas de interesse farmacêutico, possibilitando ainda a comparação dos glicanos assim obtidos com aqueles provenientes da própria hipófise humana e de outras linhagens de células de mamíferos.

1.4 Transfecção transiente

A transfecção transiente consiste na introdução de plasmídeos (contendo o gene de interesse) em células de diferentes hospedeiros, sem que ocorra a integração do material genético heterólogo ao DNA nuclear do hospedeiro (RECILLAS-TARGA, 2006). Essa forma de transfecção usada originalmente para análise e estudo da interação e expressão de diferentes vetores com a células de interesse, bem como etapa de triagem de vetores, é fundamental para determinação do plasmídeo com a melhor expressão. Atualmente, a transfecção transiente também está sendo utilizada para produção de proteínas recombinantes (JAIN *et al.*, 2017, SANT'ANA *et al.*, 2018). Em contraste com a transfecção permanente, na qual os genes são inseridos no genoma do hospedeiro e, portanto, com expressão da proteína de interesse de forma estável e contínua, os genes transfectados de forma transiente são expressos apenas por períodos limitados, sendo sua eficiência reduzida por fatores como divisão celular e/ou estresse ambiental (KIM e ELBERWINE, 2010).

Entre os métodos de transfecção transiente utilizados, o químico é o mais empregado atualmente (KIM e ELBERWINE, 2010; JAIN *et al.*, 2017; SANT'ANA *et al.*, 2018). Esses métodos, geralmente, utilizam polímeros catiônicos (SCHENBORN E GOIFFON, 2000); fosfato de cálcio; ou lipídio catiônico, o método mais comum (CUI *et al.*, 2012). A forma de interação dessas substâncias

é semelhante, sendo que o agente transfectante, com carga positiva, engloba o plasmídeo de carga negativa e forma complexos: agente transfectante (+)/plasmídeo (-), assim os complexos são atraídos para a membrana celular negativamente carregada e passam através da mesma (FELGNER E RINGOLD, 1989; HOLMEN *et al.*, 1995; SCHENBORN E GOIFFON, 2000; WASHBOURNE e MCALLISTER, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014).

1.5 Células de rim de embrião humano – HEK293

A linhagem de células humanas HEK293 (Figura 5) tem sido amplamente utilizada como ferramenta para a expressão de proteínas recombinantes, pois a sua maquinaria bioquímica, além de ser altamente eficiente, é capaz de realizar o processamento pós-traducional necessário para a produção de proteínas funcionais humanas (THOMAS e SMART, 2005). Apresenta 64 cromossomos (hipotriplóide) e tempo de duplicação de aproximadamente 34 horas (<http://www.hek293.com/cell-subculture-protocol/>). A linhagem HEK293T é cultivada aderida e a HEK293F em suspensão.

Figura 5: Foto representativa das células HEK293T em cultura. Células mantidas em cultura aderente com confluência de 95%, imagem ampliada 40x.

Fonte: Arquivo Pessoal

Dessa forma, considerando o papel fundamental da correta síntese, secreção e atividade biológica da proteína, e sabendo que a prolactina recombinante produzida em CHO possui limitações na maquinaria necessária para realizar as modificações pós-traducionais de forma a produzir moléculas similares às humanas, propomos neste trabalho estudar a hPRL glicosilada (G-hPRL) recombinante produzida em células humanas, utilizando a linhagem HEK293.

Esta linhagem já é utilizada para produções industriais (JAIN *et al.*, 2017). Para isso, foi desenvolvido um processo de produção em escala laboratorial utilizando transfecção transiente. A isoforma glicosilada de hPRL foi purificada e caracterizada, sendo sua estrutura de N-glicanos analisada e comparada com aquelas produzidas em células CHO e com as nativas sintetizados na hipófise humana. Isto, claramente, vai muito além da própria importância da hPRL glicosilada, sendo aplicado às glicoproteínas em geral, amplamente utilizadas como biofármacos (PETRESCU *et al.*, 2004; BARONE *et al.*, 2008; TIAN e ZHANG, 2010; FOGLI *et al.*, 2012; LOSFELD *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2012; JAIN *et al.*, 2017).

2 OBJETIVO

Estudo da transfecção, expressão, purificação e caracterização físico-química e biológica da hPRL glicosilada em células HEK293, incluindo análise da estrutura de carboidratos.

2.1 Objetivos específicos:

- Obtenção de vetores contendo o gene da hPRL para expressão em células de mamíferos;
- Estudos comparativos da transfecção de células HEK293 com os vetores obtidos para definição da melhor expressão;
- Produção de hPRL em células HEK293 por expressão transiente em meio de cultura livre de soro;
- Purificação e caracterização físico-química da hPRL e sua isoforma glicosilada;
- Análise das estruturas de N-glicanos, comparando os resultados obtidos com os dados descritos na literatura para outros hospedeiros (CHO e hipófise humana);
- Avaliação da atividade biológica da G-hPRL expressa em HEK293.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e amplificação dos vetores de expressão

Foram utilizados os plasmídios pEDdc-hPRL, p658-hPRL e pcDNA 3.4-TOPO, todos contendo o cDNA e o peptídio sinal da hPRL. Os plasmídeos pEDdc-hPRL e p658-hPRL foram construídos previamente para expressão em células CHO (SOARES *et al.*, 2000; 2006, HELLER *et al.*, 2010, RODRIGUES GOULART *et al.*, 2010). Já no caso do pcDNA 3.4-TOPO (Life Technology) (Carlsbad, CA, USA), o cDNA foi obtido por reação de PCR com sondas contendo a sequência Kozak (G/A) NNATGN, tendo como molde o plasmídeo pEDdc-hPRL (Figura 6). O cDNA da hPRL foi introduzido no vetor seguindo as recomendações do fabricante, onde o vetor aberto possui enzimas que se encontram ligadas covalentemente, denominada Topoisomerase I, nas extremidades da fita e em sítios específicos (sequência 5' -CCCTT). A energia do rompimento da fita é conservada na forma de uma ligação entre a região 3' fosfato da fita e o resíduo tirosil (Tyr-274) da Topoisomerase I. O inserto que possui a região 5' hidroxil é inserido revertendo a ligação e liberando a Topoisomerase (SCHUMAN *et al.*, 1994) (Figura 6A). Dessa forma, foram incubados por 5 minutos, 100 ng do produto de PCR purificado contendo o cDNA da hPRL e 1 µL do vetor pcDNA 3.4-TOPO, em temperatura ambiente e sob leve agitação. Após a incubação, a reação foi preservada em banho de gelo e em seguida realizada a transformação das células competentes de *E. coli* cepa DH5α.

Figura 6: A) Esquema da ligação do produto de PCR com o vetor pcDNA™ 3.4 TOPO®; B) Esquema do vetor pcDNA™ 3.4 TOPO®: |PCMV| Promotor CMV 47-726 nt; Sítio de clonagem TOPO para ligação do primer sense 584-604NT; |WPRE|, “Woodchuck posttranscriptional regulatory element” 782NT; pcDNA 3.4, sítio de ligação do primer anti-sense 822-844nt; |TK pA|, Sinal de poliadenilação TK 1388-1655nt; PSV40, “Early promoter” 2124-2493nt; “Neomycin”, Gene de resistência a neomicina 2529-3323nt; “SV40 pA”, Sítio de poliadenilação 34400-3629nt; “pUC ori”, sequência introduzida para aumento do número de cópias 4012-4685; “Ampicilin”, gene de resistência a ampicilina 4830-5640.

Fonte: pcDNA™ 3.4-TOPO® TA Cloning® Kit (Catalog Number A14697)

3.2 Transformação das células competentes pelo método do choque térmico

O método do choque térmico foi utilizado para a transformação da cepa de *E. coli* cepa DH5α com os plasmídeos pEDdc-hPRL ou p658-hPRL. Para a reação foram adicionados 100 ng dos plasmídeos a 200 µL de bactérias competentes descongeladas. Após incubação no gelo durante 20 min, os tubos foram transferidos para o banho-maria à 37 °C, por 2 minutos e sem agitação, então transferidos para o gelo, por um minuto. Em seguida, foi adicionando 800 µL de meio LB sem antibiótico e incubado à 37 °C por 1 hora, com agitação menor que 50 rpm. Foram semeados 100 µL da reação em placa LB agar com 0,1 mg/mL de ampicilina, incubando por 16 horas, à 37 °C. As placas contendo colônias foram conservadas a 4 °C.

A transformação por choque térmico para o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL foi realizada seguindo as recomendações do fabricante, 2 µL do produto da reação foram adicionados a 50 µL de *E. coli* DH5α fornecidas junto ao Kit pcDNA 3.4-TOPO e após leve agitação incubou-se em gelo, por 15 minutos. Posteriormente a reação foi submetida ao choque térmico em banho-maria à 42 °C, por 30 segundos incubando novamente no gelo após adição de 250 µL de meio S.O.C (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MgSO₄; 20 mM de glicose). A amostra foi incubada à 37 °C, por 30 minutos, sob agitação de 150 rpm. Foram semeados 10 µL da reação em placa LB ágar com 0,1 mg/mL de ampicilina, incubando por 16 horas, a 37 °C. As placas contendo colônias foram conservadas a 4 °C.

3.3 Seleção dos clones positivos

Os plasmídios extraídos dos clones obtidos das reações de transformação com os vetores pEDdc-hPRL ou p658-hPRL foram submetidos a digestão com enzimas de restrição e análise por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE, para confirmação dos fragmentos de DNA esperados. Foi realizado também uma triagem por PCR dos clones derivados do vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL e posterior sequenciamento do DNA para confirmação, pois há possibilidade de 50% do cDNA entrar invertido. Após a confirmação dos clones, foram realizadas as midi preparações dos plasmídeos. A quantificação do DNA foi feita utilizando o equipamento *Nanodrop*^{TM} e a pureza determinada pela razão 260/280nm.

3.4 Transfecção das células HEK293

Foram comparados três métodos de transfecção transiente, dois com lipídeos catiônicos: Lipofectamine, em células cultivadas aderidas e Expifectamine, em células cultivadas em suspensão, e um terceiro método com o polímero catiônico Xfect, em células aderidas.

3.5.1 Transfecção das células aderidas com os vetores pEDdc-hPRL, p658-hPRL e pcDNA 3.4-TOPO-hPRL, mediante Lipofectamine®

Para avaliar a produtividade na expressão transiente dos diferentes vetores, células HEK293T foram transfectadas com Lipofectamine® com os vetores pEDdc-hPRL, p658-hPRL e pcDNA 3.4-TOPO-hPRL. As células aderidas foram cultivadas a 37 °C, com 5% de CO₂, em placas de cultura de 10 cm de diâmetro (n = 10), contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), adicionado de antibióticos (50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL estreptomicina) (ATB) e antifúngico (0,25 µg/mL de anfotericina B), até a confluência atingir 80%. Para a transfecção, foram adicionados 8 µg de DNA plasmidial diluído em 1,6 mL de meio RPMI 1640 (sem SFB e ATB) em tubo cônico e agitado gentilmente. Em outro tubo, 16 µL de Lipofectamine® foram diluídos em 1,6 mL de meio RPMI 1640 (sem SFB e ATB), agitando gentilmente. O DNA foi adicionado à Lipofectamine®, para formação do complexo, misturando e incubando por 45 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi então removido e substituído por 3,2 mL de meio fresco RPMI1640 (sem SFB e ATB) em cada placa de 10 cm de diâmetro, adicionando 3,2 mL do complexo Vetor-Lipofectamine®. As células foram incubadas por um período de 4 horas, à 37 °C, com 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 6,4 mL por placa de meio RPMI 1640 com 20% SFB (sem ATB). No dia seguinte, o meio foi substituído pelo meio de produção CHO-S-SFM II (Invitrogen, Gaithersburg, MD, EUA) (10 mL/placa) acrescido de antibiótico. O meio foi coletado diariamente durante 6 dias e substituído por meio fresco. Foram separadas alíquotas de 1 mL, e o meio condicionado coletado e centrifugado, foi congelado à -80 °C.

3.5.2 Transfecção das células aderidas com vetor pcDNA 3.4-TOPO usando polímero o Xfect® e com adição dos *Enhancers* 1 e 2

O método de transfecção com polímero Xfect® (Clontech), foi aplicado às células cultivadas da mesma forma do método anterior. A transfecção de cada

placa de 10 cm de diâmetro foi realizada com 30 µg (recomendado pelo fabricante) de vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL, diluído em 600 µL de Xfect™ *Reaction buffer*, misturando com vortex por 5 segundos. Foram adicionados 9 µL de Xfect™ *Polimer* ao DNA, misturando novamente com o vortex por 10 segundos. A reação foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente, para formação das nanopartículas (complexo polímero-DNA). As placas (n = 10) tiveram seus meios renovados com 10 mL de meio Expi293™ *Expression Medium* (sem SFB e ATB) adicionando então 600 µL do complexo polímero-vetor. As células transfectadas foram incubadas por 16-20 horas e no dia seguinte o meio foi descartado, e renovado com 10 mL de meio Expi293™ *Expression Medium*, suplementado com 50 µL de *enhancer* 1 do ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit e 500 µL de *enhancer* 2 do mesmo kit comercial. O meio foi coletado a cada 2 dias, em um total de 4 dias de produção. O meio condicionado e correspondentes alíquotas de 1 mL foram congeladas a -80 °C.

3.5.3 Transfecção das células em suspensão com ExpiFectamine®

Para a produção em células em suspensão, foi utilizada a linhagem Expi293F, do kit Expi293™ *Expression System* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram descongeladas 1×10^7 células Expi293F em 30 mL do meio Expi293™ *Expression Medium* em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, incubando a 37 °C, com 8% de CO₂, sob agitação a 125 rpm. A transfecção só foi realizada quando a densidade celular chegou a $2,5 \times 10^6$ células por mL, com viabilidade > 95%. Para a transfecção, foram ressuspensos 30 µg do plasmídeo pcDNA 3.4-TOPO-hPRL em 1,5 mL de meio Opti-MEM®. Em outro tubo foram diluídos 81 µL de ExpiFectamine 293 *Reagent* em 1,5 mL de meio Opti-MEM®. As misturas foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente o pcDNA 3.4-TOPO-hPRL foi adicionado à ExpiFectamine® 293 *Reagent*. Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, a solução contendo o complexo DNA-ExpiFectamine foi adicionada à cultura. Os *enhancers* 1 e 2 do ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit foram adicionados 20 horas após a

transfecção. Foram coletadas alíquotas de 1 mL de meio diariamente, para posterior caracterização avaliando-se a viabilidade, o crescimento celular e a síntese de hPRL durante os 6 dias de cultivo. Após a determinação do melhor dia de coleta, foram realizadas duas novas produções.

3.5.4 Delineamento experimental das transfecções

Foram adotadas 3 estratégias de transfecções como descritas na Figura 7.

Figura 7: Etapas das transfecções descritas por delineamento experimental

3.5 Caracterização físico-química

Para a caracterização da hPRL obtida foram utilizadas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), Western Blotting (WB) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.5.1 SDS-PAGE

As amostras do meio de cultura condicionado, coletadas no decorrer das diferentes produções em HEK293T (aderidas) e HEK293F (suspensão) e as frações obtidas durante as etapas de purificação da hPRL foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE, sob condições não redutoras (MANIATIS *et al.*, 1989).

As amostras foram diluídas na proporção de 1:3 adicionando-se tampão de amostra 4 vezes concentrado (2 mL de glicerol 20%, 3 mL de SDS 20%, 10 mg de azul de bromofenol, 2,5 mL de Tris-HCL pH 6,8 e água ultrapura). Em seguida ferveu-se por 5 minutos antes da aplicação no gel. Para a realização da eletroforese foi empregado gel de poliacrilamida de 15% em condições não redutoras. O sistema de eletroforese utilizado foi o miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), acoplado a fonte de eletroforese, submentendo o gel a corrente de intensidade de 35 mA, durante 1 hora. A revelação das proteínas presentes no gel seguiu duas metodologias, sendo elas: a revelação por *Coomassie Brilliant Blue G-250* e revelação com nitrato de prata.

3.5.1.1 Revelação com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

A revelação foi realizada utilizando uma solução de corante composta por 0,25% de azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), 45 % de metanol e 8% de ácido acético, onde o gel foi imerso por 30 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em solução de ácido acético 10% por um período de 16h, sob agitação, para obter a transparência desejada.

3.5.1.2 Revelação com nitrato de prata

A revelação por nitrato de prata foi baseada no protocolo descrito por BLUM *et al.*, (1987). Após a corrida de eletroforese o gel é submetido à solução de fixação composta por água destilada e deionizada com 50% de metanol, 12% de ácido acético e 50 µL de formaldeído 37%, levado ao micro-ondas (MO) por 30 segundos e depois deixado sob agitação por 5 minutos em temperatura ambiente (T.A.). O gel então foi submetido a 3 incubações (30 segundos no MO, seguida de agitação por 5 min a T.A.), sendo a primeira incubação em 100 mL de álcool 30%, a segunda em 100 mL de tiosulfato de sódio 50% (0,2 g/L) e a terceira em 100 mL de água destilada. As três incubações foram repetidas na mesma ordem e com os mesmos tempos de incubação. Em seguida foi realizada uma incubação com a solução de nitrato de prata (0,2 gramas de AgNO_3 e 75 µL de formaldeído 37% em 100 mL de água destilada) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos anteriores (30 segundos no MO, seguida de agitação por 5 min a T.A.). Após a etapa de incubação com nitrato de prata o gel foi lavado em água destilada por 1 min e então submergido na solução reveladora (6 gramas de Na_2CO_3 , 75 µL de formaldeído 37%, 1 µL da solução de Tiosulfato 50%, diluído em 100 mL de água destilada). A partir desse momento a agitação passou a ser monitorada até as bandas se revelarem gradativamente (6 a 10 min). Quando foi atingida a intensidade desejada das bandas o gel foi imediatamente mergulhado em 100 mL de solução de *stop* (metanol 50%, ácido acético 12%) e mantido por 10 minutos sob agitação. Por fim, o gel foi mergulhado em 100 mL de solução de lavagem (metanol 50%) e mantido por 20 minutos sob agitação.

3.5.2 Western Blotting (WB)

A análise por WB foi realizada com as amostras submetidas à SDS-PAGE e transferidas por eletro-eluição de forma semi seca (Hoefer™ TE70) para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ – C Extra Amersham Biosciences, porosidade de 45 µm), incubada em solução de bloqueio 5% de leite desnatado (Molico® Nestlé) em TBS (40 mM Tris-HCl, 148 mM NaCl, pH 7,4) durante 1 hora

e tratada com o anticorpo primário anti-hPRL (produzido em coelho) diluído 1:1000 (25 µL/25 mL, na mesma solução de bloqueio) por 16 horas, a temperatura de 4 °C. A membrana foi então lavada três vezes por 5 minutos com solução TBS (50 mM Tris-Cl; 150 mM de NaCl, pH 7,5), e incubada por 2 horas, sob agitação, em geladeira com anticorpo secundário (produzido em cabra contra IgG de coelho) diluído 1:5000 (10 µL/50 mL) conjugado com peroxidase (Signalway Antibody LLC, College Park, MA, EUA). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS contendo 5% de leite desnatado e duas vezes com TBS. Por fim, a revelação foi realizada em câmara escura utilizando o reagente Luminol (Luminata – Merck Milipore, USA), o filme de raio-X (CL-XPosure®-Film 5x7 inches – Thermo Scientific, Bélgica) e solução de revelação e fixação (IBF-Medix, Brasil) (SUZUKI *et al.*, 2012).

3.5.3 Quantificação por técnica de imunoensaio ELISA

Para quantificação diária da concentração de hPRL no meio condicionado pós-transfecção, foram realizadas análises em duplicata utilizando kit ELISA (DS-EIA-PROLACTIN, RPC, DIAGNOSTIC SYSTEMS LABORATORIES, Rússia, sensibilidade de 0,47 ng/mL).

3.5.4 Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

As análises quantitativas e qualitativas da hPRL foram realizadas por técnicas de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) (DALMORA *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2002; CAPONE *et al.*, 2015). A detecção foi realizada mediante luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm.

A técnica de HPSEC foi realizada de forma isocrática utilizando como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, acrescido de NaCl 0,15 M, com fluxo de 1,0 mL/min. Já a técnica de RP-HPLC foi realizada utilizando a proporção de 71% de Tris 0,05 M, pH 7,5 e 29% de N-propanol como fase móvel,

sendo o fluxo de 0,5 mL/min, a coluna sendo mantida a 42 °C (SOARES *et al.*, 2002;2003; CAPONE *et al.*, 2015).

Em ambas as técnicas, o padrão interno NG-hPRL (produzido em *E. coli*) e as preparações internas de G-hPRL (CHO) foram utilizadas para a determinação do tempo de retenção e quantificação.

3.6 Purificação da hPRL

Na purificação da hPRL presente no meio condicionado, como definir a primeira etapa de purificação foram comparadas duas estratégias: troca iônica e afinidade a metais.

3.6.1 Coluna de resina de troca catiônica SP Sepharose Fast Flow (SP-FF)

A primeira estratégia consistiu na concentração e purificação usando uma resina cromatográfica de troca iônica, do tipo catiônica, SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, São Paulo, Brasil) (SOARES *et al.*, 2006; HELLER *et al.*, 2010; ARTHUSO *et al.*, 2012; CAPONE *et al.*, 2015). Nessa primeira etapa, o pH do meio condicionado, em torno de 7,4, foi ajustado para 5,0 utilizando ácido acético glacial. Em seguida, o material foi aplicado à coluna previamente equilibrada com acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Para eliminar impurezas foi realizada uma lavagem com o mesmo tampão acrescido de NaCl 90 mM. A eluição da prolactina foi realizada com tampão HEPES 25 mM, pH 8,0 em fluxo de 200 mL/h, as frações coletadas sendo de 5,0 mL cada. A absorbância em luz ultravioleta foi avaliada nas faixas de 220 e 280 nm. As frações selecionadas foram analisadas por SDS-PAGE, WB e HPLC.

3.6.2 Coluna cromatográfica de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

A segunda estratégia consistiu no uso de uma coluna cromatográfica de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (UEDA *et al.*, 2001; 2003; BRESOLI *et al.*, 2009). Para essa metodologia foi empregada uma filtração tangencial no equipamento Labscale™ TFF System de *cutoff* de peso molecular (MWCO) de 5 kDa (Millipore, Bed-ford, MA, USA), com o intuito de remover qualquer tipo de contaminante ou reagente que possa interferir na purificação. A coluna utilizada foi uma Hisprep™ FF 16/10 (GE Healthcare, Brasil) pré-carregada com Ni²⁺ seguindo as recomendações do fabricante. O equilíbrio da resina foi realizado com fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,2) acrescido de 0,8 M NaCl (Tampão A), em seguida o meio condicionado e dialisado foi aplicado à coluna. A eluição das impurezas foi realizada na primeira lavagem (*step 1*) com o tampão A contendo 30 mM de imidazol e na segunda lavagem (*step 2*), o tampão A contendo 60 mM de imidazol separou a G-PRL junto à NG-hPRL. Os contaminantes com alta afinidade para a resina foram eluídos com o tampão A, contendo 100 mM de imidazol (*step 3*). A absorbância foi monitorada a 280 nm. Para identificação e/ou quantificação da hPRL, as frações obtidas foram analisadas e quantificadas por SDS-PAGE, WB e HPLC.

As amostras eluídas no *step 2* foram acondicionadas para diálise em tubos feitos com membranas de *cutoff* de peso molecular (MWCO) de 3,5 kDa (SnakeSkin™ *Dialysis Tubing*, Thermo), seguindo as normas do fabricante (2 mL/cm), e então, mergulhadas em 1 litro da solução fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,2), por 16 horas e com 2 trocas subsequentes a cada 3 horas.

3.6.3 Purificação por RP-HPLC

Para uma separação eficiente da G-hPRL e NG-hPRL, cuja pureza é fundamental para uma precisa avaliação da atividade biológica, uma etapa adicional de purificação foi utilizada. Uma alíquota do pool formado pela coleta

das principais frações contendo prolactina, obtidas da purificação por IMAC, foram purificadas por RP-HPLC, utilizando uma coluna analítica C4 e acetonitrila como solvente, conforme descrito por CAPONE *et al*, 2015. As amostras contendo G-hPRL e NG-hPRL foram dialisadas seguindo o mesmo protocolo já descrito.

3.7 Análise de carboidratos por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Para determinação de estruturas de carboidratos presentes na G-hPRL purificada, uma amostra contendo a mistura de G-hPRL e NG-hPRL produzida em HEK293T foi enviada ao laboratório PROTEODYNAMICS (Clermont-Ferrand, França), onde após tratamento específico foi submetida a análise em um espectrômetro de massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker).

A amostra liofilizada contendo um total de 1108 µg de rhPRL (166 µg de G-hPRL e 942 µg de NG-hPRL) foi dissolvida em 400 µL de água ultrapura. Uma parte da amostra foi desnaturada em tampão fosfato pH 7,5 com 0,5% de SDS e 1% de β mercaptoetanol em 90 °C por 10 min. A deglicosilação da hPRL foi realizada por meio da digestão com a enzima PNGase F por 15 horas a 37 °C em tampão fosfato pH 7,5. Antes da análise, a amostra foi submetida a corrida em gel de eletroforese NUPAGE, na qual foram analisadas amostras antes e após deglicosilação com a enzima PNGase F.

O produto da deglicosilação por PNGase foi purificado em coluna C-18 Hypercarb Hypersep (Thermo Fisher), onde a coluna foi equilibrada com 0,1% de TFA. A eluição foi realizada com 25% de acetonitrila com 0,1% de TFA. Para melhor separação dos N-glicanos foi adotado o protocolo de permetilação, utilizando 25 mg de hidróxido de sódio e 200 µL DMSO. A amostra eluída foi liofilizada antes da análise por MALDI-TOF.

Os N-glicanos purificados e permetilados foram solubilizados em 20 µL de metanol/H₂O 50%. Foram aplicados 2 µL da solução em placa de MALDI, após a secagem foi gotejado em cima da amostra 1 µL da solução matrix CHCA (LaserBiolabs) (7 mg/mL acetonitrila/H₂O 50%). Os espectros de massa foram

realizados no modo positivo e adquiridos na função autoflex do espectrômetro de massa (Bruker). O aparelho foi calibrado com padrão externo (Pepmix4 LaserBiolabs). Os espectros dos N-glicanos foram obtidos pelo acúmulo de 10000 *shots*.

A interpretação das estruturas dos glicanos correspondentes às massas monoisotópicas foi realizada usando a ferramenta do software “EXPAZY Glycomod Tool” disponibilizada pelo portal de pesquisas de bioinformática da Swiss Institute of Bioinformatics - SIB.

3.8 Bioensaio com células Ba/F3-LLP

As células BaF₃/LLP foram descongeladas e mantidas em meio de crescimento RPMI-1640, suplementado com 10% SFB inativado por aquecimento, acrescido de ATB (50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 700 µg/mL de geneticina 418) e 1 ng/mL de hPRL. Antecedendo o ensaio de proliferação, as células foram lavadas e centrifugadas em meio de ensaio (meio de RPMI 1640, com 1% de SFB, ATB e sem adição de hPRL), 3 vezes e depois mantidas por no mínimo 3 horas em meio de ensaio, incubando a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram distribuídas em placa de 96 poços (2,0 x 10⁴ células/poço), sendo o volume final da reação, incluindo a adição das amostras, de 200 µL por poço. Após 72 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram avaliadas o número de células viáveis por coloração com MTS (CHEN *et al.*, 1998; ARTHUSO *et al.*, 2012; CAPONE *et al.*, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 Comparação do nível de expressão dos três plasmídeos em HEK293

Foram realizados experimentos de expressão após a transfecção com os três plasmídeos: pEDdc-hPRL, p658-hPRL e pcDNA 3.4-TOPO-hPRL. A hPRL presente no meio foi quantificada por ELISA. O vetor pEDdc-hPRL chegou a produzir 10,3 µg/mL de hPRL, concentrações bem superiores, em comparação a 1,7 µg/mL do vetor pcDNA 3.4 -TOPO (sem *enhancer* 1 e 2) e 1,3 µg/mL do vetor p658-hPRL (Figura 8).

Figura 8: Gráfico representativo da expressão de hPRL por diferentes vetores. Para a expressão transiente, foi utilizado o agente transfectante Lipofectamine®. Para cada vetor foi medida a expressão diária durante os 4 primeiros dias após a transfecção. (Dados quantificados pelo ensaio Elisa). A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA, obtendo valor significativo de $P < 0,0001$.

Fonte: Arquivo pessoal

O vetor de expressão pEDdc-hPRL foi escolhido para uma produção em placa (n = 10) utilizando o método de transfecção com Lipofectamine®. Foram coletadas alíquotas diárias referentes aos 6 dias de produção, contudo devido à

baixa concentração de hPRL no meio condicionado não foi possível a visualização das bandas de hPRL em gel SDS-PAGE (Figura 9), isso ocorreu devido a quantificação da hPRL expressa no meio condicionado por ELISA apresentar resultados equivocados, entretanto foi possível a quantificação verdadeira por RP-HPLC do *pool* dos 6 dias de produção em placa: 0,2 µg/mL de hPRL (Figura 10).

Figura 9: Análise por SDS-PAGE de gradiente (8-16%) das amostras dos 6 dias de produção de hPRL: 1) Marcador de massa molecular; 2) padrão interno de hPRL produzido em *E. coli*; 3) coleta dia 1; 4) coleta dia 2; 5) coleta dia 3; 6) coleta dia 4; 7) coleta dia 5, 8) coleta dia 6.

Figura 10: Análise por RP-HPLC do pool da produção de 6 dias de hPRL em HEK293T cultivada aderida. A) padrão interno *E. coli*, 5 µg; B) 500 µL do pool dos 6 dias de produção de hPRL em HEK293 após a transfecção com Lipofectamine®

4.2 Purificação por cromatografia de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow

A hPRL secretada no meio condicionado foi purificada utilizando uma etapa que consiste na concentração e simultânea purificação com resina cromatográfica por troca iônica do tipo catiônica, SP-Sepharose Fast Flow, empacotadas em colunas de vidro e acopladas ao sistema “AKTA Purifier” (General Electric). Como pode ser observado esse método foi eficiente, pois concentra a hPRL em um pico único (frações # 44 a 49 – 30 mL), conforme podemos observar na Figura 11. Contudo, devido ao meio CHO-S-SFM II não ser livre de proteínas e o método aparentemente ter concentrado todas as proteínas presentes no meio (Figura 11B), foi descartado o uso do meio CHO-S-SFM II, devido a existência de meios mais apropriados para produção, sem soro e livres de proteínas e específicos para HEK293.

Figura 11: A) Perfil cromatográfico obtido na purificação por troca catiônica da hPRL presente em 600 mL de meio condicionado de HEK293T transfectadas de forma transiente com Lipofectamine® com o vetor pED-hPRL (6 coletas diárias): I) Pico de eluição da hPRL (frações #44-51) com HEPES 25 mM, pH 8,0. B) Análise por SDS-PAGE (8-16%) das frações provenientes da purificação por troca catiônica: MM) Marcado de massa molecular; 1) Padrão interno de hPRL produzida em *E. coli*; 2) fração #44; 3) fração #45; 4) fração #46 5) fração #47; 6) fração #48; 7) fração #49, 8) fração #50; 9) Fração contendo material não retido pela coluna (volume total = 600 mL).

4.3 Produção em células HEK293T aderidas utilizando polímeros Xfect® com vetor pcDNA 3.4-TOPO e *Enhancer 1* e *2*

Um outro método realizado nesse estudo para transfecção transiente das células HEK293T aderidas foi a utilização de polímeros (tópico 3.4.2), ao invés de lipídio catiônico, e o meio utilizado foi *Expi293™ Expression Medium* (meio quimicamente definido, livre de soro e proteínas) para facilitar a purificação da hPRL. A nova metodologia foi testada em placas de 10 cm de diâmetro (n = 3), sendo a avaliação realizada por meio de amostras coletadas a cada 2 dias de cultivo, após a adição de *enhancers 1* e *2*.

As amostras foram analisadas por RP-HPLC e demonstraram o potencial dessa nova abordagem para expressão em células aderidas chegando a valores de $\cong 16 \mu\text{g hPRL/mL}$ (quantificação do meio condicionado de 1 coleta após 2 dias da adição dos *enhancers 1* e *2* – tópico 3.4.2.) contra $\cong 112 \text{ ng/mL}$ (quantificação do *pool* do meio condicionado de 6 dias após transfecção com Lipofectamine® - tópico 3.4.1.). Essa diferença de expressão se tornou mais evidente após a quantificação em RP-HPLC do pico principal da Purificação por SP-Sepharose da metodologia com Lipofectamine® ($\cong 9,8 \mu\text{g/mL}$) comparado ao meio de cultura condicionado da transfecção com Xfect® ($\cong 16 \mu\text{g/mL}$) (Figura 12).

Figura 12: Análise por RP-HPLC das amostras de hPRL de diferentes produções: **A)** *Pool* das frações #44-49 do Pico de eluição da hPRL da purificação da transfecção com lipídio catiônico por SP-Sepharose FF ($\cong 9,8 \mu\text{g/mL}$); **B)** Amostra do meio condicionado de uma placa utilizando transfecção com polímeros ($\cong 16 \mu\text{g/mL}$).

Com esse resultado, foi escolhida essa metodologia para realizar a produção em 10 placas para expressão de hPRL e para estudos de purificação.

4.4 Produção em suspensão utilizando o kit *Expi293® Expression System* e purificação parcial por SP-Sepharose Fast Flow

Em paralelo ao cultivo em placa com células aderidas, uma outra tentativa para obtenção de G-hPRL em condições viáveis de purificação, foi realizada utilizando o sistema do kit *Expi293® Expression System* com células HEK293F cultivadas em suspensão. Esse método de cultivo permite uma alta densidade de cultura celular na transfecção, aumentando significativamente os rendimentos de expressão volumétrica da hPRL em comparação aos sistemas de cultura tradicionais (PORTOLANO *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2017). Além disso, as células Expi293F são especificamente adaptadas para exibirem uma maior produção volumétrica ($\mu\text{g/mL}$) do que as células HEK293 convencionais.

Foram realizadas duas transfecções 1) Controle positivo (CP) para expressão de imunoglobulina G humana do kit *ExpiFectamine 293 Transfection* (pcDNA 3.4-TOPO-hIgG) e 2) o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL, após adição dos *enhancers* 1 e 2, seguindo o protocolo do kit (tópico 3.4.3). Foram monitoradas a densidade e viabilidade celular diariamente: para a hPRL durante 5 dias e para o CP por 6 dias (Figura 13). Foi observado que o perfil de crescimento segue um padrão pós-transfecção, onde no 2º dia após a adição dos *enhancers* 1 e 2 constata-se uma queda na densidade e na viabilidade celular. No entanto, a viabilidade se manteve acima de 60%, chegando a atingir densidades da ordem de 70 milhões de células/mL (Figura 13).

Observa-se também no 4º dia a densidade celular máxima. Claramente, esses dados mostram que as características do cultivo podem ser diferentes de acordo com a proteína expressa (ZHAO *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2017).

Figura 13: A) Viabilidade (--) e curva de crescimento celular (--) da produção do controle positivo (pcDNA 3.4-TOPO-hIgG). Cultivo realizado em um período de 6 dias, 30 mL de meio, em erlenmeyer de 125 mL, sobre agitação 130 rpm, a 37 °C e 8% de CO₂; **B) Viabilidade (--) e Curva de crescimento celular (--) da Produção de Prolactina humana (pcDNA 3.4-TOPO-hPRL).** Cultivo realizado em um período de 5 dias, em erlenmeyer de 125 mL, sobre agitação 130 rpm a 37 °C e 8% de CO₂.

Para avaliar a expressão do sistema, foram realizadas coletas diárias de 1 mL das duas transfecções e quantificados por gel de SDS-PAGE 8% para o controle positivo (Figura 14) e gel SDS-PAGE 15% e WB para a hPRL (Figura 15). O controle positivo, reproduziu a expressão descrita pelo fabricante (JAIN *et al.*, 2017), confirmando o pleno funcionamento do sistema. Observou-se também um aumento de contaminantes durante o cultivo (retângulo vermelho na Figura 15), o que pode dificultar uma futura purificação (Figura 15). Esse tipo de análise ajudou a definir o melhor dia para a coleta do material, avaliando-se a quantidade de proteína de interesse produzida e a quantidade de contaminantes presentes, ajudando assim, a definir um protocolo de produção mais apropriado e específico para a proteína que está sendo expressa.

Figura 14: Análise por SDS-PAGE 8% das amostras de meio condicionado da cultura de HEK293F transfectados com o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hlgG dos 6 dias de produção do controle positivo: 1) MM; 2) Padrão IgG Bovino; 3) 1º dia de Produção; 4) 2º dia de Produção; 5) 3º dia de Produção; 6) 4º dia de produção; 7) 5º dia de produção; 8) 6º dia de produção.

Figura 15: Análise por SDS-PAGE 15% das amostras de meio condicionado da cultura de HEK293F transfectados com o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL dos 5 dias de produção (A) e respectivo WB (B) 1) MM; 2) Padrão interno de hPRL *E. coli*, 1 µg (A) ou 500 ng (B); 3) Padrão da NIH G-hPRL 1µg (A) ou 500 ng (B) ; 4) Amostra de produção em placa da transfecção com Xfect®; 5) 1º dia de Produção ; 6) 2º dia de produção; 7) 3º dia de produção; 8) 4º dia de produção; 9) 5º dia de produção; 10) G-hPRL CHO (IPEN).

Após análise da produção piloto de hPRL ficou constatado que o 3º dia seria o melhor dia para coleta, por obter máxima produção com menor quantidade de contaminantes. Em seguida, foi realizada uma produção com 4 frascos seguindo a mesma metodologia.

A purificação por troca iônica tipo catiônica com a resina SP-Sepharose Fast Flow foi escolhida como etapa inicial de purificação, porém, logo no início do processo, ao realizar a diminuição do pH do meio condicionado (de pH 7,2 para pH 5,0) foi verificada turbidez do meio condicionado, seguido de uma difícil filtração (porosidade de 0,45 µm), etapa fundamental antes de aplicar a amostra na coluna. O perfil cromatográfico da SP-Sepharose FF na purificação da hPRL derivada do cultivo em suspensão apresentou um perfil cromatográfico alterado, com o surgimento de um segundo pico na etapa de eluição com tampão HEPES 25 mM, pH 8,0 (Figura 16 A). Foi verificado novamente, que a purificação utilizando a coluna de troca iônica do tipo catiônica SP-Sepharose FF não foi apropriada como primeira etapa de purificação, servindo principalmente para concentrar todas as proteínas encontradas no meio condicionado (Figura 16B e

10C). Além disso, o fato da mudança do pH afetar a filtração do meio, nos permite inferir que possa ter existido alguma substância que se precipita nessa condição, levando a uma possível perda de proteína na filtração.

Figura 16: Perfil cromatográfico obtido na purificação por cromatografia de troca catiônica SP-Sephacrose FF da hPRL presente em 120 mL de meio condicionado de HEK293F transfectadas de forma transiente pelo método da ExpiFectamine® com o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL: I) Pico de eluição da hPRL (frações #45-48) com HEPES 25 mM, pH 8,0; II) Segundo Pico de eluição da hPRL (frações #49-58) com HEPES 25 mM, pH 8,0

4.5 Purificação por cromatografia de troca catiônica de hPRL produzida em células HEK293F em suspensão, após diálise por sistema de filtração tangencial Labscale TFF System

Após constatação da possível existência de uma substância que afetaria o tratamento do meio (mudança do pH) para purificação por troca catiônica, foi realizado um teste com uma produção em suspensão totalizando 180 mL de meio condicionado. O pré-tratamento do meio condicionado consistiu em uma diálise em sistema de filtração tangencial no equipamento Labscale™ TFF System. A diálise foi empregada para troca de parte do meio condicionado por tampão acetato de sódio 50 mM acrescido de 90 mM de NaCl (pH 7,0). Para controle, o volume do meio dialisado foi mantido e passou por tratamento idêntico, ou seja, diminuição do pH para 5,0, não sendo constatado mudança na turbidez e nem problemas na filtração (porosidade de 0,45 µm). O cromatograma da purificação por troca catiônica voltou a ter o perfil usual (Figura 17 A), apresentando dois picos bem definidos, sendo o pico de interesse o primeiro, eluído com HEPES 25 mM, pH 8,0 (# 45-53). Foi realizada a comparação de todas etapas do processo mediante gel de SDS-PAGE (Figura 17 B). Ficou evidenciada uma menor intensidade das bandas do meio condicionado após a diálise, reforçando a suspeita da presença de algum corante ou substância que intensifique as bandas no gel e impossibilite a quantificação em SDS-PAGE.

Figura 17: A) Perfil cromatográfico obtido na purificação de hPRL por troca catiônica presente em 180 mL de meio condicionado do cultivo de células HEK293F transfectadas de forma transiente com o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL, após a diálise: I) Pico de eluição da hPRL (frações #45-53) com HEPES 25 mM, pH 8,0; II) Pico de eluição com 2 M de NaCl, utilizado para retirada das proteínas que permaneceram ligadas à coluna e revitalização da mesma. B) Análise por SDS-PAGE 15% de todas as etapas de purificação da hPRL até a diálise. 1) Padrão interno de G-hPRL e NG-hPRL de CHO, 5 µg, 2) 15 µL do *pool* do meio condicionado antes da transfecção; 3) 15 µL do *pool* do meio condicionado após a adição dos *enhancers* (180 mL); 4) 15 µL do *pool* do meio condicionado concentrado e dialisado (55 mL); 5) 15 µL do *pool* do meio condicionado dialisado e diluído até 180 mL; 6) 15 µL do *pool* do pico 1 (#45-53) da purificação em SP-FF (45 mL); 7) 15 µL do *pool* do pico 2 (#72-76) da purificação em SP-FF (50 mL).

Foi realizada análise em SDS-PAGE 15% com amostras de purificações em SP-Sepharose FF com e sem diálise (Figura 18). Na comparação entre as intensidades das bandas da purificação sem diálise (corrida 3 do gel) e com diálise (corrida 4 do gel) fica evidente a influência da diálise na pureza da amostra.

Figura 18: Gel SDS-PAGE 15% para comparação das amostras das purificações em SP-Sepharose Fast Flow. 1) Padrão interno E. coli, 1 ug; 2) *Pool* da purificação por SP-Sepharose da produção em placa com Lipofectamine® (#44-49); 3) *Pool* da purificação por SP-Sepharose da produção em suspensão com ExpiFectamine® sem diálise (#45-48); 4) *Pool* da purificação por SP-Sepharose da Produção em suspensão com ExpiFectamine® após diálise (#45-53).

4.6 Purificação por cromatografia de afinidade a metal (IMAC) da hPRL produzida em células HEK293T aderidas

A escolha dessa etapa de purificação foi baseada em dados de purificação de hPRL com coluna de afinidade a Ni^{2+} (Chelating Sepharose Fast Flow gel, Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden, XK16/40; 25 cm x 16mm I.D.) (UEDA *et al*, 2001). Para teste com essa metodologia foram utilizados 100 mL de meio condicionado de produção de hPRL expressa em células HEK293T aderidas (produção em placas de 10 cm de diâmetro) (item 4.3.). O meio condicionado foi dialisado em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, acrescido de 0,8 M de NaCl, sendo utilizado o sistema de filtração tangencial Labscale™ TFF System. O meio condicionado dialisado foi aplicado na coluna Hisprep™ FF16/10 com Ni^{2+} e a eluição da hPRL foi realizada em 3 etapas, com concentrações de imidazol de 30, 60 e 100 mM, respectivamente, com fluxo de 3 mL/min (Figura 19).

Figura 19: Cromatograma da purificação parcial de hPRL em coluna cromatográfica de afinidade a metais Hisprep™ FF 16/10. A) Aplicação da amostra (100 mL de meio condicionado); B) Fração não ligada à coluna; C) Pico 1 (fração # 7-9) eluido com Tampão A + 30 mM de Imidazol; D) Pico 2 (fração # 26-27) eluido com Tampão A + 60 mM de Imidazol; E) Pico 3 (fração # 28-33) eluido com tampão A + 60 mM de Imidazol; F) Fração eluida com Tampão A + 100 mM de Imidazol.

A utilização de 3 etapas foi bem-sucedida, na primeira etapa (30 mM de imidazol) foram retiradas algumas impurezas retidas na coluna, sem ocorrer a eluição da proteína de interesse (Figura 19 C). Já na segunda etapa (60 mM de imidazol) foi suficiente para eluição das duas isoformas de rhPRL, onde pode ser observado que a fração correspondente à G-hPRL foi eluida no início do pico, juntamente com parte da NG-hPRL (Frações # 26 -27), seguida da eluição completa da NG-hPRL (Frações # 28-33) (Figura 20D e E). Na terceira etapa é realizada a retirada de todas as proteínas com alta afinidade a metal e também serve como etapa de revitalização da coluna (Figura 20F).

Figura 20: **A)** Análise por SDS-PAGE 15% não reduzido das frações referentes à purificação de hPRL do meio condicionado de células HEK293T aderidas por IMAC: MM) Marcador de peso molecular; 1) Padrão interno de hPRL (*E. coli*); 2) *Pool* do meio condicionado da produção de hPRL por células HEK293T aderidas em Placa; 3) *Pool* do meio condicionado da produção de hPRL em placa, após diálise e troca do meio de cultura por tampão A; 4) Permeado da diálise; 5) *Pool* do Pico 1, eluido com Tampão A + 30 mM de Imidazol; 6) *Pool* do Pico 2, eluido com Tampão A + 60 mM de Imidazol; 7) *Pool* do Pico 3, eluido com tampão A + 60 mM de Imidazol; 8) *Pool* da fração eluida com Tampão A + 100 mM de Imidazol. **B) Western Blot das frações referentes a purificação de hPRL por IMAC:** 1) Padrão interno (*E. coli*); 2) *Pool* do Pico 1, eluido com Tampão A + 30 mM de Imidazol; 3) *Pool* do Pico 2, eluido com tampão A + 60 mM de Imidazol; 4) *Pool* do Pico 3, eluido com tampão A + 60 mM de Imidazol; 5) Fração não ligada a coluna; 6) *Pool* do meio condicionado da produção de hPRL em placa, após diálise e troca de meio por tampão A; 7) *Pool* do meio condicionado da produção de hPRL em placa.

As frações coletadas da purificação (Figura 19) foram analisadas por HPSEC. Foram analisados também o padrão de referência interno (NG-hPRL) e amostras do meio condicionado antes da purificação (Figura 21). A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) apresentou uma ótima recuperação da hPRL, além de concentrar a G-hPRL e NG-hPRL (Figura 21), apenas impurezas de alto peso molecular foram observadas.

Figura 21: Análise por HPSEC das amostras contendo hPRL eluída por cromatografia de afinidade: **A)** Padrão interno de NG-hPRL (*E. coli*) ($T_R = 17.77$ min); **B)** Amostra do meio condicionado antes da purificação; **C)** G-hPRL Fração # 26 da eluição com Tampão A + 60 mM de imidazol ($T_R = 17.61$ min); **D)** NG-hPRL Fração # 30 da eluição com Tampão A + 60 mM de imidazol ($T_R = 17.73$ min). T_R = Tempo de retenção

Estabelecidas as condições adequadas para purificação da hPRL por IMAC foi realizada uma produção em placa (Item 4.3.) totalizando 200 mL de meio condicionado. Foram realizadas análises por SDS-PAGE e Western-Blot (Figura 22, amostra 4) para avaliar a quantidade e pureza da hPRL obtida. Também observamos na Figura 22 a pureza da hPRL presente nesse meio condicionado, pureza essa, superior às de outras amostras que já haviam passado por uma etapa de purificação.

Figura 22: Análise por SDS-PAGE 15% (A) e Western-blot (B) comparando as purificações por SP-Sepharose da hPRL expressa em Suspensão e o meio condicionado da produção em placas da hPRL transfectada com Xfect™: 1) Padrão interno de hPRL *E. coli* (A) ou (B); 2) *Pool* resultante da purificação por SP-Sepharose da produção em suspensão com ExpiFectamine® (#45-48); 3) *Pool* resultante da segunda purificação por SP-Sepharose FF da produção em suspensão (dialisada) com ExpiFectamine® (#45-53); 4) Amostra do meio condicionado da produção em placa.

Após essa avaliação, a produção de 200 mL foi dialisada e purificada por cromatografia de afinidade a metais utilizando a coluna Hisprep™ FF16/10 com Ni^{2+} imobilizado (IMAC).

O perfil cromatográfico (Figura 23) da IMAC foi mantido e os picos eluídos foram analisados em SDS-PAGE 15% e revelado com nitrato de prata (Figura 24A). Novamente foi verificado que no pico 2, frações #26-27 (10 mL) temos a predominância das glicoformas da hPRL. A análise por WB (Figura 24 B) confirmou que a G-hPRL é encontrada também no pico 1, frações #7-9 (15 mL), que retém também supostos contaminantes presente no meio condicionado, e no pico 3, frações # 28-34 (35 mL) onde se esperava encontrar apenas a isoforma não glicosilada.

Figura 23: Cromatograma da eluição de hPRL por cromatografia de afinidade a metais com a coluna Hisprep™ FF16/10 com Ni²⁺ imobilizado (IMAC). 1) Pico eluído com Tampão A + 30 mM de Imidazol; 2) Pico (fração # 26-27) eluído com Tampão A + 60 mM de Imidazol; 3) Pico (fração # 28-34) eluído com tampão A + 60 mM de Imidazol; 4) Pico eluído com Tampão A + 100 mM de Imidazol.

Figura 24: A) Análise por SDS-PAGE 15% revelado com nitrato de prata, referente ao cromatograma da eluição de hPRL por coluna Hisprep™ FF16/10 com Ni²⁺ imobilizado (IMAC). 1) Padrão interno NG-hPRL (*E. coli*) 2) Pool pico 2 (fração # 26-27); 3) Pool pico 3 (fração # 28-34); 4) Pool do meio condicionado concentrado após a dialise. **B) Análise por Western Blotting das frações referentes a purificação por coluna Hisprep™ FF16/10 com Ni²⁺ imobilizado (IMAC).** 1) Padrão interno NG-hPRL (*E.coli*); 2) Pool pico 1 (fração # 7-9); 3) Pool pico 2 (fração # 26-27); 4) Pool do pico 3 (fração #28-34); 5) Pico 4 (fração #45); 6) Meio condicionado dialisado e concentrado.

O produto resultante dessa purificação foi caracterizado e liofilizado para posterior análise da estrutura de N-glicanos presentes na isoforma G-hPRL.

4.7 Caracterização da G-hPRL e NG-hPRL

4.7.1 Análise por HPLC

Após a etapa de purificação por IMAC foram analisados os picos contendo hPRL para quantificação da G-hPRL em RP-HPLC (Figura 25), onde foram estimadas as concentrações de 5,4 µg/mL de G-hPRL (Figura 25C) e 5,6 µg/mL de G-hPRL (Figura 25D). Foram quantificados 54 µg de G-hPRL no Pico 2 e 196 µg de G-hPRL no Pico 3. Para estimativa da pureza foi realizada a análise por HPSEC (Figura 26).

Figura 25: RP-HPLC em acetonitrila das amostras contendo hPRL eluída da IMAC. A) Padrão interno de NG-hPRL (*E. coli*), 5 µg (T_R = 50,22 min); **B)** Padrão interno de G-hPRL (CHO), 8 µg (T_R = 47,74 min; 48,64 min; 49,06 min; 49,91 min); **C)** Pool do pico 2 (Fração # 26-27) G-hPRL (T_R = 47,08 min; 48,30 min; 49,36 min) e NG-hPRL (T_R = 50,18 min); **D)** Pool do pico 3 (Fração # 28-34) G-hPRL (T_R = 47,22 min e 49,18 min) e NG-hPRL (T_R = 50,06 min).

Figura 26: Análise por HPSEC das amostras contendo hPRL eluída da IMAC. A) Padrão interno de NG-hPRL (*E. coli*), 5 µg ($T_R = 18.329$ min); **B)** *Pool* do pico 1 (Fração #7-9); C) *Pool* do pico 2 (Fração # 26-27); D) *Pool* do pico 3 (Fração # 28-34).

Podemos observar na Figura 26B que o *pool* do pico 1 (Figura 23) referente à eliminação das impurezas, não apresentam perdas significativas de hPRL nessa etapa. O pico 2 (Fração #26-27) (Figura 26C) apresentou uma quantidade considerável de outras formas que podem ser agregados ou dímeros. O pico 3 (Fração #28-34) (Figura 26D) apresenta um pico único, retendo a NG-hPRL praticamente pura, restando apenas a diálise para retirar o imidazol utilizado para eluição.

4.7.2 Separação da G-hPRL por RP-HPLC para estudo de bioatividade

A separação completa da isoforma G-hPRL da NG-hPRL de HEK293 não foi eficiente utilizando apenas a IMAC como método de purificação. Embora a

presença da isoforma não glicosilada de hPRL não seja crítica para a análise de glicanos, para os ensaios de determinação de potência biológica são necessárias amostras puras e em concentrações relativamente baixas, da ordem de nanogramas por mL, sendo assim foi separada uma fração de 100 μ L da mistura do pico 2 (Fração #26-27) e pico 3 (Fração #28-34) para essa etapa de purificação adicional.

Para a separação das isoformas de hPRL foi utilizada a técnica de RP-HPLC com acetonitrila padronizada por CAPONE *et al.*, (2015). Observamos na Figura 27A o perfil cromatográfico esquemático identificando as frações coletadas da RP-HPLC, seguido do cromatograma (Figura 27B) demonstrando o T_R . Após a separação as frações contendo G-hPRL (# 8-12) e NG-hPRL (# 13-17) foram dialisadas por 16 horas, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,05 M.

Figura 27: Perfil cromatográfico da purificação por RP-HPLC (acetonitrila) da G-hPRL e NG-hPRL. A) Esquema de coleta das frações correspondentes à G-hPRL (#8-12) e NG-hPRL (# 13-17); **B)** Cromatograma da RP-HPLC identificando o tempo de retenção (T_R) das isoformas da hPRL.

4.7.3 Atividade biológica

A atividade biológica da G-hPRL-HEK293T foi avaliada pelo bioensaio de proliferação celular BaF/3-LLP (GLEZER *et al.*, 2006; ARTHUSO *et al.*, 2012; CAPONE *et al.*, 2015). O ensaio foi desenvolvido utilizando o padrão de hPRL recombinante da Organização Mundial da Saúde (WHO 97/714), com potência declarada de $57,2 \pm 11,4$ UI/mg. Os resultados obtidos do padrão CRS (WHO), da G-hPRL-HEK293T e do padrão interno de G-hPRL-CHO estão apresentados na Figura 28. No bioensaio, a G-hPRL expressa em HEK293T apresentou uma potência bem menor que a G-hPRL de CHO, estimada em $1,16 \pm 0,02$ UI/mg, contra $18,4 \pm 0,54$ UI/mg, determinada para a G-hPRL-CHO, analisada no mesmo ensaio, portanto aproximadamente 16 vezes menor.

Figura 28: Avaliação da atividade biológica da G-hPRL produzida em HEK293T. Bioensaio de proliferação com células BaF₃/LLP comparando a atividade biológica da amostra purificada de G-hPRL (-▲-) obtida à partir de células HEK293T, do padrão de hPRL produzido em células C-127 da Organização Mundial da Saúde (WHO) 97/714 (-◆-) e do padrão interno de G-hPRL produzido em células CHO (-x-).

4.7.3 Análise estrutural dos N-glicanos da G-hPRL produzida em HEK293T

Os perfis de N-glicanos foram obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF de um único lote, os glicanos foram permetilados para melhor análise. Inicialmente foi realizada uma análise por eletroforese em gel NUPAGE (Gradiente de 4-12%) para controle de deglicosilação (Figura 29).

Figura 29: Avaliação da deglicosilação por PNGase F. Gel de eletroforese em gel de poliacrilamida, gradiente 4-12%, revelado por Comassie como controle da digestão de N-glicanos por PNGase F: MW) Marcador molecular; 1) hPRL (7ug da proteína total); 2) hPRL após a digestão por PNGase F.

Observamos na Figura 29 a prevalência da isoforma não glicosilada. A isoforma da hPRL glicosilada é pouco visualizada nesse gel, o que dificulta avaliar a eficiência da deglicosilação. Contudo é possível verificar uma pequena diminuição na banda correspondente ao material digerido por PNGase F se comparada à amostra integral.

O espectro correspondente a análise dos N-glicanos está apresentada na Figura 30. A Figura 31 mostra as estruturas correspondentes aos valores dos picos e que podem se enquadrar na composição estrutural de um glicano a partir da ferramenta “*EXPAZY Glycomod Tool*” (ferramenta gratuita do site: <https://www.expasy.org>). As estruturas dos glicanos são representadas pelo número de moléculas de cada monossacarídeo presente, descontado o núcleo pentassacarídico, comum a todos os glicanos (CAPONI *et al.*, 2015).

Figura 30: Espectro dos N-glicanos da G-hPRL produzida em HEK293T. Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF dos N-glicanos permetilados e não sulfatados da prolactina glicosilada expressa em HEK293T.

Figura 31: Perfil de N-glicanos da G-hPRL de HEK293T. Estruturas de oligossacarídeos encontrados na G-hPRL de HEK293T

Os N-glicanos identificados são todos do tipo complexo: bi-, tri- e tetra-antenários. Todos apresentaram terminação em ácido-siálico. Dentre as espécies: dois são mono-sialilados; dois di-sialilados; três tri-sialilados e apenas um tetra-sialilado. O resíduo de fucose se apresenta em quatro das espécies encontradas. Além disso, existe a relativa predominância da espécie N₂G₂S₁ (29,4%), seguido das outras espécies: N₂G₂S₂, N₃G₃S₁ e N₃G₃S₃ que apresentam valores acima de 18%.

5 DISCUSSÃO

A prolactina humana é um dos hormônios mais estudados pelo nosso laboratório (MORGANTI *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; HELLER *et al.*, 2010; ARTHUSO *et al.*, 2012; CAPONE *et al.*, 2015), sendo esse trabalho o primeiro a demonstrar expressão transiente da G-hPRL e NG-hPRL em uma célula humana HEK293 (aderidas e em suspensão). Para atingir esse objetivo foram avaliados três vetores de expressão; dois vetores previamente usados para expressão permanente da hPRL: pEDdc-hPRL e p658-hPRL e o vetor comercial pcDNA 3.4 TOPO – hPRL.

Com o vetor pEDdc-hPRL foi obtida uma expressão de 10 µg/mL de hPRL, no terceiro dia após a transfecção (quantificação por ELISA), resultado próximo às expressões obtidas em outros trabalhos do grupo (ARTHUSO *et al.*, 2012; CAPONE *et al.*, 2015), utilizando esse mesmo vetor, porém essa expressão não foi confirmada por RP-HPLC. Além disso, a expressão transiente não manteve uma uniformidade, apresentando altas variações entre os lotes de produção.

Para aumentar a expressão da hPRL foram utilizadas outras estratégias, como o uso do vetor pEDdc-hPRL, assim como o vetor comercial pcDNA 3.4-TOPO-hPRL (com os *enhancers*) e o uso de agentes transfectantes distintos. O polímero Xfect® apresentou uma capacidade de transfecção melhor que os agentes Lipofectamine® e ExpiFectamine®, chegando a $\cong 20$ µg hPRL/mL com vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL.

Nesse trabalho, também foi utilizado pela primeira vez em nosso grupo o sistema de cultivo em suspensão com células Expi293F (HEK293F), que possibilitou obter altas densidades celulares ($6,0$ a $7,0 \times 10^7$ células/mL). Foram obtidos valores superiores a 20 µg/mL de hPRL com o vetor pcDNA 3.4 – TOPO, acrescido dos *enhancers* 1 e 2, confirmando a eficiência desse sistema comercial e a sua possível aplicação na expressão da proteína de interesse, que pode ser obtida de forma rápida e em grandes quantidades, explorando as vantagens da transfecção transiente. No entanto, no decorrer dos dias de cultivo, como apresentado nas Figuras 14 e 15, ocorreu também o aumento de impurezas com

o tempo de cultivo, alertando para a necessidade de avaliar, durante o desenvolvimento do protocolo de produção, o dia mais apropriado de coleta.

Uma adaptação desenvolvida nesse trabalho, utilizando os *enhancers* 1 e 2 no cultivo em placas, junto com o vetor pcDNA 3.4 – TOPO, foi bastante efetiva. Também apresentou altas expressões e gerou um produto com alta pureza inicial. Optamos por seguir essa estratégia para a produção da G-hPRL necessária para a determinação dos N-glicanos, meta desse trabalho.

O processo de purificação de hPRL já havia sido bem estabelecido em nosso laboratório, como descrito em outros trabalhos (SOARES *et al.*, 2000; 2006; HELLER *et al.*, 2010; CAPONE *et al.*, 2015) nos quais foram utilizados como etapas de purificação a SP-Sepharose Fast Flow (troca catiônica) seguida de uma purificação em RP-HPLC com acetronitrila e posterior diálise. Contudo, nossos resultados demonstraram que a primeira etapa não foi tão eficiente, apenas concentrando o meio condicionado. O meio de produção CHO-SFM II não é livre de proteínas, que acaba sendo concentrada junto deixando o produto com impurezas derivadas do próprio CHO-SFM II. UEDA *et al.*, (2001) já relatavam problemas com essa purificação por ser mais agressiva, já que é necessário o ajuste do pH para 5,0, o que foi mais impactante em nossas purificações com a produção em suspensão (Figura 16) e o meio Expi293, possivelmente devido a alguma substância em sua composição que impede a filtração do meio após o ajuste do pH para 5,0.

A IMAC com Ni^{2+} já é utilizada pelo nosso laboratório para purificação de choque osmótico de hPRL produzida em *E. coli* (Padrão interno de NG-hPRL) e como primeira etapa chegou a atingir uma pureza de 99% e rendimentos finais de aproximadamente 76 % (UEDA *et al.*, 2001). Tendo em vista a eficiência desse método, com condições mais brandas para a purificação, por não haver alteração de pH, mantido em pH 7,2 durante a maior parte do processo e pela necessária diálise, realizada antes da aplicação da amostra na coluna Hisprep™ FF16/10. A diálise além de servir para retirada de possíveis sais ou agentes quelantes (que impossibilitam a interação do Ni^{2+} com a hPRL), serviu também para um clareamento inicial do meio de cultura condicionado, sendo empregada como primeira etapa de purificação (Figura 23).

Essa metodologia mostrou-se rápida e eficiente, permitindo uma purificação em uma única etapa de parte da G-hPRL e NG-hPRL (Frações # 28-34) e parcial purificação de grande parte de isoformas glicosiladas nas frações # 26-27 que demonstrou conter as duas principais isoformas, assim como descrito por CAPONE *et al.*, (2015) (Figura 24).

A quantificação de hPRL obtida foi realizada por RP-HPLC, utilizando acetonitrila que resultou em 250 µg de G-hPRL (Figura 25) e a caracterização da pureza foi feita por HPSEC que mostrou 64% de pureza no pico 2 (Frações #26-27) e 97% no pico 3 (Frações #28-34) (Figura 26). As análises foram realizadas sempre comparando com os padrões internos de G-hPRL (CHO) e NG-hPRL (*E. coli*). Após a caracterização e quantificação já que não foi possível a separação total da G-hPRL, as frações referentes aos picos 2 e 3 foram unidas, concentradas e então novamente purificadas em HPSEC analítica eliminando agregados e/ou proteínas de maior peso molecular, essa abordagem foi realizada para termos uma amostragem mais homogênea permitindo analisar todos os possíveis N-glicanos correspondentes às isoformas glicosiladas. O produto foi então liofilizado e enviado à empresa PROTEODYNAMICS para análise estrutural dos N-glicanos presentes na G-hPRL obtido das células HEK293T.

O resultado verificado na Figura 28, demonstra que houve uma deglicosilação parcial ou uma baixa deglicosilação, o que pode ter sido devido a solubilização inadequada do material liofilizado. Contudo é possível verificar uma diminuição na banda correspondente ao material digerido por PNGase F se comparado ao íntegro, outro fator a ser considerado é a proporção de G-hPRL/NG-hPRL (166 µg/992 µg), já que o excesso de NG-hPRL dificulta a visualização da G-hPRL.

Para a avaliação da potência G-hPRL de HEK293T *in vitro* com células BAF/3-LLP foi necessária uma etapa de separação adicional por RP-HPLC, utilizando acetonitrila como fase móvel, mesma estratégia utilizada por Capone *et al* (2015). Para isso, foi utilizada uma pequena fração da mistura dos picos 2 e 3 (100 µL) para verificação da atividade biológica (Figura 27).

A medida da atividade biológica (Figura 28) resultou em uma potência de $1,16 \pm 0,02$ UI/ mg (n=5) para a G-hPRL de HEK293T, $\cong 16$ vezes menor em

comparação ao padrão interno de G-hPRL de CHO, cuja potência foi de $18,4 \pm 0,54$ UI/ mg ($n=5$), valor próximo ao de $20,4 \pm 1,7$ UI/ mg ($n=2$) reportados por CAPONE *et al.*, (2015) para essa mesma amostra. Essa diferença de atividade, nunca relatada antes, pode ser reflexo das diferenças de carboidratos entre essas duas hPRL de origens diferentes. Curiosamente, já tem sido amplamente relatado na literatura, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, que a prolactina glicosilada apresenta atividade biológica aproximadamente quatro vezes menor que a prolactina não glicosilada, isso utilizando como hospedeiro células de ovário de hamster chinês CHO e células de camundongos C127 (PRICE *et al.*, 1995; HELLER *et al.*, 2010; CAPONE *et al.*, 2015). Podemos também observar na Figura 28, que embora tenha uma menor atividade biológica, a G-hPRL da HEK293 produz uma proliferação celular aparentemente maior, retardando o aparecimento do chamado Efeito Sino. Esse efeito ocorre quando um excesso de moléculas de prolactina satura os receptores presentes nas células BAF3 e inibem a dimerização dos mesmos, causando um antagonismo. Como a dimerização dos receptores pelos sítios 1 e 2 da prolactina é fundamental para ocorrer a estimulação da proliferação celular, o Efeito Sino resulta em uma proliferação celular menor. Esse fenômeno de antagonismo ou inibição é bem visível no caso da curva com as concentrações mais altas da G-hPRL produzida pelas células CHO.

O presente trabalho proporcionou pela primeira vez o perfil de N-glicanos da G-hPRL expressa em HEK293T, possibilitando comparar a diferença na glicosilação entre células HEK293T (Humanas) e as células CHO (hamster) e hipofisárias humanas (CAPONE *et al.*, 2015).

O perfil de N-glicanos da amostra apresentou apenas 6 espécies principais (Figura 30), o que pode ser devido a parcial ou baixa digestão pela enzima PNGase F. Porém, as estruturas adquiridas demonstram que os N-glicanos da G-hPRL possuem 100% de terminação em ácido siálico contra 64,3% na G-hPRL de CHO (CAPONE *et al.*, 2015) (Tabela 2). Confirmando a tendência já relatada na literatura das células HEK293 produzirem mais glicanos sialilados (JAIN *et al.*, 2017) e/ou fucosilados (SANT'ANA *et al.*, 2017), contudo o grau de glicosilação desses monômeros pode ser alterado dependendo da proteína expressa.

Tabela 2: Principais diferenças entre os perfis de N-glicanos da G-hPRL de HEK293T e CHO. Porcentagem das principais diferenças na glicosilação de dois hospedeiros diferentes.

Hospedeiro	HEK293 (%)	CHO (%)
Tetra-antenário	15,3	-
Tri-antenário	36,9	1,1
Bi-antenário	47,9	78,5
Ácido-siálico	100	64,3
Fucose	63,1	42,8

Além disso, o número de antenas (antenaridade) apresenta diferenças do produto recombinante de CHO, entretanto três das espécies são similares às relatadas por CAPONE *et al.* (2015), (N2G2S1F1; N2G2S2 e N3G3S3). O perfil de N-glicanos mostrou espécies tetraantenárias N4G4S2F1 e N4G4S3F1, que não tinham sido relatadas em CHO e em G-PRL hipofisária por CAPONE *et al.*, (2015). Porém SANT'ANA *et al.*, (2017), em estudos com a tireotrofina humana, encontrou espécies tri e tetraantenárias, com predominância de triantenárias, o que demonstra uma tendência das células HEK293 em sintetizar glicanos tri e tetrantenários. Outro dado importante é que o N-glicano mais abundante na amostra de HEK293T (N2G2S1F1) é o segundo mais presente na G-hPRL obtida de CHO, conforme relatado por CAPONE *et. al.*, (2015), demonstrando uma certa similaridade na construção dos oligossacarídeos recombinantes por essas linhagens. No entanto, a estrutura e a relativa intensidade do perfil de N-glicanos da G-hPRL de HEK293T deve ser repetida, para confirmação desses resultados, haja vista, como mencionado, que a obtenção dos glicanos decorreu de uma deglicosilação não tão eficiente, possivelmente decorrente dos problemas para solubilizar o material liofizado, o que levou à necessidade de uma aquisição relativamente alta de 10000 *shots*.

6 CONCLUSÃO

A expressão transiente de hPRL foi detectada nos três vetores de expressão estudados, sendo o vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL + *enhancers* 1 e 2 o responsável pela maior expressão de hPRL, tanto para células HEK293 cultivadas em suspensão ($20,96 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$), como para as células HEK293 aderidas, ($21,26 \pm 8,3 \mu\text{g/mL}$).

A metodologia utilizando o polímero Xfect® em células HEK293T aderidas, meio de produção *Expi293™ Expression Medium*, vetor pcDNA 3.4-TOPO-hPRL e *enhancers* 1 e 2 foi eficiente, e ajudou a definir o primeiro passo cromatográfico de purificação a ser seguido, ou seja, a coluna de afinidade a Ni^{2+} .

A purificação por IMAC foi eficiente demonstrando produtos com alto grau de pureza para um primeiro *step*, sendo eles de 97% para o pico 3 (Fração #28-34) e 64% para o pico 2 (fração #26-27).

A metodologia de produção com células em suspensão utilizando o kit *Expi293™ Expression System* e parcial purificação também foi eficiente. Foram obtidos altos níveis de expressão em pouco tempo. Contudo, o meio *Expi293™ Expression Medium*, após o cultivo, precisa ser dialisado para seguir a purificação (Figura 17).

O perfil de N-glicanos encontrados, embora em menor variedade, apresentam similaridades com os encontrados em CHO, contudo novas análises devem ser realizadas para confirmação desses dados.

A G-hPRL de HEK293T apresentou uma atividade biológica de $1,16 \pm 0,02 \text{ UI/mg}$, $\cong 16$ vezes menor que a da G-hPRL expressa por células CHO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, T. D., PEREIRA, M. M., ALMEIDA CAMARGO, L. S. 2014. Efeitos do uso de Lipofectamine™ 2000 e Polietilenoimina (PEI) na transfecção e expressão da proteína fluorescente verde em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. *CES Rev.*, 28,57-71.

ARTHUSO, F. S., BARTOLINI, P. & SOARES, C. R. 2012. Laboratory production of human prolactin from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 2212-24.

BARONE, R., STURIALE, L., GAROZZO, D. 2008. Mass spectrometry in the characterization of human genetic N-glycosylation defects. *Mass Spectrom Rev*, 28(3), 517-542

BEN-JONATHAN, N., MERSHON, J. L., ALLEN, D. L. & STEINMETZ, R. W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 17, 639-69.

BERNICHTTEIN, S., JEAY, S., VAUDRY, R., KELLY, P. A. & GOFFIN, V. 2003. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine*, 20, 177-90.

BERNICHTTEIN, S., TOURAINE, P. & GOFFIN, V. 2010. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol*, 206, 1-11.

BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N. & KELLY, P. A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19, 225-68.

BRESOLIN, I. T. L., MIRANDA, E. A., BUENO, S. M. A. 2009. Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) of biomolecules: fundamental aspects and technological applications. *Quimica Nova*, 32(5), 1288-1296.

BUTLER, M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotech*, 68 (3), 283-291.

BUTLER, M. 2006 . Optimisation of the cellula metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50, 57-76.

CAPONE, M. V., SUZUKI, M. F., OLIVEIRA, J. E., DAMIANI, R., SOARES, C. R. & BARTOLINI, P. 2015. N-glycoprofiling analysis in a simple glycoprotein model: a comparison between recombinant and pituitary glycosylated human prolactin. *J Biotechnol*, 202, 78-87.

CHEN, T. J., KUO, C. B., TSAI, K. F., LIU, J. W., CHEN, D. Y. & WALKER, A. M. 1998. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology*, 139, 609-16.

CUI, S., ZHANG, S., CHEN, H., WANG, B., ZHAO, Y., ZHI, D. 2012. The mechanism of Lipofectamine ^{TM} 2000 mediated transmembrane gene delivery. *Engineering*, 5, 172-175.

DALMORA, S., DE OLIVEIRA, J. E., AFFONSO, R., GIMBO, E., RIBELA, M. T. & BARTOLINI, P. 1997. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J Chromatogr A*, 782, 199-210.

DAMIANI, R., OLIVEIRA, J. E., VORAUER-UHL, K., PERONI, C. N., VIANNA, E. G., BARTOLINI, P., RIBELA, M. T. C. 2009. Stable expression of a human-like sialylated recombinant thyrotropin in a Chinese hamster ovary cell line expressing $\alpha 2$, 6-sialyltransferase. *Prot Expr Purif*, 67(1), 7-14.

ELECTRICWALA, A. 1994. Isolation of prolactin from human pituitary glands: some safety aspects of an improved partial purification procedure. *Bioseparation*, 4(4), 263-269.

FELGNER, P. L., RINGOLD, G. M. 1989. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 337, 387-388.

FERRIS. S. P., KODALI, V. K., KAUFMAN, R. J. 2014. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis Model Mech*, 7(3), 331-341.

FOGLI, A., MERLE, C., ROUSSEL, V., SCHIFFMANN, R., UGHETTO, S., THEISEN, M., BOESPFLUG-TANGUY, O. 2012. CSF N-glycan profiles to investigate biomarkers in brain developmental disorders: application to leukodystrophies related to eIF2B mutations. *Plos One*, 7(8), e42688.

GILBERT, M. S., LOWRY, P. J., CASTRO, M. G., WOODS, R. J., SAVVA, D. 1991. Expression and partial purification of human prolactin in *Escherichia coli*. *Int J Biochem*, 23, 107-114.

GLEZER, A., SOARES, C. R., VIEIRA, J. G., GIANNELLA-NETO, D., RIBELA, M. T., GOFFIN, V. & BRONSTEIN, M. D. 2006. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 1048-55.

GOFFIN, V., BOUCHARD, B., ORMANDY, C. J., WEIMANN, E., FERRAG, F., TOURAINE, P., BINART, N. 1998. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci*, 840(1), 498-509.

GOOCHEE, C. F., GRAMER, M. J., ANDERSEN, D. C., BAHR, J. B., RASMUSSEN, J. R. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins bioprocess factors affecting oligosacchare structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology*, 9, 1347-1355.

HEBERT, D. N., LAMRIBEN, L., POWER, E. T., KELLY, J. W. 2014. The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nature Chem Biol*, 10 (11), 902.

HELLER, S. R., RODRIGUES GOULART, H., ARTHUSO, F. S., OLIVEIRA, T. L., BARTOLINI, P. & SOARES, C. R. 2010. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. *J Biotechnol*, 145, 334-40.

HIRAOKA, Y., NOMATA, Y., MATSUO, K., TSUBATA, N., TANABE, K., FUKUSAWA, T. 1991. Efficient production of biologically active human prolactin in *Escherichia coli*. *Mol Cell Endocrinol*, 81, 147-154.

HODGKINSON, S. C., LOWRY, P. J. 1981. Hydrophobic-interaction chromatography and anion-exchange chromatography in the presence of acetonitrile. *Biochem J*, 199, 619-627.

HOLMES, S. L., VANBROCKLIN, M. W., EVERSOLE, R. R., STAPLETON, S. R., GINSBERG, L. C. 1995. Efficient lipid-transfection of DNA into primary rat hepatocytes. *In vitro Cel Dev Biol-Anim*, 31, 347-351.

HWANG, P., GUYDA, H., FRIESEN, H. 1975. Purification of human prolactin. *J Biol Chem.*, 247, 1955-1958.

HWANG, P., GUYDA, H., FRIESEN, H. 1972. Purification of human prolactin. *Methods Enzymol*, 247, 1955-1958.

HWANG, P., GUYDA, H., ROBERTSON, M., FRIESEN, H. 1973. The Purification of human prolactin from frozen pituitary glands. *J Clin Endocrinol Metab*, 36, 1110-1973.

JAIN, N. K., BARKOWSKI-CLARK, S., ALTMAN, R., JOHNSON, K., SUN, F., ZMUDA, J., LIU, C. Y., KITA, A., SCHULZ, R., NEILL, A., BALLINGER, R., PATEL, R., LIU, J., MPANDA, A., HUTA, C., VOEGTLI, W., PANAVALAS, T. 2017. A high-density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Prot Exp Purif*, 134, 38-46.

KIM, T. K., ELBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397(8), 3173-3178.

LEWIS, U. J., SINGH, R. N., LEWIS, L. J., SEAVEY, B. K. & SINHA, Y. N. 1984. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 385-9.

LOSFELD, M. E., SONCIN, F., NG, B. G., SINGEC, I., FREEZE, H. H. 2012. A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy. *FASEB J*, 26(10), 4210-4217.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MORGANTI, L., HUYER, M., GOUT, P. W., BARTOLINI, P. 1996. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)⁶-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 26, 67-75.

MORGANTI, L., SOARES, C. R., AFFONSO, R., GOUT, P. W., BARTOLINI, P. 1998. Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 27 (Pt 1), 63-70.

PAN, S., TAMURA, Y., CHEN, R., MAY, D., MCINTOSH, M. W., BRETNALL, T. A. 2012. Large-scale quantitative glycoproteomics analysis of site-specific glycosylation occupancy. *Mol BioSystems*, 8(11), 2850-2856.

PARIS, N. RENTIER-DELRUE, F., DEFONTAINE, A., GOFFIN, V., LEBRUN, J. J., MERCIER, L., MARTIAL, J. A. 1990. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. *Biotechnol Appl Biochem*, 12, 436-449, 1990.

PORTOLANO, N., WATSON, P. J., FAIRALL, L., MILLARD, C. J., MILANO, C. P., SONG, Y., COWLEY, S. M., SCHWABE, J. W. 2014. Recombinant protein expression for structural biology in HEK293F suspension cells: a novel and accessible approach. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (92).

PERONI, C. N, SOARES, C. R., GIMBO, E., MORGANTI, L., RIBELA, M. T., BARTOLINI, P. 2002. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. *Biotechnol Appl Biochem*, v.35, n. 1, p. 19-26.

PETRESCU, A. J., MILAC, A. L., PETRESCU, S. M., DWEK, R. A., WORMALD, M. R. 2004. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 14(2), 103-114.

PRICE, A. E., LOGVINENKO, K. B., HIGGINS, E. A., COLE, E. S., RICHARDS, S. M. 1995. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and non-glycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology*, 136, 4827-4833.

RECILLAS-TARGA, F. 2006. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol*, 34(3), 337-354.

RIBELA, M. T. C., DAMIANI, R., SILVA, F. D., LIMA, E. R., OLIVEIRA, J. E., PERONI, C. N., TORJESSEN, P. A., SOARES, C. R. J., BARTOLINI, P. 2017. N-Glycoprofiling Analysis for Carbohydrate Composition and Site-Occupancy Determination in a Poly-Glycosylated Protein: Human Thyrotropin of Different Origins. *Int J Mol Sci*, 18(2), 131.

RODRIGUES GOULART, H., ARTHUSO, F. D., CAPONE, M. V. N., DE OLIVEIRA, T. L., BARTOLINI, P., SOARES, C. R. J. 2010. Enhancement of Human Prolactin Synthesis by Sodium Butyrate Addition to Serum-Free CHO Cell Culture. *J Biomed Biotech*.

ROOS, P., NYBERG, F., WIDE, L. 1979. Isolation of human pituitary prolactin. *Biochim Biophys Acta*, 588, 368-379.

ROTH, J. 2002. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev*, 102 (2), 285-304.

SANT'ANA, P. M., OLIVEIRA, J. E., LIMA, E. R., SOARES, C. R. J., PERONI, C. N., BARTOLINI, P., RIBELA, M. T. C. 2018. Human thyroid-stimulating hormone synthesis in human embryonic kidney cells and related N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition determination. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(3), 1215-1228.

SCHENBORN, E. T., GOFFIN, V. 2000. DEADE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol Biol*, 147-153.

SCHUMAN, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, 269, 32678-32684.

SINHA, Y. N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16, 354-69.

SOARES, C. R., MORGANTI, L., MILOUX, B., LUPKER, J. H., FERRARA, P., BARTOLINI, P. 2000. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 32 (Pt 2), 127-35.

SOARES, C. R., CAMARGO, I. M., MORGANTI, L., GIMBO, E., EZEQUIEL DE OLIVEIRA, J., LEGOUX, R., FERRARA, P. & BARTOLINI, P. 2002. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. *J Chromatogr A*, 955, 229-36.

SOARES, C. R., GOMIDE, F. I., UEDA, E. K., BARTOLINI, P. 2003. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng*, 16, 1131-8.

SOARES, C. R., GLEZER, A., OKAZAKI, K., UEDA, E. K., HELLER, S. R., WALKER, A. M., GOFFIN, V., BARTOLINI, P. 2006. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif*, 48, 182-94.

SUZUKI, M. F., ARTHUSO, F. S., OLIVEIRA, J. E., OLIVEIRA, N. A., GOULART, H. R., CAPONE, M. V., RIBELA, M. T., BARTOLINI, P., SOARES, C. R. 2012. Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in *Escherichia coli* periplasmic space. *Biotechnol Appl Biochem*, 59, 178-85.

STANLEY, P., TANIGUCHI, N., AEBI, M. N- Glycans. 2017. In: VALKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Cap. 9. Acesso em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/doi: 10.1101/glycobiology.3e.009](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/doi:10.1101/glycobiology.3e.009)

SZKUDLINSKI, M. W., THOTAKURA, N. R., BUCCI, I., JOSHI, L. R., TSAI, A., EAST-PALMER, J., SHILOACH, J., WEINTRAUB, B. D. 1993. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese hamster ovary cells: the role of sialylation and sulfation in TSH bioactivity. *Endocrinology*, 133(4), 1490-1503.

THOMAS, P., SMART, T.G. 2005. HEK 293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Meth*, 51 (3), 187-200.

- THOTAKURA, N. R., DESAI, R. K., BATES, L. G., COLE, E. S., PRATT, B. M., WEINTRAUB, B. D. 1991. Biological activity and metabolic clearance of a recombinant human thyrotropin produced in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, 128(1), 341-348.
- TIAN, Y., ZHANG, H. 2010. Glycoproteomics and clinical applications. *Proteomics-Clin Appl*, 4(2), 124-132.
- UEDA, E. K. M., GOUT, P. W., MORGANTI, L. 2001. Ni (II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic Escherichia coli extracts. *J Chromatography A*. 922(1), 165-175.
- UEDA, , E. K. M., GOUT, P. W., MORGANTI, L. 2003. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *J Chromatogr A*, 988 (1), 1-23.
- UTAMA, F. E., TRAN, T. H., RYDER, A., LEBARON, M. J., PARLOW, A. F., RUI, H. 2009. Insensitivity of human prolactin receptors to nonhuman prolactins: relevance for experimental modeling of prolactin receptor-expressing human cells. *Endocrinology*, 150, 1782-90.
- VENTINI, D. C., DAMIANI, R., SOUSA, A. P., DE OLIVEIRA, J. E., PERONI, C. N., RIBELA, M. T., BARTOLINI, P., TONSO, A., SOARES, C. R., PEREIRA, C. A. 2011. Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides higher overall biomass and productivity for rhTSH. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 401-9.
- WASHBOURNE, P., MCALLISTER, A. K. 2002. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 12(5), 566-573.
- ZHAO, X., CHEN, W., GE, L., JIANG, W., TANG, B., ZHANG, Q., XU, X., WANG, C., CAO, L., GUO, H. 2016. Transient expression of Fc-fused human glycoprotein 130 in Expi293F suspension cells. *Prot Express Purif*, 124, 41-47.