Fernanda Resende Gomes

Expressão do Fator Estimulador de Colônia de
Granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em
Escherichia coli

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo
2010

RESUMO

Gomes, FR. **Expressão do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli***. [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; São Paulo, 2010.

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) produzido em *Escherichia coli* é uma proteína não glicosilada com 175 aminoácidos, de grande importância clínica para o tratamento de neutropenias. Esse fator é um medicamento de alto custo que o Brasil importa na totalidade. O presente trabalho propõe a construção de dois sistemas de expressão em *E. coli*, um sistema para obtenção do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) no citoplasma e outro para secreção da proteína recombinante no meio de cultura utilizando a sequência sinal da L-asparaginase II. Os dois sistemas de expressão foram testados e comparados. A partir desses dados, passou-se para as etapas de obtenção do rhG-CSF com o sistema de expressão sem a sequência sinal. As etapas de renaturação e purificação foram eficientes obtendo-se uma proteína com adequado grau de pureza, integridade estrutural e atividade biológica. Essa proteína também foi utilizada com sucesso para a produção de anticorpos policlonais em camundongos. Com os resultados obtidos, a proteína rhG-CSF mostrou-se viável para estudos posteriores (não definidos neste projeto) em biorreatores e produção em escala-piloto.

Palavras-chave: Fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante. Expressão em *Escherichia coli*. Corpúsculo de inclusão.

ABSTRACT

Gomes, FR. **Expression of recombinant human colony stimulating factor (rhG-CSF) in *Escherichia coli*** [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor (rhG-CSF) is a non-glycosylated protein with 175 amino acids. This factor plays an important role in hematopoietic cell proliferation and has been widely used for treating neutropenia. The purpose of this work is to construct two expression systems in *E. coli*; a system for obtaining rhG-CSF in the cytoplasm and the other for secretion of recombinant protein in the culture medium using the signal sequence of L-asparaginase II. The two expression systems were tested and compared. From these data, the next steps for obtaining the rhG-CSF were done with the expression system without the signal sequence. The refolding and purification steps were efficient, resulting in a protein with adequate purity, structural integrity and biological activity. This protein has also been successfully used for the production of polyclonal antibodies in mice. With these results, the protein rhG-CSF was feasible for further studies in bioreactors and pilot scale production.

Keywords: Recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Expression in *Escherichia coli*. Inclusion body.

1 INTRODUÇÃO

O processo de diferenciação celular do sistema hematopoiético se dá a partir de células tronco pluripotentes. Essa célula tronco hematopoiética pluripotente origina os dois principais tipos celulares do sistema imune, as células progenitoras da linhagem mielóide e células progenitoras da linhagem linfóide. Estas últimas dão origem a duas importantes populações de linfócitos: as células T e células B.

As células progenitoras da linhagem mielóide diferenciam-se gerando mais células-tronco ou células progenitoras já comprometidas, conhecidas como Unidades Formadoras de Colônia (CFU). Por serem mais diferenciadas, as CFUs são capazes de originar apenas alguns tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e os granulócitos (Figura 1).

Os granulócitos são assim denominados por possuírem grânulos densamente coráveis no citoplasma. Entre eles estão os eosinófilos, basófilos e os neutrófilos, células responsáveis pela resposta imune inata na defesa contra bactérias e fungos.

Nesse processo de diferenciação celular, as citocinas têm um papel primordial atuando como moléculas sinalizadoras do sistema imune. Essas substâncias são secretadas por células do sistema imune ou por outros tipos celulares em resposta a uma estimulação. Estudos mostram que as citocinas atuam na prevenção da apoptose celular (1) e que possuem atividade também fora do sistema hematopoiético (2).

Muitas citocinas já foram identificadas, um exemplo é o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF, em inglês, *human Granulocyte Colony Stimulating Factor*), que influencia na diferenciação das CFUs em células maduras (3), mais diretamente na formação dos neutrófilos (Figura 1).

Figura 1. Ilustração esquemática do processo de hematopoiese com indicação dos sítios de ação do G-CSF.
 FONTE: Adaptado de (4).

1.1 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF)

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) é uma citocina hematopoiética de linhagem específica (5), produzida pelas células do estroma da medula óssea, fibroblasto, células endoteliais, monócitos e macrófagos (6).

O aumento da produção e a liberação do hG-CSF são estimulados pela presença de lipopolissacarídeos (LPS), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas 1, 3 e 4, fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de macrófagos (M-CSF) e interferon gama (INF- γ) (7).

1.2 Atividade Biológica do hG-CSF

O hG-CSF estimula e regula a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos da medula óssea, que constituem a primeira linha de defesa do organismo, atuando em inflamações, infecções, principalmente bacterianas e lesões teciduais (8).

Além da função de estimular a produção de neutrófilos, o hG-CSF exerce um importante papel como regulador sistêmico dos neutrófilos circulantes no sangue (9). Também atua nos neutrófilos estimulando suas atividades bactericidas, de quimiotaxia e de fagocitose (10). O hG-CSF possui ação em células não hematopoiéticas, estimulando a proliferação e migração de células vasculares endoteliais (11). Por fim, também promove efeitos anti inflamatórios, diminuindo a liberação de citocinas pro-inflamatórias e regulando a liberação de citocinas anti-inflamatórias (12).

1.3 Receptores do hG-CSF

A atividade biológica do hG-CSF ocorre por meio de interação com receptores específicos que fazem parte da superfamília de receptores de citocina do tipo I (13). A

função desses receptores é transmitir o sinal extracelular do hG-CSF para o citoplasma das células que expressam esses receptores.

Os receptores do hG-CSF são glicoproteínas de massa molecular de aproximadamente 130KDa. Sua estrutura é composta de um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático, possibilitando assim a transdução de sinal intracelular (14).

Os estudos mostram que esses receptores são expressos em neutrófilos e também em células não hematopoiéticas como, por exemplo, células de placenta, endoteliais e várias linhagens de carcinomas (13).

O receptor de hG-CSF expresso em progenitores neutrofílicos e em neutrófilos maduros tem a função de transmitir sinais de proliferação, diferenciação e sobrevivência dessas células. Tais receptores podem também ser encontrados em monócitos, com a função de atenuar a liberação de citocinas pro-inflamatórias quando estas se encontram ativadas (15).

O número de receptores por células é de aproximadamente 300 a 2000 (13). Sabe-se que à medida que ocorre a maturação celular, aumenta o número de receptores na superfície da célula (15). Por outro lado, quando ocorre a ligação do hG-CSF ao receptor há uma diminuição dos receptores disponíveis, uma vez que esse complexo proteína-receptor é internalizado e degradado (9).

A interação do hG-CSF com o seu respectivo receptor fosforila as tirosinas quinases JAK1 e JAK2, ativando a via quinase Ras/MAP que é responsável pela transdução do sinal (9). Essa relação da atividade biológica do hG-CSF com a ligação a receptores específicos, explica a ação seletiva dessa citocina.

1.4 Caracterização Molecular do hG-CSF

Estruturalmente, o hG-CSF é uma proteína com massa molecular de aproximadamente 18,8 kDa, com cadeia polipeptídica de 174 aminoácidos. Possui duas pontes dissulfetos intramoleculares (Cys^{36, 42} e Cys^{64, 74}), com uma cisteína livre em sua forma reduzida (SH), na posição 17 e dois resíduos de triptofano nas posições 58 e 118 (16). Seu ponto isoelétrico (pI) é de 6.1 (17).

A estrutura tridimensional do hG-CSF foi determinada por cristalografia de raios-X. É composta de quatro hélices, como mostra a Figura 2. A hélice A forma-se

entre os resíduos 11-39, a hélice B entre os resíduos 71-91, a hélice C entre 100-123 e a D entre 143-172 (18, 19).

Figura 2. Estrutura tridimensional do G-CSF.
FONTE: (18).

1.5 Obtenção do hG-CSF recombinante e Uso Clínico

Os Fatores Estimuladores de Colônia (CSFs) são produzidos em quantidade limitada *in vivo* (20). Entretanto, a clonagem molecular do cDNA do hG-CSF (21) e a sua expressão recombinante (22) facilitaram significativamente o estudo dos seus efeitos no sistema hematopoiético, o entendimento da biologia desse fator (23), bem como o seu uso clínico como medicamento biotecnológico.

O hG-CSF recombinante (rhG-CSF) produzido em *E. coli* apresenta sequência de aminoácidos idêntica ao G-CSF humano, excetuando-se uma metionina N-terminal adicional; há também, a ausência de O-glicosilação no resíduo de Thr 133, que não é essencial para a atividade biológica dessa molécula (Figura 3).

Figura 3. Sequência primária do G-CSF, o desenho representa as α-hélices preditas e o desenho representa as folhas-β

FONTE:(24).

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) está disponível para o uso clínico em duas formas: não glicosilada e glicosilada (25). O rhG-CSF glicosilado, denominado comercialmente de Lenograstim, é derivado da expressão em células de mamíferos. A forma não glicosilada, comercialmente conhecida como Filgrastim, é produzida por expressão em células bacterianas de *Escherichia coli*.

Há também a forma não glicosilada produzida em *E. coli* com alguns aminoácidos substituídos, que segundo dados da literatura, resultaram numa proteína hG-CSF com maior estabilidade e potência (26). De fato, esta forma recombinante é usada na clínica médica e comercializada pela Kyowa Hakko Kogyo Co, Japão, com o nome comercial de Nartograstim.

Desde fevereiro de 1991, o uso clínico do rhG-CSF foi aprovado pela agência reguladora dos Estados Unidos *U. S. Food & Drug Administration (FDA)*, com a finalidade de diminuir a incidência de infecções associadas com neutropenia induzida por quimioterapia de pacientes com câncer (27). No Brasil, esse medicamento foi registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em julho de 2002 (28).

1.5.1 Importância clínica

Clinicamente, a eficácia do rhG-CSF está diretamente relacionada com a sua atividade biológica (9), por isso seu uso está muito associado a pacientes com neutropenia clínica, isto é, aqueles com baixa taxa de neutrófilos no sangue.

rhG-CSF é usado no tratamento de neutropenias clínicas principalmente decorrentes de transplante ou doação de medula óssea, quimioterapia, neutropenias idiopáticas e mielodisplasias, e neutropenia decorrente de síndrome da imunodeficiência adquirida (6).

Um dos primeiros usos clínicos do rhG-CSF foi em pacientes com neutropenia decorrente de transplante de medula (9). A administração do rhG-CSF nesses pacientes fez com que o tempo de recuperação da taxa de neutrófilo se reduzisse pela metade e conseqüentemente, se reduzisse também o tempo de internação (29).

Inúmeros estudos mostram resultados positivos na administração do rhG-CSF em pacientes com câncer, uma vez que a maior causa de morbidade e mortalidade em

pacientes que receberam tratamento de quimioterapia mielossupressiva está associada com neutropenia e infecções (30). Estudo realizado em pacientes em tratamento quimioterápico demonstrou que o uso de rhG-CSF rotineiramente após sessões de quimioterapia reduz o tempo de neutropenia, dias de hospitalização e terapias com outras drogas como antibióticos e antifúngicos(31).

Em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida a administração do rhG-CSF ajudou na prevenção de neutropenia severa e de febre neutropênica (32). Além disso, seu uso permitiu maiores doses do medicamento ganciclovir, utilizado para tratar infecções de citomegalovirus nesses pacientes (33).

Mais recentemente, tem sido demonstrada uma atividade do hG-CSF no Sistema Nervoso Central. A administração do rhG-CSF mobiliza células-tronco e progenitoras da medula óssea para o sangue periférico, as quais, por sua vez, ultrapassam a barreira hematoencefálica. Além deste papel periférico, a expressão do hG-CSF e seus receptores ocorre em grande parte do tecido neural, o que justificaria o seu efeito neuroprotetor aparentemente multimodal, incluindo-se uma atividade antiapoptótica nos neurônios, regeneração e reparação da vascularização e estímulo da angiogênese, além de um efeito anti-inflamatório e do estímulo da neurogênese endógena (34) (Figura 4).

Figura 4. Efeito multimodal do G-CSF no Sistema Nervoso Central.
FONTE: (34).

1.6 Expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*

O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e tem muitas vantagens comparado com sistemas eucarióticos, como o fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção (35).

Entre os diversos sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria gram negativa *E. coli* continua sendo um dos mais atraentes devido ao seu rápido crescimento em meio de cultura, sua genética já bem descrita e a disponibilidade de inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes (36). A Tabela 1 mostra os principais medicamentos recombinantes comercializados que são produzidos em *E. coli*.

Tabela 1 - Visão geral dos principais produtos recombinantes produzidos em *E. coli* e suas respectivas empresas fabricantes.

Produto	Empresa	Sistema de Expressão
Calcitonina	Unigene	<i>E. coli</i>
Hormônios de crescimento (somatropinas)	Pharmacia & Upjohn Lilly/Novo-Nordisk/Ferring/Genentech	<i>E. coli</i>
Fatores de crescimento (GCSF, GMCSF)	Novartis/Essex/Amgen	<i>E. coli</i>
	Roche	
Insulina	Aventis/Lilly/Berlin-Chemie	<i>E. coli</i>
	Bio-Technology General Corp.	
	Novo-Nordisk	
Interferon alfa	Roche/Essex/Yamanouchi	<i>E. coli</i>
Interferon beta	Shering/Biogen/Serono	<i>E. coli</i>
Interferon gama	Amgen/Boeringer	<i>E. coli</i>
Interleucina 2	Chiron	<i>E. coli</i>
OP-1	Curis/Striker	<i>E. coli</i>
Ativador plaminogênio	Genetech/Roche/Boehringer	<i>E. coli</i>
Fator de necrose tumoral - TNF	Boehringer	<i>E. coli</i>

FONTE: Adaptado (37).

A grande desvantagem da *E. coli* é que muitas vezes em um processo de expressão citoplasmática há dificuldade em obter a proteína em sua correta conformação original, além da proteína não sofrer glicosilação (35). Para muitos produtos, esse processo de glicosilação não é necessário, tornando a *E. coli* um excelente sistema de expressão citoplasmático, como é o caso do rhG-CSF.

1.6.1 Obtenção de proteínas recombinantes no citoplasma

No processo de expressão protéica em *E. coli*, o mais desejável é obter a proteína recombinante na sua forma solúvel e com sua conformação estrutural correta. Entretanto, o dobramento protéico está muito relacionado com a degradação proteolítica no citoplasma, uma vez que proteínas em sua conformação incorreta são rapidamente degradadas como forma de reciclagem de aminoácidos (36).

Além do dobramento incorreto da proteína heteróloga expressa, o alto nível de expressão citoplasmática pode resultar na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão. A maioria das proteínas produzidas nessa bactéria estão na forma de corpúsculo de inclusão devido a pequena quantidade de chaperonas no citoplasma (37). Um exemplo disso, é o rhG-CSF, que até hoje só foi obtido na sua forma insolúvel.

Por outro lado, a formação de corpúsculo de inclusão possui algumas vantagens como o isolamento fácil com alto grau de concentração e pureza das proteínas, além de ser uma proteção da proteína contra a degradação por proteases (38). Contudo, apesar da proteína na sua forma insolúvel facilitar a etapa de purificação nem sempre é possível obtê-la com atividade biológica (36).

No caso da expressão ocorrer na forma de corpúsculo de inclusão, uma tentativa é renaturar a proteína recombinante a partir do material insolúvel, e outra é modificar as estratégias de expressão para se obter a proteína já solúvel (39) (Figura 5).

Figura 5. Esquema de diferentes estratégias para obter proteínas solúveis expressa em *E. coli*.
FONTE: Adaptado de (39).

A obtenção da proteína recombinante a partir de corpúsculo de inclusão muitas vezes é a abordagem escolhida por ter alto rendimento, fácil recuperação do material insolúvel e quantidade reduzida de contaminantes, o que facilita a etapa posterior de purificação. Todavia, nesse tipo de abordagem pode ocorrer baixo rendimento das proteínas renaturadas e um possível prejuízo na integridade protéica (39). Quanto ao custo, um protocolo que envolve a etapa de renaturação geralmente apresenta maior custo comparado a protocolos em que a proteína se encontra na sua forma solúvel (37).

Na segunda abordagem em que se modifica a estratégia de expressão na tentativa de obter a proteína solúvel, se incluem testes como: expressão em diferentes temperaturas, utilização de diversos tipos de cepas, variação do meio de cultura, controle da taxa de transcrição, uso de diferentes chaperonas moleculares, entre outros (39).

1.6.2 Obtenção de proteínas recombinantes por secreção

Uma alternativa de produção em *E. coli* é a utilização de uma sequência sinal fusionada ao gene da proteína heteróloga a fim de obter um sistema de expressão com a secreção da proteína no periplasma ou no meio extracelular.

O periplasma é um ambiente oxidante que contém enzimas que catalisam a formação e o rearranjo das pontes de dissulfetos (36). Esse tipo de expressão facilita a obtenção de proteínas em sua conformação terciária correta, uma vez que o ambiente do periplasma é propício para tal processo.(38). Uma desvantagem da expressão no periplasma é o seu volume reduzido, que pode resultar num volume pequeno de produção da proteína recombinante (36).

Diante disso, há um particular interesse no desenvolvimento de sistema de expressão em *E. coli* visando a secreção das proteínas recombinantes para meio de cultura. Nesse tipo de sistema os procedimentos de produção e purificação são mais rápidos e simples, não sendo necessários protocolos dispendiosos que envolvem etapas de ruptura celular, solubilização e renaturação (37).

Para que ocorra a secreção, as proteínas são sintetizadas primeiramente (pré-proteína) contendo uma sequência sinal na sua região amino terminal, e essa sequência sinal é posteriormente clivada durante o transporte intermembrânico (36).

Após a clivagem do peptídeo sinal, é possível obter a proteína com a sequência N-terminal original, isto é, sem a adição de metionina nessa região. Entretanto, isso só é possível quando o gene de interesse está fusionado corretamente ao sítio de clivagem (40).

Em alguns casos, entretanto, essas pré-proteínas (precursoras) não são reconhecidas como proteínas de exportação e ficam acumuladas na membrana celular na forma de corpúsculo de inclusão ou sendo rapidamente degradadas no citoplasma (36). Isso ocorre porque um eficiente transporte intermembrânico requer que a proteína esteja em sua forma relaxada (36).

Há descritos na literatura diversos peptídeos sinais que foram utilizados para secreção de proteínas recombinantes em *E. coli*, tais como, PelB, OmpA, PhoA, endoxilanase, StII (40) e asparaginase II (38). Esse peptídeos são diferentes entre si quanto às suas sequências, mas possuem algumas características estruturais comuns. Uma sequência típica de peptídeo sinal é composta de um domínio hidrofóbico de aproximadamente 10 a 20 aminoácidos que pode ser precedido de

pequeno domínio N-terminal de carga positiva de 2 a 10 aminoácidos aproximadamente (40).

Em bactérias gram-negativas pelo menos três tipos de sistema de secreção já foram descritos, como de tipo I, tipo II e tipo III. O sistema mais utilizado é o de tipo II em que a proteína prematura ainda fusionada ao peptídeo sinal é exportada para o periplasma pela via Sec e posteriormente processada (40).

Um sistema eficiente de secreção de proteínas recombinantes depende da escolha do peptídeo sinal, da linhagem celular e da proteína a ser secretada. Não há descrito na literatura um método de seleção do peptídeo sinal que garanta uma correta secreção, o que existe são diversos peptídeos já utilizados anteriormente que podem ser testados, fusionando-os a diferentes proteínas e utilizando diversas linhagens de *E. coli* (40).

Os obstáculos mais comumente encontrados nessas tentativas são: o processamento incompleto da sequência sinal, a influência das características da proteína na eficiência da secreção, o baixo rendimento de proteínas secretadas, a formação de corpúsculo de inclusão no citoplasma ou periplasma quando se utiliza um promotor forte e a formação incorreta das pontes de dissulfeto (40).

Por outro lado, a literatura descreve trabalhos que obtiveram um sistema de secreção que permitiu a produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico. Recentemente, a sequência sinal da L-asparaginase II foi utilizada para essa finalidade com sucesso (38). A L-asparaginase II é uma enzima secretada que catalisa a reação extracelular de conversão da L-asparagina em aspartato e amônia. Nesse sentido, pareceu-nos importante avaliar a possibilidade do uso da sequência sinal da L-asparaginase II.

No caso do rhG-CSF, ainda não consta na literatura a utilização de um sistema de expressão extracelular para o meio de cultura, o que seria uma alternativa interessante, principalmente pela possibilidade de ser secretada com a correta conformação estrutural.

Como já visto anteriormente, um sistema de expressão eficaz é de extrema relevância na produção de proteínas de interesse clínico como o rhG-CSF. Visto que há diversas formas de obter proteínas recombinantes em *E. coli*, e considerando que cada método tem suas vantagens e desvantagens, é importante verificar qual o tipo de sistema de expressão, citoplasmática ou extracelular, é mais eficiente na expressão do rhG-CSF. E dessa forma aprimorar o método de sua obtenção em quantidade e pureza suficientes para o uso industrial.

1.7 Contexto brasileiro para medicamentos biotecnológicos

Os medicamentos obtidos por meio da biotecnologia estão cada vez mais sendo utilizados na clínica médica e consequentemente cresce a cada ano o investimento mundial na produção e comercialização desses medicamentos (37). Na Tabela 2 estão os medicamentos biotecnológicos mais comercializados no cenário mundial ordenados quanto à sua classificação em vendas.

Tabela 2 - Classificação dos 14 biofarmacos mais comercializados.

Classificação	Produto referência	Tipo	Empresa	Área terapêutica
1	Aranesp	EPO	Amgen	Hematologia Oncologia
2	Enbrel	TNF	Amgen/Wyeth/ Takeda	Reumatologia
3	Procrit/Eprex	EPO	Johnson & Johnson	Oncologia
4	Epogen	EPO	Amgen	Hematologia
5	Neupogen	G-CSF	Amgen	Oncologia
6	Pegasys	IFN-alpha 2a	Roche/Chugai	Infectologia
7	Novolin	Insulina	Novo Nordisk	Endocrinologia
8	NeoRecormon	EPO	Roche	Oncologia
9	Lantus	Insulina	Sanofi-Aventis	Endocrinologia
10	Avonex	IFN-beta-1a	Biogen Idec	Neurologia
11	Intron	IFN-alpha-2b	Schering-Plough	Infectologia
12	Rebif	IFN-beta-1a	Pfizer/Serono	Neurologia
13	Humalog	Insulina	Lilly	Endocrinologia
14	Beta(f s)eron	IFN-beta-1b	Chiron/ Schering AG	Neurologia

FONTE: Adaptado (41).

A primeira geração de medicamentos desenvolvidos por tecnologia recombinante data dos anos 80, por isso a maioria das patentes desses produtos estão expiradas ou em via de expirar, como no caso do rhG-CSF que teve sua primeira patente expirada em 2006. A expiração dessas patentes criou uma oportunidade para a produção desses medicamentos, conhecidos na Europa pelo termo “biosimilar” e nos EUA pela expressão “*follow-on biologic product*”.

O desenvolvimento de desses medicamentos é uma oportunidade, para empresas de menor porte e pouco internacionalizadas em países periféricos como o Brasil, de encontrar um novo espaço de atuação, um novo mercado interno, e por sua vez estimular o setor nacional de biotecnologia (42).

No Brasil, esses medicamentos estão inseridos no Programa de Assistência Farmacêutica do SUS como medicamentos excepcionais, ou seja, aqueles de alto custo e administrados para doenças, geralmente raras, cujo tratamento deve ser continuado (43). Um terço do montante dos recursos aplicados na política de medicamentos, pelo governo federal, é destinado a esses medicamentos considerados excepcionais. Segundo informação do Ministério da Saúde, o governo federal investiu R\$ 400 milhões para a aquisição de medicamentos biotecnológicos no ano de 2008 (44).

Um fator agravante para o alto custo de medicamentos produzidos por biotecnologia é o fato do Brasil importar a maioria desses medicamentos. A política atual do Ministério da Saúde é a introdução de plataformas tecnológicas para reduzir gradativamente a dependência do Brasil por medicamentos importados e direcionar o País à auto-suficiência.

O rhG-CSF é um medicamento em que não há produção no Brasil, consequentemente, todo o medicamento comprado pelo governo é importado, acarretando gastos públicos consideráveis. Especificamente para o rhG-CSF, o investimento do governo federal no período de janeiro de 2006 a agosto de 2007 foi de R\$ 4.807.489,78 (44).

Um estudo de viabilidade técnico-econômica da implantação da produção de rhG-CSF no Brasil demonstrou que esse medicamento pode ser produzido por custos até cerca de 90% inferiores aos valores pagos em compras governamentais, provando que é importante desenvolver a tecnologia para produção deste medicamento no Brasil (45).

Por outro lado, o investimento na produção de medicamentos biotecnológicos visa também fortalecer a posição do Brasil no cenário internacional e se traduzirá em geração de postos de trabalho especializados.

Por isso, a otimização e a produção em escala industrial do rhG-CSF se faz necessária para promover a auto-suficiência na produção desse fator recombinante e o incentivo de desenvolvimento de biotecnologia nacional. A sua produção pelo Instituto Butantan também poderá baratear o custo desse medicamento e torná-lo mais acessível à população, por meio do SUS.

6 CONCLUSÃO

Esperava-se obter um sistema de expressão eficiente para a produção do rhG-CSF em meio de cultura. Apesar disso não ter sido possível, buscamos a melhor forma de obter o rhG-CSF na forma intracelular. Isso implicou protocolos de renaturação e purificação como se tem descrito para a produção do rhG-CSF atualmente. As etapas de renaturação e purificação foram realizadas com sucesso, visto que os testes de caracterização do rhG-CSF produzido comprovaram seu grau de pureza, integridade estrutural, especificidade e alta capacidade de induzir a produção de anticorpos policlonais em camundongos. A avaliação da atividade biológica *in vivo* mostrou resultados semelhantes ao da proteína já comercializada. Isso sugere que a produção do rhG-CSF em escala piloto no Instituto Butantan pode ser viável.

REFERÊNCIAS*

- 1.Koury MJ. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Experimental hematology*, 1992;20(4):391-4.
- 2.Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 1993;81(11):2844.
- 3.Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 2002.
- 4.Bishop B, Koay D, Sartorelli A, Regan L. Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability. *Journal of Biological Chemistry*, 2001;276(36):33465.
- 5.Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, Schalm OW. *Schalm's veterinary hematology*. 5a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- 6.Henry CJ, Buss MS, Lothrop CD. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Compendium on continuing education for the practising veterinarian*, 1998;20:728-38.
- 7.Vanz AL. Clonagem, Superexpressão, Purificação e Caracterização da Proteína Recombinante Humana Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)]. Rio grande do Sul (Brasil): Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul, 2008.
- 8.Lucidi CA, Takahira RK. Granulocyte colony-stimulating factor use in neutropenias in dogs and cats, *Ciência Rural*, 2007;37:915-20.
- 9.Welte K, Gabrilove J, Bronchud M, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, 1996;88(6):1907-29.
- 10.Weisbart RH, Golde DW. Physiology of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors in host defense. *Hematology/oncology clinics of North America*, 1989;3(3):401.
- 11.Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental & Comparative Immunology*. 2004;28(5):509-54.
- 12.Boneberg E, Hartung T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflammation Research*, 2002;51(3):119-28.
- 13.Fukunaga R, Seto Y, Mizushima S, Nagata S. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990;87(22):8702-6.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

14. Iwasaki H, Shimoda K, Okamura S, Otsuka T, Nagafuji K, Harada N, et al. Production of soluble granulocyte colony-stimulating factor receptors from myelomonocytic cells. *The Journal of Immunology*, 1999;163(12):6907.
15. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 1991;78(11):2791-808.
16. Masiero SM. Estudo de métodos cromatográficos para avaliação de potência de filgrastima e correlação com ensaio biológico [dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)]. Rio Grande do Sul (Brasil): Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
17. Jevs evar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology progress*, 2005;21(2):632-9.
18. Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993;90:5167-71.
19. Raso SW, Abel J, Barnes JM, Maloney KM, Pipes G, Treuheit MJ, et al. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2005;14(9):2246.
20. Souetre E, Qing W, Penelaud PF. Economic analysis of the use of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in autologous bone marrow transplantation. *European Journal of Cancer*, 1996;32(7):1162-5.
21. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 1986;319(6052):415-418.
22. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, 1986;232(4746):61.
23. Hammerling U, Kroon R, Sjödin L. In vitro bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1995;13(1):9-20.
24. Lu H, Boone T, Souza L, Lai P. Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1989;268(1):81-92.
25. Codevilla CF, Barth T, Brum Júnior L, Fronza M, Dalmora SL. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2004;26:104-8.
26. Kuga T, Komatsu Y, Yamasaki M, Sekine S, Miyaji H, Nishi T, et al. Mutagenesis of human granulocyte colony stimulating factor. *Biochemical and biophysical research communications*, 1989;159(1):103.
27. U.S. Food and Drug Administration [homepage on the Internet]. Disponível em: [http:// www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov). [2009 jul 06].

28. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1316, de 23 de julho de 2002. Diário Oficial da União, 2002; jul 25.
29. Sheridan WP, Wolf M, Lusk J. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *The Lancet*, 1989;334(8668):891-5.
30. Garcia-Carbonero R, Mayordomo JI, Tornamira MV, Lopez-Brea M, Rueda A, Guillem V, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2001;93(1):31.
31. Harousseau J, Wu D. The use of GM-CSF and G-CSF in the treatment of acute leukemias. *Leukemia and Lymphoma*, 1995;18(5):405-12.
32. Balbiano R, Degioanni M, Valle M, Crivelli P, Bordino C, Mastinu A, et al., editors. Prevention of severe neutropenia in AIDS patients with intermittent, low-dose G-CSF (filgrastim). *International Conference on AIDS*, 1994;10:223 (abstract no. PB0323).
33. Hengge U, Brockmeyer N, Goos M. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in AIDS patients. *Journal of Molecular Medicine*, 1992;70(10):922-6.
34. Maset AL, Piron-Ruiz L, Greco OT, Lago M, Poloni AFC, Ruiz MA. O G-CSF na terapia do acidente vascular cerebral. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 2009;31(supl 1):104-11.
35. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001;12(2):195-201.
36. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999;10(5):411-21.
37. Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004;65(4):363-72.
38. Tan S, Wu W, Liu J, Kong Y, Pu Y, Yuan R. Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence. *Protein Expression and Purification*, 2002;25(3):430-6.
39. Sorensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2005;4(1):1.
40. Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004;64(5):625-35.
41. Biosimilars, Biogenerics and Follow-on Biologics. [homepage on the Internet]. Disponível em: http://www.scripnews.com/multimedia/archive/00000/BS1342_117a.pdf [2010 fev 25].
42. Fardelone LC, Branchi BA. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. *Revista da FAE*, 2006:29-38.
43. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria SAS nº 125 de 19 de abril de 2001. Altera a Tabela Descritiva do SIA/SUS estabelecida pela Portaria GM/MS nº 1230, de 14 de

outubro de 1999 no que diz respeito ao Grupo 36. Diário Oficial de União, 2001; 20 abr.

44.Ministério da Saúde [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude>. [2009 out 20].

45.Encarnação A, Almeida C, Brum P, Karele S. Projeto de uma planta para a produção de G-CSF recombinante [trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química)]. Rio de Janeiro (Brasil): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

46.Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

47.Ramos CRR, Abreu PAE, Nascimento A, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004;37:1103-9.

48.Beuken E, Vink C, Bruggeman CA. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. Biotechniques, 1998;24(5):748-50.

49.Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977;74(12):5463.

50.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 1976;72(1-2):248-54.

51.Fujii I, Nagahara Y, Yamasaki M, Yokoo Y, Itoh S, Hirayama N. Structure of KW-2228, a tailored human granulocyte colony-stimulating factor with enhanced biological activity and stability. FEBS letters, 1997;410(2-3):131-5.

52.Nagahara Y, Konishi N, Yokoo Y, Hirayama N. Crystallization and preliminary diffraction studies of recombinant human granulocyte-stimulating factor (KW2228). Journal of Molecular Biology, 1990;214(1):25-6.

53. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. Microbial Drug Resistance, 1997;3(4):401-8.

54.Cohen A, Hines D, Korach E, Ratzkin B. In vivo activation of neutrophil function in hamsters by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Infection and immunity, 1988;56(11):2861.

55.Chung BH, Sohn MJ, Oh SW, Park US, Poo H, Kim BS, et al. Overproduction of human granulocyte-colony stimulating factor fused to the PelB signal peptide in *Escherichia coli*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998;85(4):443-6.

56.Jeong KJ, Lee SY. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2001;23(2):311-8.

57.Rao D, Narasu M, Rao A. A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli* and its characterization. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2008;50:77-87.

- 58.Vanz ALS, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, et al. Human granulocyte colony stimulating factor(hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories*, 2008;7:13.
- 59.Kang SH, Na KH, Park JH, Park CII, Lee SY, Lee YI. High level expression and simple purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *E. coli*. *Biotechnology Letters*, 1995;17(7):687-92.
- 60.Yamasaki M, Konishi N, Yamaguchi K, Itoh S, Yokoo Y. Purification and characterization of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) derivatives: KW-2228 and other derivatives. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1998;62(8):1528-34.
- 61.Codevilla C, Barth T, Brum Júnior L, Fronza M, Dalmora S. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2004;26:104-8.