FARA AMELIA PRIMELLES EGUIA

Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante produzido em *Escherichia coli*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo

2018

FARA AMELIA PRIMELLES EGUIA

Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante produzido em *Escherichia coli*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

Coorientador: Dr. Enéas de Carvalho

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

PRIMELLES EGUIA, FARA AMELIA
Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante produzido em Escherichia coli / FARA AMELIA PRIMELLES EGUIA; orientador Viviane Maimoni Gonçalves ; coorientador Eneas Carvalho. -- São Paulo, 2018.
125 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. rhG-CSF. 2. estabilidade plasmidial. 3. meio de autoindução. 4. renaturação. 5. purificação. I. Maimoni Gonçalves , Viviane , orientador. II. Carvalho, Eneas, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

–

Candidato(a): Fara Amelia Primelles Eguia

Título da Tese: Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação da proteína rhG-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante) produzida em *Escherichia coli*

Orientador(a): Dra Viviane Maimoni Gonçalves

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Av Vital Brasil 1500 - Casa 82
05503-900 São Paulo SP
T +55 11 3723-2132
ceuaib@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br

butantan

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Expressão recombinante do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em Brevibacillus choshinesis e em E. colli", **protocolo nº 853/11**, sob a responsabilidade de Enéas de Carvalho, Viviane Maimoni Gonçalves e Fara Amélia Primelles Eguia – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 16/8/2017.

This is to certify that the proposal "Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rhG-CSF) expression inBrevibacillus choshinensis and *E. colli*", **protocol n° 853/11**, under the responsibility of Enéas de Carvalho, Viviane Maimoni Gonçalves and Fara Amélia Primelles Eguia – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 8/16/2017. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 10/1/2011 - 06/2018	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Biotecnologia Molecular I	Sem adição de animais	Prorrogação de vigência

São Paulo, 17 de agosto de 2017

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

A mis padres espectaculares y a mi hermano queridísimo,

mis tres mosqueteros...la luz de mi vida!

AGRADECIMIENTOS

A mi familia maravillosa a quien está dedicado este trabajo por todo su amor.

A Juanita y su familia que es también mía por todo el apoyo y la fuerza en estos años

A todos los buenos espíritus que han guiado mi camino hasta aquí, en especial Obdulia Castro quien confió en mi cuando daba mis primeros pasos de guerra.

A mis hermanos espirituales por siempre tener su mente positiva para este nuevo triunfo

A la maravillosa, incansable y optimista Viviane por todo su ayuda, suspicacia, paciencia y energía

A mis superamigos Mercedes, Daniel y Grettel, por estar en las buenas y las malas.

A mis colegas de Bioprocesos I y III, Camila, Stefanie, Douglas, Rafaela, Paola, Kadu, Felipe, Thiara por recibirme como una más de la tropa, por los buenos momentos compartidos (bolos, churrascos, casa en la playa), por toda la ayuda y por hacer mi estancia tan agradable.

A María Eugenia, Hugo y Lula por ofrecerme su casa, por hacer tan bueno esta etapa final y por demostrarme que aún existen personas increíbles.

A Fátima “amigucha”, Pedro “o amigo do cara”, y Máximo “marquinho o fura greve”, por los chistes, las carcajadas, las conversaciones y por los desayuno que compartimos.

A Joaquín por todo su conocimiento, las sugerencias y las historias interesantes.

A los meninos Sergio, Felipe, Marcela y Luciano por la compañía en estos últimos tiempos.

A Rodrigo y Claudia por su colaboración con reactivos y medidas de HPLC

A Eneas e o Henrique por ofrecer la construcción utilizada en este trabajo, los ensayos de dicroismo y sus conocimientos

A Celia, por su colaboración durante el ensayo en animales

A la profesora Primavera Borelli y Edson Makiyama por la gran ayuda durante el procesamiento de muestras para el ensayo biológico.

A CAPES por el apoyo financiero.

La Fé mueve montañas

La verdadera Fé es la vida y la acción

RESUMO

Eguia, FAP. **Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante produzido em *Escherichia coli.*** 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Os neutrófilos são glóbulos brancos do sangue e primeira linha de defesa contra as bactérias. A proliferação destas células é principalmente controlada pelo Fator Estimulador de Colônia de Granulócito (G-CSF). O G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) é um medicamento amplamente utilizado para tratar a neutropenia, condição caracterizada pela contagem de neutrófilos abaixo de 1.500/mm^3. O rhG-CSF já foi obtido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em *E. coli* como corpos de inclusão (CI), reportando-se instabilidade do plasmídeo e baixo rendimento. Neste trabalho, o plasmídeo pARKAN-I foi avaliado para produzir rhG-CSF em *E. coli* e viabilizar sua obtenção em biorreator. Esse vetor carrega a sequência pAR, inserida para aumentar sua estabilidade. *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS transformada com pARKAN-I/rhG-CSF foi cultivada em frascos agitados para avaliação da estabilidade do plasmídeo em meios complexos (2YT e de autoindução) e quimicamente definido (HDF). Avaliou-se a influência de indutores (IPTG e lactose), glicose e antibióticos sobre a estabilidade plasmidial. A fim de se obter material para purificação, foram realizados cultivos em biorreator com meio de autoindução sem antibióticos em modo batelada e HDF com antibióticos em modo batelada alimentada, a 30ºC, 30% de oxigênio e pH 6,8. As etapas de purificação incluíram: lise em homogeneizador contínuo de alta pressão, lavagens, solubilização e renaturação dos CI, e cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose. Avaliaram-se três métodos de renaturação: diafiltração, diálise e diluição. A estabilidade do plasmídeo foi avaliada pela percentagem de colônias obtidas em placas de LB-ágar com antibiótico em relação às colônias que cresceram nas placas de LB-ágar sem antibiótico. A identidade proteica foi determinada por SDS-PAGE e Western Blotting. A pureza relativa e a produção específica do rhG-CSF foram determinadas por densitometria das bandas da eletroforese. A quantificação proteica foi feita pelo método do ácido bicinconínico. Nos cultivos em frascos com meio 2YT sem glicose, o crescimento foi mais lento, porém a fase exponencial mais prolongada, alcançando concentração celular (Cx) mais elevada (2,56 g/L) do que as culturas com glicose (Cx≈1,35 g/L), que cresceram mais rápido e chegaram primeiro à fase estacionária. O cultivo com meio de autoindução proporcionou crescimento similar ao do meio 2YT sem glicose. Em meio HDF, os cultivos tiveram o crescimento mais lento e menor Cx (0,94 g/L). Os meios 2YT e de autoindução mostraram 100% de colônias resistentes à canamicina antes e após indução, exceto o 2YT sem antibiótico e sem glicose, com 97,5% e 94,1% após 6 e 8 h de indução, respectivamente, coincidindo com a maior produção de rhG-CSF. Em frascos, o meio HDF com antibiótico teve 93% de colônias resistentes antes da indução dos cultivos em frascos, diminuindo até 85% após 4 h de indução, com baixa produção do rhG-CSF, verificada apenas por Western Blotting. Os cultivos em biorreator mostraram baixa velocidade específica de crescimento (0,30 h^{-1}), porém elevada Cx e produção de rhG-CSF, sendo superior no meio de autoindução, que também resultou mais barato do que o HDF. O método de diluição em tampão tris 20 mM pH 8,0 com EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1% e glicerol 10% apresentou maior percentagem de renaturação. Foi estabelecido um processo de purificação que permitiu obter rhG-CSF com 87% de pureza, integridade estrutural e atividade biológica. O plasmídeo pARKAN-I, vetor sem restrições de propriedade intelectual e proteção de patente, mostrou alta estabilidade nos meios complexos avaliados, tanto em frasco como em biorreator, permitindo produzir rhG-CSF em larga escala sem adição de antibióticos ao meio de cultura, o que reduziu o custo do processo de obtenção.

Palavras chaves: rhG-CSF, estabilidade plasmidial, meio de autoindução, cultivo em biorreator, renaturação, purificação

ABSTRACT

Eguia, FAP. **Development of a technology to produce and purify the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli.*** 2018. 125 f. Thesis (Ph. D. Thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Neutrophils are white blood cells and part of the first line of defense against bacteria. The proliferation of these cells is mainly controlled by the Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF). Recombinant human G-CSF (rhG-CSF) is widely used to treat neutropenia, condition characterized by a neutrophil count below 1,500/ mm^3. The rhG-CSF was already obtained at the Biotechnology Center of the Butantan Institute in *E. coli* as inclusion bodies (IB), but plasmid instability and low yield were reported. In this work, the plasmid pARKAN-I was evaluated to produce rhG-CSF in *E. coli* and enable the bioreactor production. This vector carries a pAR sequence, inserted to increase its stability. *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS transformed with pARKAN-I / rhG-CSF was grown in shaken flasks to evaluate the plasmid stability in complex (2YT and autoinduction) and chemically defined (HDF) media. Also, the influence of inducers (IPTG and lactose), the addition of glucose and the presence of antibiotics on the plasmid stability were evaluated. In order to obtain material for rhG-CSF purification, a batch culture with autoinduction medium without antibiotic and fed-batch culture HDF medium with antibiotic were performance in bioreactor at 30º C, 30% oxygen and pH 6.8. The purification steps included: lysis in high pressure continuous homogenizer, wash, solubilization and refolding of IB and cation exchange chromatography in SP-Sepharose. Three refolding methods were evaluated: diafiltration, dialysis and dilution. Plasmid stability was evaluated by the percentage of colonies on LB-agar plates with antibiotic in relation to the colonies that grew on LB-agar plates without antibiotics. Protein identity was determined by SDS-PAGE and Western Blotting. Relative purity and specific production of rhG-CSF were determined by densitometry of SDS-PAGE bands. Protein quantification was performed by the bicinchoninic acid method. In shaken flask cultures with 2YT medium without glucose, the growth was slower, but the exponential phase was longer, reaching higher cell concentration (Cx=2.56 g/L) than the cultures in 2YT medium with glucose (Cx≈1.35 g/L), which grew faster and reached the stationary phase earlier. Cultures with autoinduction medium provided similar growth to the 2YT medium without glucose. Cultures with HDF medium displayed slower growth and lower Cx (0.94 g/L). Shaken flask cultures with 2YT and autoinduction media showed 100% of kanamycin resistant colonies before and after induction, except for 2YT without antibiotic and without glucose, which presented 97.5% and 94.1% of kanamycin resistant colonies after 6 and 8 h of induction, respectively, despite being the medium with higher production of rhG-CSF. In flasks, HDF medium with antibiotic presented 93% of kanamycin resistant colonies before induction, decreasing to 85% after 4 h of induction, the rhG-CSF production was very low, and could be verified only by Western Blotting. Bioreactor cultivations showed low specific growth rate (0.30 h^{-1}), but high cell density and recombinant protein production. The rhG-CSF production was higher in autoinduction medium, which was cheaper than HDF. The dilution method using 20 mM tris buffer pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 and 10% glycerol showed the highest percentage of refolding. A purification process was established and allowed to obtain rhG-CSF with 87% purity, structural integrity and biological activity. The expression vector pARKAN-I, which is free of intellectual property and patent protection, showed high plasmid stability in the complex media evaluated in flask and bioreactor and allowed to produce rhG-CSF in large scale without addition of antibiotics to the culture medium, reducing the cost of the production process.

Keywords: rhG-CSF, plasmid stability, auto-induction medium, bioreactor cultivation, refolding, purification

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Amp- ampicilina

BPF- boas práticas de fabricação

BSA- albumina do soro bovino

CADC- cultivos de alta densidade celular

CI- corpo de inclusão

CFU- unidades formadoras de colônias

Clo- cloranfenicol

ClpP- protease da família CLP produzida em *Streptococcus pneumoniae*

CSFs- fatores estimuladores de colônia

C_{sob}- concentração proteica no sobrenadante resultante depois de centrifugar o material renaturado (mg/mL)

C_{solub}- concentração proteica no material solubilizado em ureia 8 M (mg/mL)

C_X- concentração celular seca em dado instante do cultivo (g/L)

C_{X0}- concentração celular seca no início do cultivo (g/L)

C_{Xi}- concentração celular seca no início da alimentação (g/L)

DO- densidade ótica a 600nm

DNA- ácido desoxirribonucleico

EDTA- ácido etilenodiamina tetracético

G-CSF- fator estimulador de colônia de granulócito

HCT- hematócrito

HGB- hemoglobina

HPLC- Cromatografia Liquida de Alta Resolução

IMAC- cromatografia de afinidade por metais imobilizados

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IPTG- isopropil-ß-D-tiogalactopiranosídeo

Kan- canamicina

LB-ágar- meio semissólido Luria Bertani com ágar

LPS- lipopolissacarídeo (pirogênio)

m- coeficiente de manutenção celular ($g_{células}/g_{substrato\ consumido}.h$)

MCH- hemoglobina globular média

MCHC- concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV- volume médio das plaquetas

MCS- sítio múltiplo de clonagem

NF- neutropenia febril

PBS- solução salina tamponada com fosfato

PBS-T- PBS contendo Tween 20 a 0,1%(v/v)

pI- ponto isoelétrico

pAR- sequência pAR

PLT- plaquetas

OMS- Organização Mundial da Saúde

PMSF- fluoreto de fenilmetilsulfonil

PspA4Pro- fragmento clonado de PspA de clado 4 contendo a primeira porção da região rica em prolinas

RBC- glóbulos vermelhos do sangue

rhG-CSF- fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante

rpm- rotações por minuto

S- concentração de substrato no meio de cultivo (g/L)

S_0- concentração de substrato no início do cultivo (g/L)

S_f- concentração de substrato no meio de alimentação (g/L)

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio, da sigla em inglês

SpaA- Proteína A de superfície do *Streptomyces coelicolor*

SUS- Sistema Único de Saúde

T.A.4x- tampão de amostra para SDS-PAGE 4 vezes concentrado

t- tempo de cultivo (h)

t_i- tempo de cultivo no início da alimentação (h)

V_i- volume de meio no biorreator no início da alimentação (L)

V_{sob}- volume do sobrenadante resultante depois de centrifugar o material renaturado (mL)

V_{solub}- volume do material solubilizado em ureia 8 M (mL)

vvm- volume de ar por volume de meio por minuto

WBC- glóbulos brancos do sangue

$Y_{CX/S}$- fator de conversão de substrato a células ($g_{células}/g_{substrato\ consumido}$)

μ- velocidade específica de crescimento (h^{-1})

μ_{max}- velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})

μ_{set}- velocidade específica de crescimento imposta na fase de alimentação dos cultivos em modo batelada alimentada (h^{-1})

μ_{alim}- velocidade específica de crescimento calculada durante a fase de alimentação dos cultivos em modo batelada alimentada (h^{-1})

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Sequência de aminoácidos do hG-CSF. Duas ligações dissulfeto (S-S). Segmentos em α-hélice e segmentos em folhas-β (Lu et al., 1989)..... 25
Figura 2 Estrutura tridimensional do hG-CSF (Hill, 1993) 26
Figura 3 Diferenciação celular a partir das células-tronco pluripotentes (Encarnação, 2005). Os pontos de atuação do G-CSF são destacados em amarelo..... 27
Figura 4: Sistema de controle do operon lac (Fonte: página da internet (http://www.abcdamedicina.com.br/regulacao-da-expressao-genetica-transcricao-e-traducao-rna-operons.html) acessada em 20/11/ 2017..... 34
Figura 5 Mecanismo de estabilização do Tipo II indicando os componentes da sequência *par* que atuam durante a divisão celular para repartir os plasmídeos entre as células filhas, onde Par M é a proteína motora, Par R, a proteína de ligação ao centrômero e *par* C o sítio de partição (Brooks e Hwang, 2017). 37
Figura 6 Plasmídeo pARKAN-I construído no Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan: pMB1ori: origem de replicação, par: gene da sequência pAR, lac I: gene do repressor Lac I, P T7: promotor do fago T7; Lac Op: sítio operador do operon lac; RBS: sítio de ligação com o ribossomo; 6XHis: sequência da fusão com cauda de 6 histidinas na porção N-terminal da proteína; MCS: sítio multiclonagem; T7 Term: sequência de terminação do fago T7; Kan R: gene de resistência à canamicina (Eguia et al. 2018)..... 39
Figura 7 Esquema geral dos experimentos feitos para obtenção do rhG-CSF a partir de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF. 1) cultivo a partir de pré-inóculo semeado com colônia isolada em meio M9-ágar incubado por 16 h; 2) cultivo inoculado com lote de trabalho em HDF, para avaliação da estabilidade do plasmídeo; 3) três cultivos inoculados com o estoque em HDF e induzidos com 0,1 mM de IPTG e 30 °C. 47
Figura 9 Curvas de crescimento da avaliação do volume do lote de trabalho (25, 50 e 100 µL) de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) para inocular diretamente 100 mL de meio para cultivos em frascos agitados 61
Figura 10 Curvas de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF). Culturas induzidas (linha tracejada) e não induzidas (linha sólida) em meio 2YT, com antibiótico: (A) sem glicose (B) com glicose. As flechas indicam o momento da adição de IPTG 1 mM. Média e desvio de 3 experimentos independentes..... 62
Figura 11 Curvas de crescimento de E. coli BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio 2YT: I com antibiótico e glicose; II com antibiótico sem glicose; III sem antibiótico e com glicose; IV sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes. A seta indica o momento da adição de IPTG 1mM. 63
Figura 12 Estabilidade do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF calculada antes e após indução dos cultivos de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I) com antibiótico e glicose; II) com antibiótico sem glicose; III) sem antibiótico e com glicose; IV) sem antibiótico e glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes..... 64
Figura 13 Western Blotting das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLys S (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT com (canaletas 1 e 2) ou sem antibiótico (canaletas

3 e 4), antes (canaletas 1 e 3) e após 4 h de indução (canaletas 2 e 4); (5) rhG-CSF purificada como controle positivo. 65

Figura 14 SDS-PAGE (gel 15 %) corado com azul de Coomassie das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT **com antibiótico** às 4 h de indução, dissolvidas em: (2) ureia 8 M e (3) tampão da amostra; (1) padrão de peso molecular. 66

Figura 15 SDS-PAGE (géis 15 %) corados com azul de Coomassie das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT para produção de rhG-CSF com **(A)** e sem **(B)** antibióticos. (1) padrão de peso molecular, (2-6) sem glicose; (7-11) com glicose. (2 e 7) amostras não induzidas; (3 e 8) 2 h indução; (4 e 9) 4 h indução; (5 e 10) 6 h indução; (6 e 11) 8 h indução. 67

Figura 16 Percentagem relativa da banda de rhG-CSF em relação à soma da intensidade das outras bandas de proteínas em SDS-PAGE, nas amostras não induzidas e induzidas de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I) com antibiótico e glicose; II) com antibiótico sem glicose; III) sem antibiótico e com glicose; IV) sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes 68

Figura 17 Produção específica do rhG-CSF dada pela intensidade das bandas em SDS-PAGE pela DO do cultivo nas amostras induzidas e não induzidas de E. coli Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I com antibiótico e glicose; II com antibiótico sem glicose; III sem antibiótico e com glicose; IV sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes. 69

Figura 18 Curvas de crescimento dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio de autoindução. Em amarelo (NI): meio sem acréscimo de lactose; cinza: meio com pulso de 5 g/L de lactose; azul: meio com lactose desde o início, meia e desvio de três experimentos independentes. A seta indica o momento da adição de lactose. 71

Figura 19 SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B) das amostras dos cultivos em frascos de E. coli BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio de autoindução com pulso de lactose. A: P) padrão de massa molecular; 1) não induzida; 2-5) amostras das 1, 2, 3, 4 h depois de adicionar a lactose. B: 1) controle positivo rhG-CSF purificado (2-5) 4, 3, 2 e 1 h após a indução. 72

Figura 21 Curvas de crescimento dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo no experimento 3. Média e desvio de três cultivos induzidos com 0,1 mM IPTG a 30°C e um quarto cultivo não induzido (NI) como controle. A seta indica o momento da adição de IPTG 0,1 mM e da diminuição da temperatura de 37 °C até 30 °C. 78

Figura 22: Estabilidade do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF no experimento 3 calculada antes e após indução a 30 °C representando o comportamento dos cultivos em frascos de E. coli BL21(DE3) STAR pLysS em meio HDF-Kan/Clo. 79

Figura 23 Membrana corada com Ponceau S e Western Blotting das amostras dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo: 1) não induzida; 2-5) 1, 2, 3 e 4 h após a indução com IPTG 0,1 mM a 30 °C; (+) controle positivo rhG-CSF purificado; (p) padrão de massa molecular. 80

Figura 24 Curvas de crescimento dos cultivos em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C em meio autoindução sem antibiótico. 81

Figura 25 Curvas de consumo de glicerol, glicose e lactose ao longo do segundo cultivo em biorreator de E. coli BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C com meio autoindução sem antibiótico. 82
Figura 26 SDS-PAGE (superior) e Western Blotting (inferior) das amostras do cultivo no biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C com meio de autoindução sem antibiótico. P) padrão de massa molecular; 18-31) amostras de 18 h e de 25 a 31 h de cultivo; (+) controle positivo rhG-CSF purificado. 82
Figura 28: Curvas de consumo de glicerol, lactose e geração de ácido acético ao longo dos cultivos em biorreator de E. coli BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) com HDF/Kan em batelada (b) e batelada alimentada (ba)..... 85
Figura 30 Análise por eletroforese (A) e Western Blotting (B) das etapas iniciais de purificação do rhG-CSF insolúvel partir dos corpos de inclusão (CI). P) padrão de massa molecular (LMW); L) homogenato; 1) sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato; 2, 3, 4, 5) sobrenadantes obtidos após a lavagem dos CI com 1, 2, 3 e 4 M de ureia, respectivamente; 6) sobrenadante após solubilização dos CI com ureia 8 M; (+) controle positivo rhG-CSF purificado. Todas as mostras foram aplicadas para que houvesse 15 µg de proteína total no gel..... 88
Figura 31 Análise por eletroforese (A) e Western Blotting (B), das frações coletadas na cromatografia por SP-Sepharose a partir dos sobrenadantes obtidos na renaturação por diálise e diafiltração. P) marcador utilizado (LMW); 1) controle positivo do rhG-CSF; 2) material de entrada na coluna; 3) fração não-absorvida; 4-7) frações de eluição em tampão acetato 20 mM pH 4,5 com NaCl 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, respectivamente; 8) fração de eluição em tampão Tris 10 mM pH 8,0 com NaCl 500 mM..... 90
Figura 32 Análise por eletroforese das amostras dos sobrenadantes (A) e *pellets* (B) obtidos depois da renaturação por diálise de amostras com diferentes concentrações proteicas. P) padrão de massa molecular (LMW); 1-6) amostras das concentrações 0,378; 0,189; 0,094; 0,047; 0,023 e 0,011 mg/mL, respectivamente..... 91
Figura 33 Percentagem de renaturação em função da concentração de proteína nas amostras durante a renaturação do rhG-CSF por diálise. 91
Figura 34 Análise por eletroforese da renaturação por diluição em tampão com arginina e da cromatografia em SP-Sepharose. P) padrão de massa molecular; 1) controle positivo do rhG-CSF; 2) material de entrada na coluna; 3) fração não-absorvida; 4-8) proteína eluída em tampão pH 8,0, NaCl 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, respectivamente; 9) fração de limpeza com 0,1 M de NaOH. 93
Figura 35 Análise por eletroforese dos *pellets* e sobrenadantes resultantes depois de ajustar o pH do material renaturado para 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5; e o *pellet* depois de centrifugar o renaturado. P) padrão de massa molecular; (1, 3, 6, 8, 10) *pellets* e (2, 4, 7, 9, 11) sobrenadantes; 5) *pellet* depois de centrifugar o renaturado..... 94
Figura 36: Cromatograma mostrando a fração não-adsorvida da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose realizada com cinco diferentes valores de pH na entrada da coluna, 4,5 ---; 4,7---; 5,0---; 5,2 ---e 5,5---. 95
Figura 38: Eletroforese das frações da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose para avaliação da eluição do rhG-CSF em diferentes pH. P) padrão de massa molecular, 1) entrada a pH 5,0, 2) fração não adsorvida, 3) reequilíbrio, 4) eluição a pH 5,0, 5) eluição

a pH 6,0, 6) primeiro pico da eluição a pH 7,0, 7) segundo pico da eluição pH a 7,0, 8) eluição a pH 8,0. Todas as frações de eluição contêm 100 mM de NaCl. 98

Figura 39: Esquema geral de purificação definido para rhG-CSF a partir dos resultados obtidos. 99

Figura 40: Análise por eletroforese das etapas iniciais de purificação do rhG-CSF insolúvel partir dos corpos de inclusão (CI) do meio HDF em batelada alimentada. P) padrão de massa molecular (LMW); L) homogenato; 1) sobrenadante obtido após centrifugação do lisado celular; 2, 3, 4) sobrenadantes obtidos após a lavagem dos CI com 1, 2 e 3 M de ureia, respectivamente; 5) sobrenadante após solubilização dos CI com ureia 8 M; 6) sobrenadante após a renaturação; 7) sobrenadante após o ajuste de pH 5,0. 100

Figura 41: Espectros de dicroísmo circular. Curvas obtidas por espectrofotometria com luz polarizada do rhG-CSF purificado a partir do meio de autoindução (curva azul) e do meio HDF em batelada alimentada (curva vermelha). 103

Figura 42: Análise de deconvolução realizada nos espectros de dicroísmo circular do rhG-CSF purificado a partir dos meios de cultura de autoindução (azul) e HDF (vermelho). 104

Figura 43: Resultados da (A) concentração das células brancas no sangue (WBC) e (B) porcentagem de neutrófilos nos 4 grupos experimentais indicados nas abscissas (n=8 em cada grupo). A significância estatística analisada por One Way ANOVA, teste Dummet, está indicada pelo asterisco: * p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Alguns dos produtos no mercado mundial para tratar a neutropenia baseados no rhG-CSF 28
Tabela 2 Produtos biossimilares do Filgrastim comercializados no Brasil 29
Tabela 3 Composição do meio LB-ágar (De Spiegeleer et al., 2004) 43
Tabela 4 Composição do meio complexo 2YT 43
Tabela 5 Composição do meio complexo de "autoindução" 44
Tabela 6 Composição do meio quimicamente definido HDF 45
Tabela 7. Composição do meio M9-ágar 45
Tabela 8: Variantes do meio de cultura 2YT utilizados para cultivo de E. coli BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) 46
Tabela 9: Esquema de administração usado no ensaio *in vivo* para avaliação da atividade biológica do rhGCSF purificado 59
Tabela 10: Avaliação do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLys S (pARKAN-I/rhG-CSF) armazenado em meio LB-Kan/Clo 60
Tabela 11: Média dos parâmetros avaliados durante o cultivo de E. coli BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio 2YT, com e sem antibiótico e com e sem glicose 63
Tabela 12 Parâmetros determinados durante o cultivo em frascos de E. coli BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio complexo de autoindução, com pulso de lactose, lactose desde o início do cultivo e sem adição de lactose 72
Tabela 13 Avaliação do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLYS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo 75
Tabela 14: Comparação da produção de rhG-CSF nos cultivos em biorreator estimada a partir da análise do homogenato 87
Tabela 15: Comparação das etapas de purificação do rhG-CSF a partir da biomassa dos cultivos em meio de autoindução e HDF em batelada alimentada. 100
Tabela 16: Preços correspondentes às quantidades de cada componente dos meios avaliados em biorreator para a produção do rhG-CSF 102
Tabela 17: Resultados das leituras dos parâmetros do sangue coletado nos 4 grupos experimentais, utilizando o modelo de neutropenia induzida. 105
Tabela 18: Estabilidade de construções utilizadas em cultivos com meio complexo de E. coli recombinante em frascos agitados e biorreator 109
Tabela 19: Comparação das percentagens de renaturação do rhG-CSF pelos métodos utilizados neste trabalho 110

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Velocidade específica de crescimento celular 50

Equação 2- Fator de conversão $Y_{x/s}$ 50

Equação 3- Vazão de alimentação 50

Equação 4- Percentagem de renaturação 53

Equação 5- Percentagem relativa 56

Equação 6- Produção específica do rhG-CSF 56

Equação 7- Concentração do rhG-CSF 57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÂO E JUSTIFICATIVA 23

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25

2.1 O Fator Estimulador de Colônias de Granulócito (G-CSF) **25**

2.2 O rhG-CSF no mercado mundial **27**

2.3 Incidência da neutropenia no Brasil e tratamento com rhG-CSF **29**

2.4 Cultivos de microrganismos recombinantes para produzir rhG-CSF **31**
2.4.1 Meios de cultura utilizados em cultivos de *E. coli* recombinante 31
2.4.2 Cultivos de alta densidade celular (CADC) 32

2.5 Expressão de genes heterólogos utilizando o sistema do operon *lac* **33**

2.6 Estabilidade dos plasmídeos e o sistema de partição *par* **35**

2.7 Obtenção do rhG-CSF a partir de *E. coli* **38**

2.8 Purificação de rhG-CSF **39**

3 OBJETIVOS 42

4 MATERIAIS E METODOS 43

4.1 Microrganismo **43**

4.2 Meios de cultura **43**

4.3 Preparo do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I /rhG-CSF) **45**

4.4 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio complexo 2YT **46**

4.5 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio complexo de "autoindução" **47**

4.6 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio HDF **47**

4.7 Cultivos em biorreator **48**
4.7.1 Meio complexo de "autoindução" 48
4.7.2 Meio quimicamente definido HDF 49
4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos 49

4.8 Purificação do rhG-CSF a partir da massa bacteriana obtida nos cultivos em biorreator **50**
4.8.1 Renaturação por diafiltração 52
4.8.2 Renaturação por diálise 52
4.8.3 Renaturação por diluição direta 52
4.8.4 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diálise e diafiltração 53

4.8.5 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diluição direta no tampão com arginina 53
4.8.7 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diluição direta em tampão sem arginina 54

4.9 Métodos analíticos 54
4.9.1 Determinação da concentração celular 54
4.9.2 Determinação do pH 55
4.9.3 Determinação da estabilidade do plasmídeo 55
4.9.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 55
4.9.5 Identificação do rhG-CSF por Western Blotting 56
4.9.6 Determinação da pureza do rhG-CSF por densitometria 56
4.9.7 Determinação da concentração das fontes de carbono e da formação de acetato nos cultivos em biorreator 57
4.9.8 Quantificação da concentração proteica pelo método do ácido bicinconínico 57
4.9.9 Dicroísmo circular 57

4.10 Ensaio da atividade biológica do rhG-CSF 57

5 RESULTADOS 60

5.1 Avaliação do lote de trabalho em meio LB 60

5.2 Cultivos em frascos agitados em meio complexo 2YT 61
5.2.1 Estabilidade do plasmídeo 64
5.2.2 Western Blotting 65
5.2.3 Ensaio de solubilidade das amostras para eletroforese 65
5.2.4 Avaliação da produção de rhG-CSF com o vetor pARKAN-I por SDS- PAGE 66
5.2.4.1. Percentagem relativa da banda do rhG-CSF. 68
5.2.4.2. Produção específica do rhG-CSF 68

5.3 Cultivos em frascos em meio complexo de autoindução 70

5.4 Cultivos em meio definido HDF na presença de antibióticos 74
5.4.1 Preparo do lote de trabalho em HDF 74
5.4.2 Experimento 1 em meio HDF 75
5.4.3 Experimento 2 em meio HDF 76
5.4.4 Experimento 3 em meio HDF 77

5.5 Cultivos em biorreator 80
5.5.1 Meio autoindução 80
5.5.2 Batelada e batelada alimentada e meio HDF 83

5.6 Purificação do rhG-CSF a partir dos cultivos realizados em biorreator 86
5.6.1 Obtenção dos corpúsculos de inclusão (CI) 86
5.6.2 Lavagem e Solubilização dos CI 87
5.6.3 Renaturação dos CI por diafiltração 88
5.6.4 Renaturação dos CI por diálise 89
5.6.5 Cromatografia em SP-Sepharose do pool dos sobrenadantes da diafiltração e diálise 89
5.6.6 Avaliação da percentagem de renaturação em função da concentração proteica 90
5.6.7 Renaturação por diluição utilizando tampão com arginina 92
5.6.8 Cromatografia em SP-Sepharose do material renaturado em tampão com arginina 92
5.6.9 Renaturação por diluição utilizando tampão sem arginina 93
5.6.10 Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do material renaturado em tampão sem arginina 94
5.6.11 Avaliação de diferentes pH para eluição de rhG-CSF da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose 97

5.7 Comparação dos processos de purificação de rhG-CSF a partir da biomassa dos cultivos em meio de autoindução e HDF **99**

5.8 Caracterização do rhG-CSF purificado por Dicroísmo Circular **103**

5.9 Ensaio *in vivo* da atividade biológica do rhG-CSF **104**

6 DISCUSSÃO 107

7 CONCLUSÕES 114

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 116

1 INTRODUÇÂO E JUSTIFICATIVA

Os neutrófilos são glóbulos brancos do sangue definidos como a primeira linha inata de defesa contra as bactérias, por isso precisam ser renovados continuamente no organismo. A proliferação destas células é principalmente controlada pelo Fator Estimulador de Colônia de Granulócito (G-CSF), molécula que controla a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. A neutropenia (adquirida ou congênita) é uma doença na qual ocorre diminuição dos neutrófilos no sangue a valores inferiores a 1.500/mm^3. A neutropenia adquirida pode ser causada por quimioterapia, radioterapia ou pelo uso de medicamentos. A associação de neutropenia e infecções, conhecida como neutropenia febril, continua sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer que recebem quimioterapia.

O G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) é um produto biotecnológico disponível no mercado mundial, sendo uma das proteínas recombinantes mais usadas com propósito clínico na neutropenia. O tratamento de pacientes com câncer e neutropenia febril inclui internação hospitalar para terapia com antibióticos e o uso do rhG-CSF reduz o tempo e os gastos com internação e antibiótico-terapia, por isso este medicamento encontra-se na lista de medicamentos excepcionais do Programa de Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde (SUS) (Welte *et al*. 1996; Hubel e Engert 2003).

A forma não glicosilada de rhG-CSF produzida em *Escherichia coli* com sequência de aminoácidos idêntica à humana recebeu o nome genérico de Filgrastim. No final de 2015, o Ministério da Saúde anunciou um acordo de transferência de tecnologia para que o biossimilar do Filgrastim desenvolvido pela Eurofarma com o nome de Fiprima fosse produzido pela Fiocruz. Atualmente, Filgrastim e biossimilares são comercializados no Brasil pelos laboratórios Biosintética/Aché (Filgrastim), Blau Farmacêutica (Filgrastine), Amgen (Granulokine), Teva (Tevagrastim), Dr Reddy's (Granomax) e Bergamo (Myograf). Entretanto, a matéria-prima desses produtos não é produzida no Brasil, de acordo com as bulas o rhG-CSF é importado, provavelmente a granel, formulado e distribuído pelos laboratórios citados. Filgrastim é produzido por BioSidus S.A., Argentina, Granulokine por F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suíça, Tevagrastim por Lemery S.A., México, Granomax por Dr. Reddy's Laboratories Ltd, Índia, e Myograf por Xiamen Amoytop Biotech Co, China. A única exceção, além do Fiprima, parece ser o medicamento Filgrastine da Blau, porém como a empresa tem várias sucursais pelo mundo, não está claro em qual delas o produto é realmente fabricado. Dessa forma, apesar da existência dos produtos nacionais, os gastos do Brasil com

a importação do rhG-CSF seguem elevados, onerando o sistema de saúde, que distribui gratuitamente o Filgrastim.

A variante do rhG-CSF chamada Nartograstim, ainda não disponível no Brasil, tem cinco aminoácidos substituídos na região N-terminal, o que aumenta a atividade específica, estabilidade estrutural e a meia-vida da molécula. Ela foi clonada em *Escherichia coli* e produzida em frascos agitados no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan na forma de corpúsculos de inclusão (CI). Após purificar e renaturar os CI, o rhG-CSF purificado mostrou atividade biológica similar ao Granulokine (Gomes et al., 2012), porém o vetor utilizado para expressão do gene do rhG-CSF, plasmídeo pAE-6His, se mostrou instável para produção de proteínas recombinantes em cultivos de maior densidade celular (Silva et al., 2007). Para produzir uma proteína recombinante é necessário um plasmídeo estável, que permita alcançar elevada concentração da proteína de interesse, por essa razão o pAE-6His não é adequado para cultivos em biorreator. Portanto, foi construído o novo vetor de expressão, pARKAN-I, que contém uma sequência *par* para garantir a partição dos plasmídeos para as células filhas e portanto sua estabilidade (Li et al., 2005; Ptacin et al., 2010) e permitir assim a produção de proteínas recombinantes em cultivos de *E. coli* em biorreator.

Pelo papel primordial do rhG-CSF no tratamento da neutropenia e na prevenção das complicações clínicas do tratamento do câncer, além da redução dos gastos governamentais com o fornecimento gratuito desses medicamento, é de grande importância estabelecer um processo de produção nacional para obter rhG-CSF em larga escala. Além disso, a produção da variante Nartograstim visa oferecer uma alternativa terapêutica promissora ao Filgrastim, uma vez que suas características físico-químicas poderiam reduzir a dose e o tempo de tratamento da neutropenia febril. Para alcançar este propósito, além de um plasmídeo estável que garanta a síntese da proteína alvo, é necessário selecionar o meio de cultura e as condições de cultivo em biorreator, estabelecer um processo de purificação adequado e avaliar a atividade biológica da proteína purificada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Fator Estimulador de Colônias de Granulócito (G-CSF)

O Fator Estimulador de Colônia de Granulócito (G-CSF) é uma molécula monomérica composta por 174 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 18,8 kDa, pertencente à família da interleucina 6 (IL-6). A molécula contém duas ligações dissulfeto (Cys36, 42 e Cys64, 74), uma cisteína livre reduzida (SH) na posição 17 e dois resíduos de triptofano nas posições 58 e 118 (Lu et al., 1992). Seu ponto isoelétrico (pI) é 6,1 (Jevsevar et al., 2005). A estrutura secundária da molécula contém aproximadamente 69% de α-hélice, 4% de folha-β, 5% de curva-beta (Figura 1). Porém outros autores reportaram 84 % (Gomes et al., 2012) e 86 % de α-hélice (Venkata et al., 2015c).

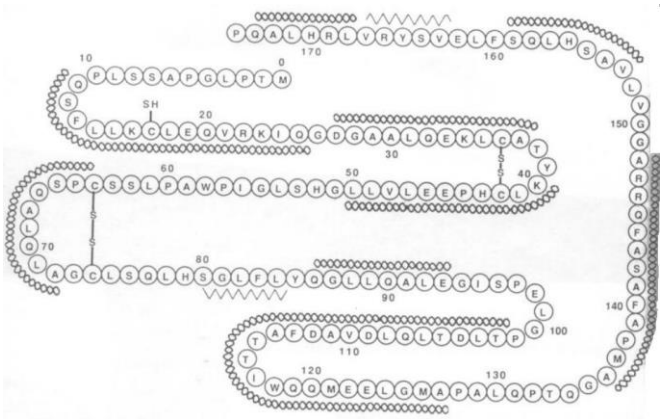

Figura 1 Sequência de aminoácidos do hG-CSF. Duas ligações dissulfeto (S-S). Segmentos em α- hélice e segmentos em folhas-β (Lu et al., 1989).

A estrutura tridimensional, determinada por cristalografia de raios-X, é composta por quatro hélices: A, B, C e D (Figura 2). A hélice A, forma-se entre os resíduos 11-39, a B entre 71-91, a C entre 100-123 e a D entre 143-172.

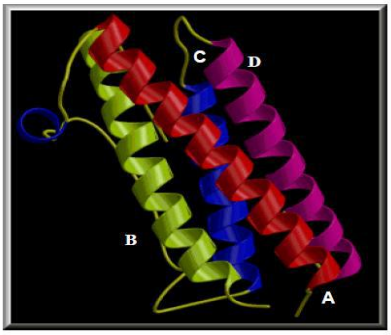

Figura 2 Estrutura tridimensional do hG-CSF (Hill, 1993)

O G-CSF pertence ao grupo dos fatores estimuladores de colônia (CSFs) que controlam a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. O fator G-CSF humano (hG-CSF) estimula e regula a proliferação, sobrevivência, nível e diferenciação dos neutrófilos (Clark and Kamen, 1987).

Os neutrófilos são glóbulos brancos do sangue definidos como a primeira linha inata de defesa contra as bactérias e que precisam ser renovados continuamente no sangue do organismo. Se diferenciam na medula óssea , circulam no sangue de oito a doze horas e entram nos tecidos onde podem funcionar entre dois e cinco dias antes de morrer (Li et al., 2002).

A diferenciação celular começa nas células-tronco pluripotentes, as quais originam os principais tipos de células do sistema imune: células da linhagem mielóide e linfóide. A linhagem linfóide origina as células T e B. As células da linhagem mielóide diferenciam-se gerando mais células progenitoras conhecidas como Unidades Formadoras de Colônia (CFU). Essas CFUs diferenciam-se em: monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e granulócitos sob a influência dos CSFs (Figura 3). O hG-CSF atua na geração dos mieloblastos a partir das CFU e daí surgem os mielócitos que originam os neutrófilos. O hG-CSF é produzido por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células mesenquimais. Também regula a atividade bactericida, quimiotaxia e fagocítica dos neutrófilos (Weisbart and Golde, 1989) e promove efeitos anti-inflamatórios reduzindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias (Boneberg and Hartung, 2002). A atividade biológica ocorre pela interação do hG-CSF com o receptor CD114, que pertence ao grupo de citocinas do tipo I, expresso em células progenitoras de neutrófilos e em neutrófilos maduros (Fukunaga et al., 1990).

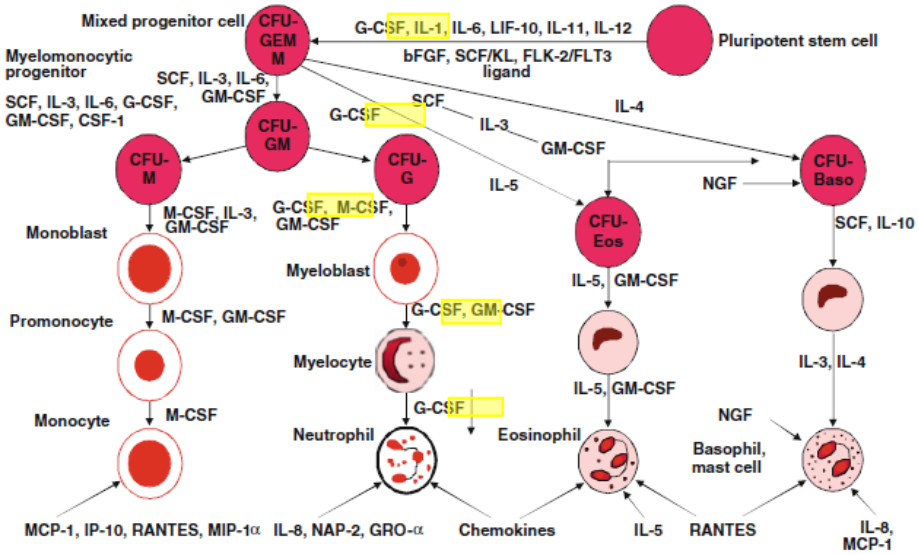

Figura 3 Diferenciação celular a partir das células-tronco pluripotentes (Encarnação, 2005). Os pontos de atuação do G-CSF são destacados em amarelo.

2.2 O rhG-CSF no mercado mundial

Para facilitar o estudo desta molécula, o gene de hG-CSF foi clonado e expressado para produzir a proteína recombinante (Clark and Kamen, 1987). Atualmente o G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) está disponível comercialmente como produto biotecnológico. Quando produzido pela tecnologia do DNA recombinante em *Escherichia coli*, a sequência de aminoácidos do rhG-CSF é idêntica à nativa, com exceção da ausência da O-glicosilação. Como será visto adiante, essa é uma das proteínas recombinantes mais amplamente usadas com propósito clínico na neutropenia (item 2.3). O hG-CSF também pode ser utilizado para mobilizar as células do sangue periférico permitindo-lhes que sejam liberadas e usadas para transplante e para o tratamento e prevenção das infecções não neutropênicas nos pacientes (Hübel and Engert, 2003).

Existem quatro formas principais do rhG-CSF disponíveis para uso clínico (Molineux, 2011): Filgrastim, rhG-CSF produzido em *E. coli*, idêntico à proteína humana não glicosilada e com grupo de metionina no N-terminal, o que reduz a degradação proteolítica e retarda a eliminação renal da molécula; Lenograstim, única versão recombinante glicosilada produzida em células de mamífero; Pegfilgrastim, único produto de segunda geração do rhG-CSF para uso clínico com uma ligação covalente ao polietilenoglicol, que aumenta sua meia-vida (Encarnação, 2005); Nartograstim, variante não glicosilada do rhG-CSF original produzida em *E. coli* com cinco aminoácidos substituídos na região N-terminal (Thr-1, Leu-3, Gly-4, Pro-5 e Cys-17 por Ala, Thr, Tyr, Arg e Ser, respectivamente), mudança que aumenta a

atividade específica, estabilidade estrutural e a meia-vida da molécula, além disso, a substituição da cisteína na posição 17 por serina evita a formação de ligações dissulfeto incorretas (Kuga et al., 1989). A Tabela 1 mostra exemplos de medicamentos disponíveis no mercado para tratar a neutropenia, baseados em rhG-CSF.

Tabela 1 Alguns dos produtos no mercado mundial para tratar a neutropenia baseados no rhG-CSF

Nome genérico	Características	Fabricante	Nome comercial
Filgrastim	Produzida em *E. coli* e **metilada**	CIM / Cuba	**ior® LeukoCIM**
Pegfilgrastim	Produzida em *E. coli* e conjugada com PEG **(peguilada)**	Amgen Europe B.V EUA- Países Baixos	**Neulasta**
Lenograstim	Produzida em células de mamífero e **glicosilada**	Chugai Pharma / UK	**Granocyte**
Nartograstim	Produzida em *E. coli* com substituição de **5 aas no N-terminal**	Dabur /India Ltd	**Neumax**

As patentes da primeira geração do rhG-CSF já expiraram. A patente do Filgrastim expirou em 2006 e a partir de então várias formas de biossimilares estão disponíveis na Europa, China e Ásia (Molineux, 2011). A patente do Nartograstim expirou em 2010 e recentemente um biossimilar proveniente da Índia passou a estar disponível no mercado mundial (Tabela 1).

No Brasil, um biossimilar do Filgrastim que recebeu o nome de Fiprima foi desenvolvido pela Eurofarma e, por meio de um acordo de transferência de tecnologia, deverá produzido pela Fiocruz, no Centro Henrique Penna inaugurado em dezembro de 2016 (Fiocruz, 2016), para distribuição gratuita pelo SUS (INCA, 2015). Os demais biossimilares comercializados no Brasil, talvez com exceção do Filgrastine da Blau, não são produtos de fabricação própria, pois a matéria-prima é importada (Tabela 2).

Tabela 2 Produtos biossimilares do Filgrastim comercializados no Brasil

Nome comercial	Laboratório	Fabricante[a]	Apresentação	Preço máximo ao consumidor[b]
Fiprima	Eurofarma	Fiocruz, Brasil[c]	Ainda não disponível	
Filgrastim	Biosintética/Aché	BioSidus S.A., Argentina	300 µg 5 frascos 1 mL	R$ 3.273,00
Filgrastine	Blau Farmacêutica	Blau Farmacêutica[d]	300 µg 5 frascos 1 mL	R$ 3.112,53
Granulokine	Amgen	Hoffmann-La Roche Ltd, Suíça	300 µg 5 frascos 1 mL	R$ 2.312,61
Tevagrastim	Teva	Lemery S.A., México	300 µg 5 seringas 0,5 mL	R$ 3.169,37
Granomax	Dr Reddy's	Dr. Reddy's Laboratories Ltd, Índia	300 µg 5 frascos 1 mL	R$ 2.146,04
Myograf	Bergamo/Amgen	Xiamen Amoytop Biotech Co, China	300 µg 5 frascos 1 mL	R$ 2.950,68

[a]informações encontradas nas bulas de cada medicamento; [b]consulta a https://pro.consultaremedios.com.br em 09/04/2018; [c]previsão de transferência de tecnologia, [d]não foi possível identificar com certeza o produtor

2.3 Incidência da neutropenia no Brasil e tratamento com rhG-CSF

A neutropenia (adquirida ou congênita) é a condição na qual ocorre diminuição dos neutrófilos no sangue a valores inferiores a 1.500/mm^3. Essa condição é mais frequente em pacientes submetidos a quimioterapia, radioterapia, com HIV ou que receberam transplante de medula óssea.

No Brasil, foi estimada, entre 2016-2017, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2016). Os pacientes com câncer são submetidos a diversas sessões de quimioterapia, que promovem supressão de imunidade inata e/ou adquirida. Esses períodos são caracterizados pela presença de anemia, plaquetopenia, leucopenia e principalmente queda importante do número de neutrófilos (INCA, 2015). Após a quimioterapia, os pacientes ficam mais susceptíveis a quadros infecciosos, provocando a neutropenia prolongada. São os quadros infecciosos a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes que recebem quimioterapia (Alvarez et al., 2014; INCA, 2015). Cerca de um terço dos pacientes em

tratamento oncológico que desenvolvem neutropenia apresentam quadro febril, conhecido como neutropenia febril (NF), caracterizado por aumento da temperatura axilar em valores superiores a 38,3ºC (Alvarez et al., 2014). O Perjeta®, medicamento usado contra câncer de mama, apresentou neutropenia (>50%), neutropenia febril e leucopenia entre as reações adversas, consideradas graves e bastante comuns (Ministério da Saúde, 2017).

O tratamento de rotina para pacientes com NF usualmente inclui internação, investigação diagnóstica extensiva e administração de antibióticos de amplo espectro (Alvarez et al., 2014; Nascimento et al, 2014). Em pacientes com câncer de mama que manifestaram NF após quimioterapia, a taxa de complicações decorrentes desse tratamento é elevada, acarretando importante morbidade e mortalidade, a taxa de óbito varia entre 4% e 21% (Yuriko et al., 2015). O mesmo estudo mostrou que o risco de morte em doentes com NF foi superior em 15%, quando comparado com doentes sem NF. A mortalidade global foi de 5% em doentes com tumores sólidos e 11% com tumores hematológicos (Yuriko et al., 2015).

A incidência de NF, bem como a sua duração, os dias de hospitalização e a terapia com antibióticos diminuem notavelmente com o uso profilático de fatores de crescimento, entre eles o G-CSF (Wittman et al., 2006; García-Carbonero et al., 2001).

Nos últimos 10-15 anos, a terapia profilática com rhG-CSF, além de ter sucesso em pacientes que recebem altas doses de quimioterapia, tem sido usada como tratamento ou prevenção para reforçar o sistema imune em pacientes com HIV, pneumonia e pacientes diabéticos com infecções nos pés (Yuriko et al., 2015).

O rhG-CSF é distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e encontra-se na lista de medicamentos excepcionais do Programa de Assistência Farmacêutica do SUS, acarretando gastos públicos consideráveis (Welte et al., 1996; Hubel e Engert, 2003). Um estudo técnico-econômico feito para a implantação da produção de rhG-CSF no Brasil demonstrou que ele pode ser produzido por custos até cerca de 90% inferiores aos valores pagos em compras governamentais, deste modo o desenvolvimento de um método eficaz e de baixo custo para a produção de rhG-CSF seria de grande importância para a Saúde Pública Brasileira e para a redução de gastos governamentais (Encarnação, 2005).

No ano 2016 o Ministério de Saúde anunciou que investiria aproximadamente R$ 443 milhões por ano para realizar a transferência tecnológica e portanto adquirir cinco medicamentos biológicos. Esses medicamentos seriam produzidos em quatro laboratórios públicos e sete empresas privadas. Todos esses medicamentos são fármacos distribuídos gratuitamente pelo SUS e entre eles está o Filgrastim (Tabela 2), classificado como oncológico (Ministério de Saúde, 2016). A cifra de investimentos mostrou-se superior do que

em 2008, quando o governo federal investiu R$ 400 milhões para a aquisição de medicamentos biotecnológicos (Ministério de Saúde, 2009).

2.4 Cultivos de microrganismos recombinantes para produzir rhG-CSF

O principal objetivo dos cultivos de microrganismos é aumentar a produtividade (quantidade de produto por unidade de volume e por unidade de tempo) (Gombert and Kilikian, 1998). Nos cultivos de microrganismos recombinantes, quando a expressão do gene alvo está controlada por um promotor reprimido, como o operon *lac*, é importante atingir altas concentrações celulares antes de iniciar a síntese da proteína alvo desencadeada pela adição do indutor, porque, uma vez iniciada a síntese da proteína heteróloga, ocorre uma subtração da energia disponível para o crescimento e manutenção do microrganismo (Gombert and Kilikian, 1998).

A produção de proteínas recombinantes origina-se da possibilidade de transferir uma sequência de DNA para um microrganismo hospedeiro. A clonagem permite que o gene que codifica uma proteína possa ser retirado de seu hospedeiro habitual, inserido em um vetor de clonagem e introduzido em outro organismo (Brown, 2003). Há relatos da obtenção de rG-CSF a partir de células de mamíferos (Holloway, 1994), *Brevibacillus choshinensis* (Yamamoto et al 2009), *Bacillus subtilis* SCK6 (Bashir et al, 2015) e *E. coli* (Vanz et al., 2008; Gomes et al., 2012; Venkata et al., 2008b; Kim et al., 2013; Vemula et al , 2015b; Pathak et al., 2016).

A bactéria *E. coli* é um dos hospedeiros mais usados para produção de proteínas recombinantes, pois cresce rapidamente em altas concentrações celulares e em substratos baratos, além da sua genética ser bem conhecida, haver disponíveis muitos vetores de clonagem e cepas mutantes (Williams et al., 2006), e ser fácil de manusear geneticamente (Choin et al., 2006). É uma bactéria que cresce a temperaturas entre 8 e 48 ºC e pH neutros, entre 6 e 8 (Neidhardt et al., 1990). Alguns dos produtos recombinantes produzidos em *E. coli* são enzimas industriais, como renina e amilases, e proteínas terapêuticas, como insulina e hormônios de crescimento (Eiteman and Altman, 2006).

2.4.1 Meios de cultura utilizados em cultivos de *E. coli* recombinante

Os meios de cultura utilizados para cultivos de *E. coli* recombinante podem se classificar em complexos (Studier, 2005; Vemula et al., 2015c) e quimicamente definidos

(Korz et al., 1995; Seeger, 1995; Kim et al., 2014). Os meios complexos (LB é o mais comum) contêm hidrolisados proteicos, também chamados peptonas, como extrato de levedura e triptona. A triptona supre à bactéria aminoácidos e pequenos peptídeos, e o extrato de levedura supre fundamentalmente a demanda de nitrogênio e vitaminas. Como consequência da presença de aminoácidos e vitaminas, esses meios proporcionam maiores valores de velocidade específica de crescimento, μ (Brown, 2003).

A presença de triptona, peptona de origem animal, apresenta o risco de contaminação por príons nos meios complexos, portanto estes meios não cumprem as recomendações dos órgãos regulatórios para as boas práticas de fabricação (BPF) (OMS, 2006). Existem hidrolisados proteicos de origem vegetal que podem substituir a triptona. Dos Santos (2012) demonstrou que a triptona do meio de autoindução (Studier, 2005) pode ser substituída por Phytone (BD/Difco), hidrolisado proteico de soja totalmente livre de compostos de origem animal, proporcionando níveis semelhantes de produção de PspA4Pro e de biomassa em *E. coli*, tanto em frascos agitados como em biorreator.

Os meios definidos são constituídos por sais, vitaminas e aminoácidos de composição conhecida, porém exigem maior cuidado na preparação. Esse tipo de meio permite atingir elevadas concentrações celulares porque facilita o controle da fonte de carbono e, portanto, da μ, o que permite regular a inibição por substrato e por metabolitos (Brown, 2003). A glicose é a fonte de carbono utilizada na maioria desses meios, cuja rápida assimilação acarreta uma intensa formação de acetato, que provoca a inibição do crescimento e da produção de proteína recombinante (Kilikian et al., 2000).

Para evitar a inibição por substrato e a formação de metabólitos ácidos, geralmente, os cultivos são realizados em meios definidos, com concentrações dos substratos inferiores às inibitórias, controlando a concentração da fonte de carbono durante a fase de alimentação em cultivos do tipo batelada alimentada (Riesenberg et al., 1991).

2.4.2 Cultivos de alta densidade celular (CADC)

Os cultivos de alta densidade celular são utilizados para aumentar a produtividade volumétrica do cultivo, diminuindo os gastos em equipamentos e reagentes (Riesenberg and Guthke, 1999). Este tipo de cultivo é muito usado para a produção de proteínas recombinantes (Seeger, 1995;Waegeman and Soetaert, 2011; Vemula et al., 2015b), pois garante elevada produção. CADC é simplesmente um cultivo em batelada alimentada (Lima, 2004) com três etapas principais: 1) batelada, onde é consumida a fonte de carbono inicial; 2) fase de

alimentação, com o acréscimo da fonte de carbono de forma controlada, evitando seu acúmulo e portanto formação de subprodutos inibidores, por exemplo acetato, além de permitir o controle da μ durante essa fase; 3) adição do indutor da síntese de proteína, onde μ diminui ficando menor que $\mu_{máx}$, devido ao estresse metabólico, que será mais discutido adiante (item 2.6).

O metabolismo de "overflow" do substrato geralmente acontece quando glicose é a fonte de carbono, pois ela é processada rapidamente pela via glicolítica até piruvato. O piruvato em condições de aerobiose é oxidado obtendo-se acetil-CoA, o qual estando em excesso não é metabolizado no ciclo de Krebs e portanto é transformado em acetato. A formação excessiva de acetato no meio é crítica para os cultivos de alta densidade celular, particularmente quando é utilizada a glicose como fonte de carbono. A glicose tem sido substituída por substratos que a célula assimila mais lentamente, tais como glicerol (Korz et al., 1995; Sargo, 2011; Dos Santos, 2012; Silva et al., 2012b), frutose (Du et al., 2016) e galactose (Bellão, 2005), os quais permitem menor acúmulo de acetato, porém, um crescimento celular mais lento. *E. coli* não possui transporte ativo para entrada do glicerol na célula (Lehninger, 2006), portanto, a sua assimilação é mais lenta que no caso da glicose, e portanto, a formação de acetato é menor. Por esta razão, quando as células são cultivadas com glicerol atingem maior concentração celular durante a alimentação (Carvalho et al., 2012). Sargo (2011) utilizou o glicerol como principal fonte de carbono e demonstrou que o coeficiente de manutenção celular (m) foi 10 vezes maior que o obtido em presença de glicose. Neste trabalho, Sargo conseguiu manter a concentração de glicerol entre 5 e 10 g/L durante a fase de alimentação sem acúmulo de acetato, garantindo o rápido crescimento celular e minimizando o estresse provocado pela baixa concentração de substrato.

2.5 Expressão de genes heterólogos utilizando o sistema do operon *lac*

A escolha do vetor, do hospedeiro e das condições de crescimento é importante para garantir altos níveis de expressão do gene heterólogo. A maioria dos sistemas de expressão para síntese de proteínas recombinantes em *E. coli* está controlada pelo operon *lac* (Figura 4), que controla o metabolismo da lactose regulado pelas enzimas β-galactosidase, permease e transcetilase codificadas, respetivamente, pelos genes *lacZ, lacY* (Lehninger, 2006) e *lacA* (Champe et al., 2009).

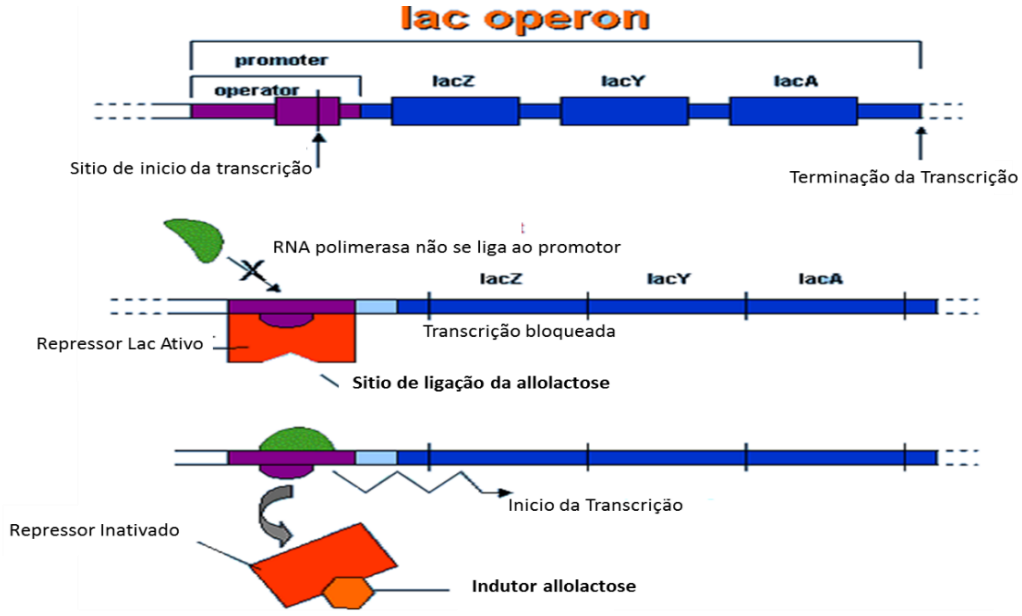

Figura 4: Sistema de controle do operon lac (Fonte: página da internet (http://www.abcdamedicina.com.br/regulacao-da-expressao-genetica-transcricao-e-traducao-rna-operons.html) acessada em 20/11/ 2017.

Essas enzimas são produzidas na presença de lactose, que sofre isomerização formando a alolactose, que por sua vez se liga ao repressor LacI. Quando alolactose liga-se ao LacI, sua conformação se altera e ele se desliga do operador LacO, deixando-o livre, permitindo assim que a RNA polimerase transcreva os três genes necessários para a utilização de lactose (Wheatley et al., 2013) (Figura 4). Em sistemas do tipo do vetor pET, o gene heterólogo é inserido no plasmídeo no lugar dos genes *lacZ*, *lacY* e *lacA*, portanto a expressão do gene da proteína de interesse será controlada por um derivado do operon *lac*, e depende da presença do indutor que produz aumento na transcrição dos genes estruturais do operon (Berg et al., 2002; pET User Manual, 2014). Quando a glicose está no meio com concentrações entre 5 e 10 g/L, ocorre a repressão catabólica do operon *lac*, ou seja, a utilização de lactose fica reprimida, como consequência da influência da glicose sobre o promotor lac UV5 da T7 RNA polimerase e portanto inibe a síntese de proteína recombinante (Champe et al., 2009; pET User Manual, 2014)

Os indutores para as construções derivadas do operon *lac* são a própria lactose ou seus análogos, sendo o isopropil-ß-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) um dos mais usados (Silva et al., 2012a; Vemula et al., 2015b; Vemula et al., 2015c; Babaeipour et al., 2015). Para uso do IPTG devem-se definir: concentração, o momento de ser acrescentado no meio, temperatura e

tempo de indução. A maioria dos autores da área de Biologia Molecular diz que o momento ideal para adicionar o IPTG é quando a densidade ótica (DO) está entre 0,6 e 0,8, ou seja, no início da fase exponencial do crescimento (Einsfeldt et al., 2011; Larentis et al., 2011). Alguns autores que realizaram o cultivo em frascos relatam que diminuindo 10 vezes a concentração do IPTG (de 1 mM para 0,1 mM), ele ainda é capaz de induzir a síntese proteica, sem impacto negativo na quantidade de proteína recombinante produzida (Einsfeldt et al., 2011; Larentis et al., 2011; Tsai et al., 2017). Einsfeldt et al. (2011) observaram que temperaturas mais baixas e tempos mais longos de indução aumentaram a produção de PsaA em *E. coli*, estabelecendo para a indução: 25ºC, 0,1 mM de IPTG e 16 h de indução.

O IPTG é caro e pode ter impacto negativo no crescimento celular pelos efeitos tóxicos nas células hospedeiras (Einsfeldt et al., 2011; Dvorak et al., 2015), o que é uma limitação para utilizá-lo em processos de larga escala. Portanto, seria mais vantajoso usar indutores menos tóxicos e igualmente eficientes (Lee, 1996; Vaz et al., 2008). A lactose comparada com IPTG tem menor custo, atua como fonte de carbono e não inibe o crescimento celular. Porém, a lactose precisa da permease para entrar na célula, levando à necessidade de utilizar diferentes estratégias de indução. A lactose pode ser adicionada ao meio desde o início do cultivo, ou quando as outras fontes de carbono estejam esgotadas (Yan et al. 2004; Vaz, 2008; Dos Santos, 2012).

Kilikian et al. (2000) mostraram que a produção da proteína Tropinina C foi maior utilizando IPTG do que com a lactose, além de produzir poucos metabolitos e o plasmídeo mostrar maior estabilidade. Alguns autores reportaram níveis de expressão semelhantes com os dois indutores (Silva, 2005) e outros indicaram que a produção da proteína recombinante foi superior na presença de lactose (Silva et al., 2012a; da Silva et al., 2013). Muitos pesquisadores já empregaram lactose em lugar de IPTG como indutor com resultados favoráveis (Dos Santos, 2012; Horta et al. 2012; Vélez et al. 2014; Campani et al. 2016; Bashir et al., 2016; Eguia et al., 2018).

2.6 Estabilidade dos plasmídeos e o sistema de partição *par*

O vetor de expressão para produção industrial deve ser estável e permitir a síntese da proteína de interesse. Durante a indução ocorre um elevado estresse metabólico na célula, a qual é forçada a direcionar grande parte da energia e dos aminoácidos gerados para atender a demanda da síntese proteica (Kilikian et al., 2000; Goyal et al. 2009; Silva et al., 2012b). Esse fenômeno acarreta desaceleração do crescimento e instabilidade do plasmídeo, ou seja, as

células não conseguem mais manter a função de replicar genes e regular a concentração do plasmídeo dentro da célula (Ow et al., 2006; Wang et al., 2006). Essa instabilidade pode provocar a não retenção do plasmídeo dentro das células pela desigual distribuição dos mesmos para as células filhas durante a divisão celular. Em alguns casos se reduz o rendimento da proteína alvo cujo gene está presente no plasmídeo (Friehs, 2004; Silva et al. 2007).

Este fenômeno é comumente contornado com a inserção no plasmídeo de um gene de resistência a antibiótico e com adição deste reagente ao meio de cultivo. A presença do antibiótico gera uma pressão seletiva para que as células retenham o plasmídeo que contém também o gene de interesse (Hägg et al., 2004; Xu et al. 2006). Porém, alguns autores mostraram que essa alternativa nem sempre é bem sucedida devido ao estresse adicional provocado nas células como consequência da produção da proteína de resistência ao antibiótico e da degradação deste (Johansson e Liden, 2006; Goyal et al. 2009).

A partição dos plasmídeos entre as células filhas é um processo dinâmico, no qual os plasmídeos são movimentados e posicionados na célula para garantir que ao menos uma cópia do plasmídeo fique dentro de cada célula filha durante a divisão celular (Baxter e Funnell, 2014). Existem três mecanismos que garantem a partição do plasmídeo:

i) Segregação aleatória, manifestada em plasmídeos de alta cópia e que pressupõe uma distribuição normal da quantidade de plasmídeos entre as células filhas (Field e Summers, 2011).

ii) Sistema de partição ativo, típico de plasmídeos de baixa cópia, formado pelo gene *par*, que codifica para as proteínas responsáveis por distribuir pelo menos uma cópia do plasmídeo para cada célula filha (Salje et al., 2010)

iii) Morte pós-segregação, modelo baseado no sistema toxina-antitoxina, no qual as células filhas que não têm o plasmídeo com o gene da antitoxina são mortas pela toxina na célula hospedeira (Stieber et al. 2008).

O mecanismo de partição ativo é formado por três elementos principais: sítios de partição (sítio *par*), a proteína de ligação ao centrômero (CBP) e a proteína motora, uma ATPase. Os sítios *par* são regiões do DNA plasmidial que dirigem o processo da segregação, com estruturas similares a centrômeros que garantem a estabilidade do plasmídeo em procariotos, porque constituem sítios de união durante a segregação (Baxter eFunnell, 2014). A proteína motora propicia a correta distribuição dos plasmídeos para as células filhas e a CBP une a proteína motora com o sitio *par*. Os sistemas *par* são classificados de acordo com o tipo de proteína motora: Tipo I Walker-A P-loop; Tipo II com Actina (Gerdes et al. 2000); e

Tipo III com Tubulina (Gerdes et al. 2010; Baxter e Funnell, 2014). Especificamente, o sistema Tipo II é o mais conhecido, cujo mecanismo de estabilização foi descrito por Brooks e Hwang (2017) (Figura 5).

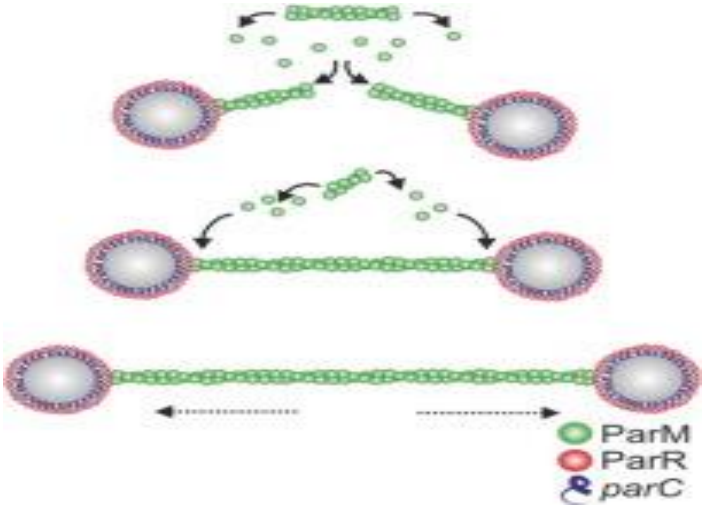

Figura 5 Mecanismo de estabilização do Tipo II indicando os componentes da sequência *par* que atuam durante a divisão celular para repartir os plasmídeos entre as células filhas, onde Par M é a proteína motora, Par R, a proteína de ligação ao centrômero e *par* C o sítio de partição (Brooks e Hwang, 2017).

Em linhas gerais, o mecanismo de partição ativa atua da seguinte maneira. Primeiro, várias CBPs se ligam ao sítio *par* do DNA. Segundo, a proteína motora se liga ao complexo CBP-DNA ocorrendo a sua polimerização, aí os filamentos se estendem para fora em duas direções da célula. Terceiro, começam os ciclos de ligação e hidrólise do ATP, então a hidrólise do ATP desencadeia a desmontagem dos filamentos e os plasmídeos são puxados (tipo I) ou empurrados (tipos II e III) para os polos opostos da célula, segregando-os nas duas células filhas.

A sequência *par* é usada na clonagem genética para garantir estabilidade do plasmídeo nas células hospedeiras durante a divisão celular, garantindo a retenção do plasmídeo pelo hospedeiro e, portanto, a estabilidade de ambos (Chang et al., 1987; Ptacin et al., 2010). Quando estas regiões *par* se perdem, o plasmídeo ainda se replica, mas a estabilidade diminui durante o crescimento celular. Estudos mostraram que os plasmídeos contendo o gene *par* são mais estáveis durante a replicação (Gerdes and Molin, 1986; Li et al., 2004; Liu et al., 2005, Eguia et al.,2018). Dentre eles, Liu et al. (2005) avaliaram várias construções para expressar a proteína hemoglobina de Vitreoscilla (VHb) com e sem a sequência do *par*, comprovando um aumento de estabilidade do plasmídeo quando ele continha a região de partição (*par*). Essa

estabilidade foi observada durante a divisão celular de 100 gerações na ausência de antibióticos.

2.7 Obtenção do rhG-CSF a partir de *E. coli*

Já foram abordadas no item 2.4 as razões para escolha de *E. coli* pela maioria dos autores para obtenção de proteínas recombinantes. Diversos autores têm trabalhado na produção do rhG-CSF a partir de *E. coli*. A maioria usou meios de alta densidade celular (Kim et al., 2014; Vemula et al., 2015 b) ou meio complexo com acréscimo de antibiótico (Bishop 2001; Vanz et al. 2008; Venkata et al., 2008a; Gomes et al., 2012; Vemula et al., 2015c). Aqueles que usaram biorreator para produzir rhG-CSF em cultivo de alta densidade celular, utilizaram cultivos em frascos agitados com meio complexo para o inóculo, com agitação entre 150 e 300 rpm a 37 ºC. Nesses trabalhos, com produção em larga escala ou não, a proteína foi obtida em corpos de inclusão (CI) e mostrou atividade similar ao rhG-CSF comercialmente disponível (Venkata et al., 2008b; Vanz et al. 2008; Gomes et al., 2012; Kim et al., 2013).

Quase todos os autores empregaram o IPTG (entre 1 e 2 mM) como indutor (Venkata et al., 2008b; Gomes et al., 2012; Kim et al., 2013; Vemula et al., 2015b). Vanz et al. (2008) produziram o rhG-CSF a partir de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET23a(+) em 24 h de cultivo sem adição de indutor. Gomes et al. (2012) produziram o rhG-CSF no Laboratório de Biotecnologia Molecular, Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, em *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS empregando o vetor pAE, plasmídeo bacteriano que possui gene de resistência à ampicilina e permite a produção da proteína recombinante com cauda de seis histidinas na porção N-terminal sob o controle do promotor derivado do fago T7 (Ramos et al., 2004). Apesar de a proteína ter mostrado atividade biológica similar ao Granulokine, o vetor pAE tinha-se mostrado instável para produção de proteínas recombinantes em cultivos de alta densidade celular (Silva et al., 2007), sendo inviável seu uso para cultivos em biorreator.

Desse modo, o grupo responsável pela clonagem do rhG-CSF construiu um novo vetor de expressão, o plasmídeo pARKAN-I, para permitir a produção do rhG-CSF em biorreatores (Figura 5). Esse plasmídeo contém a sequência *par* (item 2.6), procurando garantir a partição dos plasmídeos para as células filhas (Chang et al., 1987; Li et al., 2005; Ptacin et al., 2010; Eguia et al., 2018) e, portanto, sua estabilidade.

O vetor pARKAN-I, além da sequência *par*, contém também os genes do repressor LacI e de resistência à canamicina (Kan) e um sítio de clonagem (MCS) a jusante da sequência de fusão com uma cauda de 6 histidinas na porção N-terminal da proteína de interesse. As enzimas de restrição *Nde* I e *Kpn* I foram empregadas para inserir o gene do rhG-CSF (Nartograstim) nesse vetor (Figura 6).

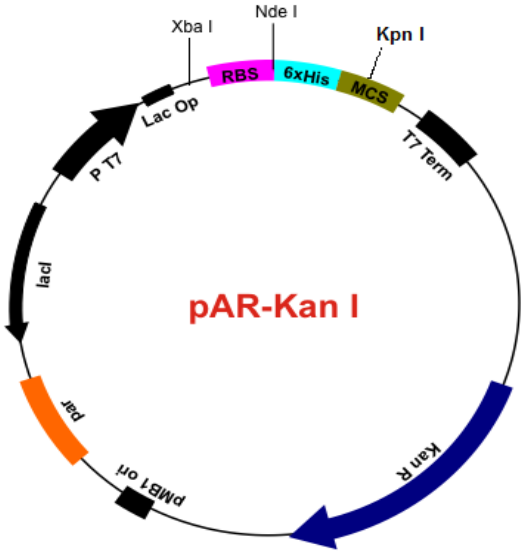

Figura 6 Plasmídeo pARKAN-I construído no Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan: pMB1ori: origem de replicação, *par*: gene da sequência pAR, *lac* I: gene do repressor Lac I, P T7: promotor do fago T7; Lac Op: sítio operador do operon lac; RBS: sítio de ligação com o ribossomo; 6XHis: sequência da fusão com cauda de 6 histidinas na porção N-terminal da proteína; MCS: sítio multiclonagem; T7 Term: sequência de terminação do fago T7; Kan R: gene de resistência à canamicina (Eguia et al. 2018).

2.8 Purificação de rhG-CSF

A purificação de uma proteína é o conjunto de procedimentos realizados a partir de um produto bruto para atingir o grau de pureza que se requer para que o produto final purificado seja usado, maximizando sua recuperação e minimizando o custo (Ward, 1991). Os procedimentos baseiam-se nas diferenças entre as propriedades físico-químicas das impurezas e do produto alvo: localização (intra ou extracelular), carga elétrica, massa molecular, hidrofobicidade, solubilidade e afinidade por ligantes específicos (Wheelwright, 1991).

As etapas gerais de purificação de uma proteína recombinante são: 1) separação das células do meio de cultura, que pode ser feita por centrifugação (convencional ou contínua) ou microfiltração (tangencial ou convencional); 2) ruptura celular e separação dos *debris* caso a proteína seja intracelular, o que acontece na maior parte dos casos; 3) purificação primária,

onde se eliminam as impurezas com propriedades bem diferentes da molécula de interesse, geralmente, feita mediante precipitações e cromatografias de troca iônica, hidrofóbica e de afinidade; 4) purificação de alta resolução, onde se separam as impurezas com propriedades semelhantes às do produto alvo, empregando precipitações seletivas, cromatografia de filtração em gel e cromatografia de afinidade (Scopes, 1994).

Existem artigos que abordam a obtenção e purificação do rhG-CSF no sobrenadante do cultivo quando a proteína é secretada no meio (Yamamoto et al., 2009; Bashir et al., 2015). Porém, a maioria descreve a purificação a partir da *E. coli*, quando o rhG-CSF é produzido intracelularmente na forma de CI (Vanz et al., 2008; Venkata et al., 2008b; Gomes et al., 2012; Zhao et al., 2014; Vemula et al., 2015b; Vemula et al., 2015c).

Os CI são resultado da deposição de proteínas na forma inativa em agregados insolúveis no citoplasma da célula hospedeira. A obtenção da proteína recombinante a partir de CI é escolhida pela fácil recuperação do material insolúvel (pela centrifugação do lisado celular) e baixa quantidade de contaminantes presentes. Além disso, a proteína de interesse é protegida da degradação por proteases, o que permite o isolamento com alta concentração e pureza (Tan et al., 2002). Porém, após a recuperação dos CI é necessário realizar etapas de solubilização e renaturação da proteína, tornando o processo mais longo, complexo e caro, podendo, resultar em baixo rendimento da proteína renaturada e perda da integridade proteica (Sørensen and Mortensen, 2005; Vanz et al., 2008; Yamamoto et al., 2009; Gomes et al., 2012), portanto, pode-se perder a atividade biológica (Baneyx, 1999).

Vanz et al. (2008); Venkata et al., (2008a); Venkata et al., (2008b); Gomes et al. (2012), Kim et al. (2013), Zhao et al. (2014), Rathore et al. (2016) basearam-se nos passos básicos que envolvem a purificação proteica a partir de CI: centrifugação para separar as células do meio de cultura, lise das bactérias em homogeneizador de alta pressão para liberar o conteúdo intracelular, centrifugação para recuperar os CI, lavagem dos CI com baixa concentração de agentes desnaturantes, solubilização dos CI com alta concentração de agentes desnaturantes, renaturação por diminuição gradativa da concentração do desnaturante, uma etapa cromatográfica de troca catiônica para purificar o produto e um polimento final para remover o sal da fração purificada.

Agentes desnaturantes como ureia e guanidina são usados para solubilizar os CI, pois provocam desdobramento completo ou parcial da estrutura da proteína. Depois é feita a renaturação, que é, sem dúvida, o passo mais crítico. Nesta etapa formam-se novamente as ligações dissulfeto e a proteína deve recuperar sua forma biologicamente ativa (Rosano e

Ceccarelli, 2014). Têm sido reportados vários métodos para renaturar o rhG-CSF solubilizado a partir dos CI:

1. Método das diálises consecutivas utilizando concentrações decrescentes de ureia desde 4 M até 0 M (Vanz et al., 2008; Gomes et al.,2012).
1. Diafiltração em membranas de 5 kDa, na qual o desnaturante é removido lentamente do solubilizado lavando-o com tampão de renaturação mantendo o volume fixo do retentado (Venkata et al., 2008b, Zhao et al., 2014).
2. Diluição do produto, que consiste em diluir o material solubilizado no tampão de renaturação, o que pode ser feito adicionando o produto no tampão de renaturação (diluição direta) (Venkata et al., 2008a; Kim et al., 2014; Vemula et al., 2015b; Vemula et al., 2015c)) ou tampão no produto (diluição inversa) (Vallejo et al., 2002).
3. Renaturação em coluna cromatográfica, onde é realizada a renaturação da proteína juntamente com a purificação. Vemula et al. (2015b) e Wang e Geng (2012) argumentam que o método cromatográfico para renaturar é mais rápido e eficiente porque tem a possibilidade de renaturar e purificar a proteína em só uma etapa.

Autores que obtiveram o rhG-CSF a partir de CI reportaram os seguintes rendimentos de proteína purificada: 0,5 mg/L (Bishop et al., 2001); 3,2 mg/L (Vanz et al., 2008); 15 mg/l (Gomes et al., 2012); 2,18 g/L (Venkata et al., 2008b); 1,75 g/L (Kim et al., 2013), esses dois últimos a partir de cultivos realizados em biorreator.

Protocolos que envolvem a etapa de renaturação geralmente apresentam maior custo comparado a protocolos em que a proteína está na sua forma solúvel no início da purificação (Yamamoto et al., 2009; Bashir et al., 2015). Baseado nesta justificativa, Yamamoto et al. (2009) produziram o G-CSF canino (cG-CSF) em *Brevibacillus choshinensis*, bactéria Gram-positiva, sem genes de proteases e com ampla capacidade de secretar proteínas no meio (Takara, 2006)**.** A purificação foi realizada a partir do sobrenadante livre de células, submetido a duas precipitações com adição de sulfato de amônio (40% e 20% de saturação) e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Hi-prep Butil-Sepharose. O cG-CSF purificado apresentou atividade biológica de $8{,}0 \times 10^6$ U/mg.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia compatível com a escala industrial para produzir e purificar o Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante (rhG-CSF) para tratamento da neutropenia.

Para isso foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a estabilidade de um novo vetor de expressão de genes heterólogos, pARKAN-I, para a produção do rhG-CSF.
- Avaliar meios de cultura complexo e definido para produção do rhG-CSF em frascos a partir de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLys S transformada com pARKAN-I/ rhG-CSF.
- Aumentar a escala de produção do rhG-CSF para o biorreator empregando os meios de cultura selecionados a partir dos cultivos em frascos.
- Avaliar diferentes métodos de renaturação e desenvolver o processo de purificação da proteína rhG-CSF.
- Caracterizar a estrutura secundária do rhG-CSF por dicroísmo circular e a atividade em um modelo de neutropenia em camundongos.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Microrganismo

A linhagem de *E. coli* utilizada foi BL21(DE3) STAR pLysS transformada com o plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF, obtido no laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan e gentilmente cedido para este trabalho. O plasmídeo, além do gene do rhG-CSF, contém o gene do repressor LacI, o marcador de resistência à canamicina (Kan), o promotor T7 e o gene pAR. O gene do rhG-CSF (Nartograstim) foi inserido empregando-se os sítios de restrição *Nde* I e *Kpn* I (Figura 6), portanto a molécula não tem a sequência de seis histidinas no N-terminal. O plasmídeo pLysS da bactéria, que contém o gene da lisozima, tem marca de resistência ao cloranfenicol (Clo).

4.2 Meios de cultura

Foram utilizados diferentes meios de cultura para avaliar o crescimento celular e a síntese proteica. O meio de cultivo semissólido Luria Bertani-Ágar (LB-ágar) descrito na Tabela 3, foi empregado para ativação das células do estoque congelado e avaliar a estabilidade do plasmídeo.

Tabela 3 Composição do meio LB-ágar (De Spiegeleer et al., 2004)

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10
Ágar	20

Os experimentos em frascos agitados foram realizados em meio complexo 2YT (Tabela 4), meio de autoindução (Tabela 5) e meio quimicamente definido HDF (Tabela 6), acrescidos ou não com 30 μg/mL de Clo e 50 μg/mL Kan.

Tabela 4 Composição do meio complexo 2YT

Nutrientes	Concentração g/L
Triptona	16
Extrato de Levedura	10
NaCl	5

A formulação do meio complexo de “autoindução” (Tabela 5) tem como base o meio ZYM-5052 desenvolvido por (Studier, 2005) e modificado por Dos Santos (2012).

Tabela 5 Composição do meio complexo de “autoindução”

Nutrientes	**Concentração para cultivo em frascos**	**Concentração para cultivo em reator**
Glicerol	5 g/L	60 g/L
Glicose	0,5 g/L	10 g/L
Lactose*	5,0 g/L	20 g/L
Extrato levedura	5,0 g/L	5 g/L
Phytone	10 g/L	10 g/L
KH_2PO_4	3,4 g/L	3,4 g/L
Na_2HPO_4	9 g/L	9 g/L
NH_4Cl	2,7 g/L	2,7 g/L
Na_2SO_4	0,7 g/L	0,7 g/L
$MgSO_4$_$7H_2O$	0,5 g/L	0,5 g/L
Citrato férrico	100,8 mg/L	100,8 mg/L
$CoCl_2$_$6H_2O$	2,5 mg/L	2,5 mg/L
$MnCl_2$_$4H_2O$	15 mg/L	15 mg/L
$CuCl_2$_$2H_2O$	1,5 mg/L	1,5 mg/L
H_3BO_3	3 mg/L	3 mg/L
Na_2MoO_4_$2H_2O$	2,1 mg/L	2,1 mg/L
$Zn(CH_3COOH)_2$_H_2O	33,8 mg/L	33,8 mg/L
EDTA	14,1 mg/L	14,1 mg/L
Tiamina	45 mg/L	45 mg/L

*A lactose foi omitida em alguns experimentos conforme explicado no texto

A fórmula do meio quimicamente definido HDF baseou-se na proposta de Seeger et al (1995) contendo, kan 50 µg/mL (Tabela 6).

Tabela 6 Composição do meio quimicamente definido HDF

Nutrientes	Concentração para cultivo em frascos	Concentração para cultivo em reator	Concentração no meio de alimentação para batelada alimentada
Glicose	10 g/L	-	-
Glicerol	-	40 g/L	600 g/L
KH_2PO_4	13,3 g/L	13,3 g/L	-
Ácido Cítrico	1,7 g/L	1,7 g/L	-
$(NH_4)_2HPO_4$	4 g/L	4 g/L	-
$MgSO_4$_$7H_2O$	1,2 g/L	1,2 g/L	20 g/L
Citrato férrico	100,8 mg/L	100,8 mg/L	40 mg/L
$CoCl_2$_$6H_2O$	2,5 mg/L	2,5 mg/L	4 mg/L
$MnCl_2$_$4H_2O$	15 mg/L	15 mg/L	23,5 mg/L
$CuCl_2$_$2H_2O$	1,5 mg/L	1,5 mg/L	2,3 mg/L
H_3BO_3	3 mg/L	3 mg/L	4,7 mg/L
Na_2MoO_4_$2H_2O$	2,1 mg/L	2,1 mg/L	4 mg/L
$Zn(CH_3COOH)_2$_H_2O	33,8 mg/L	33,8 mg/L	16 mg/L
EDTA	14,1 mg/L	14,1 mg/L	13 mg/L
Tiamina	4,5 mg/L	45 mg/L	45 mg/L
Canamicina	50 mg/L	50 mg/L	50 mg/L

O meio mínimo M9 ágar foi empregado para selecionar as células de *E. coli* capazes de crescer em meio mínimo (Tabela 7).

Tabela 7. Composição do meio M9-ágar

Nutrientes	Concentração (g/L)
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NH_4Cl	1
NaCl	0,5
$MgSO_4$	0,24
$CaCl_2$	0,011
Ágar	20

4.3 Preparo do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I /rhG-CSF)

O estoque a -80◦C de *E. coli* carregando pARKAN-I/rhG-CSF, fornecido pelo Dr. Enéas de Carvalho, foi usado para semear uma placa de LB-ágar com antibióticos. A placa foi incubada a 37 °C por 18 h. Uma das colônias isoladas foi inoculada em frasco de 300 mL com 30 mL de meio LB suplementado com antibióticos (Silva et al, 2007). A cultura foi incubada a 37 °C e 250 rpm por 12 h.

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.500 g por 10 min e as células ressuspendidas em 1/10 do volume com meio LB fresco com antibióticos e 10% de glicerol (Dos Santos, 2012). A suspensão bacteriana foi dispensada em tubos com 50 µL ou 200 µL, que foram usados para inocular diretamente os cultivos em frascos agitados. Os seguintes ensaios foram realizados para avaliar a qualidade do lote:

- Coloração de Gram: Para descartar contaminação e verificar o estado das células.
- Viabilidade: Foram feitas diluições seriadas de 10^4 até 10^8 que foram plaqueadas em LB-ágar, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h e a contagem de colônias realizada.
- Estabilidade do plasmídeo: Determinada pela proporção de colônias que cresceram em placas LB-ágar com antibiótico em relação às que cresceram em LB-ágar sem antibiótico.
- Avaliação do volume de inóculo: foram testados 25, 50 e 100 µL de volume do lote de trabalho para inocular 100 mL de meio 2YT.

4.4 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio complexo 2YT

Alíquotas de 50 µL do lote de trabalho foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de cada uma das variantes (I, II, III e IV) do meio 2YT (Tabela 4).

Tabela 8: Variantes do meio de cultura 2YT utilizados para cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF)

Variante	Canamicina	Glicose (g/L)
I	sim	10
II	sim	0
III	não	10
IV	não	0

Para cada variante de meio, foram semeados três frascos para posterior indução e um controle não induzido. Os frascos foram incubados a 37 °C e 250 rpm. Ao atingir densidade ótica (DO) igual ou maior a 0,6 (Cx ≥ 0,22 g/L), acrescentou-se 1 mM de IPTG para indução da síntese da proteína recombinante, que foi mantida por 8 h. Amostras foram retiradas antes e a cada duas horas após indução para avaliação da produção do rhG-CSF a estabilidade do plasmídeo.

4.5 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio complexo de "autoindução"

Alíquotas de 50 µL do lote de trabalho em LB (item 4.3) foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL do meio complexo de autoindução (Tabela 5), sem acréscimo de antibiótico. Foram feitos três experimentos, no primeiro a cultura foi incubada a 30 °C e 250 rpm sem indução com lactose, sendo avaliada apenas a estabilidade do plasmídeo e a curva de crescimento. No segundo, o cultivo foi realizado a 37 °C e 300 rpm e, quando a cultura atingiu DO maior ou igual a 2,3 (Cx ≥ 0,75 g/L), foi realizada a adição de 5 g/L de lactose para induzir a síntese da proteína (Dos Santos, 2012). Retiraram-se amostras antes e nas 4 h após a indução. O terceiro cultivo foi realizado com lactose presente desde o início, a 37 °C e 300 rpm retirando-se as amostras a cada hora para a curva de crescimento e a partir das 11 até 16 h para avaliar a síntese de rhG-CSF e a estabilidade do plasmídeo.

4.6 Cultivo em frascos agitados para avaliar estabilidade do plasmídeo e síntese do rhG-CSF em meio HDF

A Figura 7 mostra o esquema geral dos experimentos realizados em meio definido HDF.

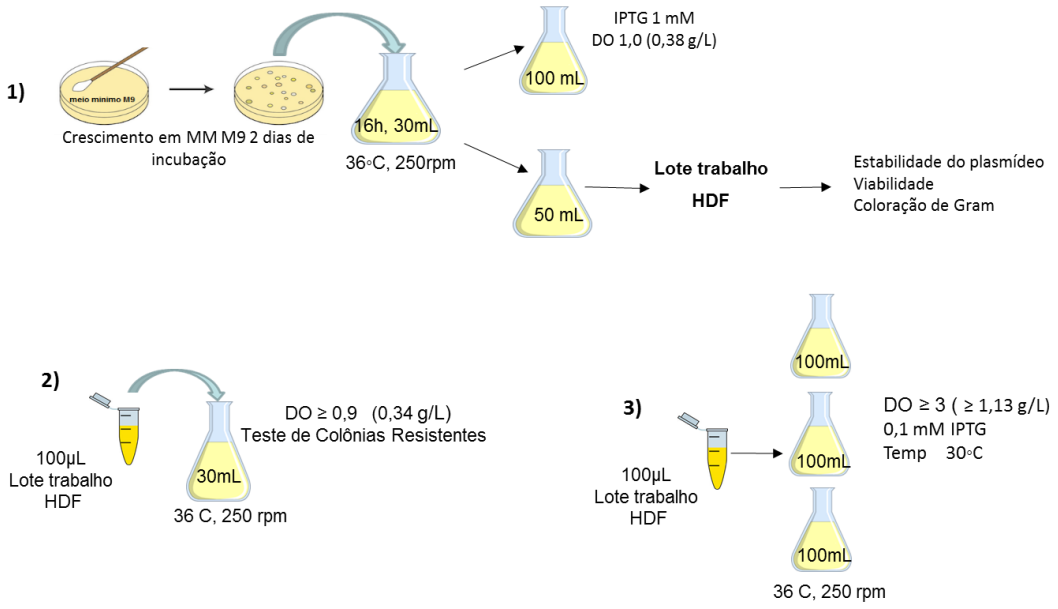

Figura 7 Esquema geral dos experimentos feitos para obtenção do rhG-CSF a partir de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF. 1) cultivo a partir de pré-inóculo semeado com colônia isolada em meio M9-ágar incubado por 16 h; 2) cultivo inoculado com lote de trabalho em HDF, para avaliação da estabilidade do plasmídeo; 3) três cultivos inoculados com o estoque em HDF e induzidos com 0,1 mM de IPTG e 30 °C.

Para o experimento 1, uma alça do lote de trabalho preparado em LB (item 4.3) foi espalhada em uma placa com meio mínimo M9-ágar, que foi incubada a 37 °C por aproximadamente 48 h. Uma das colônias foi inoculada em 30 mL do meio HDF para preparar o pré-inóculo de um novo cultivo e o lote de trabalho em HDF. O frasco foi incubado a 37 °C e 250 rpm. Após aproximadamente 16 h, um frasco com 100 mL de meio fresco foi inoculado com a cultura do pré-inóculo para obter DO inicial de 0,1 (Cx = 0,04 g/L). A indução foi realizada por 4 h com IPTG 1 mM quando a DO atingiu cerca de 1,0 (Cx = 0,38 g/L) e retiraram-se amostras antes e a cada hora após a indução. Outro frasco com 50 mL do meio foi inoculado com o próprio pré-inóculo e incubado novamente por cerca de 8 h para preparar o lote de trabalho em meio HDF, segundo descrito acima no item 4.3, porém empregando HDF em lugar de LB para ressuspender as células.

No experimento 2, 100 µL do lote de trabalho em HDF obtido durante o experimento 1, foi semeado diretamente em 30 mL de meio HDF. Quando o cultivo atingiu DO ≥ 0,9 (Cx ≥0,34 g/L), foram retiradas amostras durante três horas para avaliar a estabilidade do plasmídeo.

No experimento 3, três frascos de 500 mL contendo 100 mL de HDF foram inoculados diretamente com 100 µL do lote de trabalho em HDF. Quando os cultivos atingiram DO ≥ 3 (Cx ≥ 1,13 g/L), foi realizada a indução com IPTG 0,1 mM e a temperatura foi diminuída até 30 °C, para avaliar a estabilidade do plasmídeo e a produção do rhG-CSF.

4.7 Cultivos em biorreator

4.7.1 Meio complexo de “autoindução”

Dois cultivos foram feitos em um reator de 10 L com meio complexo de autoindução (Tabela 5), sem adição de antibióticos. Em ambos cultivos o volume inicial de meio de cultura no reator foi de 7 L, inoculados com aproximadamente 100 mL do inóculo obtido com mesmo meio, porém sem adição de lactose, de forma a obter DO inicial de 0,1 (0,038 g/L) no biorreator. A temperatura foi controlada em 30 ºC (Dos Santos, 2012) e o pH em 6,8 pela adição de NH_4OH 25%(v/v). A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 30 % de saturação por uma cascata de agitação de 150 a 1000 rpm e a vazão total de gás foi de 1 volume de ar por volume de meio por min (vvm).

Amostras foram retiradas a cada 2 h para determinar DO, fontes de carbono, geração de acetato, produção de proteína e estabilidade do plasmídeo. Atingida a fase estacionária,

todo o volume de cultivo foi coletado e as bactérias foram recuperadas por centrifugação (11.200 g, 15 min a 4 ºC). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi armazenado a -20 ºC.

4.7.2 Meio quimicamente definido HDF

Dois cultivos foram feitos em um reator de 10 L com meio HDF, um em modo batelada e outro em batelada alimentada, com adição de canamicina (Tabela 6). Em ambos cultivos o volume inicial de meio de cultura no reator foi de 6 L, inoculados com aproximadamente 100 mL do inóculo obtido com mesmo meio, para obter DO inicial de 0,1 (0,038 g/L) no biorreator. A temperatura foi controlada em 30 ºC e o pH em 6,8 pela adição de NH_4OH 25%(v/v). A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 30% de saturação por uma cascata de agitação de 150 a 1000 rpm e a vazão total de gás foi de 1 vvm.

No cultivo em batelada o crescimento prosseguiu até adicionar-se lactose 20 g/L e IPTG 0,1 mM para induzir a síntese proteica, mantida durante 4 horas. No cultivo batelada alimentada, após a fase de alimentação, adicionou-se lactose 20 g/L e IPTG 0,5 mM para induzir a síntese proteica, mantida durante 5 horas. O IPTG ativa o mecanismo do operon lac e assim permite a síntese da lac permease e a assimilação da lactose na célula. Durante o cultivo em batelada foi determinada a conversão do glicerol em biomassa, Y(cx/s) (ver adiante Equação 2). Na batelada alimentada, o meio de alimentação (Tabela 6) foi acrescentado quando se esgotou o glicerol, o que foi determinado pelo aumento abrupto da concentração de oxigênio dissolvido no reator.

Amostras foram retiradas a cada 2 h para determinar DO, fontes de carbono, geração de acetato, produção de rhG-CSF e estabilidade do plasmídeo. Passado o tempo de indução, todo o volume de cultivo foi coletado, 1 L do caldo foi separado para fazer a curva de DO por massa seca e as bactérias foram recuperadas por centrifugação (11.200 g, 15 min a 4 ºC). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi armazenado a -20 ºC.

4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento (μ) é a variação da concentração microbiana em função do tempo, seu valor máximo é atingido na fase exponencial sendo constante, ou seja, $\mu=\mu_{max}$ (Equação 1) (Schmidell et al., 2001).

$$\mu = \left(\frac{1}{Cx}\right) * \frac{dCx}{dt} \qquad \text{Equação 1}$$

OndeCx é concentração celular em um dado tempo e t o tempo de cultivo. Com os valores de DO das amostras retiradas a cada hora durante os cultivos, convertidos a concentração celular (item 4.9.1), foi feito o gráfico de ln Cx pelo tempo, no qual o coeficiente angular da reta de regressão linear obtida é o valor de μ_{max}.

O fator de conversão do substrato a células expressa a formação de biomassa em função do consumo do substrato, sendo calculado segundo a Equação 2:

$$Y_{CX/S} = \frac{C_x - C_{x0}}{S_0 - S} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde Cx_0 é a concentração celular no início do cultivo, S_0 é a concentração inicial do substrato, e S concentração do substrato em um determinado tempo. Com os dados de concentração de glicerol no meio durante o cultivo foi construído um gráfico de concentração de biomassa por glicerol consumido onde o coeficiente angular da reta de regressão linear obtida é o valor de $Y_{Cx/S}$.

A vazão de alimentação durante a batelada alimentada foi calculada de acordo com a Equação 3:

$$vazão\ \left(\frac{L}{h}\right) = \left\{\left(\frac{1}{Y_{Cx/S}} * \mu_{set}\right) + \mathrm{m}\right\} * \left(V_i * \frac{C_{xi}}{S_f}\right) * e^{\mu_{set}*(\mathrm{t}-t_i)} \qquad \text{Equação 3}$$

Onde $Y_{Cx/S}$ é o fator de conversão de glicerol em biomassa ($g_{células}/g_{glicerol\ consumido}$), m é o coeficiente de manutenção (0,025 $g_{células}/g_{glicerol\ consumido}.h$), μ_{set} é o valor de velocidade específica (h^{-1}) desejado durante a fase de alimentação, V_i e C_{xi}, volume e concentração do cultivo na hora que iniciou a alimentação, S_f a concentração do glicerol no meio de alimentação, t é o tempo em um instante dado e t_i o tempo no início da alimentação.

4.8 Purificação do rhG-CSF a partir da massa bacteriana obtida nos cultivos em biorreator

Na Figura 8 é apresentado o esquema geral das etapas de purificação. Para purificar o rhG-CSF, aproximadamente 100 g da massa bacteriana úmida (*pellet*) do segundo cultivo com meio de autoindução foi ressuspendida em 1 L do tampão de lise (Tris 10 mM, NaCl 50 mM,

pH 8.0, 0,1 % de Triton X-100, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), utilizando um homogenizador de pás (CAT Ingenieurbüro, modelo X-520) a 11.000 rpm até desaparecerem os grumos. A lise celular foi realizada a 500 bar durante 8 min de recirculação em circuito fechado em um homogeneizador contínuo de alta pressão (APV Gaulin) controlando a temperatura em 14 °C, mediante o sistema de esfriamento acoplado. O material lisado foi centrifugado (11.200 g, 1 h a 4 ºC) para separar o sobrenadante dos CI, recuperados no precipitado. Logo, foram feitas quatro lavagens dos CI, em tampão Tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0, com as concentrações 1, 2, 3 e 4 M de ureia, respectivamente. Depois de cada lavagem o produto foi centrifugado a 11.200 g, 30 min a 4ºC.

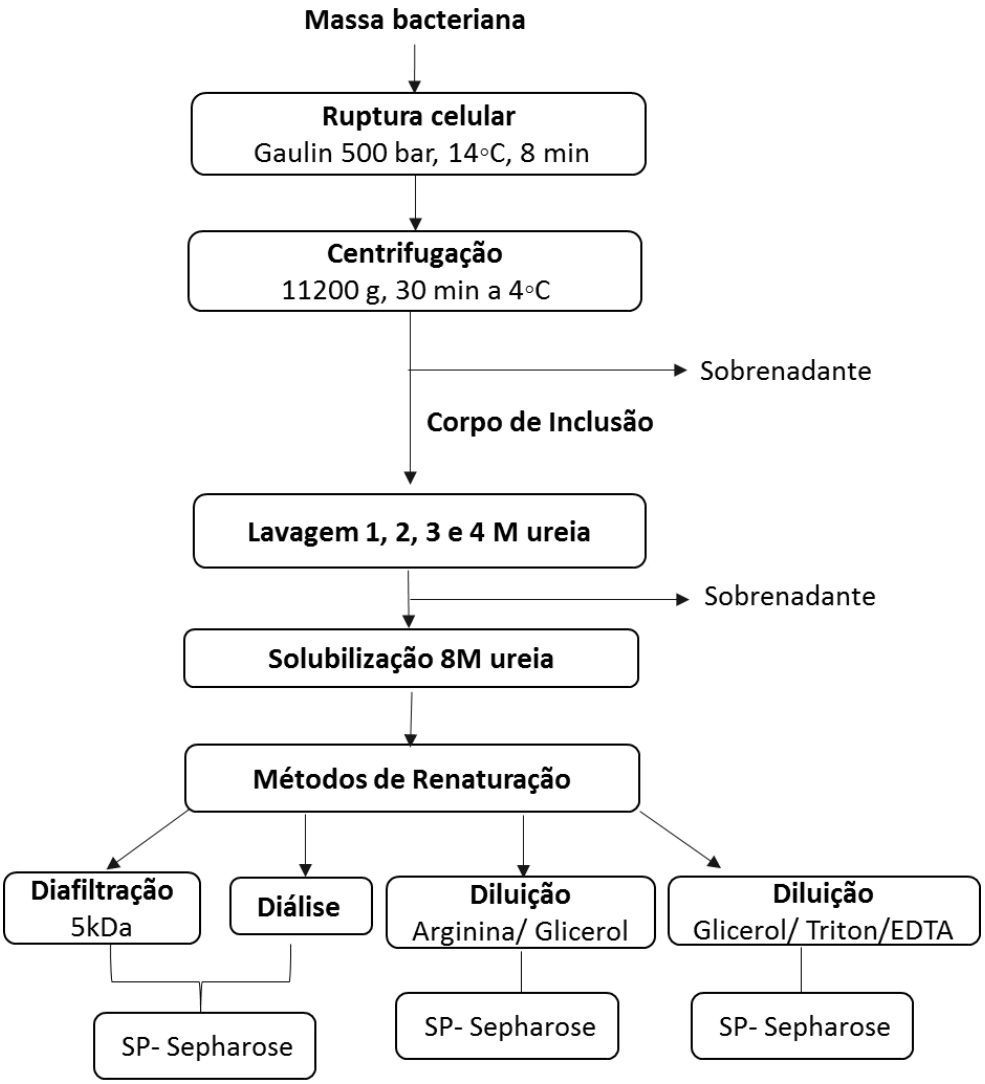

Figura 8 Esquema geral da purificação e as alternativas de renaturação avaliadas durante o processo.

Os CI foram solubilizados overnight em 1 L de tampão Tris 20 mM, NaCl 50 mM, ß-mercaptoetanol 5 mM, pH 8,0, acrescido de ureia 8 M. Passadas 16 h, a suspensão foi

centrifugada a 11.200 g, 2 h a 4 ºC, para separar o material insolúvel e recuperar aquele que ficou solúvel. O sobrenadante (solubilizado) foi dividido em alíquotas para avaliar vários métodos de renaturação, descritos a seguir. Uma vez estabelecido o processo de purificação, ele foi também realizado a partir da biomassa bacteriana produzida no cultivo em batelada alimentada com meio HDF.

4.8.1 Renaturação por diafiltração

Para renaturação por diafiltração baseou-se no protocolo de Venkata et al. (2008b) com as seguintes modificações: utilizou-se um sistema Labscale TFF (Millipore) com três membranas de 5.000 Da de celulose regenerada (Pellicon XLPLCCC5, Millipore, de 50 cm^2 cada uma), 50 mL do solubilizado em ureia 8 M foi lavado a volume constante, com 6 volumes, ou seja, 300 mL de tampão acetato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 com fluxo de 3,5 mL/min, pressão de entrada 25 psi e pressão de saída 15 psi.

4.8.2 Renaturação por diálise

Dois experimentos foram realizados mediante a diálise. No primeiro, baseado no descrito por Gomes et al. (2012), 50 mL do solubilizado em ureia 8 M passou por sucessivas trocas de tampão de diálise, nas quais a concentração de ureia do tampão acetato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 foi reduzida em cada troca à metade da anterior, ou seja, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M e 0 M. Cada etapa da diálise foi realizada durante pelo menos 4 h, a 4° C sob agitação. Finalizado o procedimento, o dialisado foi centrifugado a 11.200 g 30 min a 4 ºC, conservando o sobrenadante.

No segundo experimento, realizado de maneira similar ao descrito por Zhao et al. (2014), foram feitas diluições seriadas de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 vezes do solubilizado em ureia 8 M, cada diluição em volume final de 5 mL. O material diluído foi submetido ao mesmo procedimento de diálise descrito no primeiro experimento, para avaliar em qual concentração proteica se obtém maior percentagem de renaturação

4.8.3 Renaturação por diluição direta

Nesse método, avaliaram-se dois tampões com ou sem arginina: (A) Tris 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1 %, glicerol 10% e arginina 500 mM e (B) Tris 20 mM, EDTA

2 mM, Triton X-100 0,1 % e glicerol 10%, ambos em pH 8,0. Para o tampão com arginina, 50 mL do material solubilizado em ureia 8 M foi gotejado com fluxo de 1 mL/min no tampão de renaturação, de forma a diluir a proteína e alcançar a concentração proteica que resultou em maior percentagem de renaturação (item 4.8.2). Em 1 L do tampão sem arginina, diluíram-se 200 mL do solubilizado, nas mesmas condições antes descritas para o tampão com arginina. Para retirar as proteínas precipitadas durante a renaturação, ambos renaturados foram centrifugados a 11.200 g 30 min a 4 ºC, conservando o sobrenadante. A porcentagem de renaturação foi calculada para cada método avaliado segundo a Equação 4:

$$\%\ \text{renaturação} = \left(\frac{\text{Vsob}*\text{Csob}}{\text{Vsolub}*\text{Csolub}}\right) * 100 \qquad \text{Equação 4}$$

Na qual Vsob e Csob são, respectivamente, volume (mL) e concentração proteica (mg/mL) do sobrenadante resultante depois de centrifugar o renaturado, enquanto Vsolub e Csolub são, respectivamente, volume (mL) e concentração proteica (mg/mL) do solubilizado em ureia 8 M.

4.8.4 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diálise e diafiltração

O material dos sobrenadantes da renaturação por diálise e diafiltração foi misturado e filtrado para submetê-lo à cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose (1 ml de leito – 5 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, HiTrap FF). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 20 mM, NaCl 50 mM, pH de 4,5. A amostra com a proteína renaturada teve seu pH ajustado a 4,5 e a condutividade igual à do tampão de equilíbrio. Após a adsorção da amostra, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio para retirar o material não adsorvido. A eluição foi realizada com concentrações crescentes de NaCl: 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM em tampão acetato 20 mM pH 4,5.

4.8.5 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diluição direta no tampão com arginina

O material renaturado com o tampão A contendo arginina (item 4.8.3) foi centrifugado e submetido à cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose (1 ml de leito – 5 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, HiTrap FF). O pH e a condutividade do renaturado foram

ajustados antes de entrar na coluna de SP-Sepharose. Para eluir o material renaturado foi usado tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. A seguir, o material restante ainda adsorvido à coluna foi eluído com tampão Tris 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0. A limpeza da coluna foi realizada com seis volumes de NaOH 0,1 M.

4.8.7 Purificação em cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do rhG-CSF renaturado por diluição direta em tampão sem arginina

O material centrifugado após renaturação com o tampão sem arginina (item 4.8.3) foi dividido em volumes iguais, os quais foram ajustados a pH 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5. Depois de repouso overnight a 4 ºC, as alíquotas foram centrifugadas e filtradas antes de ajustar a condutividade igual à do tampão de equilíbrio. As soluções foram submetidas à cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose (10 ml de leito – 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 20 mM, NaCl 50 mM, pH de 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5. Após a adsorção da amostra, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio para retirar o material não adsorvido. A eluição foi realizada com 100 mM de NaCl em tampão acetato 20 mM (pH 5,0) e tampão fosfato (pH 6,0; 7,0; 8,0). A seguir, o material restante ainda adsorvido à coluna foi eluído com tampão Tris 10 mM, NaCl 500 mM com o pH correspondente. A limpeza da coluna foi realizada com seis volumes de NaOH 0,1 M. Foram utilizados 10 volumes de coluna de cada tampão, se coletaram frações de 10 mL para cada eluição e todas as operações foram realizadas com fluxo de 5 mL/min.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Determinação da concentração celular

O crescimento da bactéria foi acompanhado pela DO a 600nm determinada no espectrofotômetro HITACHI U-5100, com diluição adequada da cultura em solução salina estéril. Além disso, os valores de DO foram convertidos em concentração celular empregando o coeficiente angular da curva de DO pela massa seca em que DO = 1,0 equivale a 0,38 g/L de biomassa celular seca.

Para construção da curva de correlação entre DO e massa seca, 1 L da suspensão celular obtida em reator (item 4.7.2) foi inativado com formalina a 2%(v/v) por 18 h à temperatura ambiente. A suspensão inativada foi centrifugada (11.200 g, 15 min a 4 ºC) e o

pellet ressuspendido em solução salina. A partir da suspensão concentrada foram obtidas 10 suspensões com diferentes DO de 3,85 a 38,5, que foram distribuídas em duplicata em tubos de centrífuga secos previamente em estufa e pesados. Após centrifugação (11.200 g, 15 min a 4 ºC), o pellet bacteriano de cada tubo foi seco em estufa a 60° C até massa constante. Os valores obtidos foram empregados para construção da curva.

4.9.2 Determinação do pH

No final de cada cultivo em frasco, centrifugaram-se 40 ml (8.500 g, 10 min) para determinar o pH do sobrenadante. Nos cultivos realizados em biorreator, o pH foi monitorado e controlado pelo software MCFS.

4.9.3 Determinação da estabilidade do plasmídeo

Tomaram-se amostras de 100 µL do cultivo, antes e após indução, que foram diluídas até 10^5 e 10^6 e semeadas em placas de LB-ágar sem antibiótico. As placas foram incubadas a 37 °C por pelo menos 16 h. Para cada amostra, 70 colônias foram repicadas em meio LB-ágar sem e com antibiótico. As novas placas foram incubadas a 37 °C por pelo menos 18 h. A retenção do plasmídeo (colônias resistentes) foi calculada como a proporção de colônias que cresceram no meio com antibiótico em relação ao total de colônias que cresceram no meio sem antibiótico.

4.9.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para análise da síntese proteica por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE na sigla em inglês), amostras de 1 mL retiradas dos cultivos foram centrifugadas a 14.000 g por 5 min, o pellet foi armazenado e o sobrenadante descartado. Os pellets foram ressuspendidos em 150 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE 4 vezes concentrado (T.A.4x) ou dissolvidos em ureia 8 M antes do acréscimo do T.A.4x, ajustando-se a DO para 10 (3,76 g/L) em ambos casos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% após aquecimento a 95 ºC durante 5 min. A separação foi realizada a 110 V por 2 h e os géis corados com Coomassie Blue R-250.

Todas as amostras obtidas durante as etapas de purificação também foram submetidas à SDS-PAGE para determinar em qual fração se encontrava o rhG-CSF assim como o grau de pureza. Para isso foram aplicadas 15 μg de proteína em cada canaleta do gel.

4.9.5 Identificação do rhG-CSF por Western Blotting

Amostras de alguns cultivos e frações da purificação, depois de serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi corada com Ponceau S para visualizar e marcar a posição das bandas. A seguir, o Ponceau S foi lavado com (PBS) contendo 0,1%(v/v) Tween 20 (PBS-T) e a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 10%(m/v) dissolvido em PBS-T, a 4° C, durante uma hora e meia. Depois do bloqueio, foram feitas duas incubações de 90 min sob agitação em temperatura ambiente: a primeira com anticorpo primário obtido da imunização de camundongos com rhG-CSF (Gomes et al, 2012), e a segunda com anticorpo secundário específico conjugado: soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A membrana foi lavada por três vezes com PBS-T (10 min cada lavagem), revelada com um substrato quimioluminescente (ECL®, GE Healthcare) e a imagem obtida no fotodocumentador "Image Quant LAS 4000".

4.9.6 Determinação da pureza do rhG-CSF por densitometria

A pureza da proteína foi quantificada por densitometria das bandas de SDS-PAGE, empregando o densitômetro BioRad GS-800 e o software Quantity One 4.6.3 (BioRad) ou o programa Image J.

A porcentagem relativa, ou pureza, da banda do rhG-CSF foi calculada pela Equação 5.

$$\%\ \text{relativa rhG-CSF} = \frac{\text{intensidade banda rhG-CSF} \times 100}{\sum \text{intensidade todas as bandas da canaleta}} \qquad \text{Equação 5}$$

A produção específica do rhG-CSF foi calculada pela Equação 6.

$$\text{produção específica rhG-CSF} = \frac{\text{intensidade banda rhG-CSF} \times \text{Cx cultivo}}{\text{Cx ajustada (3,76 g/L)}} \qquad \text{Equação 6}$$

4.9.7 Determinação da concentração das fontes de carbono e da formação de acetato nos cultivos em biorreator

As análises das concentrações de glicerol, glicose e lactose nas amostras dos sobrenadantes dos cultivos com meio de autoindução e HDF em biorreator foram realizadas em cromatografia liquida de alta resolução (HPLC, Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler), utilizando a coluna Aminex HPX87H (Biorad) e solução de H_2SO_4 5 mM como fase móvel, com uma vazão de 0,6 mL/min, a 60 ºC. As amostras foram diluídas 10 vezes em H_2SO_4 25 mM e filtradas por 0,45 µm antes da aplicação à coluna. As fontes de carbono foram detectadas mediante o índice de refração (IR) e o acetato pela absorbância em detector UV a 210 nm.

4.9.8 Quantificação da concentração proteica pelo método do ácido bicinconínico

A quantificação da concentração proteica foi realizada empregando-se o kit do ensaio colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA, Novagen). Albumina do soro bovino (BSA) foi usada como padrão nas concentrações de 5 a 250 µg/mL. A concentração de rhG-CSF foi estimada pela Equação 7.

$$\text{concentração de rhG-CSF} = \frac{\%\ \text{relativa de rhG-CSF} \times \text{concentração proteica}}{100} \qquad \text{Equação 7}$$

4.9.9 Dicroísmo circular

Este método permite analisar a estrutura secundária das proteínas. Para análise do rhG-CSF purificado foi empregado o espectropolarímetro JASCO J-810. As medições se realizaram nos comprimentos de onda entre 190 e 260 nm, a cada 0,5 nm e um caminho óptico de 0,01 cm, com a proteína rhG-CSF purificada a uma concentração de 0,3 mg/ml em tampão fosfato 10 mM pH 7,4.

4.10 Ensaio da atividade biológica do rhG-CSF

Avaliou-se a atividade biológica do rhG-CSF purificado mediante um estudo *in vivo*. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão Ética do Uso de Animais e realizados de acordo com as normas da Lei nº 11.794 do Decreto 6.899 (protocolo CEUAIB nº 853/11). Foram utilizados 32 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, separados em 4 grupos de 8

animais cada (Tabela 9). Durante cinco dias, os camundongos receberam pela via intraperitoneal (ip) doses das seguintes substâncias: tampão fosfato, rhG-CSF de referência (Granulokine, Filgrastim da Roche) e rhG-CSF purificado. Desse modo, os grupos experimentais foram divididos em:

Grupo 1: controle positivo, animais que receberam diariamente 100 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 estéril;

Grupo 2: controle negativo, animais em que foi induzida neutropenia com 100 µL (4,5 µg) de ciclofosfamida (Sigma) por via ip no primeiro dia e nos 4 dias posteriores os animais receberam 100 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 estéril;

Grupo 3: animais em que foi induzida neutropenia com 100 µL (4,5 µg) de ciclofosfamida (Sigma) no primeiro dia e nos 4 dias posteriores os animais receberam 100 µL de amostra contendo 1,5 µg de rhG-CSF purificado dissolvidos em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 estéril;

Grupo 4: animais em que foi induzida neutropenia com 100 µL (4,5 µg) de ciclofosfamida (Sigma) no primeiro dia e nos 4 dias posteriores os animais receberam 100 µL de amostra contendo 1,5 µg de Granulokine dissolvidos em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 estéril.

No sexto dia, as amostras sanguíneas foram obtidas a partir da punção do plexo axilar dos camundongos, previamente anestesiados com xilazina (10 mg/Kg de peso, Rompun ®, Bayer HealthCare animal Health, Leverkusen, Alemanha) e cetamina (100 mg/Kg de peso, Ketamina ®, Cristália, São Paulo, Brasil). O sangue foi coletado com pipetas de transferência e colocado em tubos Eppendorf, contendo EDTA (sal potássico do ácido etileno diaminotetracético) a 10%(m/v), na proporção de 50 µL/mL de sangue total, para a realização do hemograma e da extensão sanguínea nas lâminas, posteriormente coradas com corante May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld. Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados. Esta parte do experimento foi realizada no laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia sobre a supervisão da Profa. Primavera Borelli e Edson Makiyama.

Tabela 9: Esquema de administração usado no ensaio *in vivo* para avaliação da atividade biológica do rhGCSF purificado

Grupos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
1. Controle positivo	fosfato	fosfato	fosfato	fosfato	fosfato
2. Controle negativo	ciclofosfamida	fosfato	fosfato	fosfato	fosfato
3. rhG-CSF purificado	ciclofosfamida	rhG-CSF	rhG-CSF	rhG-CSF	rhG-CSF
4. Granulokine	ciclofosfamida	Granulokine	Granulokine	Granulokine	Granulokine

Para a análise da atividade biológica, primeiro foi realizada em duplicata a quantificação das células do sangue no equipamento ABC Vet (ABX Diagnostics, Horiba, Kyoto, Japão) e depois a contagem diferencial ao microscópio das células brancas (WCB) nas lâminas coradas. Para realizar a análise estatística dos dados foi empregado o programa GraphPad Prism 5, utilizando os testes D´Agostino and Pearson Omnibus Normality e Kolmogorov-Smirvov para verificar se a distribuição do dados era normal. Para os dados com distribuição normal, os grupos foram comparados por One Way Anova Compares e Teste Dummet. Para os dados cuja distribuição não foi normal, os grupos também foram comparados por One Way Anova Compares, porém o Teste Dums All Pains (não paramétrico) foi aplicado. Em ambos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do lote de trabalho em meio LB

Os resultados da Tabela 10 mostram que o lote de trabalho obtido em meio complexo LB apresentou ótima viabilidade e estabilidade plasmidial de 100 %, assim como morfologia característica das bactérias segundo a coloração de Gram. Portanto, o lote de trabalho produzido nesse meio foi considerado adequado para ser usado nos cultivos dessa bactéria para produção do rhG-CSF.

Tabela 10: Avaliação do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLys S (pARKAN-I/rhG-CSF) armazenado em meio LB-Kan/Clo

Ensaio	Resultado
Estabilidade do plasmídeo	100 %
Viabilidade	2×10^{9} UFC/mL
Coloração de Gram	Bactérias íntegras com aspecto de coco-bacilo e alguns filamentos alongados

A análise do volume do lote de trabalho necessário para inocular diretamente 100 mL de meio de cultura pode ser observada na Figura 8. A diferença entre eles para atingir a DO adequada para indução, ou seja, DO ≥ 1,0 (≥ 0, 38 g/L), foi de apenas uma hora; assim resolvemos usar 50 µL para inocular diretamente os cultivos em frascos agitados, de forma a atingir a DO desejada em cerca de 4 h de cultivo e minimizar o uso do estoque congelado.

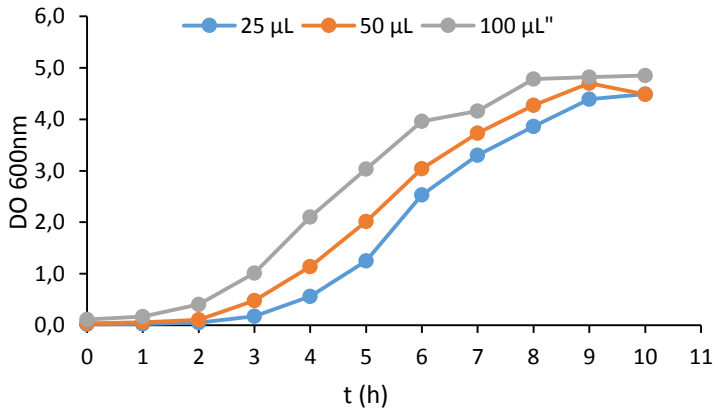

Figura 9 Curvas de crescimento da avaliação do volume do lote de trabalho (25, 50 e 100 µL) de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) para inocular diretamente 100 mL de meio para cultivos em frascos agitados

5.2 Cultivos em frascos agitados em meio complexo 2YT

Para avaliar as condições de produção de rhG-CSF em *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS com o novo vetor pARKAN-I/rhG-CSF, foram feitos cultivos em meio 2YT, com e sem antibiótico, com e sem glicose (Figura 10). Os cultivos foram induzidos com IPTG 1 mM quando a DO atingiu valores ≥ 0,6 (≥ 0,22 g/L). As amostras retiradas antes e a cada duas horas após indução foram submetidas à eletroforese e Western Blotting. A DO inicial de todos os cultivos foi de aproximadamente 0,2 (0,075 g/L). Ao final, a DO dos cultivos com e sem glicose, em média, foram de 3,98 (1,50 g/L) e 7,0 (2,63 g/L), respectivamente. Não houve diferenças entre a concentração celular dos frascos induzidos e não induzidos em meio sem glicose (Figura 10A), mas foi observada uma pequena diferença na presença de glicose (Figura 10B).

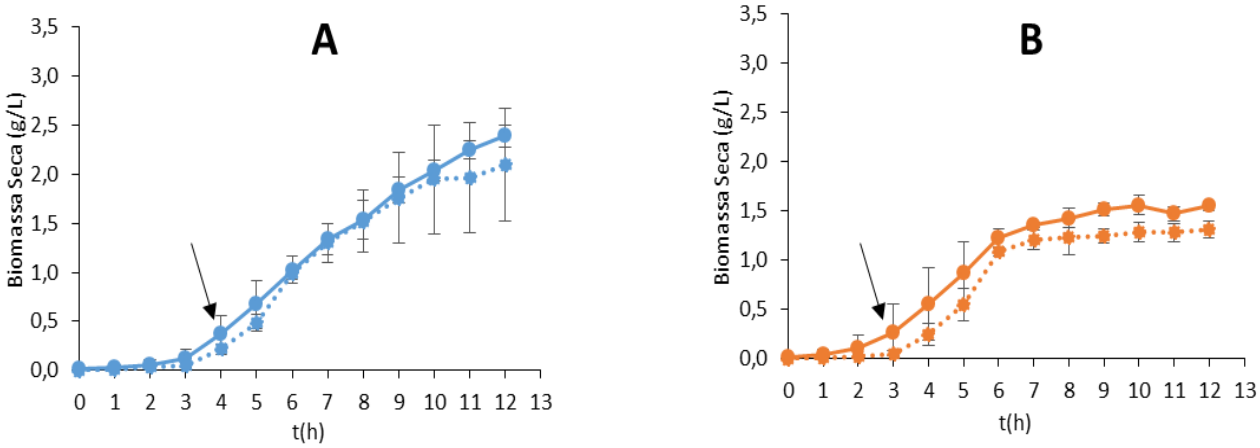

Figura 10 Curvas de crescimento do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF). Culturas induzidas (linha tracejada) e não induzidas (linha sólida) em meio 2YT, com antibiótico: (A) sem glicose (B) com glicose. As flechas indicam o momento da adição de IPTG 1 mM. Média e desvio de 3 experimentos independentes.

Quando comparadas as curvas de crescimento obtidas nos quatro tipos de cultivos induzidos feitos em meio 2YT (Figura 11), pode-se observar que os meios sem glicose (com antibiótico ou não) mostraram um crescimento mais lento, porém tiveram uma fase exponencial prolongada. Esses cultivos alcançaram concentrações celulares maiores do que aqueles com glicose, onde o crescimento foi mais rápido, porém atingiram a fase estacionária mais cedo. Esse resultado corrobora o fato de que quando a glicose é usada como fonte de carbono (variantes I e III), a sua rápida assimilação traz como consequência a formação de acetato e portanto diminuição do pH, provocando a inibição do crescimento bacteriano (Kilikian et al., 2000).

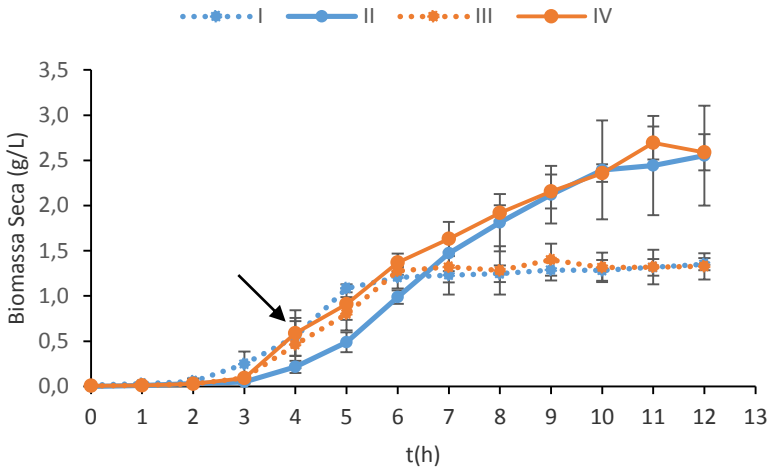

Figura 11 Curvas de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio 2YT: I com antibiótico e glicose; II com antibiótico sem glicose; III sem antibiótico e com glicose; IV sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes. A seta indica o momento da adição de IPTG 1mM.

Na Tabela 11 podem ser observados os valores das médias dos parâmetros avaliados durante o cultivo. Coincidindo com o observado na Figura 11, dentre os cultivos com antibiótico, aquele com acréscimo de glicose promoveu crescimento mais rápido das bactérias, (μ_{max} = 1,21 h^{-1}) do que aquele sem glicose (μ_{max} = 1,02 h^{-1}). Estes valores são novamente consequência da presencia ou não da glicose no meio (ver parágrafo anterior). Nos meios sem antibiótico as velocidades máximas de crescimento foram similares em ambos os cultivos: μ_{max} = 1,20 h^{-1} (sem glicose) e μ_{max} = 1,24 h^{-1} (com glicose).

Tabela 11: Média dos parâmetros avaliados durante o cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio 2YT, com e sem antibiótico e com e sem glicose

Cultivo	Antibiótico	Glicose	μ_{max} (h^{-1})	biomassa final (g/L)	pH
I	X	X	1,21	1,36	4,95
II	X		**1,02**	2,44	7,68
III		X	1,24	1,31	4,61
IV			1,20	2,56	7,91

O meio com antibiótico e sem glicose teve o crescimento mais lento (cultivo II, Tabela 11), resultado explicado pela ausência da fonte de carbono, que é metabolizada para gerar energia (Novagen, 2006), e pela ativação dos genes de resistência a antibióticos na presença

de Kan e Clo. Devido a isto, a célula bacteriana precisou disponibilizar energia metabólica para seu crescimento, para a síntese do rhG-CSF e para a síntese das proteínas responsáveis pela resistência ao antibiótico, criando um estresse metabólico adicional (Goyal et al., 2009).

Em geral a média dos valores de pH dos sobrenadantes no final dos cultivos foi 7,79 para os meios sem glicose e 4,78 com glicose (Tabela 11), nos quais atingiu-se mais rapidamente a fase estacionária. O ácido acético é o principal metabolito da via fermentativa em *E. coli*, formado mais rapidamente a partir da glicose. Também é um inibidor do crescimento bacteriano e da síntese de proteína heteróloga, sendo a causa do pH final ácido nos cultivos com glicose. O acúmulo de ácido acético é o fenômeno mais pronunciado em meios de cultivo complexos com extrato de levedura na sua composição (Vaz, 2008).

5.2.1 Estabilidade do plasmídeo

A percentagem de colônias resistentes aos antibióticos nas amostras retiradas durante os cultivos em meio 2YT foi calculada pela proporção de colônias que cresceram no meio com antibiótico em relação às que cresceram no meio sem antibiótico. O valor médio foi 100% de colônias resistentes em todas as amostras retiradas dos quatro cultivos, exceto naquele sem antibiótico e sem glicose (cultivo IV), nos quais 6 h e 8 h após a indução as percentagens médias foram 97,5% e 94,1%, respectivamente (Figura 12).

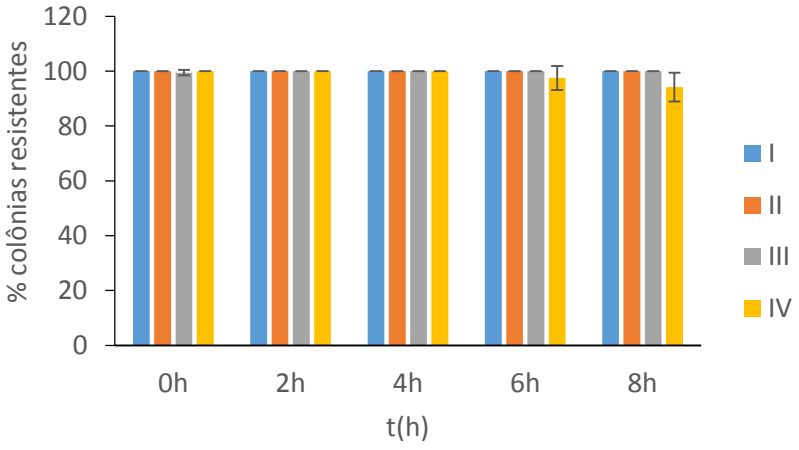

Figura 12 Estabilidade do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF calculada antes e após indução dos cultivos de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I) com antibiótico e glicose; II) com antibiótico sem glicose; III) sem antibiótico e com glicose; IV) sem antibiótico e glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes.

Estes resultados mostram que o plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF é altamente estável mesmo sem o acréscimo de antibiótico no meio de cultura. Esse resultado confirma mais uma

vez o papel da sequência pAR na estabilidade do plasmídeo durante a divisão celular (Gerdes and Molin, 1986; Li et al., 2004; Liu et el., 2005; Ptacin et al., 2010).

5.2.2 Western Blotting

Para avaliar se o rhG-CSF foi produzido nos cultivos com meio 2YT, foi realizado Western Blotting das amostras retiradas antes e depois da indução. Na Figura 13 pode-se notar a banda do rhG-CSF nas amostras induzidas na altura da banda do controle positivo utilizado (rhG-CSF produzido em *E. coli* por Gomes et al., 2012). Esse resultado confirma que o rhG-CSF foi produzido por *E. coli* carregando o vetor pARKAN-I/rhG-CSF, em presença ou não de antibiótico.

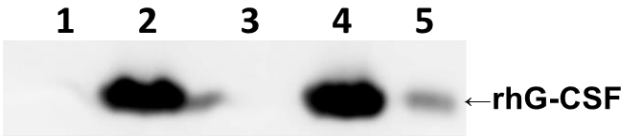

Figura 13 Western Blotting das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLys S (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT com (canaletas 1 e 2) ou sem antibiótico (canaletas 3 e 4), antes (canaletas 1 e 3) e após 4 h de indução (canaletas 2 e 4); (5) rhG-CSF purificada como controle positivo.

Este resultado, aliado à alta percentagem de colônias resistentes desses cultivos, levanta a possibilidade de eliminar o uso da canamicina no meio de cultura, o que tornaria mais barato o procedimento de obtenção do rhG-CSF.

5.2.3 Ensaio de solubilidade das amostras para eletroforese

Uma vez que o rhG-CSF foi produzido na forma insolúvel, as amostras do *pellet* bacteriano foram ressuspendidas diretamente em tampão de amostra para eletroforese, ou solubilizadas em ureia 8 M, para avaliar se haveria diferença na intensidade das bandas em SDS-PAGE. Observe-se na Figura 14 que a banda da proteína, na altura dos 18,8 kDa, do *pellet* dissolvido em ureia 8 M é bem mais intensa e tem maior percentagem relativa que a banda correspondente à amostra do *pellet* ressuspendido no tampão da amostra.

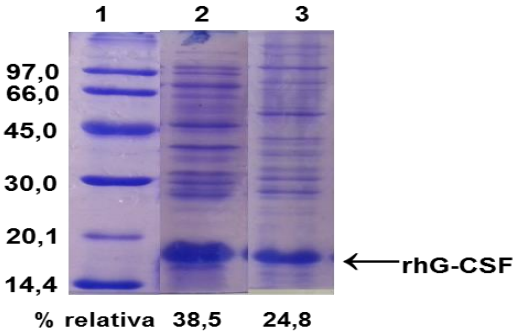

Figura 14 SDS-PAGE (gel 15 %) corado com azul de Coomassie das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT **com antibiótico** às 4 h de indução, dissolvidas em: (2) ureia 8 M e (3) tampão da amostra; (1) padrão de peso molecular.

A partir deste resultado, as amostras dos cultivos para realização de eletroforeses passaram a ser dissolvidas em ureia 8 M, ajustando-se o volume para obter o equivalente à DO igual a 10 (3,76 g/L).

5.2.4 Avaliação da produção de rhG-CSF com o vetor pARKAN-I por SDS- PAGE

Na Figura 15, observa-se nas canaletas das amostras induzidas nos quatro meios avaliados (A com antibiótico e B sem antibiótico), a banda do rhG-CSF com peso molecular equivalente à 18,8 kDa entre as bandas de 20 kDa e 14,4 kDa do padrão de massa molecular. Essas bandas não apareceram nas amostras tomadas antes da indução, embora pareça ter havido um pequeno escape antes da indução, o qual foi mais controlado na presença de glicose.

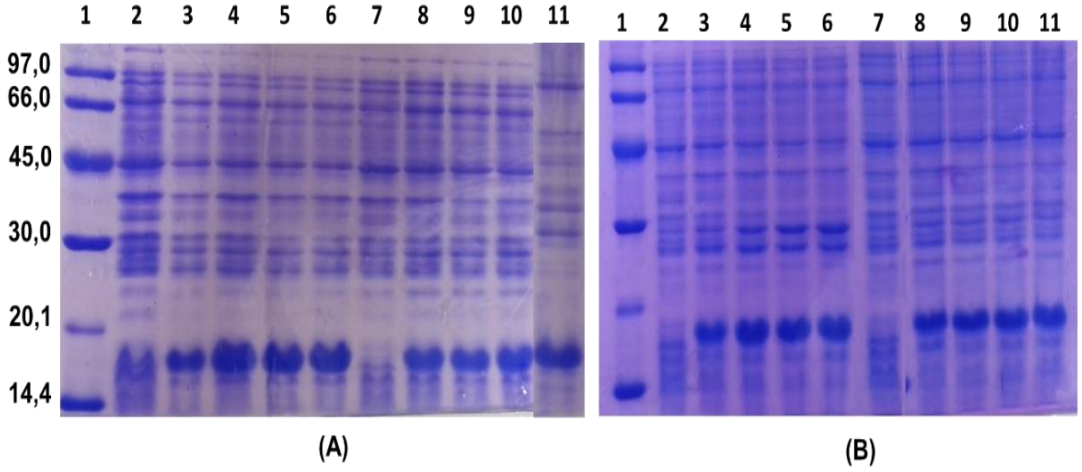

Figura 15 SDS-PAGE (géis 15 %) corados com azul de Coomassie das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio 2YT para produção de rhG-CSF com **(A)** e sem **(B)** antibióticos. (1) padrão de peso molecular, (2-6) sem glicose; (7-11) com glicose. (2 e 7) amostras não induzidas; (3 e 8) 2 h indução; (4 e 9) 4 h indução; (5 e 10) 6 h indução; (6 e 11) 8 h indução.

Lembre-se que a glicose tem a capacidade de diminuir o nível basal da síntese da proteína alvo, atuando diretamente sobre o promotor Lac UV5 que regula a síntese da T7 RNA polimerase (pET User Manual, 2014); fenômeno denominado repressão catabólica (Champe et al., 2009). Isso poderia justificar que nos cultivos com antibiótico sem glicose (II) o crescimento seja mais lento (Figura 11), porque parte da energia metabólica poderia estar sendo usada para produzir pequenas quantidades de proteína na ausência do IPTG. Porém, no resultado do Western Blotting (Figura 13), nas amostras não induzidas não aparece banda na altura do controle positivo, então a banda de pequena intensidade com altura similar à do rhG-CSF observada em amostras não induzidas no SDS-PAGE, provavelmente seja uma proteína nativa de *E. coli* com peso molecular semelhante ao do rhG-CSF.

Pode-se observar também que as bandas das amostras dos cultivos sem glicose foram levemente mais intensas do que as bandas correspondentes às amostras do cultivo com glicose (Figura 15). Em ausência de glicose, como já foi explicado, há maior probabilidade de que o crescimento bacteriano continue ocorrendo porque não há inibição por acetato, mesmo que seja mais lentamente, e a proteína continue sendo produzida, daí as bandas mais intensas no meio sem glicose.

5.2.4.1. Percentagem relativa da banda do rhG-CSF.

Os valores de percentagem relativa determinados por densitometria das bandas das amostras dos géis da Figura 15 são mostrados no gráfico da Figura 16. Dado que a DO foi ajustada para 10 (3,76 g/L) na ressuspensão dos pellets bacterianos em ureia 8 M, a percentagem relativa por massa celular manteve-se praticamente constante após 2 h de indução em todos os cultivos. Em cada um dos cultivos antes da indução (0 h) a quantidade relativa da proteína foi extremamente baixa, o que está de acordo com o resultado do SDS-PAGE (Figura 15).

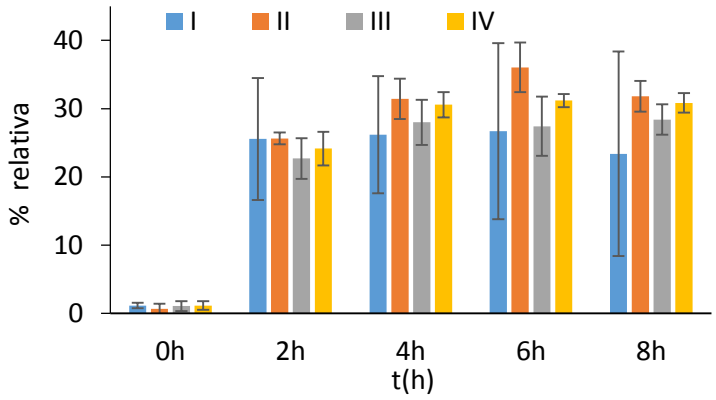

Figura 16 Percentagem relativa da banda de rhG-CSF em relação à soma da intensidade das outras bandas de proteínas em SDS-PAGE, nas amostras não induzidas e induzidas de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I) com antibiótico e glicose; II) com antibiótico sem glicose; III) sem antibiótico e com glicose; IV) sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes

Considerando as barras de erros, não houve diferenças importantes na produção do rhG-CSF entre os quatro tipos de cultivo. Portanto, o emprego de antibiótico e glicose não influenciou o valor de percentagem relativa da proteína durante o cultivo.

5.2.4.2. Produção específica do rhG-CSF

Quando a intensidade da banda foi calculada em função da concentração celular do cultivo, e considerando as barras de erros, foram observadas diferenças na produção do rhG-CSF entre os cultivos sem glicose e com glicose. Similar à análise de porcentagem relativa, em todos os cultivos antes da indução (0 h) não houve produção ou escape da proteína, concordando também com o resultado do Western Blotting (Figura 13). Ocorreu o aumento paulatino da produção de proteína das 2 h de indução até o final nos cultivos sem glicose (II e

IV, Figura 17), paralelamente com o aumento da concentração celular (Figura 11). Entretanto, nos cultivos com glicose (I e III, Figura 17) a produção específica foi similar entre 2 h e 8 h de indução, provavelmente porque a concentração celular manteve-se praticamente constante após 2 h de indução (Figura 11). Coincidindo com esses resultados, as bandas dos cultivos sem glicose (Figura 15) foram mais intensas que aquelas dos cultivos com glicose no meio.

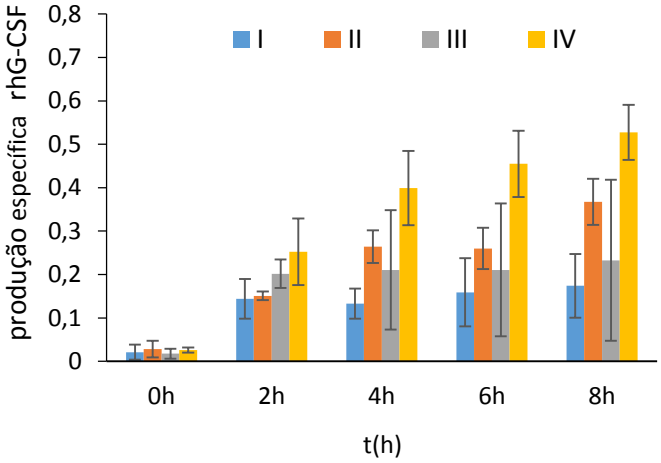

Figura 17 Produção específica do rhG-CSF dada pela intensidade das bandas em SDS-PAGE pela DO do cultivo nas amostras induzidas e não induzidas de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS em meio 2YT: I com antibiótico e glicose; II com antibiótico sem glicose; III sem antibiótico e com glicose; IV sem antibiótico e sem glicose. Médias e desvio de 3 experimentos independentes.

Kilikian et al. (2000) destacaram a concentração de glicose como um dos fatores chave para a formação de ácido acético, o qual torna o pH ácido, e tende a inibir o crescimento bacteriano, levando, provavelmente, os cultivos I e II a atingirem mais rápido a fase estacionária. Consequentemente, a produção específica de proteína foi praticamente constante após o término da fase de crescimento da bactéria.

Vaz et al. (2008) observaram o efeito do extrato de levedura sobre a cinética de crescimento de *E. coli* BL21 recombinante e o acúmulo do ácido acético com efeito inibidor do crescimento celular e da expressão da proteína. Nesse estudo o pH alcalino foi considerado mais apropriado por neutralizar os ácidos gerados pelo metabolismo de *E. coli*. Nossos resultados obtidos com meio de cultura 2YT sem adição de glicose corroboram a observação de Vaz et al (2008), mas é importante ressaltar aqui que essas observações são válidas para os cultivos em frascos agitados apenas, onde não há controle nem do pH nem da concentração de oxigênio dissolvido durante o crescimento.

Segundo Goyal et al (2009) a presença de antibiótico no meio produz estresse adicional pela produção da proteína inativadora do antibiótico. Assim, aqueles cultivos com

antibiótico no meio produziram menos rhG-CSF, porém a estabilidade foi alta. O cultivo realizado em meio de cultura sem antibiótico e sem glicose (IV) teve a maior produção específica da proteína e maior densidade celular, coincidindo com ter a percentagem mais baixa de colônias resistentes (97% em 6 h e 95% em 8 h, Figura 12). Esse resultado corrobora que nos cultivos de bactérias recombinantes são necessárias altas concentrações celulares, pois a síntese de proteína heteróloga está associada ao consumo de parte da energia disponível para o crescimento e manutenção da bactéria (Dos Santos, 2012). Na ausência de antibiótico, as células bacterianas não usam energia metabólica para sintetizar as proteínas que inativam os antibióticos, por isso há maior energia disponível para síntese da proteína alvo, porém é mais provável a perda do plasmídeo.

Nesses cultivos com 2YT, a construção *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS transformada com o plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF confirma os resultados da literatura sobre a elevada estabilidade que a sequência pAR confere aos plasmídeos (Chang et al., 1987;Lawley and Taylor, 2003; Lui et al., 2005). Em nossos experimentos a alta estabilidade foi verificada mesmo sem acréscimo de antibiótico, aí cabe a possibilidade de realizar os próximos cultivos sem adição destes compostos, o que levaria à redução do custo de produção. Também poder-se-ia considerar interromper os cultivos após 4 h ou 6 h de indução, poupando tempo. Além da alta estabilidade, a construção permitiu a produção de rhG-CSF em pequena escala, então a construção é uma boa candidata para produzir a proteína em larga escala.

5.3 Cultivos em frascos em meio complexo de autoindução

O meio 2YT, apesar dos resultados favoráveis obtidos, contém triptona, componente de origem animal que traz o risco de contaminação com príons, e não é um bom meio para biorreator na ausência de glicose, pelo fato de não ser tamponado e de não conter sais, não permitindo assim alcançar altas densidades celulares em biorreatores. Diante disso, avaliamos uma variante de meio complexo de autoindução (Studier et al., 2005) proposta por Dos Santos (2012), que substitui a triptona por phytone (componente de origem vegetal) e que usa lactose para indução, aproveitando suas vantagens frente ao IPTG. Nesse meio são adicionadas três fontes de carbono: glicose, glicerol e lactose. Quando a glicose se esgota, deixa de exercer a repressão catabólica sobre o operon *lac*, ao mesmo tempo o glicerol passa a ser consumido como fonte de carbono principal, para que então se inicie o consumo da lactose, que atua também como indutor. Esse meio foi usado anteriormente com sucesso pela equipe do

Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (Dos Santos, 2012; da Silva et al., 2013; Vélez et al., 2014; Campani et al. 2016).

Inicialmente o meio de autoindução contendo phytone foi avaliado em frascos agitados. Como descrito em Materiais e Métodos (item 4.5), obtiveram-se dois cultivos induzidos e outro não induzido para avaliar as curvas de crescimento, estabilidade do plasmídeo e a produção de rhG-CSF em meio de autoindução. Um dos cultivos foi induzido quando alcançou DO 2,3 (0,86 g/L), adicionando-se um pulso de 5 g/L de lactose e se retiraram amostras antes e 4 h após a adição. No outro cultivo induzido (triplicata) a mesma quantidade de lactose foi acrescentada desde o início do experimento. Veja-se na Figura 18 o comportamento das curvas de crescimento dos cultivos induzidos e aquele não induzido em meio de autoindução.

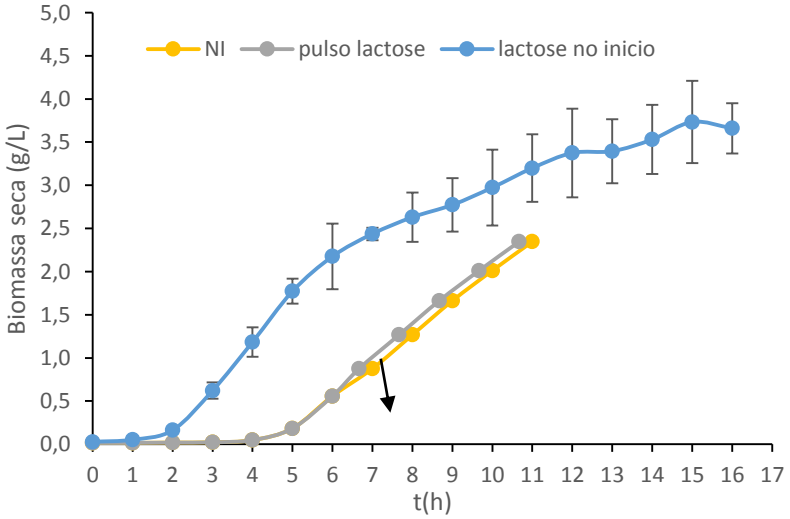

Figura 18 Curvas de crescimento dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio de autoindução. Em amarelo (NI): meio sem acréscimo de lactose; cinza: meio com pulso de 5 g/L de lactose; azul: meio com lactose desde o início, meia e desvio de três experimentos independentes. A seta indica o momento da adição de lactose.

Os cultivos não induzido e aquele com pulso de lactose mostraram valores similares de μ_{max} e pH (Tabela 12). O cultivo induzido com lactose desde o início teve concentrações celulares e μ_{max} maiores (Tabela 12), supomos que devido à maior concentração de fontes de carbono e ao maior tempo de crescimento. O cultivo não induzido teve o menor valor de biomassa pela ausência de lactose no meio, ou seja, não havia fonte de carbono disponível para o crescimento celular quando se esgotaram a glicose e o glicerol. Em todos os cultivos

com o meio de autoindução, a percentagem de colônias resistentes foi 100% antes a após indução.

Tabela 12 Parâmetros determinados durante o cultivo em frascos de *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS **(**pARKAN-rhG-CSF) em meio complexo de autoindução, com pulso de lactose, lactose desde o início do cultivo e sem adição de lactose

Cultivo	μ_{max} (h^{-1})	Biomassa seca (g/L)	pH
Sem lactose	0,75	2,34	6,74
Com pulso de lactose	0,79	2,35	6,94
Lactose desde início	1,14	3,66	6,63

Na Figura 19 é mostrado o resultado do Western Blotting (A) e do SDS-PAGE (B) do cultivo induzido com pulso de lactose. Identificou-se a banda do rhG-CSF à altura do controle positivo (18,8 kDa), sendo mais intensas aquelas após 3 h e 4 h de indução, além de uma banda fraca na segunda hora de indução. Isso coincide com as percentagens relativas 2,34%, 6,02% e 6,79% obtidas para as bandas das amostras de 2, 3 e 4 h, respectivamente, depois da indução e ausência de rhG-CSF na primeira hora, o que indica que a síntese proteica começou duas horas após da adição de lactose.

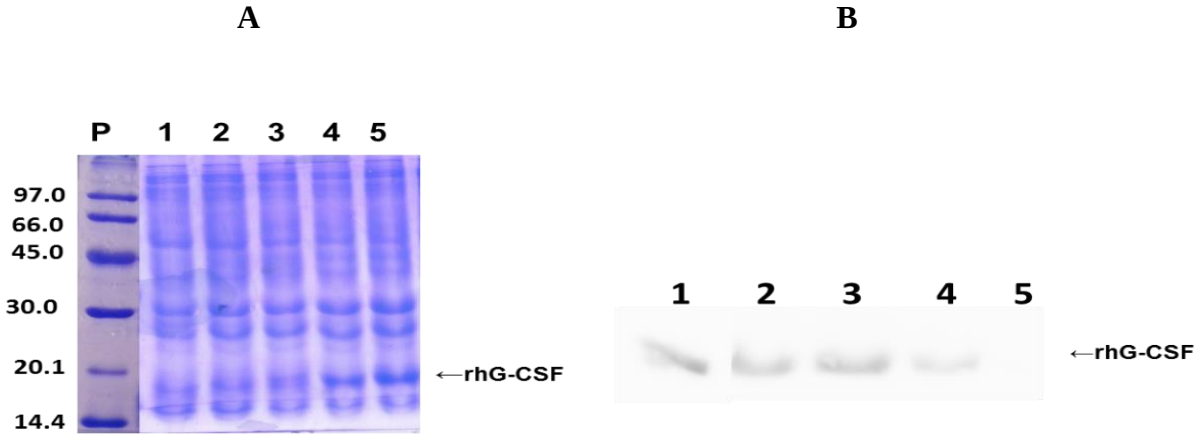

Figura 19 SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B) das amostras dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio de autoindução com pulso de lactose. A: P) padrão de massa molecular; 1) não induzida; 2-5) amostras das 1, 2, 3, 4 h depois de adicionar a lactose. B: 1) controle positivo rhG-CSF purificado (2-5) 4, 3, 2 e 1 h após a indução.

Quanto ao cultivo com lactose no meio de cultura desde o início do processo, retiraram-se as amostras para análise de estabilidade e síntese de proteína de 11 h até 16 h do cultivo. Observe-se a banda da proteína nas amostras nomeadas, tanto no Western como no gel de SDS-PAGE na altura de 18,8 kDa (Figura 20). As densidades relativas foram 7,2%; 7,3%; 7,7%, 8,8%; 8,9% e 9,2%, respectivamente, nas 11, 12, 13, 14, 15 e 16 h de cultivo, o que indica que apesar de o valor da biomassa ter atingido um platô em 3,73 g/L (15 h, Figura 18), a produção do rhG-CSF continuou aumentando. Esses valores, comparados com aqueles das amostras do cultivo com pulso de lactose, evidenciam que a produção de proteína recombinante é favorecida quando a lactose é acrescentada desde o início. Talvez se o cultivo com pulso tivesse prosseguido por mais tempo, uma vez que ele ainda não havia entrado na fase estacionária do crescimento, a produção do rhG-CSF poderia ter sido similar.

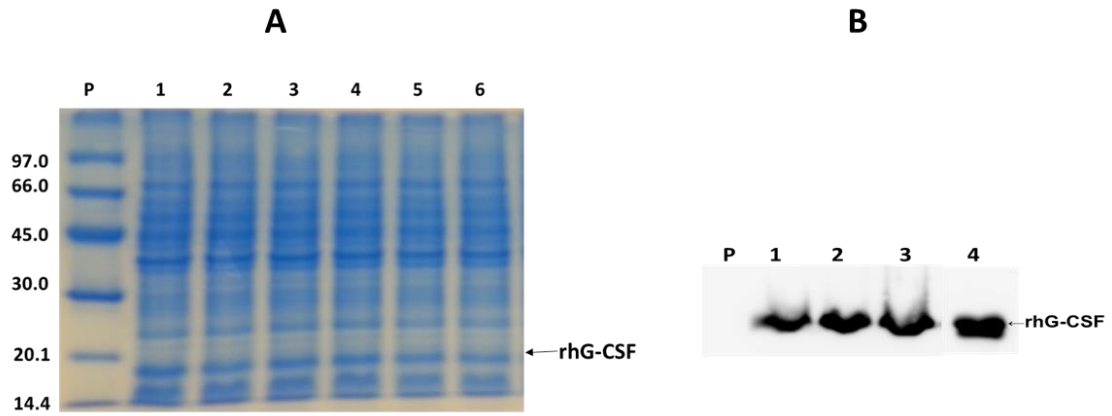

Figura 20 SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B) das amostras dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio de autoindução com lactose adicionada desde o início. A: 1-6) amostras de 11 até 16 h de cultivo. B: 1-3) amostras de 14, 15 e 16 h de cultivo; 4) controle positivo rhG-CSF purificado. P) padrão de massa molecular

Frequentemente nos cultivos induzidos com lactose a produção da proteína alvo é mais demorada (Sargo, 2011), porém a produção de proteína de interesse pode ser até maior que em cultivos induzidos por IPTG (da Silva et al., 2013). Provavelmente a indução com lactose é mais lenta devido à dependência da produção da Lac permease, proteína codificada pelo gene *lac* Y que permite a entrada da lactose na célula, ou seja, o operon *lac* tem de ser desreprimido para que entre maior quantidade de lactose na célula e permita a indução da síntese proteica. Portanto, a lactose pode efetivamente substituir o IPTG como indutor, porém é necessário um tempo mais prolongado de indução, conclusão também afirmada por Campani et al. (2016). Além disso, a lactose é mais econômica do que o IPTG, não é toxica para a bactéria e é consumida como fonte de carbono (Dos Santos, 2012; Vélez et al., 2014; Campani et al., 2016).

Similar ao meio 2YT, o meio complexo autoindução permitiu a produção de rhG-CSF e apresentou estabilidade plasmidial de 100% mesmo sem acréscimo de antibiótico à cultura, como já foi dito, esse meio foi empregado anteriormente para obter proteínas recombinantes em larga escala (Dos Santos, 2012; da Silva et al., 2013; Vélez et al., 2014; Campani et al., 2016).

5.4 Cultivos em meio definido HDF na presença de antibióticos

Para conseguir uma boa produção de proteína recombinante é preciso que o meio de cultura utilizado atinja altas concentrações celulares, para isso existem protocolos bem estabelecidos onde o meio de cultivo é barato e permite controlar a velocidade especifica de crescimento antes e depois da indução. Meios quimicamente definidos contêm basicamente uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio inorgânico, sais minerais e vitaminas e permitem atingir altas densidades celulares, por isso têm sido dos mais usados em cultivos para obtenção de rhG-CSF a partir de *E. coli* em biorreator em batelada (Venkata et al., 2008b) e batelada alimentada (Kim et al., 2014; Vemula et al., 2015b).

5.4.1 Preparo do lote de trabalho em HDF

Inicialmente foi feita uma tentativa de realizar o cultivo em meio definido HDF empregando o estoque congelado preparado em meio LB (50 µL) para inocular diretamente 30 mL de HDF, tal como realizado nos experimentos com 2YT. Entretanto, a cultura não se desenvolveu e após 7 h a DO foi de apenas 0,09 (0,033 g/L).

Assim, uma alíquota do estoque congelado em LB foi semeada em uma placa de meio mínimo M9-ágar com os antibióticos Kan e Clo. Uma colônia isolada dessa placa foi semeada 30 mL do meio HDF para obter-se um novo inóculo para avaliação do crescimento, estabilidade plasmidial e produção de rhG-CSF na *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em HDF. O restante da cultura do pré-inóculo foi utilizado para inocular o cultivo partir do qual foi obtido um estoque congelado em HDF (Figura 7), preparado e analisado segundo descrito no item 4.6.

Os resultados da Tabela 13 mostram que o lote obtido em meio HDF teve estabilidade plasmidial de 100 %, assim como morfologia característica das bactérias segundo a coloração de Gram. A viabilidade resultou semelhante à do estoque obtido em meio LB. O lote de

trabalho também se mostrou adequado para produção de rhG-CSF, sendo necessários 100 µL para inocular 100 mL de meio HDF.

Tabela 13 Avaliação do lote de trabalho de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLYS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo

Ensaio	Resultado
Estabilidade do plasmídeo	100 %
Viabilidade	3,3 x 10^9 UFC/mL
Coloração de GRAM	Bactérias íntegras com aspecto de coco-bacilo e alguns filamentos alongados

5.4.2 Experimento 1 em meio HDF

Na Figura 17 observa-se a curva de crescimento que corresponde ao primeiro experimento, que foi realizado a partir do inóculo obtido de uma colônia isolada em meio M9-ágar/Kan/Clo. A indução foi feita após 6 h de cultivo por causa do crescimento mais lento (μ_{max} = 0,7 h^{-1}) de *E. coli* observado nesse meio de cultura comparado com os meios complexos avaliados (Tabelas 10 e 11).

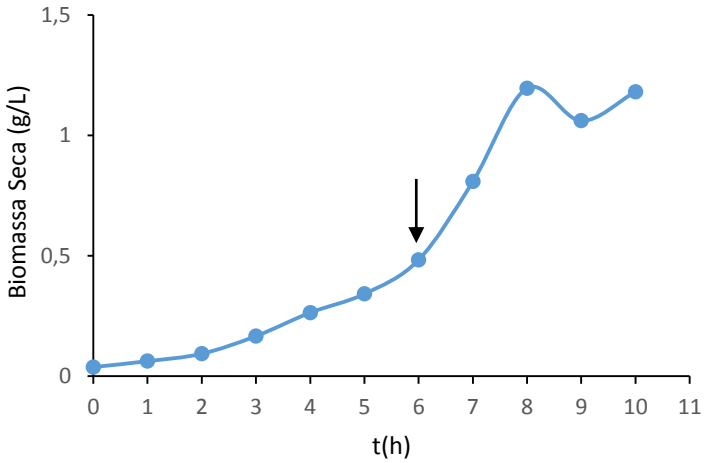

Figura 17 Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em cultivo em frascos com meio HDF-Kan/Clo a 37 °C com DO inicial de 0,1 (0,038 g/L). A seta indica o momento da indução com IPTG 1 mM.

Após indução com IPTG 1 mM obtiveram-se percentagens bem baixas de colônias resistentes, portanto o plasmídeo não foi estável depois de acrescentar o indutor, pois antes da

indução 100% das colônias eram resistentes (Figura 18). Uma vez que haveria a possibilidade de que o IPTG na concentração utilizada fosse tóxico para as células, resolvemos em diminuir 10 vezes a sua concentração no próximo cultivo. Devido à baixa estabilidade plasmidial, não foram realizados SDS-PAGE ou Western Blotting.

Observamos que a μ_{max} no meio HDF foi menor do que no meio 2YT e no meio de autoindução, provavelmente devido à ausência de triptona ou extrato de levedura na composição. A triptona contém aminoácidos e peptídeos e o extrato de levedura nitrogênio e vitaminas (Brown, 2003), porém em meio quimicamente definido esses compostos necessários à sobrevivência celular devem ser sintetizados a partir de glicose e amônia, portanto a ausência desses nutrientes é a principal causa de menor velocidade específica de crescimento.

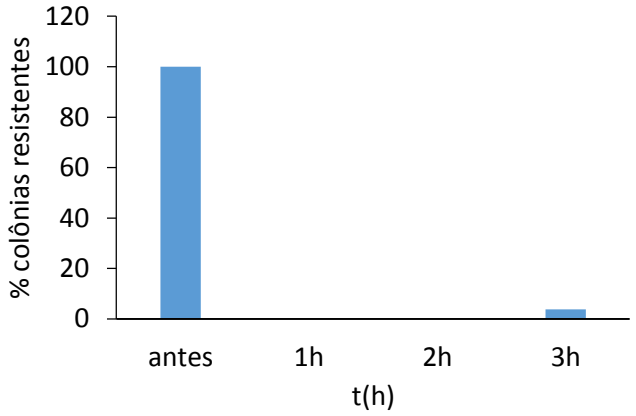

Figura 18 Percentagens de colônias resistentes à Kan nas amostras do cultivo em frascos do experimento 1 a 37 °C com meio HDF- Kan/Clo antes e após 3 h de indução de *E. coli* Star BL21(DE3) pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF).

5.4.3 Experimento 2 em meio HDF

No experimento 2 (Figura 7), um frasco de 300 mL com 30 mL de meio HDF foi inoculado com 100 µL do estoque preparado em HDF-Kan/Clo. Quando a DO ≥ 0,9 (Cx ≥ 0,34 g/L) foi atingida, amostras foram retiradas em 5 h, 6 h e 7 h para avaliar a estabilidade do plasmídeo (Figura 19).

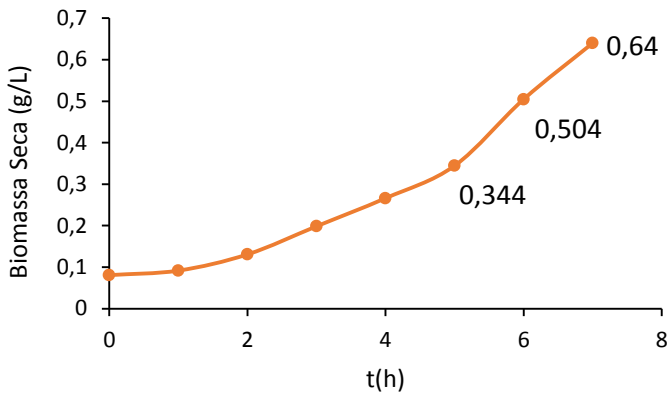

Figura 19 Curva de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo a 37°C no cultivo em frascos do experimento 2. Não foi realizada adição de IPTG.

Pode-se observar na Figura 20 que a percentagem de colônias resistentes nessas amostras foi maior que 97%, indicando alta estabilidade do plasmídeo em concentrações celulares superiores a 0,34 g/L na ausência de IPTG.

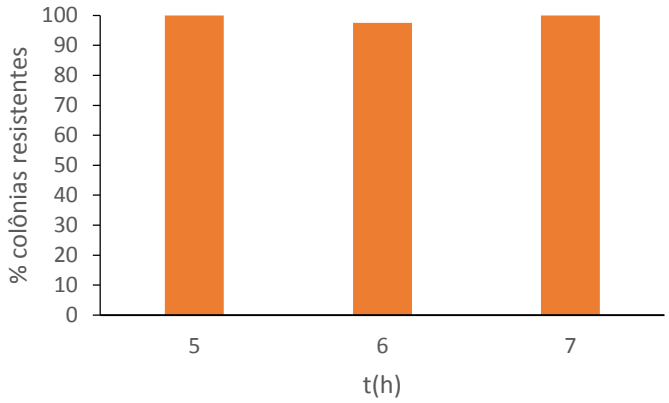

Figura 20 Percentagens de colônias resistentes à canamicina nas amostras de 5, 6 e 7 h do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 37°C em meio HDF-Kan/Clo no cultivo em frascos do experimento 2 sem adição de IPTG.

5.4.4 Experimento 3 em meio HDF

Para o experimento 3 (Figura 7), inocularam-se três frascos diretamente com 100 µL do estoque em HDF. Devido às limitações metabólicas decorrentes do emprego de um meio quimicamente definido, os cultivos foram induzidos com 0,1 mM de IPTG quando a DO atingiu valores superiores a 3,0 (1,13 g/L), e a temperatura foi diminuída de 37 °C para 30 °C, visando aumentar a retenção do plasmídeo na presença do indutor.

Veja-se na Figura 21 a curva da média dos cultivos com meio HDF-Kan/Clo que foram induzidos em comparação ao cultivo não induzido. Até 8 h dos cultivos as curvas de crescimento tiveram um comportamento similar, porém nas últimas horas, aquela correspondente ao cultivo não induzido teve densidade celular superior.

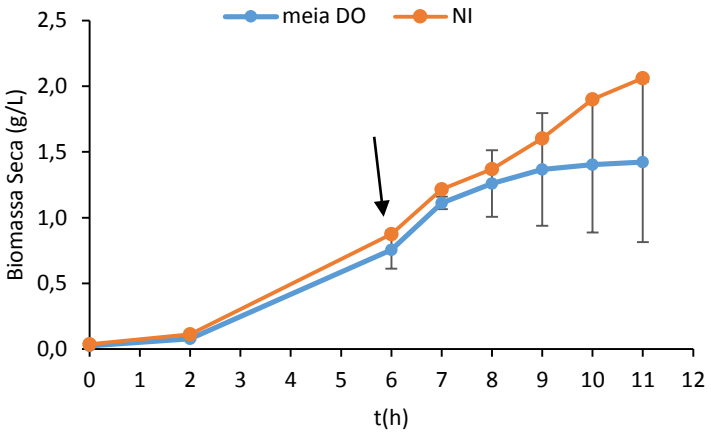

Figura 21 Curvas de crescimento dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo no experimento 3. Média e desvio de três cultivos induzidos com 0,1 mM IPTG a 30°C e um quarto cultivo não induzido (NI) como controle. A seta indica o momento da adição de IPTG 0,1 mM e da diminuição da temperatura de 37 °C até 30 °C.

As condições mais comumente utilizadas para produção de proteínas recombinantes em escala de laboratório são concentração de IPTG de 1 mM e temperatura de 37°C (Larentis et al., 2011). No entanto, tem sido observado em vários trabalhos que concentrações menores de IPTG são capazes de induzir a síntese proteica sem impacto negativo na quantidade de proteína produzida (Olaofe et al., 1995; Larentis et al., 2011; Kim et al., 2014). Larentis et al. (2011) demostraram que a concentração do indutor pode ser reduzida 10 vezes sem impacto negativo na expressão. Se menores quantidades do IPTG podem ser usadas, o processo de produção torna-se mais barato. Além disso, a conhecida citotoxicidade do IPTG e seu efeito negativo no crescimento celular podem ser minimizados usando menores quantidades.

No caso da temperatura, segundo alguns autores a elevação deste parâmetro no cultivo às vezes pode ter efeito negativo na solubilidade e estabilidade da proteína. Einsfeldt et al. (2011) observaram que temperaturas mais baixas e tempos de indução mais longos aumentaram a produção de PsaA recombinante em *E. coli*, daí definiram como condições ideais de indução 25 °C, 0,1 mM de IPTG e 16 h de indução. Segundo Zhang et al. (2002) temperaturas mais altas podem afetar a produção de proteína recombinante, uma vez que o

aumento de temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e consequentemente a produção proteica. Dos Santos (2012) demostrou que tanto cultivos em frascos como em biorreator com maior temperatura apresentaram menor retenção do plasmídeo. A baixa retenção do plasmídeo relaciona-se com o metabolismo mais acelerado observado com temperaturas de cultivo mais elevadas e, portanto, é mais provável que se formem células filhas sem carregar o plasmídeo (Rinas, 1996).

A Figura 22 mostra a percentagem de colônias resistentes dos cultivos em frascos do experimento 3 feitos com o meio HDF-Kan/Clo. Como esperado, houve, mais uma vez 100% de retenção do plasmídeo antes da indução, porém a retenção diminuiu a partir da primeira hora até ficar em 85% na quarta hora, ou seja, a estabilidade do plasmídeo diminuiu com o tempo de indução, porém não chegou a valores inferiores a 85%. Este resultado apoia a hipótese de que, apesar desse meio permitir alcançar elevadas concentrações celulares, devido às limitações metabólicas é necessário fazer a indução com DO mais elevada, quando já estejam sintetizadas as substâncias necessárias ao metabolismo a partir de sais e fontes de carbono e nitrogênio (Kilikian et al., 2000). Assim o risco de perda do plasmídeo e portanto diminuição da produção da proteína de interesse é menos provável (Hagg et al.,2004)

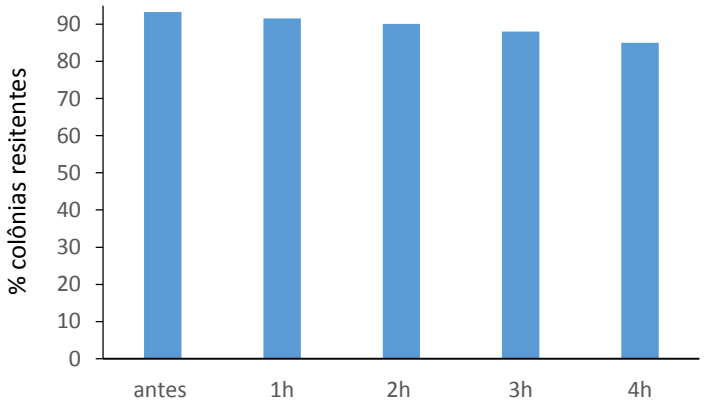

Figura 22: Estabilidade do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF no experimento 3 calculada antes e após indução a 30 °C representando o comportamento dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS em meio HDF-Kan/Clo.

A Figura 23 mostra o resultado do Western Blotting dos cultivos induzidos do experimento 3. Nas amostras dos três cultivos induzidos, à altura da banda do controle positivo (18,8 kDa) observa-se a presença do rhG-CSF nas amostras a partir da primeira hora após a indução, não sendo assim na amostra não induzida. A bactéria *E. coli* com o vetor pARKAN-I/rhG-CSF foi capaz de produzir o rhG-CSF em HDF-Kan/Clo, com percentagens relativas de 4,20%, 4,24%, 4,78%, 5,18%e na 1h, 2h, 3h e 4h após da indução respetivamente,

apesar da perda de colônias resistentes aos antibióticos com o tempo de indução. Vale ressaltar que somente nas condições de indução com IPTG 0,1 mM a 30 °C o plasmídeo foi mais estável.

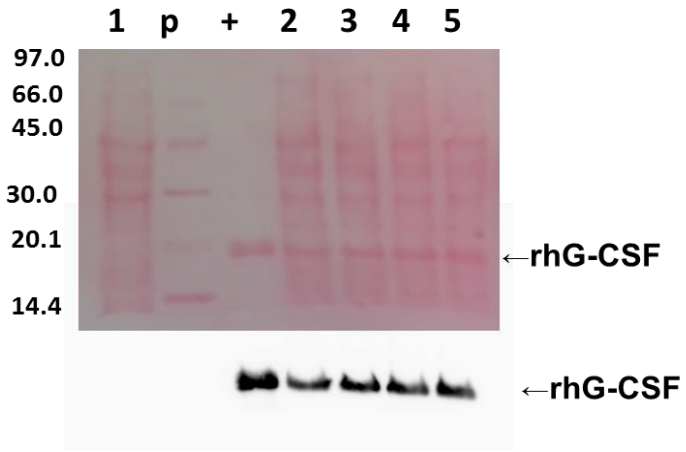

Figura 23 Membrana corada com Ponceau S e Western Blotting das amostras dos cultivos em frascos de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF-Kan/Clo: 1) não induzida; 2-5) 1, 2, 3 e 4 h após a indução com IPTG 0,1 mM a 30 °C; (+) controle positivo rhG-CSF purificado; (p) padrão de massa molecular.

Segundo o trabalho de Einsfeldt et al. (2011), com maior tempo de indução a produção proteica é maior, assim talvez com mais tempo de indução a produção do rhG-CSF poderia ter sido maior. Esses autores mostraram que a produção da PsaA foi de 5 a 6 vezes maior induzindo com 0,1 mM de IPTG a 28 ºC do que com aquelas usuais (1 mM IPTG e 37 °C). Concluindo, esse meio pode ser utilizado para obter o rhG-CSF em biorreator, sendo habitualmente utilizado para cultivos de alta densidade celular.

Não se observaram as bandas em SDS-PAGE nas amostras induzidas, portanto a densitometria das bandas para determinar percentagem relativa e produção específica do rhG-CSF foi realizada mediante o programa Imagem J.

5.5 Cultivos em biorreator

5.5.1 Meio autoindução

Foram realizados 2 cultivos em biorreator de 10 L de volume, com 7 L do meio de autoindução (Tabela 5), a 30 ºC e agitação inicial de 150 rpm. O primeiro cultivo foi acompanhado por 19 h e o segundo, por 31 h. A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada como 0,3 h^{-1} com os dados do primeiro cultivo, o qual foi finalizado após 19 h.

Neste cultivo o rhG-CSF não foi detectado por SDS-PAGE nem por Western Blotting. No segundo cultivo não foram retiradas amostras entre 6 e 18 h.

Veja-se na Figura 24 as curvas de crescimento de *E. coli* no biorreator desses dois cultivos em meio de autoindução. Pelos dados do segundo cultivo, a concentração de biomassa atingiu valores acima de 7,52 g/L após 20 h. O crescimento celular prosseguiu até 30 h de cultivo e depois entrou na fase estacionária, atingindo 18,8 g/L.

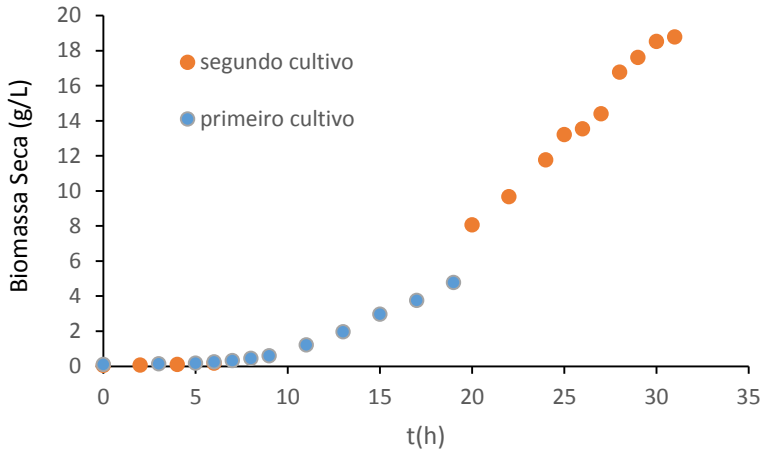

Figura 24 Curvas de crescimento dos cultivos em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C em meio autoindução sem antibiótico.

Na Figura 25 é apresentado o comportamento do consumo das fontes de carbono (glicose, glicerol e lactose) a partir das 18 h do segundo cultivo. Observe-se que em 18 h de cultivo todas as fontes adicionadas já tinham começado a ser consumidas, sendo maior a quantidade do glicerol, pois sua concentração inicial era mais elevada. A glicose inicial havia sido complemente consumida, mas a concentração de glicose manteve-se em um valor basal após 18 h devido ao consumo da lactose, a qual é degradada a glicose e galactose.

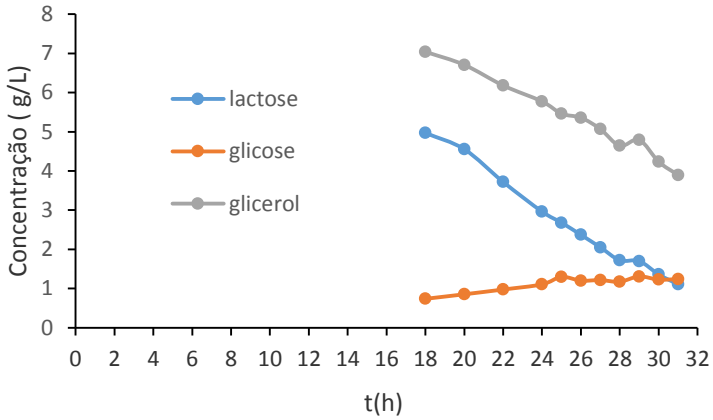

Figura 25 Curvas de consumo de glicerol, glicose e lactose ao longo do segundo cultivo em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C com meio autoindução sem antibiótico.

A Figura 26 mostra o Western Blotting e o SDS-PAGE das amostras retiradas em 18 h e entre 25 e 31 h de cultivo em biorreator com meio de autoindução sem antibiótico. Observa-se claramente a banda do rhG-CSF (18,8 kDa) a partir das 25 h de cultivo (canaletas 25 a 28), a qual não foi detectada em 18 h de cultivo por Western Blotting, então mais uma vez se comprova que a indução da síntese de proteína é mais lenta com lactose. Neste caso específico, a glicose precisa ser consumida, deixando de exercer a repressão catabólica sobre o operon *lac*, para que então se inicie o consumo da lactose. Este resultado explica a ausência do rhG-CSF nas amostras retiradas no primeiro cultivo, que se encerrou após 19 h quando a síntese do rhG-CSF ainda não havia se iniciado, e indica que a construção permitiu produzir satisfatoriamente o rhG-CSF no biorreator em meio complexo de autoindução na ausência da pressão seletiva do antibiótico.

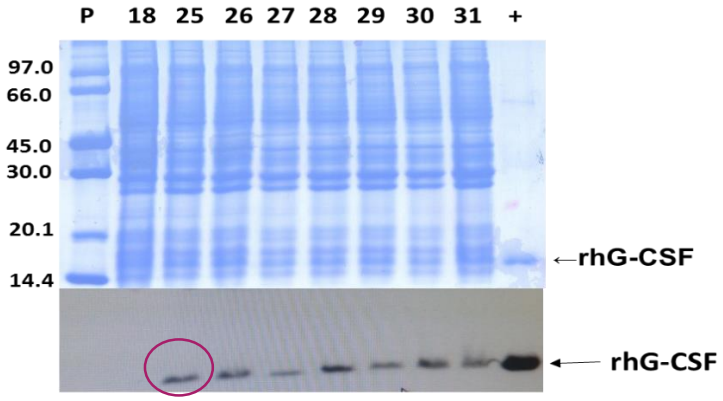

Figura 26 SDS-PAGE (superior) e Western Blotting (inferior) das amostras do cultivo no biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) a 30 °C com meio de autoindução sem antibiótico. P) padrão de massa molecular; 18-31) amostras de 18 h e de 25 a 31 h de cultivo; (+) controle positivo rhG-CSF purificado.

As bandas entre as 25 h e 31 h de cultivo mostraram percentagem relativa entre 3,97% e 4,49% da banda de rhG-CSF em relação a todas as demais bandas de cada canaleta, indicando que a produção do rhG-CSF manteve-se praticamente constante nas últimas horas do cultivo, o que difere do crescimento bacteriano, que aumentou paulatinamente até 18,8 g/L. Em 31 h de cultivo, a percentagem relativa da banda de rhG-CSF foi 4,49% e a concentração proteica, 9,52 mg/mL, portanto obteve-se um rendimento teórico do rhG-CSF de 427 mg/L, ou seja, 25 vezes o rendimento de 15 mg/L reportado por Gomes et al. (2012) e 118 vezes o valor de 3,2 mg/L reportado por Vanz et al. (2008) após a purificação. Este é um dado muito importante porque demostrou-se que o rhG-CSF pode ser produzido satisfatoriamente em larga escala com o novo vetor de expressão e, provavelmente, mesmo que a recuperação na purificação seja baixa, o rendimento final ainda deverá ser superior aos reportados em estudos anteriores. Existem outros relatos de rendimentos mais elevados do rhG-CSF produzido em larga escala: 500 mg/L (Kim et al., 2014) e 2,18 g/L (Venkata et al., 2008a).

Devemos destacar aqui que não foi acrescentado antibiótico ao meio de autoindução e, tal como nos cultivos em frascos com meios complexos (2YT e autoindução), a estabilidade do plasmídeo foi 100% ao final do cultivo. Podemos concluir então que o antibiótico pode ser eliminado nessas condições de cultivo para diminuir os custos do processo.

5.5.2 Batelada e batelada alimentada e meio HDF

Foram feitos dois cultivos em biorreator de 10 L, com 6 L do meio HDF com antibiótico canamicina, HDF/Kan (Tabela 6), a 30 ºC e agitação inicial de 150 rpm. A μ_{max} foi 0,29 h^{-1} para fase de batelada e a velocidade específica durante a alimentação (μ_{alim}) foi 0,19 h^{-1} na batelada alimentada.

Veja-se na Figura 27 as curvas de crescimento de *E. coli* no biorreator usando o meio HDF/Kan. Quando a DO atingiu 57,2 (21,5 g/L de massa seca) nas 21 h de cultivo em modo batelada adicionou-se lactose 20 g/L e IPTG 0,1 mM. A indução manteve-se durante 4 h e logo o cultivo entrou na fase estacionária, atingindo 23,2 g/L.

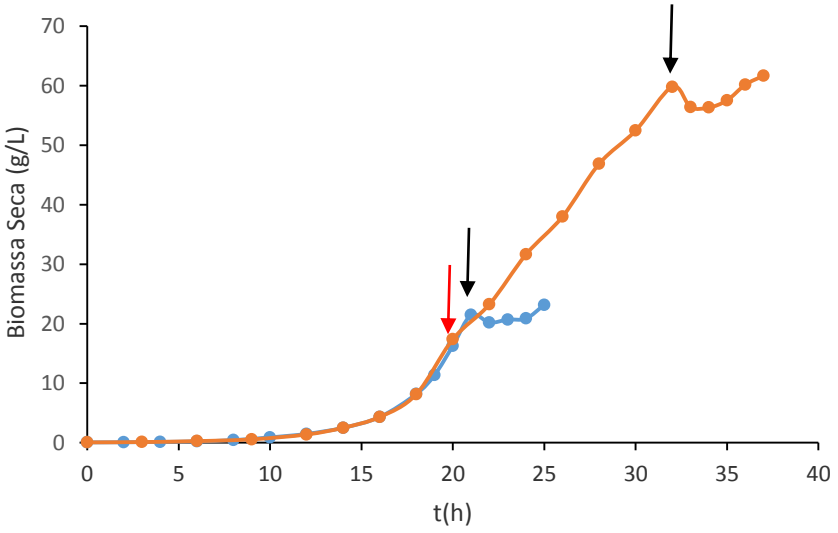

Figura 27: Curva de crescimento do cultivo em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF/Kan a 30 °C em modo batelada (azul) e batelada alimentada (laranja). A seta preta indica o momento da adição de IPTG (0,1 mM na batelada e 0,5 mM na batelada alimentada) e lactose 20 g/L e a seta vermelha o começo da adição do meio de alimentação.

No cultivo em modo batelada alimentada com HDF/Kan, a concentração celular atingiu 17,4 g/L em 20 h, momento no qual começou a adição do meio de alimentação (Figura 27). O crescimento prosseguiu até ser acrescentado o indutor (lactose 20 g/L e IPTG 0,5 mM) em 32 h de cultivo com 59,8 g/L de massa celular seca. A indução manteve-se durante 4 h e logo o cultivo entrou na fase estacionária, atingindo 61,7 g/L. Em ambos cultivos, as amostras foram retiradas cada duas horas antes e a cada hora depois da indução. A estabilidade do plasmídeo na hora final da indução foi 76% na batelada, similar aos valores observados nos cultivos em frasco realizados com este meio. Porém, no cultivo alimentado, a estabilidade do plasmídeo foi 17% ao final do cultivo.

A Figura 28 mostra o comportamento do consumo de glicerol e lactose, assim como a formação de acetato durante os cultivos com meio HDF/Kan. Observe-se que o glicerol foi consumido paulatinamente até ficar em zero. O fator de conversão de glicerol a biomassa ($Y_{Cx/S}$) determinado na batelada foi 0,54 g células/ g glicerol consumido, valor usado para determinar a vazão de alimentação (Equação 3). No caso da batelada, acrescentou-se a lactose para indução quando acabou o glicerol, o que foi verificado pelo aumento abrupto do O_2 dissolvido, e no cultivo alimentado se começou a adição do meio de alimentação. A lactose adicionada na hora da indução (22 h na batelada e 33 h na batelada alimentada) foi consumida até sua concentração chegar em 4 g/L na batelada e em zero na penúltima hora do cultivo

batelada alimentada, indicando que a baixa retenção do plasmídeo ao final da batelada alimentada pode ter ocorrido por falta de nutrientes para manter o metabolismo celular.

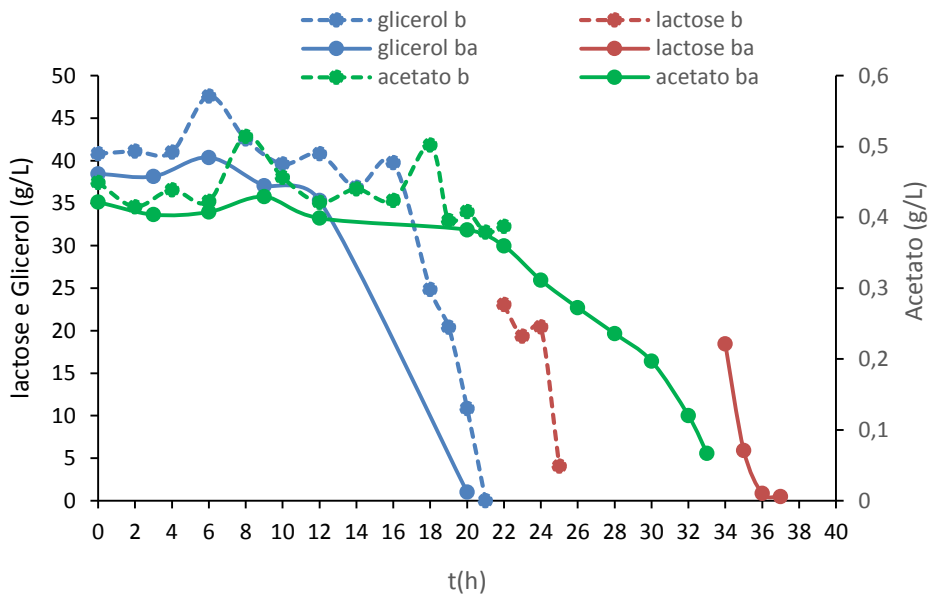

Figura 28: Curvas de consumo de glicerol, lactose e geração de ácido acético ao longo dos cultivos em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) com HDF/Kan em batelada (b) e batelada alimentada (ba).

O nível de acetato manteve-se praticamente constante do início do cultivo até o início da alimentação, fase durante a qual ele foi consumido devido à adição paulatina da fonte de carbono, que evitou seu acúmulo no meio. Korz et al (1995) observaram menor geração de acetato quando foi usado o glicerol como fonte de carbono, substrato que permite atingir altas velocidades de crescimento celular sem formação de acetato. Vários autores já usaram o glicerol como fonte de carbono em lugar da glicose (Sargo, 2011; Silva et al., 2012b; Carvalho et al., 2012).

A Figura 29 mostra o Western Blotting das amostras (*pellets*) retiradas nos dos cultivos em meio HDF/Kan. Observa-se claramente a banda de 18,8 kDa a partir de 21 h de cultivo (canaletas 6 a 8) na batelada, que corresponde a 2 h após a indução. Na batelada alimentada observou-se a banda a partir de 34 h de cultivo (canaletas 5 a 8), o que também corresponde a 2 h após a adição dos indutores lactose e IPTG. Este resultado é similar àquele obtido no cultivo em frascos com meio de autoindução e pulso de lactose, onde a indução da síntese proteica também começou após 2 h de indução (Figura 19).

Figura 29: Western Blotting das amostras do cultivo de *E. coli* BL21(DE3) STAR pLysS (pARKAN-I/rhG-CSF) em meio HDF/Kan, (A) batelada: canaletas 1 a 4) amostras antes da indução, respectivamente 18 a 21 h de cultivo; canaletas 5 a 8) amostras de 1 a 4 h após a indução. (B) batelada alimentada: canaletas 1 a 3) amostras antes da indução, respectivamente, 28 h, 30 h e 32 h de cultivo; canaletas 4 a 8) amostras de 1 a 5 h após a indução. (+) controle positivo rhG-CSF purificado.

Em ambos cultivos, para começar a síntese do rhG-CSF foi preciso deixar livre o operador que permite transcrever o gene da enzima Lac permease, que transporta a lactose para dentro da célula, o que foi garantido pela adição de IPTG. Isso explica porque a síntese começa depois da segunda hora da adição dos indutores. Pode-se verificar que a construção permitiu produzir satisfatoriamente o rhG-CSF no biorreator em meio HDF com canamicina, tanto em modo batelada como em batelada alimentada.

5.6 Purificação do rhG-CSF a partir dos cultivos realizados em biorreator

5.6.1 Obtenção dos corpúsculos de inclusão (CI)

Terminados cada um dos cultivos no biorreator, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e a massa bacteriana armazenada a -20°C para posterior desenvolvimento do processo de purificação do rhG-CSF. O segundo cultivo realizado em meio autoindução rendeu 292 g de massa celular úmida, os cultivos em HDF produziram 467 g em modo batelada e 2100 g em modo batelada alimentada.

Como descrito em Materiais e Métodos (item 4.8), a lise foi feita em homogeneizador contínuo de alta pressão a 500 bar durante 8 min e temperatura controlada a 14 °C. A Tabela 14 mostra os valores de concentração proteica, percentagem relativa e concentração do rhG-CSF no lisado celular (homogenato) a partir dos dois meios de cultura avaliados no biorreator.

Tabela 14: Comparação da produção de rhG-CSF nos cultivos em biorreator estimada a partir da análise do homogenato

Cultivo	Proteínas (g/L)	% relativa rhG-CSF	rhG-CSF (g/L)
Autoindução /Batelada	15,67	7,44	1,17
HDF/ Batelada Alimentada	10,45	8,94	0,95

A produção de rhG-CSF calculada a partir do homogenato durante a batelada alimentada em HDF e batelada em meio de autoindução foi 0,95 g/L e 1,17 g/L, respetivamente (Tabela 14). A produção em HDF foi superior à produção reportada por Kim et al (2014) de 0,5 g/L e inferior de 1,75 g/L reportada por Kim et al (2013) para obtenção do rhG-CSF em meio definido. A produção em meio de autoindução (1,17 g/L, Tabela 14) foi 2,5 vezes superior ao valor estimado a partir da densitometria da amostra de 31 h de cultivo (427 mg/L, item 5.5.1), sendo similar a outros relatos para a produção do rhG-CSF em larga escala em meio complexo (Venkata et al., 2008b). Os valores de produção estimados em duas etapas distintas da obtenção do rhG-CSF a partir do meio de autoindução resultaram diferentes porque a eficiência de lise e liberação de rhG-CSF foi maior empregando o homogenizador do que com o tratamento com ureia para preparo das amostras para eletroforese.

5.6.2 Lavagem e Solubilização dos CI

Depois de centrifugar o lisado celular obtido do cultivo em meio de autoindução, descartou-se o sobrenadante e foram feitas quatro lavagens do *pellet* com 1, 2, 3 e 4 M de ureia, seguidas da solubilização em ureia 8 M (Figura 8). A Figura 30 mostra o gel de eletroforese das amostras retiradas desde a lise celular até a solubilização.

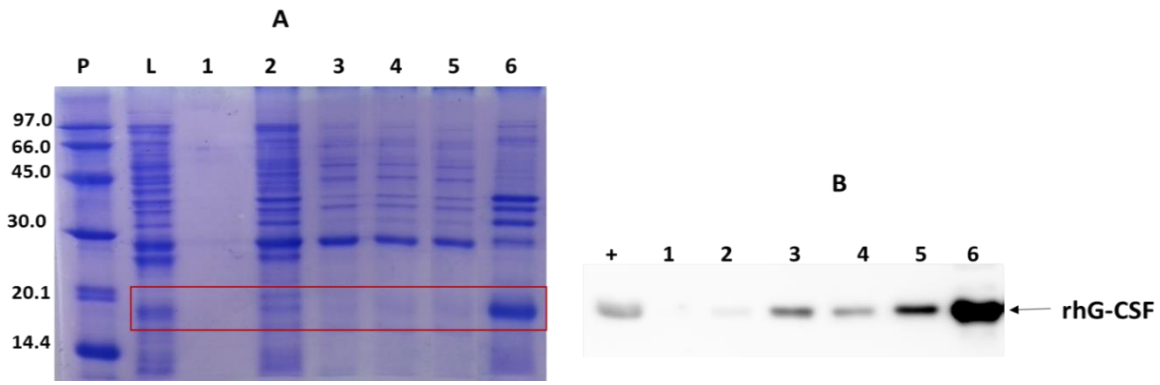

Figura 30 Análise por eletroforese (A) e Western Blotting (B) das etapas iniciais de purificação do rhG-CSF insolúvel partir dos corpos de inclusão (CI). P) padrão de massa molecular (LMW); L) homogenato; 1) sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato; 2, 3, 4, 5) sobrenadantes obtidos após a lavagem dos CI com 1, 2, 3 e 4 M de ureia, respectivamente; 6) sobrenadante após solubilização dos CI com ureia 8 M; (+) controle positivo rhG-CSF purificado. Todas as mostras foram aplicadas para que houvesse 15 µg de proteína total no gel.

As lavagens com ureia proporcionaram a eliminação de proteínas contaminantes, com uma pequena perda do rhG-CSF na primeira lavagem (Figura 30, canaletas 2). Observe-se que a banda do rhG-CSF é bem mais intensa na amostra do Western Blotting correspondente à lavagem com 4M de ureia (Figura 30B, canaleta 5), portanto resolvemos eliminar essa última lavagem nas próximas purificações. Os CI foram solubilizados em 1 L do tampão tris 10 mM pH 8,0 com ureia 8 M e β-mercaptoetanol 5 mM durante aproximadamente 12 h, logo centrifugou-se a amostra para separar o material insolúvel. O solubilizado (2,81 mg/mL) obtido nesta etapa foi dividido em várias alíquotas para avaliar os diferentes métodos de renaturação descritos a seguir.

5.6.3 Renaturação dos CI por diafiltração

A diafiltração foi realizada para retirar a ureia com o fluxo de 3 mL/min, mantendo-se o volume da amostra constante, mas não se mostrou um bom método de renaturação, uma vez que após a eliminação da ureia, a maior parte do rhG-CSF voltou a ficar insolúvel. O material recolhido da diafiltração foi centrifugado (11.200 g por 30 min) e apenas 3,09% da proteína solubilizada em ureia permaneceu solúvel, portanto, a maior parte do rhG-CSF ficou no *pellet*.

5.6.4 Renaturação dos CI por diálise

A renaturação por diálise foi realizada com trocas do tampão a cada 4 h diminuindo-se a concentração de ureia de 4 M até 0 M (item 4.8.2). Este método também resultou ineficiente para renaturar rhG-CSF porque grande quantidade da proteína ficou insolúvel, sendo a percentagem de renaturação apenas 2,36%. O sobrenadante da renaturação por diafiltração foi reunido ao sobrenadante da renaturação por diálise. O pool contendo 47 mg de proteínas totais foi submetido à cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose FF HiTrap de 1 mL.

5.6.5 Cromatografia em SP-Sepharose do pool dos sobrenadantes da diafiltração e diálise

A Figura 31 mostra a análise por eletroforese (A) e Western Blotting (B) das frações da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose realizada com o *pool* dos sobrenadantes resultantes da renaturação por diálise e diafiltração. Na Figura 31, verificou-se que o rhG-CSF está presente em todas as frações de eluição coletadas. A maior quantidade de rhG-CSF foi eluída com 200 e 300 mM de NaCl (canaletas 5 e 6), que foram as frações com maior pureza (78% e 32%). Nas demais frações há maior presença de proteínas contaminantes que eluíram junto com o rhG-CSF. Esse resultado mostrou que, ainda que não houvesse perda da proteína alvo na fração não absorvida, a cromatografia precisava ser otimizada para eluir a maior parte do rhG-CSF em uma única fração, com a menor quantidade de contaminantes possível. Uma vez que o pH do tampão de eluição foi 4,5, o rhG-CSF estava com carga positiva e altas concentrações de NaCl não foram suficientes para elui-lo completamente. Assim, um pH superior deve ser necessário para a eluição, tal como reportado por Gomes et al (2012), onde o rhG-CSF eluiu totalmente na fração de 100 mM de NaCl a pH 8,0.

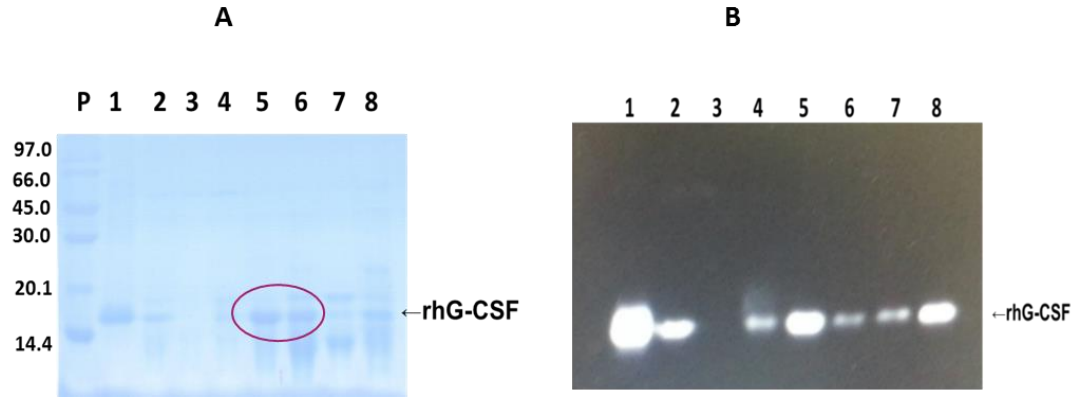

Figura 31 Análise por eletroforese (A) e Western Blotting (B), das frações coletadas na cromatografia por SP-Sepharose a partir dos sobrenadantes obtidos na renaturação por diálise e diafiltração. P) marcador utilizado (LMW); 1) controle positivo do rhG-CSF; 2) material de entrada na coluna; 3) fração não-absorvida; 4-7) frações de eluição em tampão acetato 20 mM pH 4,5 com NaCl 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, respectivamente; 8) fração de eluição em tampão Tris 10 mM pH 8,0 com NaCl 500 mM.

A maioria dos autores que têm usado cromatografia de troca catiônica na purificação do rhG-CSF eluíram a proteína com pH ≥ 8 (Vanz et al; 2008; Gomes et al., 2012; Venkata et al., 2008a; Vemula et al., 2015b). O ponto isoelétrico do rhG-CSF é 6,1, portanto, com valores básicos de pH no tampão de eluição a proteína fica com carga negativa e desliga-se da coluna carregada também negativamente, SP-Sepharose neste caso. A percentagem de recuperação do rhG-CSF nesta cromatografia foi 7,46% considerando o *pool* das frações de 200 e 300 mM. Além de desconsiderar o rhG-CSF das outras frações, houve um pico na fração de limpeza com 0,1 M de NaOH que não foi coletada, onde provavelmente ficou parte do rhG-CSF.

5.6.6 Avaliação da percentagem de renaturação em função da concentração proteica

Para avaliar a influência da concentração proteica na eficiência da renaturação, foram realizadas diálises com diferentes diluições do material solubilizado em ureia 8 M (item 4.8.2), o que resultou em concentrações proteicas entre 0,011 e 0,378 mg/mL. Houve precipitação em todas as diluições avaliadas, portanto sobrenadante e *pellet* obtidos após a centrifugação foram analisados por SDS-PAGE (Figura 32). As concentrações avaliadas

foram comparadas mediante a percentagem de renaturação (item 4.8.3, Equação 4).

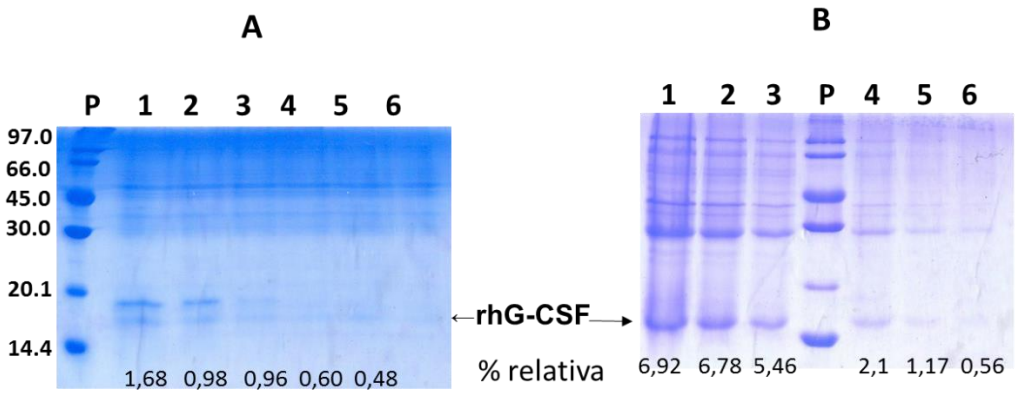

Figura 32 Análise por eletroforese das amostras dos sobrenadantes (A) e *pellets* (B) obtidos depois da renaturação por diálise de amostras com diferentes concentrações proteicas. P) padrão de massa molecular (LMW); 1-6) amostras das concentrações 0,378; 0,189; 0,094; 0,047; 0,023 e 0,011 mg/mL, respectivamente.

A Figura 32 mostra que, segundo os valores da porcentagem relativa da banda de rhG-CSF determina por densitometria, o rhG-CSF está presente tanto no sobrenadante (A) como no *pellet* (B) de todas as concentrações proteicas avaliadas, sendo sempre maior parte no *pellet*. A Figura 33 mostra que quanto mais diluída esteja a amostra, maior será a percentagem de renaturação porque as moléculas de proteína terão menos oportunidade de interagir entre elas (zonas hidrofóbicas e ligações dissulfeto) e como consequência existe menor possibilidade de se formar agregados e precipitar.

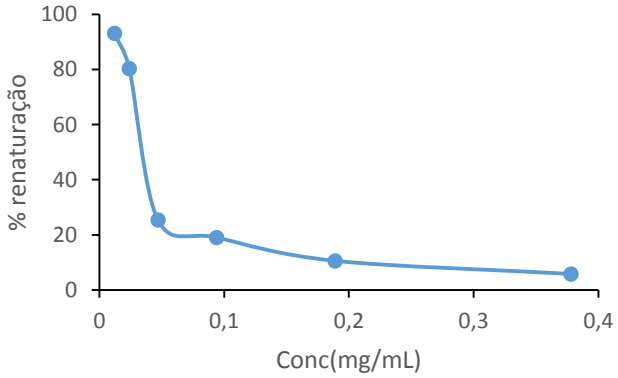

Figura 33 Percentagem de renaturação em função da concentração de proteína nas amostras durante a renaturação do rhG-CSF por diálise.

As concentrações proteicas desses sobrenadantes ficaram entre 23 e 11 µg/mL as quais mostraram maior percentagem de renaturação: 80 e 96%, respectivamente. Zhao et al (2014) comprovaram que quanto menor a concentração proteica, maior a percentagem de renaturação e a atividade especifica do rhG-CSF. Apesar de esse método ser inviável para grande escala,

ele permitiu determinar a melhor faixa de concentração proteica para realizar a etapa de renaturação.

5.6.7 Renaturação por diluição utilizando tampão com arginina

Para avaliação da renaturação por diluição direta, 50 mL do solubilizado em ureia 8 M foram adicionados a 1 L do tampão de renaturação contendo arginina (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1%, glicerol 10%, arginina 500 mM, pH 8,0). O material solubilizado foi gotejado com ajuda de uma bomba peristáltica ao fluxo de 1 mL/min até alcançar aproximadamente 40 µg/mL. Considerando que a maior porcentagem de renaturação por diálise foi obtida com concentrações proteicas abaixo de 23 µg/mL (item 5.6.6), este método foi mais eficiente que os métodos utilizados anteriormente (itens 5.6.3 e 5.6.4), sendo a percentagem de renaturação 33%.

5.6.8 Cromatografia em SP-Sepharose do material renaturado em tampão com arginina

O material resultante da renaturação com tampão de arginina foi filtrado, o pH ajustado para 4,5 e diluído até alcançar a condutividade do tampão de equilíbrio da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose (acetato 20 mM, 50 mM NaCl, pH 4,5), o que elevou o volume para 5,5 L devido à concentração de arginina no tampão de renaturação, aumentando assim para 5 dias o tempo necessário para realizar a cromatografia na coluna de 1 mL utilizada. O método de diluição é mais rápido que a diálise, e não precisa monitoramento como na diafiltração, porém o tempo economizado na renaturação foi perdido durante os 5 dias da cromatografia.

A Figura 34 mostra o gel das frações coletadas da cromatografia em SP-Sepharose do material renaturado por diluição em tampão com arginina. A eluição foi feita com gradiente descontínuo de NaCl 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM em tampão Tris 20 mM pH 8,0.

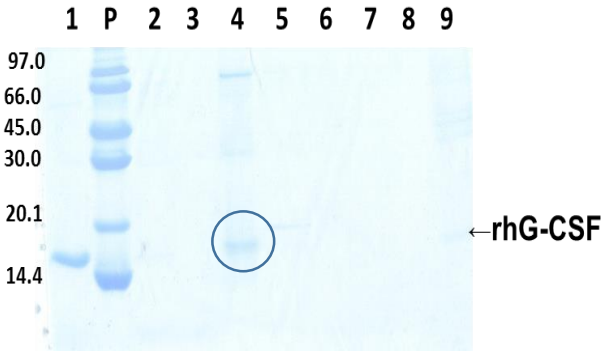

Figura 34 Análise por eletroforese da renaturação por diluição em tampão com arginina e da cromatografia em SP-Sepharose. P) padrão de massa molecular; 1) controle positivo do rhG-CSF; 2) material de entrada na coluna; 3) fração não-absorvida; 4-8) proteína eluída em tampão pH 8,0, NaCl 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, respectivamente; 9) fração de limpeza com 0,1 M de NaOH.

Na Figura 34 se observa que a proteína foi eluída na fração com 100 mM de NaCl (canaleta 4), confirmando que pH 8,0 é melhor para eluir o rhG-CSF em só uma fração durante a cromatografia de troca catiônica, porém diversas impurezas foram eluídas junto com o rhG-CSF. Considerando somente a fração de 100 mM de NaCl, a percentagem de recuperação depois da cromatografia foi 3,27%, menor do que o recuperado na cromatografia realizada com o *pool* de sobrenadantes da diálise e diafiltração (7,46%), cuja eluição foi feita a pH 4,5.

5.6.9 Renaturação por diluição utilizando tampão sem arginina

Para renaturar por diluição utilizando o tampão sem arginina, 200 mL do solubilizado em ureia 8 M foram gotejados nas mesmas condições já descritas (item 4.8.3) em 1 L do tampão de renaturação sem arginina (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100, 0,1%, glicerol 10%, pH 8,0). O produto ficou límpido quando acabou o volume do solubilizado, mesmo assim foi centrifugado e um pequeno *pellet* foi observado, analisado depois por SDS-PAGE. A percentagem de renaturação foi 99%, valor superior ao obtido utilizando o tampão com arginina. Nessa condição foi possível renaturar maior quantidade de proteína, alcançando 0,55 mg/mL, valor 24 vezes superior àquele determinado durante o ensaio de renaturação por diálise (23-11 µg/mL) e 14 vezes superior à renaturação em tampão com arginina. Desse modo, essa condição de renaturação foi estabelecida para fazer parte do processo de purificação desenvolvido.

5.6.10 Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose do material renaturado em tampão sem arginina

Parte do sobrenadante do renaturado em tampão sem arginina (item 5.6.9) foi dividido em 5 volumes iguais e cada amostra ajustada para pH 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5. As amostras ficaram em repouso por uma noite a 4 °C (item 4.8.7) e em todos esses pH foi observada a formação de precipitado. Depois de centrifugar as amostras, conservou-se *pellets* e sobrenadantes para análise da presença de rhG-CSF por SDS-PAGE (Figura 35).

Observe-se que nos *pellets* gerados após a centrifugação do renaturado e a redução do pH eliminou-se grande quantidade de proteínas contaminantes de aproximadamente 30 kDa a 45 kDa. Além disso, a perda de rhG-CSF nos *pellets* pode ser considerada desprezível, uma vez que os *pellets* estavam concentrados. Especificamente a pureza do rhG-CSF nos sobrenadantes obtidos a pH 4,5; 4,7 e 5,2 aumentou, atingindo 70% no sobrenadante do pH 5,2. Portanto, a etapa de ajuste do pH antes da cromatografia foi incluída no processo de purificação.

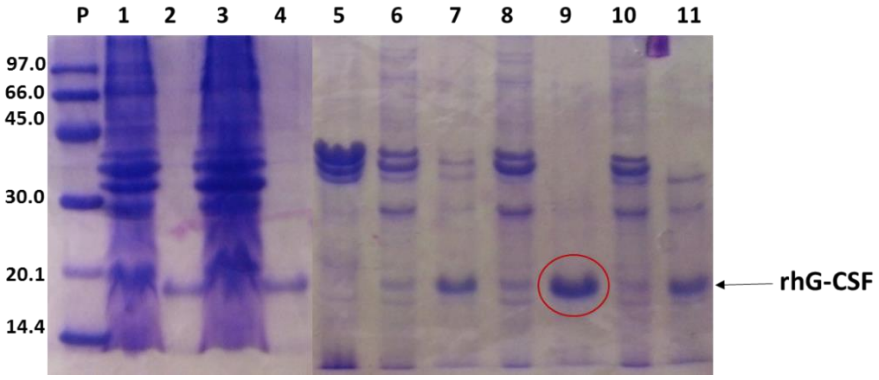

Figura 35 Análise por eletroforese dos *pellets* e sobrenadantes resultantes depois de ajustar o pH do material renaturado para 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5; e o *pellet* depois de centrifugar o renaturado. P) padrão de massa molecular; (1, 3, 6, 8, 10) *pellets* e (2, 4, 7, 9, 11) sobrenadantes; 5) *pellet* depois de centrifugar o renaturado.

A condutividade dos sobrenadantes obtidos após ajuste do pH e centrifugação foi ajustada até alcançar a condutividade do tampão de equilíbrio para a cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose (acetato 20 mM, 50 mM NaCl). Os seguintes valores de pH foram avaliados para equilibrar a coluna: 4,5; 4,7; 5,0; 5,2 e 5,5. A eluição foi realizada com NaCl 100mM e 500 mM em tampão Tris 20 mM pH 8,0.

Os cromatogramas obtidos das entradas com diferentes pH mostram que quanto menor o pH de entrada, menor a área do pico da fração não adsorvida e maior a ligação proteica à resina (Figura 36).

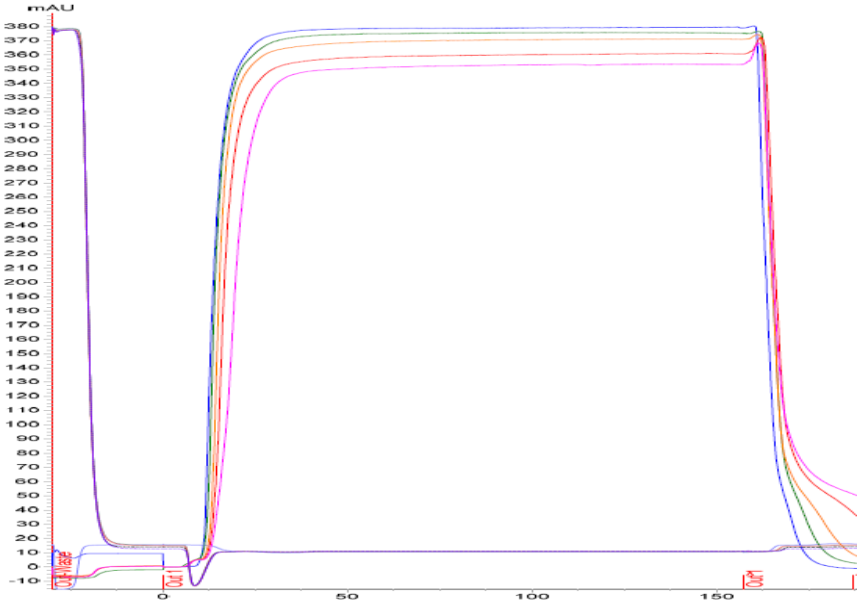

Figura 36: Cromatograma mostrando a fração não-adsorvida da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose realizada com cinco diferentes valores de pH na entrada da coluna, 4,5 ---; 4,7---; 5,0---; 5,2 ---e 5,5---.

A Figura 37 mostra os géis de eletroforese das amostras de entrada, frações não adsorvidas e de eluição, coletadas durante a cromatografia em SP-Sepharose para cada um dos pH avaliados e o Western Blotting das frações de eluição. As frações de eluição não apresentaram nenhuma banda de 18,8 kDa no SDS-PAGE e outras impurezas eluíram, porém o Western Blotting revelou a presença de rhG-CSF nessas frações (Figura 37B).

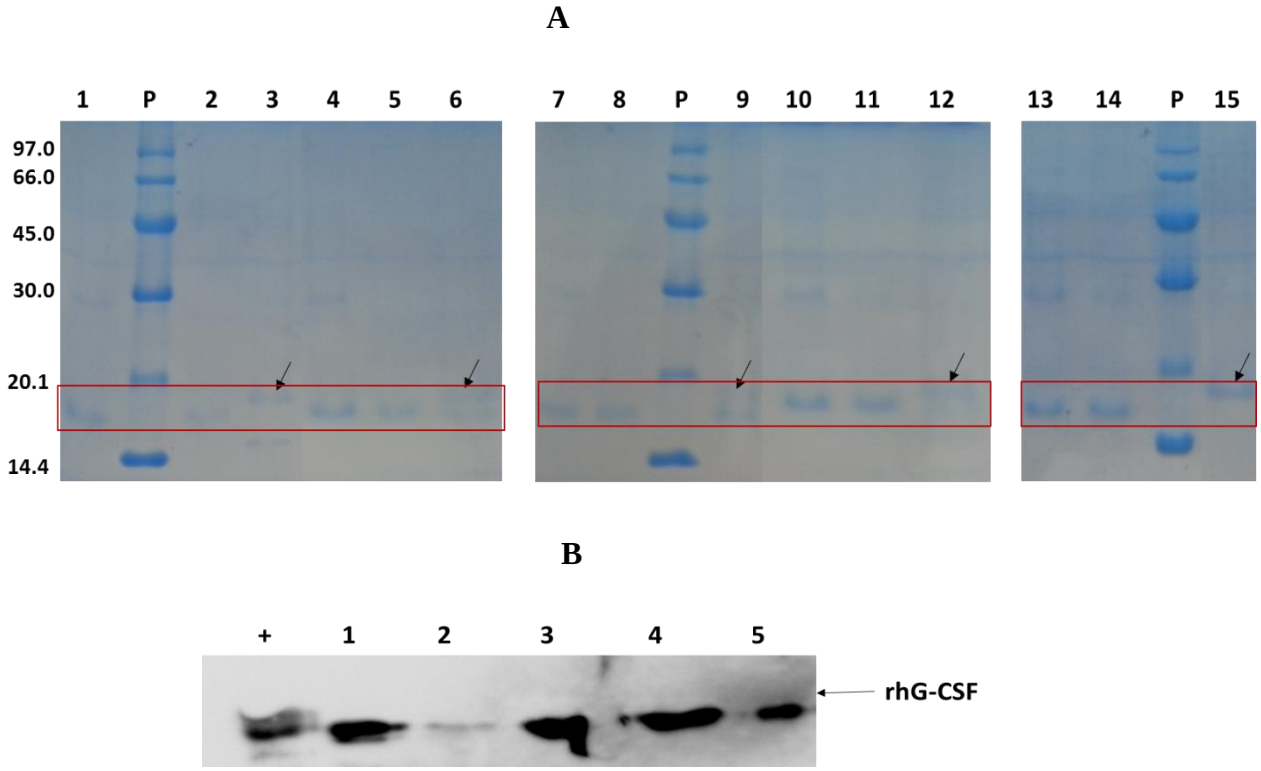

Figura 37: (A) Eletroforese das amostras de entrada (1, 4, 7, 10, 13), frações não adsorvidas (2, 5, 8, 11, 14) e de eluição (3, 6, 9, 12, 15) da cromatografia em SP-Sepharose realizada com diferentes pH do tampão de equilíbrio: pH 4,5 (canaletas 1 a 3); pH 4,7 (canaletas 4 a 6); pH 5,0 (canaletas 7 a 9); pH 5,2 (canaletas 10 a 12) e pH 5,5 (canaletas 13 a 15), P) padrão de massa molecular. As frações de eluição estão indicadas pelas flechas. **(B)** Western Blotting das amostras da eluição: (+) controle positivo do rhG-CSF; 1) pH 4,5; 2) pH 4,7; 3) pH 5,0; 4) pH 5,2; 5) pH 5,5

Observe-se também a presença de rhG-CSF nas frações não adsorvidas (Figura 37A), portanto, houve perda da proteína alvo no *flow through*. Estas cromatografias foram feitas a partir do produto renaturado em tampão sem arginina, o qual permitiu renaturar maior concentração proteica, porém resultou em concentração final de ureia mais elevada na amostra aplicada à coluna, aproximadamente 1,5 M, enquanto no material de entrada das cromatografias de troca iônica realizadas anteriormente a concentração de ureia ficou entre 0,45 M e 0,6 M, pois as amostras aplicadas foram diluídas para ajustar a condutividade (renaturado com tampão de arginina, item 5.6.8) ou a maior parte da ureia já tinha sido eliminada no caso do pool da diálise e diafiltrado (item 5.6.5) . Portanto, provavelmente a concentração de ureia mais elevada no material renaturado com tampão sem arginina atrapalhou a interação do rhG-CSF com a resina cromatográfica. Assim, para os próximos processos de purificação, depois do ajuste de pH e centrifugação, a amostra de entrada foi

diluída até concentração final de ureia ≤ 0,6 M antes da aplicação à cromatografia em SP-Sepharose.

5.6.11 Avaliação de diferentes pH para eluição de rhG-CSF da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose

Tomando-se em conta os resultados descritos anteriormente, as seguintes modificações foram feitas no processo de purificação do rhG-CSF: 200 mL do material solubilizado em tampão com ureia 8 M foram renaturados por diluição em tampão sem arginina (item 5.6.9), o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético e, após a centrifugação para remover o precipitado, o sobrenadante foi diluído até a concentração de ureia ficar em 0,5 M; a amostra foi então aplicada à coluna de cromatografia em SP-Sepharose de 10 mL previamente equilibrada com tampão acetato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0. A eluição foi feita em diferentes valores de pH, a saber, 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0, sempre com 100 mM de NaCl no tampão de eluição. Para pH 5,0 foi empregado tampão acetato 20 mM e para pH 6,0, 7,0 e 8,0 foi empregado tampão fosfato 20 mM.

Neste novo processo, não houve perdas de rhG-CSF nem na fração não absorvida (canaleta 2, Figura 38) nem no reequilíbrio (canaleta 3, Figura 38), confirmando, portanto, que concentrações de ureia entre 1,0 e 1,5 M atrapalham a interação do rhG-CSF com a resina cromatográfica. Apesar de a ureia não ser carregada, quando em concentrações acima de 0,5 M, ela interferiu na interação iônica provavelmente porque expôs resíduos de aminoácidos do rhG-CSF que normalmente ficariam no interior da proteína, alterando assim a densidade de cargas da molécula.

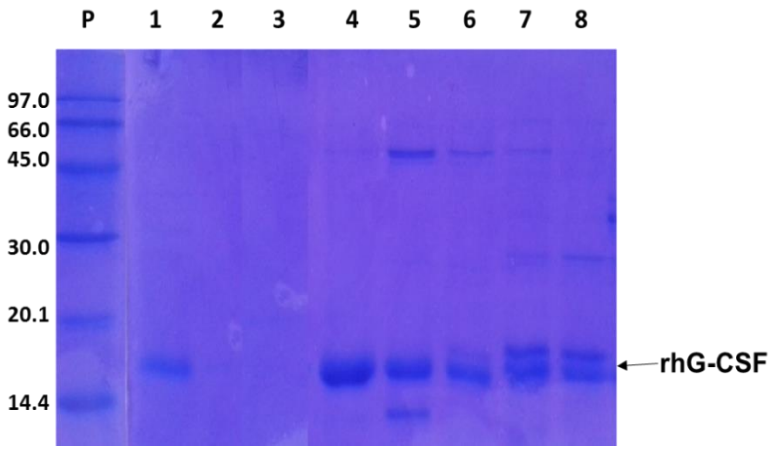

Figura 38: Eletroforese das frações da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose para avaliação da eluição do rhG-CSF em diferentes pH. P) padrão de massa molecular, 1) entrada a pH 5,0, 2) fração não adsorvida, 3) reequilíbrio, 4) eluição a pH 5,0, 5) eluição a pH 6,0, 6) primeiro pico da eluição a pH 7,0, 7) segundo pico da eluição pH a 7,0, 8) eluição a pH 8,0. Todas as frações de eluição contêm 100 mM de NaCl.

A fração eluída a pH 5,0 apresentou a banda de rhG-CSF mais intensa e com maior pureza (87%) (canaleta 4, Figura 38) em comparação com as demais frações coletadas (canaletas 5 a 8, Figura 38), porém este pH não foi suficiente para eluir completamente a proteína da resina, sendo a recuperação de apenas 1%. A fração eluída com pH 6,0 (canaleta 5, Figura 38) mostra impurezas visíveis. A eluição com pH 8,0 (canaleta 8, Figura 38) também apresentou duas bandas como nas frações de eluição da Figura 37, veja-se que já nos picos coletados a pH 7,0 (canaletas 6 e 7) aparecem as duas bandas.

De acordo com os resultados obtidos, o esquema de purificação estabelecido seria o que está esquematizado na Figura 39.

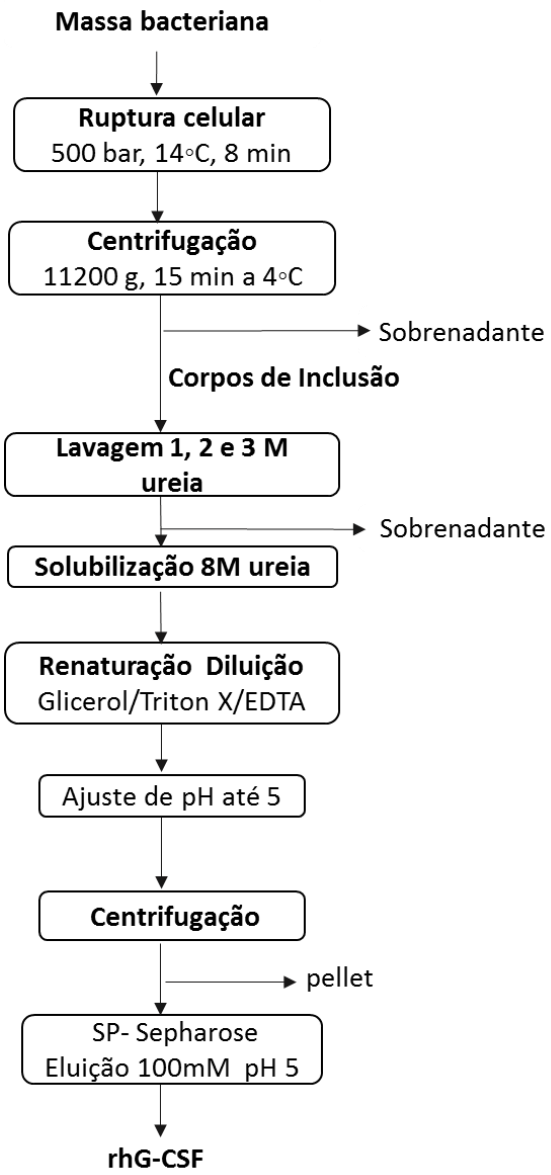

Figura 39: Esquema geral de purificação definido para rhG-CSF a partir dos resultados obtidos.

5.7 Comparação dos processos de purificação de rhG-CSF a partir da biomassa dos cultivos em meio de autoindução e HDF

O processo de purificação estabelecido (Figura 39) foi desenvolvido partindo de 25 g de massa bacteriana úmida obtida do cultivo realizado em biorreator com meio de autoindução em batelada. Quando o mesmo processo de purificação foi realizado a partir do material produzido em meio HDF não houve perda do rhG-CSF no sobrenadante depois da centrifugação do homogenato para obter os CI (Figuras 30 e 40), também ocorreu pequena perda de rhG-CSF na primeira lavagem com ureia 1 M e a pureza foi aumentando a cada etapa de purificação.

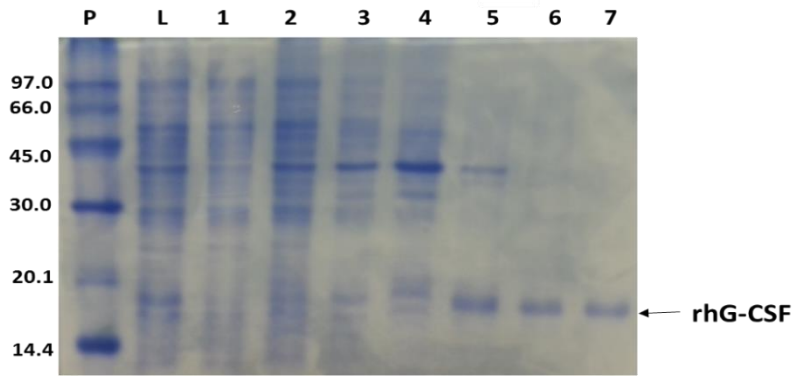

Figura 40: Análise por eletroforese das etapas iniciais de purificação do rhG-CSF insolúvel partir dos corpos de inclusão (CI) do meio HDF em batelada alimentada. P) padrão de massa molecular (LMW); L) homogenato; 1) sobrenadante obtido após centrifugação do lisado celular; 2, 3, 4) sobrenadantes obtidos após a lavagem dos CI com 1, 2 e 3 M de ureia, respectivamente; 5) sobrenadante após solubilização dos CI com ureia 8 M; 6) sobrenadante após a renaturação; 7) sobrenadante após o ajuste de pH 5,0.

A Tabela 15 mostra as quantidades do rhG-CSF em cada etapa de purificação desenvolvida partindo de cada meio avaliado.

Tabela 15: Comparação das etapas de purificação do rhG-CSF a partir da biomassa dos cultivos em meio de autoindução e HDF em batelada alimentada.

Fração	Proteína total (mg)		% relativa		rhG-CSF (mg)		Recuperação global (%)	
	AI	HDF	AI	HDF	AI	HDF	AI	HDF
Homogenato	5036	4575	7,4	8,8	373,7	402,6	100	100
Solubilizado	624	1120	48,3	27,09	315	303,5	84	75,4
Renaturado	623	966	50,6	31,75	301	306,7	80	76,2
pH ajustado	603	810	70	48,62	422	394	112,9	97,8
Fração 100mM	1,62	0,8	78	79	1,0	0,59	0,25	0,15

Apesar de as quantidades iniciais de rhG-CSF serem um pouco diferentes no homogenato de cada cultivo, observe-se que elas são similares nas demais etapas do processo, do solubilizado até a entrada na SP Sepharose (Tabela 15). A pureza final depois da cromatografia foi de aproximadamente 80%, reproduzindo o resultado obtido quando rhG-CSF foi eluído com 100 mM a pH 5,0 (Figura 39). A recuperação foi menor do que 1% em ambos os casos. Na fração de limpeza da resina com NaOH 0,1 M saiu um pico bem definido em ambas purificações, que não foi analisado, mas poderia conter o rhG-CSF que estivesse ficado fortemente adsorvido à resina.

Partindo de meios de cultura diferentes, o resultado final do processo de purificação foi semelhante, portanto, fizemos uma comparação global entre esses meios como material de partida da purificação do rhG-CSF. O meio de autoindução tem várias vantagens sobre o HDF em batelada alimentada: a estabilidade no meio de autoindução foi de 100 % na última hora de cultivo sem acréscimo de antibiótico, a lactose usada como indutor é adicionada desde o início sem necessidade de monitorar o reator até o momento ideal para adicioná-la, além disso, com 31 h de cultivo em batelada obteve-se produção de 1,17 g/L de rhG-CSF, enquanto em HDF a produção foi de 0,95 g/L em 37 h. Quanto ao cultivo em HDF, além de ter sido mais longo (37 h), são necessários monitoramento e controle para sua execução, e ele requereu antibiótico na sua composição, tanto na fase batelada quanto no meio de alimentação, e mesmo assim a estabilidade do plasmídeo foi 17% na última hora do cultivo. O antibiótico e a adição de IPTG junto com a lactose encareceram grandemente o processo, além de o IPTG ser tóxico para a célula. Fazendo um balanço entre os custos dos meios de cultura em cada processo, o HDF em batelada alimentada foi 2 vezes mais caro (R$ 1.037,00 por processo) do que o meio de autoindução em batelada (R$ 476,00 por processo), diferença marcada pela presença da canamicina, do IPTG e do glicerol (Tabela 16). Portanto, o meio de autoindução foi o mais recomendável para obter o rhG-CSF em larga escala empregando o vetor de expressão pARKAN-I para produção recombinante em *E. coli*.

Tabela 16: Preços correspondentes às quantidades de cada componente dos meios avaliados em biorreator para a produção do rhG-CSF

Nutrientes	Meio de Autoindução		Meio definido HDF	
	Quantidade *	R$	Quantidade **	R$
Glicerol	420g	144,66	1041, 2 g	358,62
Glicose	70 g	6,16	-	-
Lactose	140 g	112,70	24,24 g	21,39
Extrato levedura	35 g	19,81	-	-
Phytone	70 g	87,27	-	-
Ácido Cítrico	-	-	10,50 g	3,83
$(NH_4)_2HPO_4$	-	-	24,71 g	16,32
IPTG	-	-	1,57 g	349,26
KH_2PO_4	23,8 g	18,49	82,15 g	63,83
Na_2HPO_4	63 g	70,00	-	-
NH_4Cl	18,9 g	9,03	-	-
Na_2SO_4	4,9 g	3,53	-	-
$MgSO_4_7H_2O$	3,5 g	2,76	33,88 g	26,73
Citrato férrico	705,6 mg	0,91	675,5 mg	0,87
$CoCl_2_6H_2O$	17,5 mg	0,081	20,7 mg	0,10
$MnCl_2_4H_2O$	105 mg	0,209	123,7 mg	0,25
$CuCl_2_2H_2O$	10,5 mg	0,018	12,3 mg	0,02
H_3BO_3	21 mg	0,0053	23,8 mg	0,01
$Na_2MoO_4_2H_2O$	14,7 mg	0,021	18,2 mg	0,03
$Zn(CH_3COOH)_2_H_2O$	236,6 mg	0,17	229,9 mg	0,17
EDTA	98,7 mg	0,06	104,3 mg	0,06
Tiamina	31,5 mg	0,07	187,6 mg	0,42
Canamicina	-	-	375,0 mg	195,00
Preço Total	-	**476,00**	-	**1037,00**

*quantidades dos nutrientes calculadas para 7 L do meio de autoindução em batelada alimentada
** quantidade total dos nutrientes calculadas para o meio HDF (6 L do biorreator e 1,5 L do meio de alimentação)

5.8 Caracterização do rhG-CSF purificado por Dicroísmo Circular

As frações eluídas da cromatografia em SP-Sepharose com tampão acetato 20 mM pH 5,0 e 100 mM de NaCl (item 5.6.11) obtidas a partir dos meios de autoindução e HDF em batelada alimentada, foram concentradas e dialisadas com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Para verificar a estrutura secundária da proteína purificada, o espectro de dicroísmo circular com luz polarizada de 185 nm a 260 nm foi obtido para cada amostra (Figura 41). O espectro de dicroísmo circular do rhG-CSF obtido a partir do meio de autoindução é típico de proteínas ricas em α-hélices, o que significa que o rhG-CSF está com a conformação correta, sendo compatível com os resultados anteriormente descritos na literatura (Gomes et al., 2012). Porém o espectro do rhG-CSF obtido em HDF em batelada alimentada não cumpre completamente com a conformação correta.

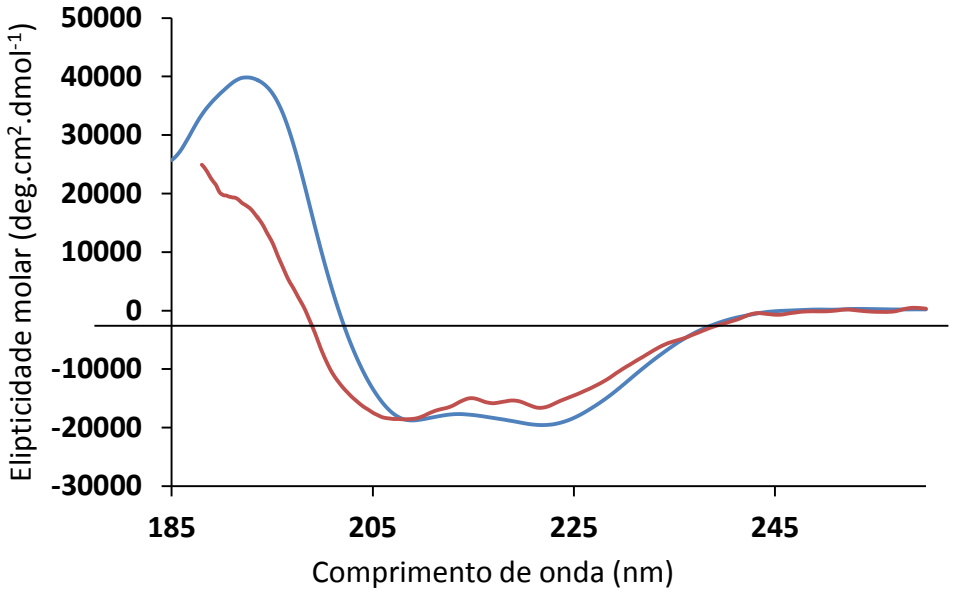

Figura 41: Espectros de dicroísmo circular. Curvas obtidas por espectrofotometria com luz polarizada do rhG-CSF purificado a partir do meio de autoindução (curva azul) e do meio HDF em batelada alimentada (curva vermelha).

A deconvolução dos espectros obtidos por dicroísmo circular foi realizada mediante o algoritmo CDSSTR, análise que mostrou a estrutura secundária esperada no caso do rhG-CSF a partir do meio de autoindução coincidindo as percentagens das conformações com o reportado por outros autores (Gomes et al., 2012; venkata et al., 2015c) e confirmou que a estrutura do rhG-CSF purificado a partir do meio HDF não tem a conformação correta (Figura 42).

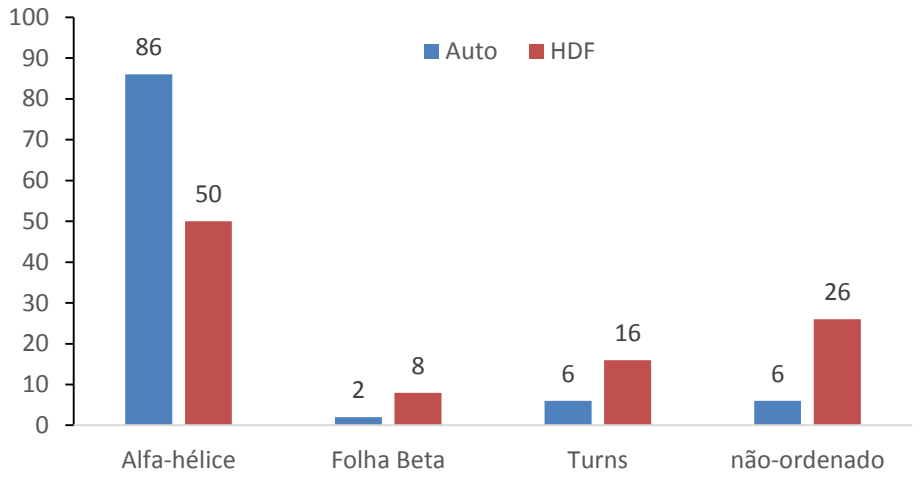

Figura 42: Análise de deconvolução realizada nos espectros de dicroísmo circular do rhG-CSF purificado a partir dos meios de cultura de autoindução (azul) e HDF (vermelho).

5.9 Ensaio *in vivo* da atividade biológica do rhG-CSF

Para realizar o ensaio *in vivo* em camundongos foi utilizada a fração eluída da cromatografia em SP-Sepharose com tampão acetato 20 mM pH 5,0 e 100 mM de NaCl (item 5.6.11). Após o tratamento dos grupos de animais, o sangue foi coletado e foram preparadas lâminas para contagem diferencial de leucócitos. O sangue dos animais também foi empregado para contagem das células brancas (WBC), células vermelhas (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), tamanho médio das plaquetas (MCV), hemoglobina globular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) no aparelho ABC Wet (Tabela 17).

Foi encontrada distribuição normal das medidas obtidas para RBC, HGB, HCT e PLT, por isso esses dados foram analisados por One Way Anova e teste Dunmet. Os resultados para MCV, MCH e MCHC não tiveram distribuição normal e foram processados mediante o teste não paramétrico Dums All Pains. Em ambos os casos a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Tabela 17: Resultados das leituras dos parâmetros do sangue coletado nos 4 grupos experimentais, utilizando o modelo de neutropenia induzida.

Grupo	RBC (10^6/mm^3)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (10^3/mm^3)	MCV (*f*L)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
1	6,02	8,75	26,73	358,4	44,38	14,86	33,51
2	5,27	7,58	23,26	474,4	43,88	14,27	31,88
3	5,56	7,99	24,15	434,19	43,31	14,36	33,14
4	5,53	8,14	24,41	296,93	44,31	14,71	33,33

Células vermelhas (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), volume médio das plaquetas (MCV), hemoglobina globular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os 4 grupos do ensaio nos valores de nenhum dos parâmetros determinados nas amostras de sangue que estão mostrados na Tabela 17.Este resultado demonstra que os tratamentos aplicados com rhG-CSF purificado e Granolokine não tiveram efeito sobre as células vermelhas e as plaquetas do sangue. Por outro lado, eles afetaram a contagem de células brancas e a contagem de neutrófilos (Figura 43).

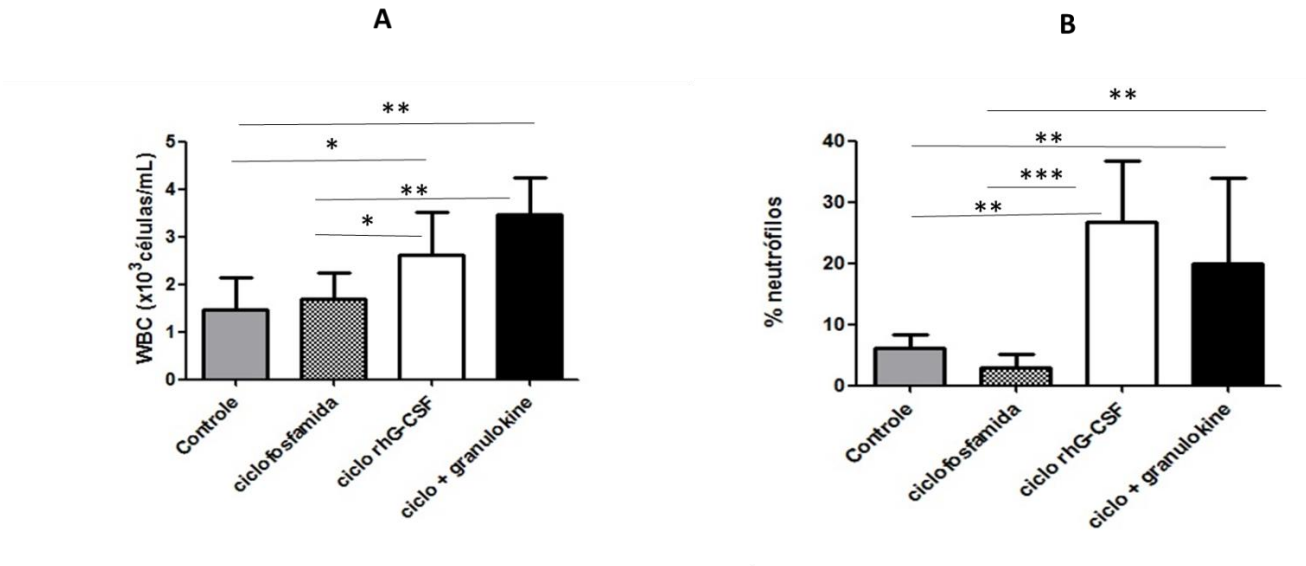

Figura 43: Resultados da (A) concentração das células brancas no sangue (WBC) e (B) porcentagem de neutrófilos nos 4 grupos experimentais indicados nas abscissas (n=8 em cada grupo). A significância estatística analisada por One Way ANOVA, teste Dummet, está indicada pelo asterisco: * p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001

Veja-se que tanto o grupo controle como aquele com neutropenia induzida pela ciclofosfamida e que não recebeu tratamento, mostraram diferenças estatisticamente

significativas com relação aos grupos tratados (rhG-CSF purificado e Granulokine), tanto na percentagem de neutrófilos como na quantidade de células brancas (WBC). A atividade biológica *in vivo* do rh-GCSF purificado (Nartograstim) foi estatisticamente indistinguível quando comparada com o medicamento de referência, Granulokine, já comercializado para tratamento da neutropenia. Pelos resultados, afirmamos que o rhG-CSF purificado mediante o processo de purificação estabelecido (Figura 39) foi capaz de aumentar o número de glóbulos brancos e de neutrófilos após 5 dias da indução de neutropenia. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e aquele que recebeu ciclofosfamida sem tratamento, nem na contagem de neutrófilos nem nas WBC. O esperado era que após a administração de ciclofosfamida, diminuiria a contagem dessas células, pois esse modelo de neutropenia induzida já foi utilizado por Gomes et al. (2012).

6 DISCUSSÃO

Nosso trabalho teve como objetivo principal desenvolver um método para obtenção do rhG-CSF em larga escala, desde o cultivo até a purificação. Os meios de cultura avaliados em frasco já tinham sido utilizados por outros autores para cultivo de *E. coli* recombinante em pequena escala: Silva et al. (2007) empregaram 2YT e Santos (2012) comparou os meios de autoindução e definido. Santos (2012) realizou cultivos em frascos com definido e de autoindução para obter a proteína PspA4Pro e observou que o meio de autoindução teve maior velocidade especifica de crescimento e formação de biomassa. Campani et al. (2016) também utilizaram o meio de autoindução para cultivo em modo batelada para obter a proteína PspA4Pro em biorreator, reportando 30 g/L de massa seca. Vélez et al. (2014) compararam cultivos em biorreator em modo batelada alimentada com meio quimicamente definido induzido por IPTG e com meio de autoindução, induzido por lactose, e também verificaram que o meio de autoindução teve maior biomassa e produção da proteína de interesse.

Dentre as variantes avaliadas neste trabalho nos cultivos realizados em frascos agitados para o meio de autoindução, aquela com lactose desde o início teve maiores velocidade específica de crescimento, estabilidade plasmidial e concentração de biomassa. Quando comparamos os cultivos realizados em biorreator, aquele com meio de autoindução propiciou também maior produção de rhG-CSF e elevada estabilidade do plasmídeo. Segundo Xu et al (2012), os cultivos de *E. coli* recombinante em meio de autoindução com lactose desde o início permitem alcançar maiores quantidades da proteína de interesse sem ter que definir o momento mais apropriado para adicionar o indutor. O meio de autoindução é uma estratégia interessante para produzir proteínas recombinantes em modo batelada, tendo em conta que essa é uma modalidade rápida e fácil de realizar em qualquer laboratório ou indústria (Santos, 2012). Neste trabalho, a velocidade máxima de crescimento dos cultivos em biorreator foi 0,3 h^{-1} tanto para o meio de autoindução como para o meio HDF. Venkata et al. (2008a) cultivaram *E. coli* em 3 L para obter rhG-CSF utilizando meio complexo com ampicilina e durante a alimentação mantiveram μ_{alim} em 0,3 h^{-1}, valor que de acordo com os autores garante baixa produção de acetato e evita a perda do plasmídeo.

Para evitar a perda do plasmídeo, uma das estratégias mais comuns é nele inserir um gene de resistência a um antibiótico como marca de seleção e adicionar esse antibiótico ao meio de cultivo. O antibiótico gera uma pressão seletiva para que as células retenham o plasmídeo que contém também o gene da proteína alvo, portanto geralmente os meios de

cultura de *E. coli* recombinante contêm antibiótico em sua composição (Goyal et al., 2009). Desse modo, todos os artigos encontrados na literatura utilizaram meio definido em batelada alimentada (Kim et al., 2014; Vemula et al., 2015b, Babaeipour et al., 2015) ou meio complexo LB em batelada (Venkata et al., 2008a; Vemula et al., 2015c) para obtenção do rhG-CSF, todos eles com acréscimo de antibiótico. Em nosso caso, nos cultivos com meio complexo 2YT, a estabilidade do pARKAN-I/rhG-CSF foi maior que 95% na última hora de indução nos cultivos em frascos, mesmo sem adição de antibiótico. Além disso, até onde sabemos, esta é a primeira vez que o meio de autoindução é empregado em reator em modo batelada para obtenção do rhG-CSF sem adição de antibiótico.

Apesar de haver pouca informação na literatura sobre a estabilidade de plasmídeos, alguns artigos relatam os valores de percentagem de colônias resistentes ao antibiótico para avaliação da retenção plasmidial durante culturas de *E. coli* recombinante em frascos e em biorreator (Tabela 18). Os valores de estabilidade do plasmídeo encontrados na literatura de construções para obtenção de proteínas recombinantes em meios complexos também são elevados (Tabela 18), mas em todos os casos foi acrescentado o antibiótico ao meio de cultura, corroborando o papel da sequência pAR na estabilidade do nosso plasmídeo (Chang et al., 1987; Liu et al., 2005; Ptacin et al., 2010; Eguia et al., 2018).

Tabela 18: Estabilidade de construções utilizadas em cultivos com meio complexo de E. coli recombinante em frascos agitados e biorreator

	Construção	Meio cultura	Temp	% resistência	Referência
Frascos*	pARKAN-I/rhG-CSF	2YT **sem antib**	37 ºC	100	Eguia et al., 2018
	pT101/D-TOPO	LB + Amp	24 °C	89	Vélez et al., 2014
	pET28b/*clpP*	LB **sem antib**	37 °C	5	Einsfeldt et al, 2011
	pAE- pspA1p	2YT + Amp	37 °C	6	Silva et al, 2007
	pAE- pspA3p	2YT + Amp	37 °C	0	Silva et al, 2007
Reator **	pARKAN-I/rhG-CSF	Autoind **sem antib**	30 ºC	100	este trabalho
	pET37+/PspA4Pro	Autoind + Kan	25 °C	94	Campani et al., 2016
	pT101-PGA	Autoind + Amp	20 °C	80	Vélez et al., 2014

* após 4h de indução com IPTG; ** ao final do cultivo; Amp – ampicilina; Kan – canamicina; sem antib – sem antibiótico.

Einsfeld et al. (2011) avaliaram a influência da concentração de IPTG e canamicina na produção da proteína recombinante ClpP e reportaram apenas 5% de colônias resistentes após indução com IPTG 1mM, sem canamicina no meio LB. Comparando nosso plasmídeo com o pET28b desse estudo, podemos dizer que nossa construção foi 19 vezes mais estável.

A lactose já tinha sido usada por vários autores como indutor da síntese de proteína recombinante em cultivos de *E. coli* (Santos, 2012; Carvalho et al 2012; Veléz et al., 2014; Dvorak et al., 2015; Campani et al., 2016) pelas vantagens que tem sobre o IPTG. Nossos resultados também apontaram a lactose como melhor indutor que o IPTG e, até onde sabemos, não há relatos na literatura de cultivos para obtenção do rhG-CSF a partir de *E. coli* utilizando a lactose como indutor.

O meio definido HDF também foi avaliado para cultivo em biorreator por ser um dos mais usados para atingir alta concentração celular de *E. coli* recombinante. Nos cultivos realizados com HDF em batelada e batelada alimentada foi utilizado o glicerol como fonte de carbono e as concentrações de acetato foram menores que 0,4 g/L desde o início dos cultivos.

O glicerol tem sido usado como fonte de carbono alternativa à glicose (Sargo, 2011; Carvalho et al 2012; Xiao et al., 2018), porque gera menos acetato ao ser metabolizado na célula. Sem glicose no meio, o acetato não se acumula porque o glicerol é assimilado mais lentamente pela célula. As avaliações experimentais de Enjalbert et al. (2017) confirmaram que a produção de acetato pode ser reduzida e até revertida, baseando-se no duplo papel da via fosfato acetil transferase – acetato kinase (Pta-AckA), que pode passar rapidamente da produção de acetato ao consumo, dependendo apenas da sua concentração extracelular. As células de *E. coli* que crescem em condições de excesso de glicose produzem acetato, mas o consomem apenas após a glicose ser totalmente consumida, por causa da repressão catabólica exercida pela glicose na utilização de acetato. Essa descoberta destaca o duplo papel da via Pta-AckA na produção e consumo de acetato durante o crescimento em substratos glicolíticos, e expande significativamente as capacidades metabólicas de *E. coli*, pois indica que ela é capaz de consumir acetato como fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano.

Existem vários métodos utilizados para renaturar proteínas recombinantes: diálise e diafiltração para pequena e média escala e diluição e cromatografia para larga escala. Especificamente para renaturar o rhG-CSF já foi usada a diálise (Windfiled et al., 1988; Vanz et al., 2008; Gomes et al., 2012); diafiltração (Venkata et al., 2008b), diluição direta (Cheng et al., 2008; Venkata et al 2008a; Kim et al., 2014; Vemula et al., 2015b; Vemula et al., 2015c; Babaeipour et al., 2015) e cromatografia (Wang et al., 2009). Neste trabalho, o método de renaturação por diálise foi útil para determinar a concentração proteica que permite atingir maior percentagem de renaturação. A diafiltração foi ligeiramente mais efetiva que a diálise (Tabela 19), talvez se a diafiltração fosse feita usando 20 µg/mL de concentração proteica, ou 550 µg/mL como conseguido no tampão com glicerol e sem arginina, para eliminar a ureia, o resultado poderia ter sido melhor, sabendo que este método é mais rápido que a diálise.

Tabela 19: Comparação das percentagens de renaturação do rhG-CSF pelos métodos utilizados neste trabalho

Método de renaturação	% de renaturação
Diluição em tampão com glicerol e arginina	33
Diluição em tampão com glicerol e sem arginina	95 a 98
Diafiltração 5 kDa	3,09
Diálise	2,36

A diluição direta tem sido o método mais usado pelos autores para renaturar o rhG-CSF obtido na forma de CI, em qualquer escala de produção, mas é usado fundamentalmente

em larga escala, pois neste método não é necessário monitorar pressão e vazão durante o processo, como no caso da diafiltração. Cheng et al. (2008) usaram arginina em 0,75 M e relataram 65% de renaturação; Vemula et al. (2015b) definiram 10% de glicerol como a melhor concentração para renaturar o rhG-CSF, porém não mostraram as percentagens de renaturação alcançadas; e Kim et al. (2014) determinaram que a diluição deveria atingir a concentração proteica de 1 mg/mL.

O método de diluição em tampão com arginina avaliado neste trabalho atingiu apenas 33 % de renaturação (Tabela 19). A arginina em concentrações de 0,5-2 M é um agente muito utilizado como estabilizador na renaturação por diluição e diálise, e foi comprovado que os grupos de guanidina presentes nessa substância interagem com o triptofano da estrutura da proteína (Tsumoto et al., 2004). Chen et al (2008) mostraram que a função supressora de agregação da arginina age fundamentalmente sobre os agregados de G-CSF formados pela interação das zonas hidrofóbicas intermoleculares. Além disso, demostraram que na presença de arginina 1 M ainda existiam agregados formados por ligação covalente. Esta última questão poderia explicar porque o tampão com arginina (0,5 M) atingiu menor percentagem de renaturação, mesmo tendo na sua composição o glicerol 10%, que também é uma substância estabilizadora, . Outros autores que utilizaram o método de diluição foram Vallejo et al. (2002), que obtiveram 60% de renaturação da rhBMP-2 quando a concentração proteica foi 20 µg/mL, percentagem de renaturação superior à nossa em tampão com arginina, e Gieseler et al. (2017), que usaram o mesmo método de Vallejo mas não reportaram a porcentagem de renaturação obtida.

A diluição direta com tampão com glicerol e sem arginina atingiu a maior percentagem de renaturação, em torno 100% (Tabela 19). A arginina e o glicerol são agentes muito utilizados como estabilizadores na renaturação por diluição (Tsumoto et al., 2004). Propõe-se que o glicerol interaja com zonas de hidrofobicidade, atuando como interface anfifílica entre a superfície hidrofóbica e o solvente polar, evitando a agregação proteica (Vagenende et al., 2009).

Havíamos proposto que a concentração ótima para renaturar o rhG-CSF por diluição determinada no item 5.6.6 seria de 20 µg/mL, porém o tampão sem arginina admitiu maior concentração proteica ao final da etapa de renaturação, chegando a 550 mg/mL (item 5.6.9). Entretanto, a concentração de ureia remanescente (1,0 M a 1,5 M) quando essa concentração proteica foi atingida interferiu na cromatografia de troca iônica e, portanto, foi necessário diluir o material renaturado até que a concentração de ureia fosse ≤ 0,5 M para se alcançar sucesso na cromatografia. Zhao et al. (2014) compararam diluição e ultrafiltração para

renaturar rhG-CSF e alcançaram maiores percentagens de renaturação com a diluição direta. Esses autores também avaliaram concentrações da proteína entre 100 e 1000 µg/mL, atingindo melhor renaturação naquela de menor concentração proteica.

Kim et al. (2013) utilizou o ajuste de pH durante a purificação do rhG-CSF para eliminar proteínas contaminantes usando os valores de 5,5; 6,5 e 7,5. As amostras de entrada da cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose foram ajustadas a pH entre 4,5 e 5,5 e foi observada precipitação em todas elas depois de pelo menos 12 h, semelhante ao relatado por Kim et al. (2013).

São diversos os métodos cromatográficos propostos para purificar o rhG-CSF depois da etapa de renaturação: interação hidrofóbica (Wang et al., 2012), gel filtração (Babaeipour et el., 2015) e troca iônica. A maioria dos trabalhos usa mais uma etapa cromatográfica para obter a pureza adequada (Kim et al., 2014; Venkata et al., 2008a, Babaeipour et el., 2015). Gomes et al (2012) e Venkata et al (2008a) usaram troca catiônica em SP-Sepharose. No primeiro caso, eluíram o rhG-CSF com NaCl 100 mM em tampão fosfato 20 mM pH 8,0 e não relataram a pureza final nem a recuperação. No segundo caso, eluíram o rhG-CSF com 100 mM Tris pH 8,0 e reportaram baixa recuperação após a eluição devido à formação de agregados, porém sem mostrar o valor de recuperação obtido. Os autores argumentaram que a formação de agregados é consequência do contato da proteína com o tampão de eluição a pH 8,0, o que poderia ativar o resíduo da cisteína livre (Cys_{17}) e provocar a formação intra e intermolecular de ligações dissulfeto. Venkata et al. (2008b) realizaram apenas a gel filtração para a troca de tampão (desalting) após a renaturação e obtiveram recuperação de 69% e pureza de 100%, provavelmente a maior recuperação deve-se à ausência de interação da proteína com a resina neste tipo de cromatografia. Neste trabalho, tentamos purificar o rhG-CSF a partir do material renaturado empregando o sistema LabScale com um conjunto de 3 membranas de 5 kDa de corte nominal (área filtrante total de 150 cm^2) em lugar da cromatografia, uma vez que a pureza relativa de rhG-CSF nesta etapa estava bastante elevada (70 % de pureza). O material renaturado foi concentrado até 200 mL e diafiltrado a volume constante com 1,2 L de tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Esperávamos assim eliminar proteínas menores que 5 kDa, porém na amostra concentrada obtida ao final dessa etapa apareceram bandas de maior tamanho que o rhG-CSF e que provavelmente estavam em concentração muito baixa para serem observadas anteriormente no material renaturado.

Gieseler et al. (2017) reportaram uma recuperação global de apenas 2 % e pureza superior ao 90% depois de purificar a proteína rhBMP-2 utilizando cromatografia de troca catiônica. Em nosso trabalho foi utilizada a cromatografia em SP-Sepharose para purificar

rhG-CSF partindo-se dos renaturados obtidos por meio dos diferentes métodos de renaturação avaliados, porém a recuperação foi baixa em todas as cromatografias realizadas. A maior recuperação, 7,46%, foi alcançada a partir do *pool* dos renaturados por diálise e diafiltração (item 5.6.5) e a menor, 1%, a partir do renaturado em tampão sem arginina (item 5.6.10), valor similar ao de Gieseler et al. (2017), mas com pureza menor que a dele (80%). Existem poucos dados na literatura que relatam a recuperação global ou por etapas após a purificação de proteínas recombinantes obtidas em CI, exceções feitas aos trabalhos já citados de Venkata et al. (2008b) e Gieseler et al. (2017). Assim, é razoável se inferir que a recuperação deva ser baixa na grande maioria dos casos de proteínas recombinantes obtidas na forma insolúvel. Daí também o grande interesse por estratégias para obtenção solúvel (Hajinia et al., 2012; Bashir et al., 2015). Apesar da baixa recuperação nas frações eluídas da SP-Sepharose, partindo tanto do material obtido em meio de autoindução em batelada como em meio HDF em batelada alimentada (item 5.7), a estrutura do rhG-CSF purificado a partir do material obtido com meio de autoindução estava com a conformação correta e biologicamente ativa, o que foi demonstrado por dicroísmo circular (item 5.8) e pelo ensaio de atividade biológica *in vivo* em camundongos (item 5.9).

7 CONCLUSÕES

- O plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF foi altamente estável nos meios de cultura complexos avaliados, mesmo sem acréscimo de antibiótico, o que permite reduzir os custos de produção e obter o rhG-CSF com um vetor sem restrições de propriedade intelectual e proteção de patente.

- Em meio quimicamente definido, HDF, foi necessário acrescentar canamicina à cultura a fim de aumentar a retenção do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF.

- O plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF foi mais estável em meio HDF quando se diminuiu a concentração do IPTG de 1,0 para 0,1 mM e a temperatura de 37 °C para 30 °C durante a indução.

- O glicerol usado como fonte de carbono nos cultivos com meio definido HDF levou a baixa formação de acetato, que não ultrapassou 0,4 g/L.

- A produção de rhG-CSF em biorreator com meio de autoindução em batelada mostrou-se economicamente mais vantajosa do que em HDF em batelada alimentada, pois no meio de autoindução o cultivo requer menos tempo, não é necessário acrescentar nem canamicina nem IPTG e a quantidade de glicerol empregada é menor.

- O rhG-CSF foi produzido satisfatoriamente em biorreator, sendo o meio de autoindução que permitiu maior estabilidade do plasmídeo e maior produção da proteína frente ao meio definido HDF em batelada alimentada.

- A renaturação por diluição direta em tampão tris 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, Triton X-100 a 0,1 %(m/v) e glicerol 10%(m/v) foi o método de maior percentagem de renaturação.

- O ajuste de pH do material renaturado em valores inferiores a 6,0 durante o processo de purificação do rhG-CSF propiciou a eliminação de impurezas no precipitado formado.

- O processo de purificação estabelecido permitiu obter o rhG-CSF com a estrutura secundária esperada e biologicamente ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, PA., Berezin, EN., Mimica, MJ., 2014, Etiología das infecções em criançascomneutropeniafebril pós-quimioterapia. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo, v.1, p .40-42.

Babaeipour, V., Khanchezar, S., Mofid, MR., Abbas, MPH, 2015, Efficient Process Development of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rh-GCSF) Production in *Escherichia coli* Iranian Biomedical Journal, v. 19 (2), p. 102-110.

Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Curr Opin Biotechnol, v. 10, p. 411-21.

Bashir, S., Sadaf, S., Ahmad, S., Akhtar, MW., 2015, Enhanced and Secretory Expression of Human Granulocyte Colony Stimulating Factor by Bacillus subtilis SCK6: Biomed Res Int, v. 2015, p. 636249.

Bashir, H., Ahmed, N., Khan, MA., Zafar, AU., Tahir, S., Khan, MI., Khan, F., Husnain,T., 2016, Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN: Biotechnol Appl Biochem, v. 63, p. 708-714.

Baxter, JC., Funnell, BE., 2014, Plasmid partition mechanisms. Microbiol Spectrum 2:PLAS-0023-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014.

Bellão, C., 2005, Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3), Universidade de São Carlos, São Paulo.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer L, 2002, Biochemistry, 5th Edition: ISBN-10: 0-7167-3051-0 Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22512/>

Bishop, B., Koay, DC., Sartorelli, AC., Regan, L., 2001, Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability: J Biol Chem, v. 276, p. 33465-70.

Boneberg, EM., Hartung T., 2002, Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF:Inflamm Res, v. 51, p. 119-28.

Brasil. Ministério da Saúde: homepage on the Internet. Disponível em: http:// portal.saude.gov.br/saude. [2009 out 20]. Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde, 2015, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA.http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/brasil_cria_medicamentos_contra_efeitos_colaterais_do_tratamento_de_cancer. Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde. 2015 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Tratamento do câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; p., 122 2015. Disponível em < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>. Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde, 2017, Pertuzumabe para o tratamento do câncer de mama HER2-positivo metastático em primeira linha de tratamento associado ao trastuzumabe e docetaxel. Relatório de Recomendação Disponível em:<http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2017/Relatorio_PertuzumabeTrastuzumabe_CA_Mama_CP13_2017.pdf > Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde, 2016, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 122.

Brown, TA., 2003, Clonagem gênica e analise de DNA-uma introdução, Porto Alegre, Artmed.

Brooks AC., Hwang LC., 2017, Reconstitutions of plasmid partition systems and their mechanisms, Plasmid, v. 91, p. 37-41.

Campani, G., Silva, GG., Horta, ACL., Badino, AC., Giordano, RC., Gonçalves, VM., Zangirolami, TC.,2016, Recombinant protein production by engineered E*scherichia coli i*n a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis, Chem Eng Process, v. 103, p. 63-69.

Carvalho, RJ., Cabrera-Crespo, J., Tanizaki, MM., Gonçalves VM., 2012, Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumocoCxal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences: Appl Microbiol Biotechnol, v. 94, p. 683-94.

Champe, PC., Harvey, RA., Ferrier, DR., 2009, Bioquímica Ilustrada, Artmed. Porto Alegre, p. 520.

Chang, S., Chang, SY., Gray , O., 1987, Structural and genetic analyses of a par locus that regulates plasmid partition in Bacillus subtilis: J Bacteriol, v. 169, p. 3952-62.

Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., Ding, H., Su, Z., 2008, Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding: Biotechnol Prog, v. 24, p. 1365-72.

Choin, H. J., Keum. K., Lee. S.Y., 2006, Production of recombinante protein by high cell density culture of *Escherichia coli*, Chemical Engineering Science, v. 61, p. 876-885.

Clark, S. C., and Kamen , R., 1987, The human hematopoietic colony-stimulating factors: Science, v. 236, p. 1229-37.

da Silva, AJ., Horta, AC., Velez, AM., Iemma, MR., Sargo, CR., Giordano, RL., Novo, MT., Giordano, RC., Zangirolami, TC., 2013, Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaCxine antigen in rE. coli fed-batch cultures: Springerplus, v. 2, p. 322.

Dantas, N. S., Silva, R., 2006, Manual de Medicamentos Excepcionais: Brasilia.

De Spiegeleer, P., Sermon, J., Lietaert, A., Aertsen, A., Michiels, CW., 2004, Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: J Appl Microbiol, v. 97, p. 124-33.

Dos Santos, M., 2012, Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção da proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli.* recombinante, Universidade de São Carlos.

Du, W., Song, Y., Liu, M., Yang, H., Zhang, Y., Fan, Y., Luo, X., Li, Z., Wang, N., He, H., Zhou, H., Ma, W., Zhang, T., 2016, Gene expression pattern analysis of a recombinant Escherichia coli strain possessing high growth and lycopene production capability when using fructose as carbon source: Biotechnol Lett, v.38, p.1571–1577.

Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, PI., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo,V., Prokop, Z., Damborsky, J., 2015, Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway: Microb Cell Fact, v. 14, p. 201.

Eguia, FAP., Ramos, HR., Kraschowetz, S., Omote, D., Ramos CRR., Ho, PL., Carvalho, E., Gonçalves., 2018, A new vector for heterologous gene expression in *Escherichia coli* with increased stability in the absence of antibiotic: Plasmid (Submetido).

Einsfeldt, K., Severo Júnior, JB., Corrêa Argondizzo, AP., Medeiros, M.A., Alves, TL., Almeida, RV., Larentis, AL., 2011, Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability: Vaccine, v. 29, p. 7136-43.

Eiteman, MA., Altman, E., 2006, Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations: Trends Biotechnol, v. 24, p. 530-6.

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

Friehs, K., 2004, Plasmid copy number and plasmid stability: Adv Biochem Eng Biotechnol, v. 86, p. 47-82.

Field, CM., Summers, DK., 2011, Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe, J of Theoretical Biology, v. 29, p.119-127.

Fiocruz, 2016, https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-inaugura-novo-centro-de-producao-de-insumos-para-o-sus. Acesso em 09 de abril de 2018.

Fukunaga, R., Seto , Y., Mizushima, S., Nagata, S., 1990, Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, p. 8702-6.

García-Carbonero, R., Mayordomo, JI., Tornamira, MV., López-Brea, M., Rueda, A., Guillem, V., Arcediano, A., Yubero, A., Ribera, F., Gómez, C., Trés, A., Pérez-Gracia, JL.,

Lumbreras, C., Hornedo, J., Cortés-Funes, H., Paz-Ares, L., 2001, Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial: J Natl Cancer Inst, v. 93, p. 31-8.

Gerdes, K., Molin, S., 1986, Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the parA locus: J Mol Biol, v. 190, p. 269-79.

Gerdes, K., Mùller-Jensen, J., Jensen, R.B., 2000, Plasmid and chromosome partitioning:surprises from phylogeny, Molecular Microbiology, v. 3, p. 455-466.

Gerdes, K., Howard, M., Szardenings, F., 2010, Pushing and pulling in prokariotic DNA segregation, Cell, v. 141, p. 927-942.

Gieseler, G., Pepelanova, I., Stuckenberg, L., Villain, L., Nölle, V., Odenthal, U., Beutel, S., Rinas, U., Scheper, T., 2017, Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography, Appl Microbiol Biotechnol, v.101, p.123-130.

Gombert, AK., and Kilikian, BV., 1998, Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer: J Biotechnol, v. 60, p. 47-54.

Gomes, FR., Maluenda, AC., Tápias, JO., Oliveira, FL., Sá-Rocha, LC., Carvalho, E., Ho, PL., 2012, Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in *Escherichia coli*: World J Microbiol Biotechnol, v. 28, p. 2593-600.

Goyal, D., Sahni, G., Sahoo, DK., 2009, Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture, Bioresour Technol, v.100, p. 4468-4474.

Hägg, P., de Pohl JW., Abdulkarim, F., Isaksson, LA., 2004, A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*: J Biotechnol, v. 111, p. 17-30.

Hajinia, E., Fatemi, SS., Karkhane, AA., Akbar, A., Safekordi, AA., Yakhchali, B., 2012, Optimization of secretory expression of recombinant hGM-CSF in high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli using Taguchi statistical method Iranian Journal of Biotechnology, v. 10, No. 4, October 2012.

Holloway, CJ., 1994, Applications of recombinant DNA technology in the production of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Eur J Cancer, v. 30A Suppl 3, p. S2-6.

Horta, AC., Sargo, CR., da Silva, AJ., de Carvalho, GAM., Dos Santos, MP., Gonçalves, VM., Zangirolami, TC., de Campos, GR., 2012, Intensification of high cell-density cultivations of rE. coli for production of S. pneumoniae antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control, Bioprocess Biosyst Eng, v. 35, p.1269-1280.

Hübel, K., Engert, A., 2003, Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary: Ann Hematol, v. 82, p. 207-13.

Jevsevar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., Menart, V., 2005, Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted: Biotechnol Prog, v. 21, p. 632-9.

Johansson, L., Liden, G., 2006, A study of long-term effects on plasmid-containing *Escherichia coli* in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorometry, Biotechnol Prog, v. 22, p.1132-1139.

Kilikian, BV., Suarez ID., Liria, CW., Gombert, AK., 2000, Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction.: Process Biochemistry, v. 35, p. 1019-1025.

Kim, CK., Lee, CH., Lee S-B., Oh, J-W., 2013, Simplified Large-Scale Refolding, Purification, and Characterization of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli*: Plos One, v. 8.

Kim,CK., Choi, JH., Lee, SB., Lee, SM., Oh, JW., 2014, Expression and Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Fed-Batch Culture of *Escherichia coli* Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 172, p. 2425-2435.

Korz, DJ., Rinas , U., Hellmuth, K., Sanders, EA., Deckwer WD., 1995, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*: J Biotechnol, v. 39, p. 59-65.

Kuga, T., Komatsu, Y., Yamasaki, M., Sekine, S., Miyaji, H., Nishi, T., Sato, M., Yokoo, Y., Asano, M., Okabe, M., 1989, Mutagenesis of human granulocyte colony stimulating factor, Biochem Biophys Res Commun, v. 1, p.103-111.

Larentis, AL., Argondizzo, AP., Esteves, GS., Jessouron, E., Galler, R., Medeiros, MA., 2011, Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumocoCxal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage: Protein Expr Purif, v. 78, p. 38-47.

Lawley, TD., Taylor, DE., 2003, Characterization of the double-partitioning modules of R27: correlating plasmid stability with plasmid localization: J Bacteriol, v. 185, p. 3060-3067.

Lee, SY., 1996, High cell-density culture of *Escherichia coli*: Trends Biotechnol, v. 14, p. 98-105.

Lehninger AL, 2006, Lehninger- Princípios de Bioquimica 4a Ed. Sarvier, p. 534-536.

Li, S., Feng , G., Bu, H., Li, Y., Zhang, J., Yang, Y., Lu , Y., 2002, Human peripheral blood monocyte derived dendritic cell culture and mature regulation: Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, v. 19, p. 268-72.

Li, Y., Dabrazhynetskaya , A., Youngren B., Austin, S., 2004, The role of Par proteins in the active segregation of the P1 plasmid: Mol Microbiol, v. 53, p. 93-102.

Lima, WJN., 2004, Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos de alta densidade celular, Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, 158 p.

Liu, T., Chen, JY., Zheng, Z., Wang, TH., Chen, GQ., 2005, Construction of highly efficient E. coli expression systems containing low oxygen induced promoter and partition region: Appl Microbiol Biotechnol, v. 68, p. 346-54.

Lu, H. S., Boone T. C., Souza L. M., Lai, P. H., 1989, Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Arch Biochem Biophys, v. 268, p. 81-92.

Lu, H. S., Clogston, C. L., Narhi, L. O., Merewether, L. A,. Pearl, W. R., Boone, T. C., 1992, Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. Characterization of the disulfide-reduced intermediates and cysteine-serine analogs: J Biol Chem, v. 267, p. 8770-8777.

Molineux, G., 2011, Granulocyte colony-stimulating factors: Cancer Treat Res, v. 157, p. 33-53.

Nascimento, TG., Andrade, M., Oliveira, RA., Almeida, AM., Gozzo, TO, 2014, Neutropenia: ocorrência e manejo em mulheres com câncer de mama em quimioterapia: Rev. Latino-Am. Enfermagem mar.-abr. v.22, p. 301-308.

Neidhardt, FC., Ingraham, JL., Schaechter, M., 1990, Physiology of the bacterial cell : A molecular approach: Sunderland, Mass., U.S.A., Sinauer Associates.
Novagen, 2006, pET System Manual. NOvagen- the GOLD standard for protein expression., 78 p.

Olaofe, OA., Burton, SG., Cowan, DA., Harrison, STL., 1995, Comparison of temperature - induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fobroblast growth-factor in hight-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*: biochemical Engineering Journal, v. 52, p. 6.

Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K.W., Yap, M.G.S., 2006, Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 alpha during batch fermentation: Enzyme Microb Technol, v, 39, p. 391–398.

Pathak, M., Dixit, S., Muthukumar,S., Rathore, A. S., 2016, Analytical characterization of in vitro refolding in the quality by design paradigm: Refolding of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: J Pharm Biomed Anal v. 126, p 124 -31.

Ptacin, J. L., Lee, S. F., Garner, E. C., Toro, E., Eckart, M., Comolli, L. R., Moerner, W. E., Shapiro, L., 2010, A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation: Nat Cell Biol, v. 12, p. 791-8.

Ramos, C. R., Abreu, P. A., Nascimento, A. L., Ho, P L.., 2004, A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide: Braz J Med Biol Res, v. 37, p. 1103-9.

Riesenberg, D., Guthke, R., 1999, High-cell-density cultivation of microorganisms: Appl Microbiol Biotechnol, v. 51, p. 422-30.

Riesenberg, D., V. Schulz, W. A. Knorre, H. D. Pohl, D. Korz, E. A. Sanders, A. Ross, and W. D. Deckwer, 1991, High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate: J Biotechnol, v. 20, p. 17-27.

Rinas, U., 1996, Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*: Biotechnol Prog, v. 12, p. 196-200.

Rosano, GL., Ceccarelli, EA., 2014, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges: Front Microbiol, v. 5, p. 172.

Salje, J., Gayathri, P., Lowe, J., 2010, The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments, Nat. Rev.Microbiol, v. 8, p. 683–692.

Sargo, CR., 2011, Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r *E.coli* utilizando glicerol como fonte de carbonoAperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r E.coli utilizando glicerol como fonte de carbono, Universidade Federal de são Carlos, 83 p.

Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W, 2001, Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica, v. 2 Editora Edgard Blücher, São Paulo.

Scopes, R. K., 1994, Protein purification: Principles and Practice.

Seeger, A., Schneppe, B., M.C. Carthy, Deckwer, W. D, Rinas, U.,1995, Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in hight-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, Enzyme and Microbiological Technology, v. 10, p. 947-953.

Silva, M., 2005, Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*, Programa de Interunidades em Biotecnologia ICB/IPT/Instituto Butantan Universidade de São Paulo, 149 p.

Silva, M., J. Cabrera-Crespo, M. E. Sbrogio-Almeida, E. N. Miyaji, P. L. Ho, L. C. Leite, and A. P. Lopes, 2007, Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein a, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3: Mol Biotechnol, v. 37, p. 146-54.

Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2012a, Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*: Biotechnol Adv, v. 30, p. 691-708.

Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2012b, Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology, Appl Microbiol Biotechnol, v. 93, p. 2571–2580.

Stieber, D., Gabant, P., Szpirer, C., 2008, The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications,BioTechniques, v. 45, p.344–346.

Studier, FW., 2005, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures: Protein Expr Purif, v. 41, p. 207-34.

Sørensen, HP., Mortensen, KK., 2005, Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*: Microb Cell Fact, v. 4, p. 1.

Tan, S., Wu, W., Liu J., Kong, Y., Pu,Y., Yuan, R., 2002, Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in E. coli using the L-asparaginase II signal sequence: Protein Expr Purif, v. 25, p. 430-436.

Tsai, W.,Wu, T.C.,Chiang, B. L.,Wen, H. W., 2017, Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in *Escherichia coli*: Protein Expr Purif, v 130, p 35-43.

Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., Arakawa, T., 2004, Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification: Biotechnol Prog, v. 20, p. 1301-1308.

Vagenende, V., Yap, M. G., Trout, B. L., 2009, Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol: Biochemistry, v. 48, p. 11084-11096.

Vallejo, LF., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, HA., Rinas, U., 2002, Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*: J Biotechnol, v. 94, p. 185-194.

Vanz, A. L., G. Renard, M. S. Palma, J. M. Chies, S. L. Dalmora, L. A. Basso, and D. S. Santos, 2008, Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization: Microb Cell Fact, v. 7, p. 13.

Vaz, M., 2008, Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinante (elF, LACK) para expressão de antígenos da Leishmania chagasi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Vélez, AM., da Silva, AJ., Horta, AC., Sargo, CR., Campani, G., Gonçalves, SG., de Lima CGR., Zangirolami, TC., 2014, High-throughput strategies for penicillin G acylase production in rE. coli fed-batch cultivations, BMC Biotechnol 14:6.

Vemula, S., Dedaniya, A., Bandaru, R., Mallu, MR., Settaluri VS., Ronda, SR., 2015a, Production of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli* Using Novel Media Supplements Through Integrated Statistical Optimization Designs: International Journal of Peptide Research and Therapeutics, v. 21, p. 299-312.

Vemula, S., Dedaniya, A., Thunuguntla, R., Mallu ,MR., Parupudi, P., and Ronda, SR., 2015b, Simplified in vitro refolding and purification of recombinant human granulocyte colony stimulating factor using protein folding cation exchange chromatography: Journal of Chromatography A, v. 1379, p. 74-82.

Vemula, S., Thunuguntla, R., Dedaniya, A., Kokkiligadda, S., Palle , C., Ronda, SR., 2015c, Improved Production and Characterization of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor from *E-coli* under Optimized Downstream Processes: Protein Expression and Purification, v. 108, p. 62-72.

Venkata , RD., Narasu, ML., Rao, AK., 2008a, A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor

expressed in *Escherichia coli* and its characterization: Biotechnol Appl Biochem, v. 50, p. 77-87.

Venkata, KD., Deepthi, A., Kali, SA., 2008b, Optimization of the downstream process for high recovery of rhG-CSF from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*, Process Biochemistry, v. 43, p. 566-575.

Waegeman, H., and W. Soetaert, 2011, Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering: J Ind Microbiol Biotechnol, v. 38, p. 1891-910.

Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., 2006 Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism: Microb Cell Fact, v.5, p. 34-51.

Wang, CH., Wang, L., Geng, X., 2009, Optimization of refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Escherichia coli* by immobilized metal ion affinity chromatography, Biochemical Engineering Journal, v. 43, p.197–202.

Wang, C., Geng, X., 2012, Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor using hydrophobic interaction chromatography at a large scale: Process Biochemistry, v. 47, p. 2262-2266.

Ward, O. P., 1991, Bioprocessing, New York: Van Nostrand Reinhold.

Weisbart, R. H., Golde, D. W., 1989, Physiology of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors in host defense: Hematol Oncol Clin North Am, v. 3, p. 401-9.

Welte, K., Gabrilove, J., Bronchud, M. H., Platzer, E., Morstyn, G., 1996, Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years: Blood, v. 88, p. 1907-29.

Wheatley, R W., Lo, S., Jancewicz, LJ., Dugdale, ML., Huber, RE., 2013, Structural Explanation for Allolactose (*lac*Operon Inducer) Synthesis by *lacZ* β-Galactosidase and the Evolutionary Relationship between Allolactose Synthesis and the *lac* Repressor: The Journal of Biological Chemistry, v. 288, p. 12993-13005.

Wheelwright, S. M., 1991, Protein purification: desing and scale up of dowstream processing, Hanser publishers.

Williams, J.A., Luke, J., Johnson, L.,Hodgson, C., 2006, pDNAVACCultra vector family: high throughput intracellular targeting DNA vaCxine plasmids, VaCxine, v. 24, p. 4671-4676.

Wittman, B., Horan, J., Lyman, G. H., 2006, Prophylactic colony-stimulating factors in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials: Cancer Treat Rev, v. 32, p. 289-303.

Xiao, K., Yue, XH., Chen, WC., Zhou, XR., Wang, L., Xu, L., Huang, FH., Wan, X., 2018, Metabolic Engineering for Enhanced Medium Chain Omega Hydroxy Fatty Acid Production in *Escherichia coli*. , v. 9, p.139.

Xu, J., Li, W., Wu, J., Zhang, Y., Zhu, Z., Liu, J., 2006, Stability of plasmid and expression. Of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol, v. 73, p. 780-788.

Xu, J., Banerjee, A., Pan, SH., Li, ZJ., 2012, Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains: Protein Expr Purif. v. 83(1), p. :30-36.

Yamamoto, A., A. Iwata, T. Saito, F. Watanabe, and S. Ueda, 2009, Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor (cG-CSF): Vet Immunol Immunopathol, v. 130, p. 221-5.

Yan, J., Zhao, SF., Mao, YF., Luo, YH, 2004, Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. World Journal of Gastroenterology, v.10, p.1755–1758.

Yuriko, S., M. Glebson, O. Namide, and d. s. M. Elizabeth, 2015, Neutropenia febril de recorrência pós quimioterapia em pacientes com câncer de mama, Revista de emfermagem da UFPI.

Zhao, D., Liu, Y., Wang, X. Li, Wang, Q., Su, Z., 2014, Membrane combined with hydrophilic macromolecules enhances protein refolding at high concentration: Process Biochemistry, v. 49, p. 1129-1134.