



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO
RECOMBINANTE OBTIDO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE
Escherichia coli, VISANDO SUA APLICAÇÃO CLÍNICA**

JOÃO EZEQUIEL DE OLIVEIRA

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

Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho P. Ribela

**São Paulo
1999**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE OBTIDO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia coli*, VISANDO SUA APLICAÇÃO CLÍNICA

JOÃO EZEQUIEL DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Ciências na área de Tecnologia Nuclear.

Orientadora:

Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela

São Paulo

1999



Ao meu pai Luiz (*in memoriam*), com quem aprendi que a paciência é a ciência da sabedoria.

À minha mãe Eduwilgem (*in memoriam*) com quem aprendi a amar e ter esperança.

Aos meus irmãos e irmãs com os quais aprendi a crescer e lutar por meus ideais.

A minha família e amigos, pelo amor e apoio.

À quem ainda vier a me amar:

“Porque eu te amo, tu não precisas de mim, Porque tu me amas, eu não preciso de ti. No amor, jamais nos deixamos completar. Somos um para o outro, deliciosamente desnecessários.

O amor é tanto, não quanto. Amar é enquanto, portanto. Ponto.”

Roberto Freire

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação, confiança, amizade e incentivo dispensados.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Rosangela, com quem aprendi a dar os primeiros passos no laboratório.

Aos amigos da Supervisão de Radioensaios, Carlos, Calixto, Cibele, Cícero, Elisabeth, Eric, Iara, Ligia, Maria Helena, Regina e Rute, pela amizade e incentivo e colaboração.

Aos amigos da Supervisão de Radiobiologia, especialmente ao André, Elaine, Helena, Márcia, Miriam, Mônica, Nanci, Patrícia e Paulo, pela amizade e colaboração.

Ao Patrick, pela amizade em todos os momentos e apoio.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

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

PURIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE OBTIDO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia coli*, VISANDO SUA APLICAÇÃO CLÍNICA

João Ezequiel de Oliveira

RESUMO

Neste trabalho é descrito um procedimento de purificação de seis etapas, com altos rendimentos, para a preparação do hormônio de crescimento humano (rec-hGH) secretado no espaço periplásmico bacteriano, com grau farmacêutico, fornecendo detalhes da otimização de cada etapa de purificação.

Ênfase particular é dada às recuperações do hormônio e à eliminação máxima dos contaminantes devido à célula hospedeira. A estratégia adotada, além de usar uma precipitação e cinco etapas cromatográficas numa seqüência particularmente eficiente, baseou-se também nos perfis resultantes dos ensaios imunoradiométricos das proteínas de *E. coli* para cada etapa cromatográfica. Uma recuperação total de rec-hGH maior do que 40 %, com uma concentração de proteínas de *E. coli* abaixo de 10 ppm é descrita pela primeira vez. Foram também estudadas em detalhes a exatidão da quantificação de hGH e de proteína total, especialmente nas primeiras etapas do processo e a eliminação máxima de formas alteradas de hGH. Para estes fins a HPLC de exclusão molecular e fase reversa mostraram-se ferramentas analíticas extremamente valiosas. Testes adicionais foram realizados mostrando a pureza farmacêutica do produto e a manutenção de sua atividade biológica.

**PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH
HORMONE SECRETED IN *Escherichia coli* PERIPLASMIC
SPACE, FOR CLINICAL APPLICATION**

João Ezequiel de Oliveira

ABSTRACT

A six step, high-yield purification procedure for the preparation of clinical grade recombinant human growth hormone (rec-hGH) secreted in bacterial periplasmic space is described, providing details concerning the optimization of each purification step.

Particular emphasis is given to hormone recovery yields and maximum contaminant host cell elimination. The strategy adopted, in addition to using one precipitation and five chromatographic steps in a particularly efficient sequence, was also based on running *E. coli* proteins – immunoradiometric assay profiles right after each chromatographic elution. Thus, an overall rec-hGH recovery higher than 40 %, with a final concentration of *E. coli* proteins below 10 ppm is described for the first time. The accuracy of hGH and total protein quantification, especially in the early steps of the process, and the maximum elimination of hGH-related forms were also studied in detail. For these purposes size-exclusion and reversed-phase HPLC were found to be extremely valuable analytical tools. Additional tests were carried out showing the pharmaceutical purity of the product and maintenance of its biological activity.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 - Material	8
2.1.1 - Cepa de <i>E. coli</i> produtora de hGH	8
2.1.2 - Padrão de hGH	8
2.1.3 - Reagentes	8
2.1.4 - Resinas cromatográficas	10
2.1.5 - Equipamentos e acessórios	10
2.2 - Métodos	12
2.2.1 - Fermentação	12
2.2.2 - Choque osmótico	15
2.2.3 - Purificação	17
2.2.3.1 - Fracionamento com sulfato de amônio e primeira cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)	17
2.2.3.2 - Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose Fast Flow (DEAE-FF) e Segunda Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)	18
2.2.3.3 - Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose Fast Flow (Q-FF) e cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL4B (Phenyl CL4B)	18
2.2.4 - Determinação das proteínas derivadas da célula hospedeira (ECP)	21

2.2.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	21
2.2.6 - Determinação da atividade biológica do rec-hGH <i>in vivo</i>	22
2.2.7 - Avaliação dos níveis de pirogênio	23
2.2.8 - Determinação de DNA contaminante	24
2.2.9 - Determinação da presença de tetraciclina no produto final	26
2.2.10 - Determinação de proteína	26
3 - RESULTADOS	27
3.1 - Quantificação da proteína total e de rec-hGH nas etapas iniciais do processo de produção de hGH	27
3.2 - Etapas do processo de produção do rec-hGH	28
3.3 - Conteúdo de proteínas de <i>E. coli</i> após cada etapa cromatográfica	42
3.4 - Análise das formas relacionadas de hGH durante o processo de purificação	43
3.5 - Recuperação de rec-hGH durante o processo de purificação	48
3.6 - Avaliação da atividade biológica do produto final	50
3.7 - Avaliação dos níveis de pirogênio do produto final	52
3.8 - Determinação de DNA residual no produto final	53
3.9 - Determinação de tetraciclina no produto final	54
4 - DISCUSSÃO	55
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 – INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, um número crescente de proteínas para uso clínico, em humanos, têm sido produzidas por tecnologia de DNA recombinante.

A produção de uma proteína recombinante não é um processo “limpo” como a síntese química de uma macromolécula, com quantidades limitadas de subprodutos. Muitos agentes estão presentes no extrato cru inicial e precisam ser seletivamente removidos. A proteína de interesse, dependendo do organismo hospedeiro (bactérias, leveduras, células de mamíferos, baculovírus), pode representar uma parcela pequena quando comparada à quantidade de material estranho presente, podendo estar na forma solúvel ou insolúvel. Em sistemas de expressão bacterianas, um dos principais usados para a produção de proteínas terapêuticas, elas podem corresponder a 5% - 25 % da proteína total presente no material inicial ^(19, 38), além de em geral estarem em uma concentração muito baixa. Conseqüentemente, o isolamento do produto alvo, bem como sua purificação, são elementos críticos dos processos biotecnológicos. Nesses, o processo de purificação representa uma das etapas mais complexas e de maior custo ^(19, 44). Sendo assim, é desejável estabelecer estratégias adequadas para a obtenção da proteína de interesse que garantam que sua recuperação seja alta e seu nível de pureza adequado. Para planejar um processo otimizado de purificação é preciso combinar adequadamente metodologias diversas que separem eficientemente as proteínas de acordo com as diferenças de suas propriedades físico-químicas (Tabela 1). Um protocolo eficiente de purificação deve explorar alguns princípios gerais dessas técnicas cromatográficas. Assim sendo, uma cromatografia de exclusão molecular é adequada após uma de troca

iônica, uma vez que os princípios de separação da proteína para esses dois métodos são complementares. No caso do método de interação hidrofóbica, cujos princípios são significativamente diferentes daqueles envolvidos em outras técnicas cromatográficas, é conveniente ser realizada após uma cromatografia de troca iônica ou após um fracionamento com sulfato de amônio, uma vez que a interação hidrofóbica é mais forte quanto mais a concentração de sal aumenta (11,52)

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da proteína e técnicas cromatográficas usadas durante a purificação de uma proteína recombinante.

PROPRIEDADE DA PROTEÍNA	TÉCNICA CROMATOGRÁFICA
Tamanho	Exclusão Molecular
Carga	Troca Iônica
Hidrofobicidade	Interação Hidrofóbica Fase Reversa
Afinidade Biológica	Afinidade
Força de van der Waals, ligações de hidrogênio, momento dipolo	Adsorção

A proteína recombinante de uso terapêutico cujo processo de purificação é objeto do presente estudo é o hormônio de crescimento. Suas principais aplicações são no tratamento do nanismo, da deficiência parcial do hormônio de crescimento, em casos de severas debilitações (convalescências, situações pós-cirúrgicas, AIDS, etc), em queimaduras graves, na osteoporose e em casos de deficiência renal ou cardíaca.

O hGH (Figura 1) é um polipeptídeo com 191 aminoácidos secretado pela hipófise anterior, possui um peso molecular de 22 kDa e exibe atividade somatogênica e lactogênica. A primeira é induzida via receptor de hGH e a segunda via receptor de prolactina. Sua estrutura terciária é caracterizada por um arranjo antiparalelo de quatro hélices com conexões entre as hélices formadas por alças de tamanhos diferentes. Uma alça grande conecta a hélice 1 e 2, uma região curta conecta a hélice 2 e 3 e uma grande conecta a hélice 3 e 4. Duas pontes dissulfeto estão presentes: uma entre as cisteínas Cys⁵³ (da alça entre a hélice 1 e 2) e Cys¹⁶⁵ (da hélice 4) e outra próxima a cisteína Cys¹⁸² e Cys¹⁸⁹ do terminal carboxyl. As pontes dissulfeto são elementos importantes da seqüência primária da proteína que conferem estabilidade à estrutura molecular.

Até aproximadamente 1980, a extração do hGH era realizada a partir da glândula hipofisária humana, que é produtora e armazenadora deste hormônio. Neste tipo de procedimento há sérios riscos de contaminação por vírus ou príon (doença de Creutzfeld-Jacob, hepatite, AIDS, etc) além de dificuldades ético-legais na obtenção das hipófises de cadáveres.

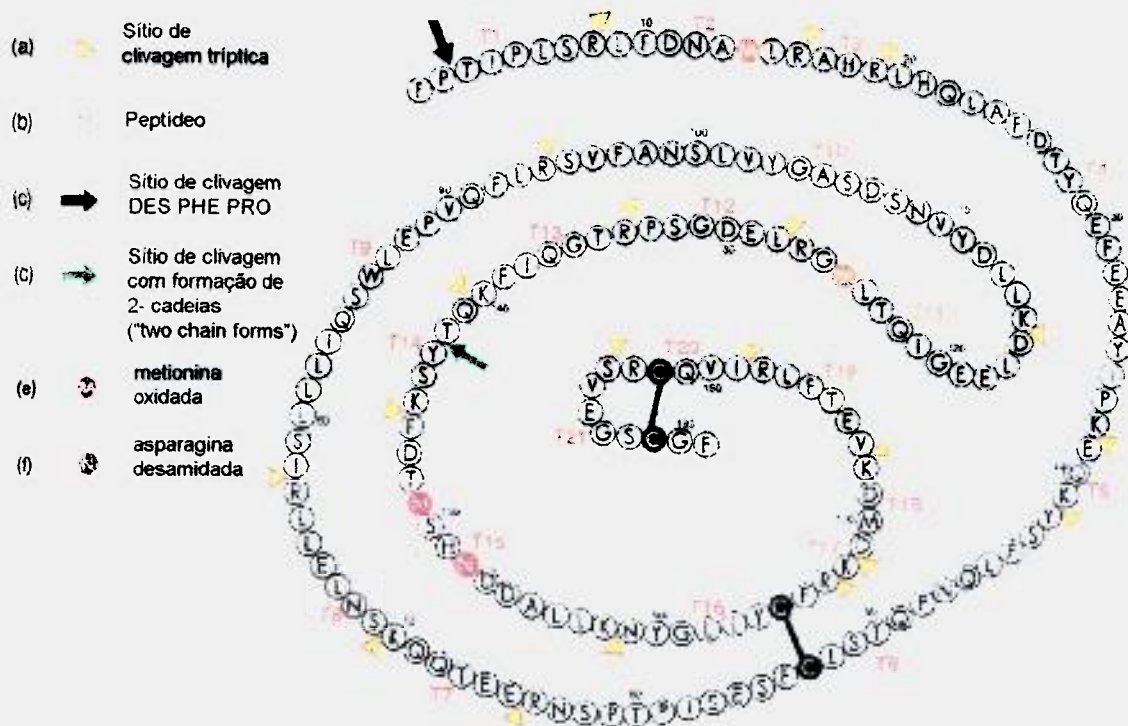


Figura 1 – Estrutura primária da molécula de hormônio de crescimento humano segundo Roswall e cols ⁽⁵⁸⁾.

Avanços tecnológicos recentes, especialmente da biologia molecular, possibilitaram a produção, mediante técnicas de DNA recombinante, do hormônio de crescimento humano (rec-hGH), denominado internacionalmente Somatropina.

Na literatura encontra-se descrita a expressão do rec-hGH em bactérias ^(5, 6, 16, 17, 28, 30, 31, 32, 33, 39), leveduras (*Sacharomices cerevisiae*) ⁽⁶⁰⁾ e em células de mamíferos ^(25, 46).

A molécula sintética de hGH recombinante produzida em bactérias geneticamente modificadas pode ser estocada em forma insolúvel como corpos de inclusão citoplásmicos, que devem ser solubilizados e renaturados ^(28, 33), ou

excretada diretamente para o meio de cultura^(32, 39) ou ainda secretada no espaço periplásmico graças à introdução de uma sequência sinalizadora adequada^(5, 6, 16, 30, 31) no vetor de expressão construído. No primeiro caso, o produto obtido é o metionil-hGH, ou seja o produto natural acrescido de uma metionina inicial codificada pelo “starting codon” ATG, que representa o sinal para o início de síntese protéica. No caso do hGH recombinante secretado e estocado no periplasma ou excretado para o meio, a molécula possui a estrutura e a conformação corretas, sendo idêntica à molécula natural (autêntica), sem a metionina adicional N-terminal. O hormônio de crescimento humano autêntico também foi obtido mediante adição de uma extensão amino-terminal, posteriormente removida mediante exopeptidase⁽¹⁷⁾.

Um grau de pureza extremamente elevado é necessário para proteínas recombinantes utilizadas “in vivo” como fármacos, sendo necessário reduzir a presença de alguns contaminantes para níveis praticamente indetectáveis. Os contaminantes são constituídos pelos derivados do sistema de expressão (proteínas da célula hospedeira, endotoxinas ou DNA residual) ou pelas variantes da proteína de interesse derivadas de modificações covalentes (oxidação, desamidação, clivagem proteolítica, agregação) ou não covalentes (agregação não covalente, desnaturação) que podem aparecer durante o processo de produção. Com relação às modificações covalentes, pode ocorrer oxidação das metioninas presentes na molécula ou ainda aparecer formas desamidadas quando as asparaginas (Asn¹⁴⁹ e/ou Asn¹⁵²) isomerizam para formar ácido aspártico (Asp) ou iso-aspártico (iso-Asp), aumentando a carga negativa. Quanto aos agregados, eles resultam, ao menos na forma solúvel, do processamento incorreto de ligações dissulfeto⁽⁴⁸⁾.

Para a Somatropina injetável, para uso humano, as farmacopéias européia e brasileira ^(21, 22) regulamentam que a presença destes contaminantes seja mantida dentro dos seguintes limites: 6% para dímeros e formas de alto peso molecular, 13% para formas desamidadas e sulfóxidos, 5 unidades de endotoxina (EU) por miligrama de produto, 10 partes por milhão (ppm) de proteínas de *E. coli*, 5 partes por milhão (ppm) de DNA bacteriano e níveis indetectáveis de tetraciclina (que é freqüentemente adicionada ao meio de fermentação) ^(2, 3, 12, 13, 20, 23, 26, 27, 29, 36, 38, 62).

A purificação do hormônio de crescimento humano recombinante tem sido estudada por vários autores ^(7, 24, 26, 37, 43, 49, 50, 51, 57, 61), mas nenhum deles reportou dados descrevendo uma alta recuperação do rec-hGH quando diversas etapas são usadas para reduzir a ECP a limites permissíveis.

Entre os autores que se referem ou a rendimentos ou a pureza farmacêutica, Fryklund e colaboradores ⁽²⁶⁾ e Flodh ⁽²⁴⁾ declararam uma enorme redução do nível de ECP, cerca de 20 vezes, (de >200 ppm para < 10 ppm), quando adicionaram duas etapas de purificação (uma troca iônica e uma precipitação) ao esquema original de três etapas (duas trocas iônicas e uma filtração molecular). Estes autores, entretanto, não fazem referência à recuperação do hGH nesses dois esquemas de purificação. Cabe aqui lembrar que, diferentemente do nosso que é derivado de secreção periplásmica, o hGH purificado por estes autores era de origem citoplásmica. Por outro lado, Becker e Hsiung ⁽⁷⁾ referem-se a uma recuperação de 71% para a purificação do hGH secretado no periplasma de *E. coli* empregando uma etapa de filtração molecular e uma de troca iônica. Nesse caso entretanto, o produto só foi analisado eletroforeticamente, do ponto de vista de pureza em formas de hGH, nada sendo mencionado sobre o nível de contaminação por ECP. O fato que apenas duas

etapas cromatográficas foram usadas nesse processo de purificação sugere que este produto não estava pronto para uso humano. Já Niimi ⁽⁵⁰⁾, objetivando o desenvolvimento futuro de um produto com grau de pureza farmacêutica, descreveu um esquema de purificação, para o metionil-hGH secretado no citoplasma bacteriano, de 4 etapas (uma precipitação, uma troca iônica, uma cromoeletrofocalização e uma filtração de exclusão molecular). A recuperação declarada pelo autor foi de 19 %, não sendo entretanto mencionado o nível obtido de ECP contaminante, apenas tendo sido mostrada a pureza eletroforética do produto final, mencionando que as ECP foram eliminadas etapa por etapa. Lefort e colaboradores ⁽⁴³⁾, partindo de meio de cultura de uma linhagem tumoral de células de rim de macaco transformadas, reportaram rendimentos cumulativos de rec-hGH de 28 - 48 % dependendo do uso ou de Octyl ou de Phenyl Sepharose como primeira coluna de um processo de purificação de três etapas cromatográficas. Também nesse trabalho a análise da pureza do produto baseou-se exclusivamente em estudos eletroforéticos clássicos.

Os outros autores citados ^(37, 49, 51, 57, 61) não mencionam nem os rendimentos obtidos e nem a eliminação de ECP.

A estas razões se deve o objetivo do presente trabalho, cuja meta é estudar as condições ideais de purificação do hormônio de crescimento humano recombinante que permita a obtenção de um produto com grau de pureza farmacêutica, mantendo ainda altos rendimentos de produção.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

2.1.1 – Cepa de *E. coli* produtora de hGH

A fração periplásmica usada como material de partida para a purificação do hGH foi preparada a partir de bactérias *Escherichia coli* K12 (cepa RR1) transformadas com vetor de expressão, construído em nosso laboratório, no qual o gene de hGH (cDNA) está sob controle do promotor λP_L ^(5, 6, 54).

2.1.2 – Padrão de hGH

O 1º padrão internacional para Somatropina (hormônio de crescimento humano recombinante) WHO 88/624, com atividade específica de 3 IU/mg ⁽¹⁴⁾, foi gentilmente doado pelo “National Institute for Biological Standards and Control” (South Mimms, Inglaterra).

2.1.3 – Reagentes

- Acetato de amônio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Ácido acético, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ácido bórico, p.a., QM (São Paulo, Brasil);
- Ácido clorídrico, p.a., CAAL (São Paulo, Brasil);
- Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico) (EDTA), Carlo Erba, (São Paulo, Brasil);
- Ácido fosfórico, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Agar-Agar purificado para bacteriologia, Merck (São Paulo, Brasil);

- Bicarbonato de amônio, p.a., Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha);
- Caseína de hidrólise ácida, DIFCO (São Paulo, Brasil);
- Cloreto de cálcio dihidratado, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Cloreto de cobre II, p.a., Reagen (Rio de Janeiro, Brasil);
- Cloreto de sódio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Extrato de levedura para microbiologia, DIFCO (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de sódio bibásico, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Glicose, p.a., CAAL (São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de sódio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Iodeto de potássio, p.a., Carlo Erba (São Paulo, Brasil);
- Molibdato de sódio, p.a., Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- n-propanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Sacarose para uso em meios de cultura bacteriológicos, Difco (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de amônio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de cobalto II (heptahidratado), p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de ferro II (heptahidratado), p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de magnésio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de manganês (monohidratado), p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de potássio, p.a., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de zinco (heptahidratado), p.a., Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- Tetraciclina, Sigma (St. Louis, EUA),
- Triptona, Difco (São Paulo, Brasil);
- Tris (hidroximetil) aminometano, p.a., Merck (São Paulo, Brasil).
- Tween 20, Sigma (St. Louis, EUA);

2.1.4 – Resinas cromatográficas

- DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE-FF), Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Q-Sepharose Fast Flow (Q-FF), Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Phenyl Sepharose CL4B (Phenyl-CL4B), Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Sephacryl S-100 high resolution, Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Sephadex G-100 medium, Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia).

2.1.5 – Equipamentos e acessórios

- Agitador rotatório tipo Vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil);
- Agitador magnético modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo 2350, V4, ISCO (Lincoln, EUA);
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, Millipore (Bedford, EUA);
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T, precisão de 0,01 mg, Mettler (Zurich, Suíça);
- Banho-maria, modelo 112, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Bomba peristáltica modelo P-1, Pharmacia LKB (Uppsala, Suécia);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorval (Newton, EUA);
- Coletor de frações, modelo Frac-200, Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Coluna para HPLC de exclusão molecular TSK G2000 SW (60 cm x 7,7 mm D.I.), tamanho das partículas 10 μ m e poros de 125 Å e pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm D.I.), Tosohaas (Montgomeryville, EUA);

- Coluna para HPLC de fase reversa C₄, 214 TP54 (25 cm x 4,6 mm D.I.), diâmetro dos poros 300 Å e tamanho das partículas de 5 µm e pré-coluna 214 GK54 (5µ, 1,0 cm x 4,6 mm D.I.), Vydac (Hesperia, EUA);
- Colunas cromatográficas XK 50/100 (100 cm x 5,0 cm D.I.), XK 26/40 (40 cm x 2,6 cm D.I.) e XK 16/40 (40 cm x 1,6 cm D.I.), Pharmacia Fine Chemicals, (Uppsala, Suécia);
- Contador gama tipo “poço”, com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ¹²⁵I de 80 %, Packard Instrument Company (Illinois, EUA);
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro, modelo PQM II, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha);
- Estufa de esterilização e secagem, modelo 315 SE, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Fermentador New MBR (Zurich, Suíça),
- Freezer -20° C, Prosdócimo (São Paulo, Brasil);
- Freezer -80° C, modelo 8425, Forma Scientific (Marietta, EUA);
- Máquina para produzir gelo picado, modelo EGE 150, Everest (Rio de Janeiro, Brasil);
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Orion (Boston, EUA);
- Placas de microtitulação com fundo em “U”, Dynatech (Chantilly, EUA)
- Refrigerador duplex, modelo 320 clear, Brastemp (São Paulo, Brasil);
- Refrigerador com porta de vidro Modelo VE 730M, Metalfrio (São Paulo, Brasil);
- Refrigerador para cromatografia com duas portas de vidro, modelo 2201 combicoldrac II, LBK (Bromma, Suécia);
- Shaker incubador, série 25, New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison, EUA).

2.2 – MÉTODOS

2.2.1 - Fermentação

Para a preparação do inóculo a cepa produtora de hGH, armazenada a -80°C , é semeada em placa de Petri contendo meio LB/agar com tetraciclina ($12,5\ \mu\text{g/mL}$) e incubada, aproximadamente por 16 horas, em estufa a 30°C . Após o crescimento das bactérias, uma colônia é extraída da placa e adicionada a 400 mL de meio LB/tetraciclina e incubada a 30°C , em Shaker, sob agitação de 300 rpm, até atingir uma absorvância em comprimento de onda de 600 nm (A_{600}) de aproximadamente 0,4. O conteúdo total desse inóculo é utilizado para a fermentação. Vários desses inóculos são preparados, sendo utilizado um volume correspondente a 16 % do volume total a ser fermentado. A fermentação se dá em um fermentador de 20 litros, sob condições seletivas ($12,5\ \mu\text{g/mL}$ de tetraciclina), a uma temperatura de 30°C . Utiliza-se para o cultivo o meio de cultura HKSII, descrito por Jensen e colaboradores ⁽³⁵⁾, duas vezes concentrado, que consiste de: triptona (20 g/L); extrato de levedura (10 g/L); caseína (4 g/L); sulfato de potássio (3,1 g/L); sulfato de magnésio (0,8 g/L) e cloreto de cálcio (0,08 g/L). É também adicionada uma mistura contendo traços dos metais Fe, Mn, Zn, Mo, B, Co e K (160 $\mu\text{L/L}$). Como fonte de carbono utiliza-se glicose, adicionada em quantidade de 1,2 g/L h, desde o início do processo, durante 5 horas, em um fluxo constante (60 mL/h). Após cerca de 5 horas, quando a A_{600} está em torno de 5, dá-se início à ativação aumentando-se a temperatura para 42°C . A fermentação continua nesta temperatura por um período de 6 horas. Após a determinação da absorvância (A_{600}), todo o volume de suspensão bacteriana (V) é coletado e deixado em repouso, em banho de gelo, até o processamento do choque osmótico.

Durante todo o processo de fermentação o pH (7,2), a temperatura, a aeração e o nível de espuma são automaticamente controlados enquanto a agitação e a tensão de oxigênio dissolvido (DOT) são manualmente controlados, assegurando um DOT de aproximadamente 40 %. A cada hora, leituras de A_{600} são realizadas em um espectrofotômetro.

Meios de cultura e soluções utilizadas:

a) Meio de cultura LB:

Extrato de levedura	5,0 g
NaCl.....	10,0 g
Triptona.....	10,0 g
H ₂ O destilada qsp.....	1000 mL

b) Meio de cultura LB/Agar:

Agar.....	15 g
Meio de cultura LB.....	1000 mL

c) Meio de cultura HKSII:

Extrato de levedura.....	5,0 g
Triptona.....	10,0 g
Caseína	2,0 g
K ₂ SO ₄	3,1 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O.....	0,8 g

CaCl₂.....0,08 g
H₂O destilada qsp.....1000 mL
O pH é ajustado para 7,2 com NaOH 5 N.

d) Solução estoque de antibiótico:

Tetraciclina.....12,5 mg

Dissolver em:

500 µL de etanol p.a.

500 µL H₂O destilada

e) Solução de metais:

FeSO₄ 7 H₂O.....0,5 g

MnSO₄ n H₂O.....0,3 g

ZnSO₄ 7 H₂O.....0,1 g

Na₂MoO₄ 2 H₂O.....0,1 g

H₃BO₃.....0,025 g

CoSO₄ 7 H₂O.....0,43 g

CuCl₂ 2 H₂O.....0,05 g

KI.....0,03 g

HCl 5 N.....50 mL

2.2.2 - Choque osmótico

A extração das proteínas periplásmicas a partir da suspensão bacteriana da fermentação é realizada por choque osmótico (incubação em meio hipertônico seguida de incubação em meio hipotônico), sem ruptura da célula (Figura 2), processado de acordo com técnica descrita na literatura ⁽⁴²⁾.

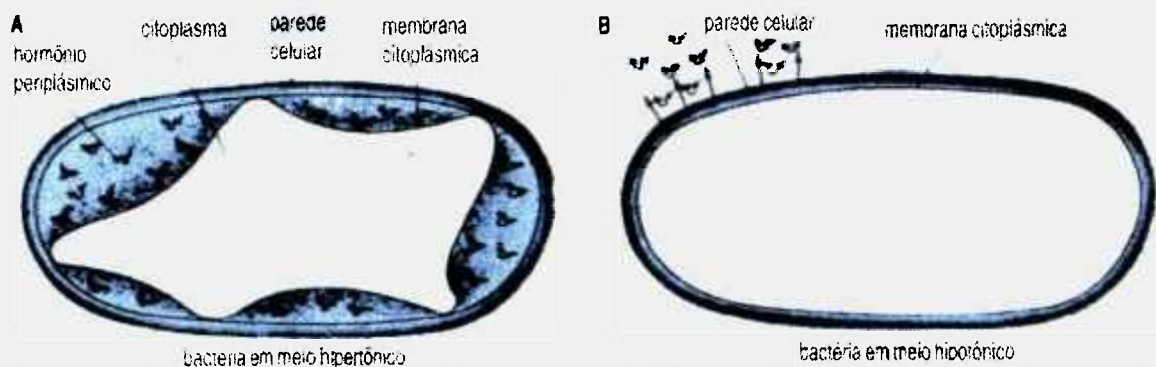


Figura 2 – Esquema de choque osmótico realizado para extração das proteínas periplásmicas.

A) Meio hipertônico

B) Meio hipotônico

As bactérias são precipitadas por centrifugação, realizada em centrífuga refrigerada, durante 5 minutos. O precipitado resultante, após ressuspensão em solução de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo sacarose 20% e solução de EDTA 0,5 M pH 8,0, é mantido em repouso, em banho de gelo, durante 10 minutos. Nova centrifugação é realizada, nas mesmas condições anteriores, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado é ressuspensão em solução de Tris-HCl 1 mM pH 7,0 e mantido em banho de gelo por 10 minutos. Nova centrifugação é realizada, nas mesmas condições anteriores, durante 15 minutos. O precipitado é descartado e o sobrenadante, contendo as proteínas periplásmicas, é mantido a 4° C.

Soluções utilizadas no choque osmótico:

a) Solução de sacarose

Sacarose20 g
 Trisma Base0,12 g
 H₂O destilada qsp100 mL
 O pH é ajustado para 7,5 com HCl

b) Solução de EDTA

EDTA.....18,6 g
 O pH é ajustado para 8,0 com NaOH
 H₂O destilada qsp100 mL

c) Solução de Tris-HCl 1 mM

Trisma Base.....0,121 g
 H₂O destilada qsp1000 mL
 O pH é ajustado para 7,0 com HCl

Volume das soluções utilizadas no choque osmótico:

$$\text{a) Vol. de sol. de sacarose (S) = } \frac{A_{600} \text{ (u.o.)} \times V \text{ (L)}}{100}$$

$$\text{b) Vol. de EDTA = } \frac{S}{30}$$

$$\text{c) Vol. de Tris = } \frac{S}{2}$$

A produção do hormônio de crescimento foi avaliada qualitativamente e quantitativamente no choque osmótico através de análise em HPLC fase reversa (RP-HPLC) ⁽¹⁸⁾.

2.2.3 – Purificação

2.2.3.1 – Fracionamento com sulfato de amônio e primeira cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)

Estando o produto de interesse diluído em grandes volumes, fez-se necessária a concentração do produto. Foi utilizada em nosso esquema de trabalho, como primeira etapa de purificação, uma precipitação com sulfato de amônio, para fracionar o produto resultante do choque osmótico. O volume total do extrato periplásmico, em 1 mM Tris-HCl, pH 7,0, foi medido e um volume igual de solução saturada de sulfato de amônio foi adicionado, lentamente, sob agitação, a 4° C (50 % saturação). Terminada a adição dessa solução a agitação continuou por uma hora. O precipitado, obtido após centrifugação por 30 minutos a 6000 g, em centrífuga refrigerada, foi ressuspenso em bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,9 e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante assim obtido foi cromatografado a 4° C em uma coluna de Sephacryl S-100 (100 cm x 5 cm D.I.), equilibrada e eluída no mesmo tampão bicarbonato, com um fluxo de 200 mL/h.

Para otimização da etapa de precipitação com sulfato de amônio estudou-se o produto do choque osmótico fracionado com diferentes concentrações de solução saturada de sulfato de amônio: 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60% de saturação.

Com relação à cromatografia de exclusão molecular duas resinas cromatográficas foram testadas visando avaliar uma melhor resolução entre os picos presentes:

- Sephadex G-100 medium (diâmetro das partículas: 40 – 120 µm) que permitiu uma eluição com fluxo de 120 mL/h.
- Sephacryl S-100 high resolution (diâmetro das partículas: 25 – 75 µm) que permitiu uma eluição com fluxo de 200 mL/h.

2.2.3.2 – Cromatografia de troca aniônica em DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE-FF) e segunda cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)

As frações eluídas da Sephacryl S-100 contendo a forma monomérica do hGH (coeficiente de distribuição, $K_d \sim 0,4$) foram agrupadas e aplicadas a uma coluna de DEAE-FF (9 cm x 2,6 cm D.I.) previamente equilibrada em acetato de amônio 10 mM, pH 8,0, contendo 50 mM de cloreto de sódio. A fração não ligada foi removida pela lavagem com, pelo menos, dois volumes de coluna deste mesmo tampão. O rec-hGH foi eluído com gradiente linear de cloreto de sódio de 50 a 200 mM em aproximadamente 2,5 horas, com um fluxo de 200 mL/h.

Para estabelecer a condição de eluição do rec-hGH em que ocorre uma melhor purificação das proteínas de *E. coli* (ECP), foram estudadas eluições com diferentes gradientes lineares de NaCl:

50 mM - 400 mM NaCl; 50 mM - 250 mM NaCl e 50 mM - 150 mM NaCl.

As frações contendo hGH resultante da DEAE-FF foram reaplicadas na mesma coluna Sephacryl S-100, (lavada com pelo menos dois volumes de coluna de tampão bicarbonato de amônio) repetindo exatamente o mesmo procedimento acima descrito.

2.2.3.3 – Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose Fast Flow (Q-FF) e cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL4B (Phenyl CL4B)

O “pool” de hGH resultante da filtração molecular foi então aplicado a uma coluna de Q-Sepharose Fast Flow (11 cm x 1,6 cm D.I.), equilibrada em acetato de amônio 10 mM, pH 7,0, contendo cloreto de sódio 50 mM. Após lavagem com pelo menos dois volumes de coluna deste tampão, elevou-se a concentração de cloreto de sódio para 100 mM, eluindo assim o hGH em condições de equilíbrio, com um fluxo de 120 mL/h.

Para estabelecer a melhor condição de eluição do hGH em que ocorre maior purificação das ECP, um estudo semelhante àquele efetuado para a etapa cromatográfica em DEAE Sepharose foi realizado para essa segunda etapa cromatográfica de troca aniônica. Analisaram-se várias condições de eluição do hGH com gradientes lineares de NaCl de diferentes inclinações (50 mM – 400 mM NaCl; 50 mM – 250 mM NaCl e 50 mM – 150 mM NaCl) e com uma única concentração de NaCl (100 mM), todos em tampão acetato de amônio 10 mM pH 8,0. Foram também analisadas as condições de eluição do hGH com tampão acetato de amônio 10 mM, 100 mM NaCl em diferentes pHs (7,0 e 8,0).

As frações, resultantes da cromatografia em Q-FF, contendo hGH foram reunidas e levadas para uma concentração de 400 mM em acetato de amônio, pH 7,0 e aplicadas a uma coluna de Phenyl Sepharose CL4B (26 cm x 2,6 cm D.I.), previamente equilibrada em acetato de amônio 200 mM, pH 7,0. Após realizadas lavagens com pelo menos dois volumes de coluna de tampão acetato

de amônio 200 mM e subsequentemente 50 mM pH 7,0 o hGH foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,3 mM, pH 7,0, com um fluxo de 120 mL/h.

As condições ideais de trabalho para a cromatografia em Phenyl Sepharose CL4B foram estabelecidas após os seguintes estudos:

Variando-se as condições de ligação do hGH à Phenyl Sepharose:

a) Variando-se a natureza do sal:

Sulfato de amônio 400 mM pH 7,0 ou acetato de amônio 400 mM pH 7,0.

b) Variando-se a concentração de sal:

Acetato de amônio pH 7,0 200 mM; 300 mM; 400 mM; 600 mM e 900 mM.

Também foram avaliadas condições diferentes de força iônica e de pH dos tampões de lavagem:

a) Acetato de amônio pH 8,0 200 mM, 100 mM, 50 mM e 3 mM;

b) Acetato de amônio pH 7,0 200 mM, 100 mM, 50 mM e 3 mM.

Ressaltamos que a seleção do material a ser utilizado após cada etapa da purificação, seja em caso de um estudo ou na rotina, baseou-se também na distribuição de ECP ao longo das frações coletadas.

2.2.4 - Determinação das proteínas derivadas da célula hospedeira (ECP)

A detecção e quantificação das ECP foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Anicetti e colaboradores ⁽¹⁾, por um ensaio imunoradiométrico (IRMA) tipo “sandwich”, de sensibilidade da ordem de 0,03 ng/mL. Este ensaio é específico para nossa cepa e processo de purificação, e foi desenvolvido em nosso laboratório por Soares C.R.J. ⁽⁵⁹⁾. Foram utilizadas, como fase sólida, placas de microtitulação cujos poços foram recobertos com IgG anti ECP previamente purificada por cromatografia de afinidade. Nestas placas foram incubados os padrões, as amostras e os controles (100 µL), durante 24 horas, a 4° C. Após lavagem com tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,05 % Tween 20, 100 µL de IgG marcada com ¹²⁵I (2 x 10⁵ cpm/poço) foram adicionados e incubados por 24 horas a 4° C. Após lavagem com PBS (três vezes), os poços foram cortados e a radioatividade contada em contador γ.

2.2.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A avaliação qualitativa e quantitativa do rec-hGH, nas diferentes etapas do processo de purificação, foi realizada por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) ^(18, 55, 56). Em ambas as metodologias, a técnica de eluição foi isocrática monitorando as proteínas em 220 nm. No caso da HPSEC utilizou-se bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,0 como fase móvel, com um fluxo de 1,0 mL/min. Já para a RP-HPLC a coluna foi mantida a uma temperatura de 45°C e utilizou-se como fase móvel o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo 29 % de n-propanol, sendo o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min.

A determinação do tempo de retenção bem como a quantificação das formas alteradas (desamidados e sulfóxidos no caso da RP-HPLC e formas diméricas e de alto peso molecular no caso da HPSEC) se fez sempre comparativamente ao padrão internacional de rec-hGH WHO 88/624, do qual aplicou-se 10 µg no caso da HPSEC e 20 µg na RP-HPLC.

2.2.6 - Determinação da atividade biológica do rec-hGH “*in vivo*”

A atividade biológica do rec-hGH produzido em nosso laboratório foi determinada por ensaio biológico, anteriormente padronizado em nosso laboratório ^(9, 10) utilizando camundongos anões (lit/lit), com idade entre 45 e 90 dias, da linhagem C57BL6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA). Foram utilizados 53 animais (machos e fêmeas), cuja variação de peso, em dez dias, ficou dentro do limite de $0,0025 \pm 0,0045$ g/dia. A duração do ensaio foi de 10 dias.

Foram utilizadas quatro preparações de hGH:

O primeiro Padrão Internacional de hGH recombinante (WHO 88/624) com potência declarada de 3 UI/mg, e três lotes de rec-hGH IPEN (lotes 05797, 06197 e 06297).

A cada animal foram administradas 10 µg/dia de hGH por via subcutânea, tendo sido a dose dividida em duas inoculações diárias.

O peso corporal dos animais foi controlado diariamente durante os 10 dias de ensaio e usado para calcular as curvas de crescimento.

2.2.7 - Avaliação dos níveis de pirogênio

A concentração de endotoxina bacteriana no produto final da purificação foi determinada pelo teste “*in vitro*” do lisado de amebócitos do caranguejo *Limulus* (LAL). Esta técnica usa um complexo enzimático isolado das células de sangue do *Limulus* que na presença de traços de endotoxina é ativado, resultando na geleificação da mistura de reação.

Para esta determinação utilizou-se o “*Limulus amoebocyte Lysate test*” da Endosafe (Charleston, EUA), sendo os ensaios realizados segundo as especificações do fabricante. Avaliou-se a resposta pela leitura positiva ou negativa da reação. A reação positiva é caracterizada pela formação de gel que fica aderido ao fundo do tubo quando de sua inversão. Utilizou-se água apirogênica como controle negativo do teste e como controle positivo uma endotoxina bacteriana purificada de concentração 0,125 unidades de endotoxina (EU)/mL. O produto em estudo, na concentração de 1,4 mg/mL, foi testado em várias diluições (1:20; 1:40; 1:56; 1:80, 1:160), previamente estabelecidas com base na Máxima Diluição Válida (MDV) que é calculada pela fórmula:

$$\text{MDV} = \frac{\text{Limite de endotoxina (EU/mg)} \times \text{Potência do hGH (mg/mL)}}{\text{Sensibilidade do LAL (EU/mL)}}$$

Limite de endotoxina para o hGH = 5 EU/mg

Sensibilidade do LAL = 0,125 EU/mL

Para o caso do hGH, normalmente utilizado em concentração de 1,4 mg/mL, a MDV é 56.

O produto é considerado aceitável quando, em diluições iguais ou maiores a 1:56 apresenta reação negativa.

A concentração de endotoxinas bacterianas (X) nas amostras desconhecidas foi calculada dividindo-se a sensibilidade do reagente LAL pela concentração de hGH correspondente à maior diluição da solução teste que fornece resposta positiva.

2.2.8 - Determinação de DNA contaminante

Para verificar a presença de DNA de *E. coli* contaminante no produto final, foi utilizada a técnica de hibridização em “*slot blot*”⁽⁴⁷⁾ que consiste dos seguintes passos:

a) Preparação do DNA cromossômico - O DNA das bactérias *E. coli* cepa RR1 (sem o plasmídeo de expressão) foi purificado e depois digerido com as enzimas de restrição Eco R I, Hind III, Hae III e Ava II. O DNA foi quantificado em gel de agarose por comparação com um marcador contendo quantidades conhecidas de DNA e diluído de maneira a se obter uma curva padrão, a partir da qual será determinado o conteúdo de DNA cromossômico nas amostras de hGH.

b) Preparação do DNA plasmídico - Da cepa RRI transformada com o plasmídeo de expressão contendo o gene de hGH (p8T-hGH) foi extraído e purificado o DNA plasmídico. O DNA foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro e diluído para se obter uma curva-padrão, a partir da qual será determinado o conteúdo de DNA plasmídico nas amostras de hGH.

c) Preparação das amostras - As amostras de DNA e de hGH foram tratadas da seguinte maneira: a cada 100 μL de amostra foram adicionados 100 μL de NaOH 0,6 N, fervendo por 2 minutos e adicionando 200 μL de acetato de amônio 2 M.

d) Preparação de filtros - Os filtros foram preparados em aparelhos de “*slot blot*” adicionando-se 500, 100, 20, 4 e 0,8 pg de DNA cromossômico ou de DNA plasmídico por poço. Para a determinação da presença de DNA contaminantes na preparação de hGH, 50 μg e 5 μg do hormônio foram também aplicados nos filtros.

Após a aplicação das amostras, os poços foram lavados com 200 μL de acetato de amônio 1 M, por duas vezes. Os DNAs foram fixados aos filtros deixando-se uma hora a 80°C.

e) Sondas - DNA cromossômico da cepa RRI purificado (25 ng) e DNA plasmídico do vetor p8T-hgh purificado (25 ng) foram utilizados para marcação. A marcação dos DNAs com α ^{32}P dCTP foi realizada pela técnica de “random primers”, utilizando-se o kit da Gibco-BRL.

f) Hibridização - Os filtros foram pré-hibridizados por 2 horas no tampão de hibridização ⁽⁴⁷⁾ a 65°C, sob agitação em banho maria. A hibridização foi realizada no mesmo tampão onde foram adicionadas as sondas (DNA cromossômico ou DNA plasmídico) por 16 horas também a 65°C. As lavagens dos filtros foram realizadas por 30 minutos a 65°C em tampão SSC ⁽⁴⁷⁾ contendo 0,5 % de SDS. Estes filtros foram usados para impressionar uma placa radiográfica.

2.2.9 - Determinação da presença de tetraciclina no produto final

Utilizou-se para detecção da presença de tetraciclina o ensaio biológico de antibióticos (em placas) sugerido pela Farmacopéia Britânica ⁽¹⁵⁾. De acordo com este método uma quantidade conhecida de suspensão do microorganismo “*Staphilococcus aureus*” é usada para inocular um meio apropriado, de maneira a obter uma opacidade mensurável após 4 horas de incubação. Foram usadas três doses de preparação padrão de tetraciclina e três diluições diferentes das amostras em estudo. Após incubação, o crescimento de microorganismos foi inibido mediante adição de formaldeído lendo-se em seguida a opacidade dos padrões e amostras desconhecidas em sistema ótico apropriado.

O limite mínimo de detecção do ensaio, isto é, a menor diluição para a qual há resposta é de 0,15 µg de tetraciclina/mL.

Foram analisadas três amostras derivadas das seguintes etapas da purificação: uma fase bem inicial do processo (choque osmótico), primeira coluna cromatográfica (Sephacryl S-100 I) e última coluna cromatográfica (Phenyl Sepharose CL4B).

2.2.10 - Determinação de proteína

O conteúdo total de proteína nas amostras foi determinado por três métodos:

Método clássico de Lowry ⁽⁴⁵⁾, leitura espectrofotométrica a 276 nm, utilizando 8,22 como absorvância específica ($A_{276}^{1\%}$) do hGH ⁽¹⁴⁾, e um método físico (DLP), baseado na pesagem, em balança Mettler de precisão, de amostras dialisadas e liofilizadas ⁽⁴¹⁾.

3- RESULTADOS

3.1 – Quantificação da proteína total e de rec-hGH nas etapas iniciais do processo de produção do hGH

Nas primeiras etapas de produção do hGH (choque osmótico e precipitação com sulfato de amônio), uma análise quantitativa exata e confiável é muito difícil de ser realizada, uma vez que nestas etapas o hGH ainda está junto com muitas outras proteínas. Cinco técnicas analíticas diferentes e complementares foram testadas para quantificar comparativamente o hGH e as proteínas presentes nas primeiras etapas do processo: Lowry, leitura espectrofotométrica em 276 nm (A_{276}), pesagem após diálise e liofilização (DLP), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC). As primeiras três técnicas foram usadas para determinar as proteínas totais e as duas últimas, o conteúdo de hGH (Tabela 2). Com relação à quantificação da proteína total obteve-se um melhor acordo para as medidas estimadas por Lowry e DLP. A média da proteína total estimada por essas duas técnicas foi de $5490 \text{ mg} \pm 330$ desvio padrão (DP) mg para o choque osmótico e de 1073 ± 199 mg para o precipitado de sulfato de amônio. Quando as amostras são muito heterogêneas (extrato periplásmico e precipitado de sulfato de amônio), é observada uma alta discrepância no valor da absorvância específica com relação aos valores obtidos por Lowry e DLP. Por outro lado, para amostras mais homogêneas (acima de 80 % de hGH), como é o caso da Sephacryl I, um alto nível de concordância foi encontrado entre as três técnicas. A reprodutibilidade inter-métodos, considerando todas as técnicas, foi excelente: $360 \pm 9,2$ mg de hGH em um total de $463 \pm 13,4$ mg de proteínas, o coeficiente de variação sendo menor do que 3 % em ambos os casos.

Tabela 2 : Quantificação da proteína total e do rec-hGH nas três primeiras etapas do processo de purificação

ETAPA	Determinação de Proteínas			Determinação de hGH	
	Lowry (mg)	A ₂₇₆ * ¹ (mg)	DLP* ³ (mg)	RP-HPLC (mg)	HPSEC (mg)
Choque osmótico	5724	4330* ²	5257	412	-----
Precipitação	1213	1766	932	385	465
Sephacryl I	448	469	473	367	354

*¹ Determinação em mg baseada na absorvância específica $A_{276}^{1\%} = 8,2$ ⁽¹⁴⁾ própria do hGH puro

*² Amostra dialisada e centrifugada

*³ Diálise, liofilização e pesagem

3.2 – Etapas do processo de produção do rec-hGH

A Figura 3 mostra o perfil típico de um extrato periplásmico de *E. coli* em RP-HPLC (3A) e HPSEC (3B). Uma ótima resolução é observada na Figura 3A entre o pico do hormônio de crescimento e outros componentes menos hidrofóbicos. Isto foi ilustrado em trabalho anterior de Dalmora e colaboradores ⁽¹⁸⁾ pela comparação de cromatogramas da RP-HPLC do extrato periplásmico de duas cepas de *E. coli* transformadas, uma com o gene do hGH no vetor e a outra com o gene do hGH ausente. O hGH quantificado por esta metodologia corresponde a 7,5 % do total das proteínas periplásmicas. A HPSEC nesta etapa,

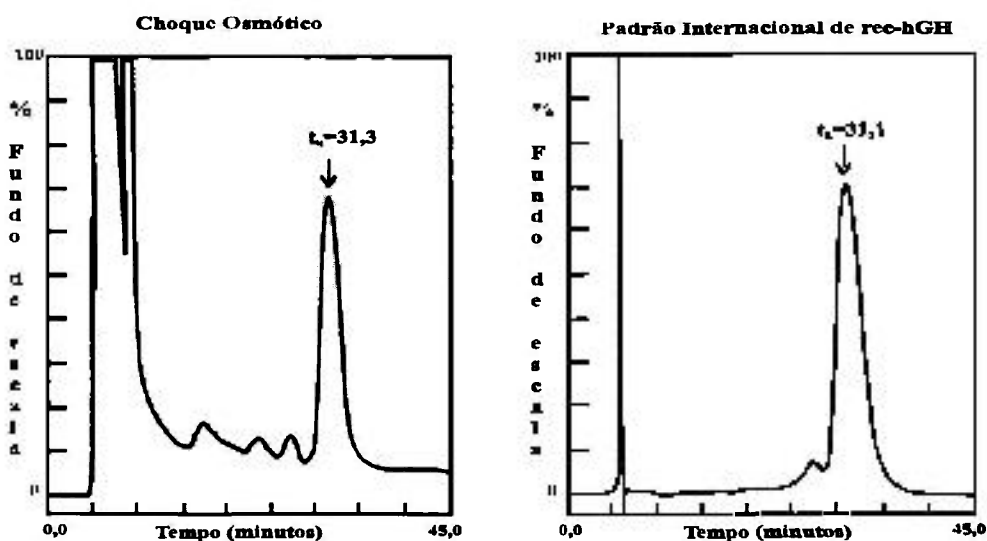
foi utilizada apenas como um teste de identidade e para uma avaliação semi quantitativa.

Na etapa de precipitação, a quantificação pode ser feita por RP-HPLC (Fig.4A) ou HPSEC (Fig.4B). Entretanto a quantificação por esta última técnica pode ser superestimada, uma vez que a amostra é ainda heterogênea. Nesta etapa a atividade específica do hGH aumenta 4,8 vezes. A melhor condição de precipitação do rec-hGH ocorre em presença de 60 % de solução saturada de sulfato de amônio (Tabela 3). Nestas condições, entretanto, o conteúdo de ECP no precipitado é superior àquele presente quando é utilizado 50 % de saturação. Considerando que neste último caso cerca de 80 % de hGH é recuperado, esta foi a condição de trabalho escolhida para esta etapa do processo de purificação.

Os perfis cromatográficos obtidos nas outras etapas de purificação do rec-hGH, em uma purificação típica, podem ser observados na Figura 5. Nessa mesma figura é mostrada também a distribuição das ECP. As ECP e o hormônio interferem reciprocamente na maioria das colunas cromatográficas. As frações selecionadas em cada etapa foram obtidas tentando-se descartar o máximo de ECP com a menor perda possível da proteína de interesse.

Uma boa purificação pode ser observada já na primeira coluna de Sephacryl (Fig.5A), onde a proteína de interesse separa-se de pelo menos outros dois componentes de peso molecular maior. Com relação à ECP, podemos observar que, nessa etapa, um amplo pico e outras caudas menores de ECP puderam ser eliminadas sem grandes perdas de hGH. A determinação do coeficiente de distribuição (K_d) dos vários componentes mostram que o pico III ($K_d=0,450$) corresponde à forma monomérica do hGH ^(4, 53). Quando o pico III foi analisado em HPSEC (Fig.6), foi constatado que a maior parte do pico (88%) era monômero, enquanto apenas 8 % era dímero e cerca de 4 % agregado.

A - RP-HPLC



B - HPSEC

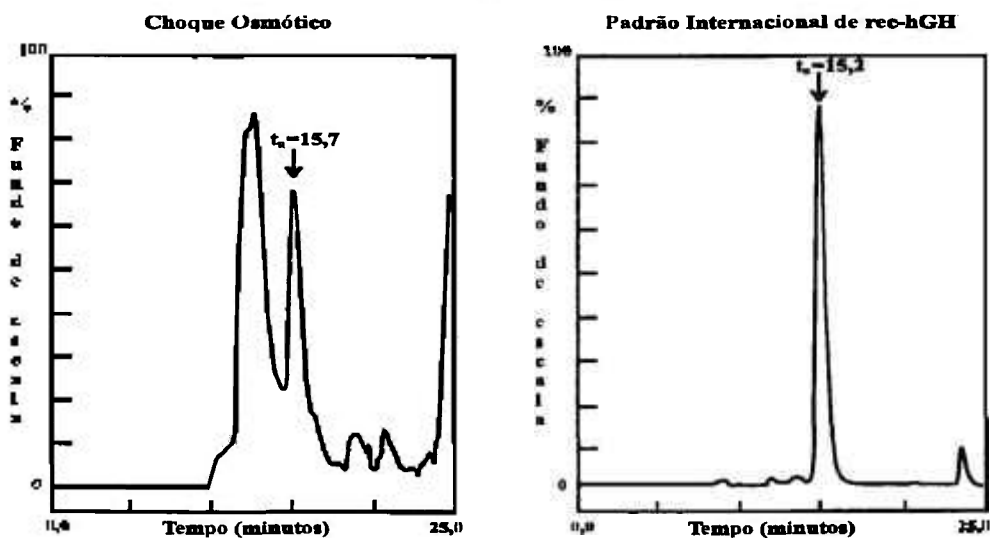
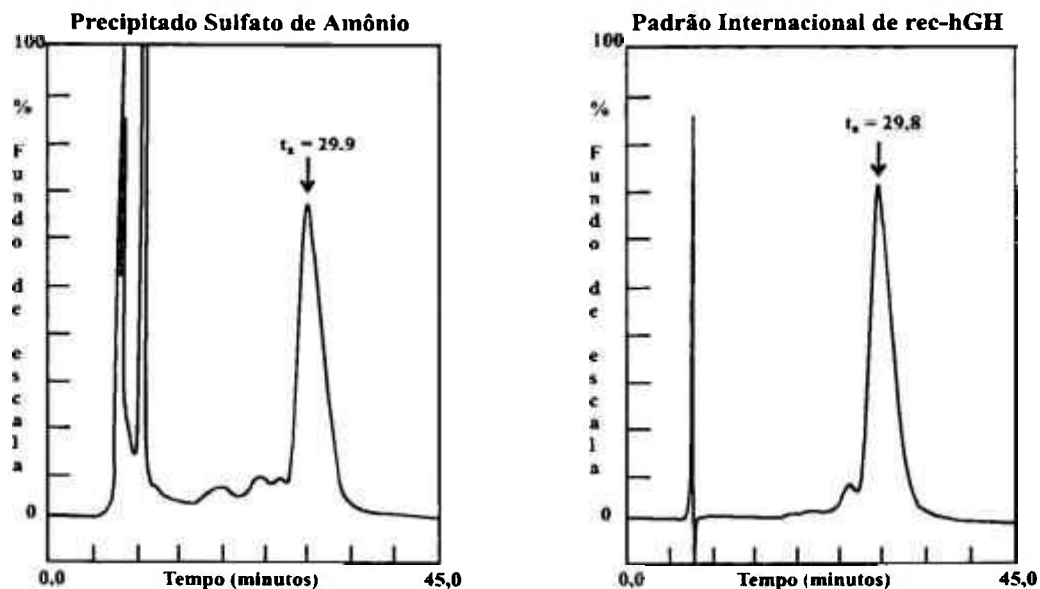


Figura 3 – Análise em HPLC do choque osmótico de uma cepa produtora de hGH e do padrão internacional de rec-hGH (88/624)

A) RP-HPLC isocrática: 50 μ L do fluido periplásmico e 20 μ L (20 μ g) do padrão de rec-hGH

B) HPSEC isocrática: 36 μ L do fluido periplásmico e 10 μ L (10 μ g) do padrão de rec-hGH

A - RP-HPLC



B - HPSEC

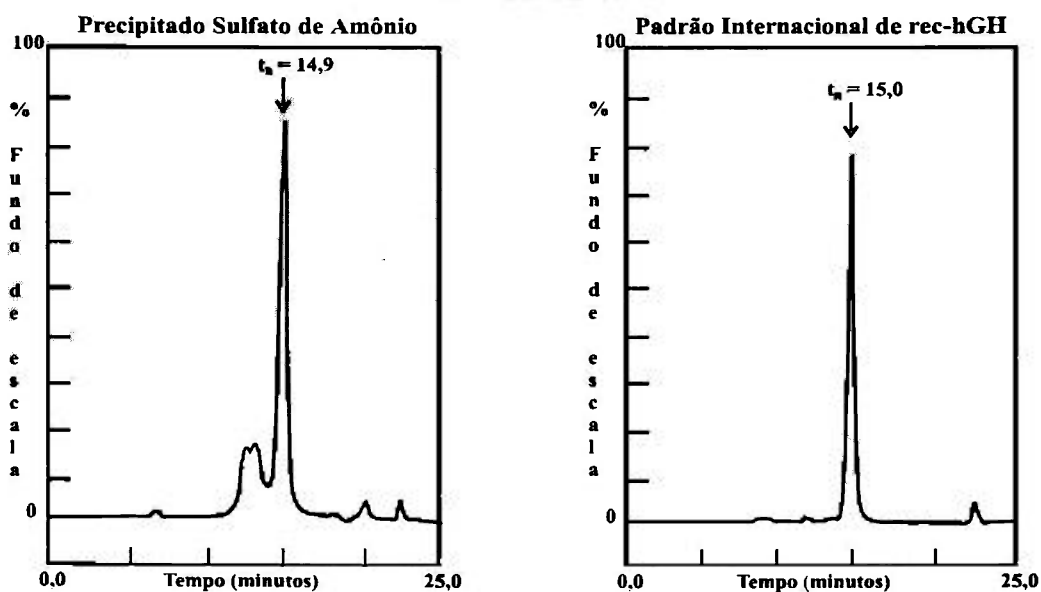


Figura 4 – Análise em HPLC do produto da etapa de precipitação com sulfato de amônio e do padrão internacional de rec-hGH (88/624)

A) RP-HPLC isocrática: 40 μ L do precipitado resultante do fracionamento com sulfato de amônio e 20 μ L (20 μ g) do padrão de rec-hGH

B) HPSEC isocrática: 20 μ L do precipitado resultante do fracionamento com sulfato de amônio e 10 μ L (10 μ g) do padrão de rec-hGH

Tabela 3: Recuperação de rec-hGH e contaminação por ECP em diferentes condições de precipitação com sulfato de amônio

SATURAÇÃO (%)	rec-hGH ^{*1} (mg)	ECP ^{*2} (ppm) x 10⁶
10	---	---
20	1,2	1,7
30	3,7	3,0
40	12,5	0,85
50	26,2	0,75
60	34,8	4,2

hGH aplicado: 33,1 mg

***¹ Determinação por RP-HPLC**

***² Determinação por IRMA**

Os outros dois picos eluídos da mesma coluna (I e II) que representam 51 % do total das proteínas eluídas, revelaram a presença de quantidades extremamente pequenas de hGH (~ 6%) quando analisados por HPLC (Tabela 4). Para esta finalidade foi necessário utilizar RP-HPLC, especialmente na análise do pico I e II, onde é praticamente impossível resolver na HPSEC formas poliméricas de hGH de outras proteínas com peso molecular similar.

Na Figura 6 observa-se que a maior parte do pico I (71 %) aparece na posição correspondente ao tempo de retenção de formas de alto peso molecular

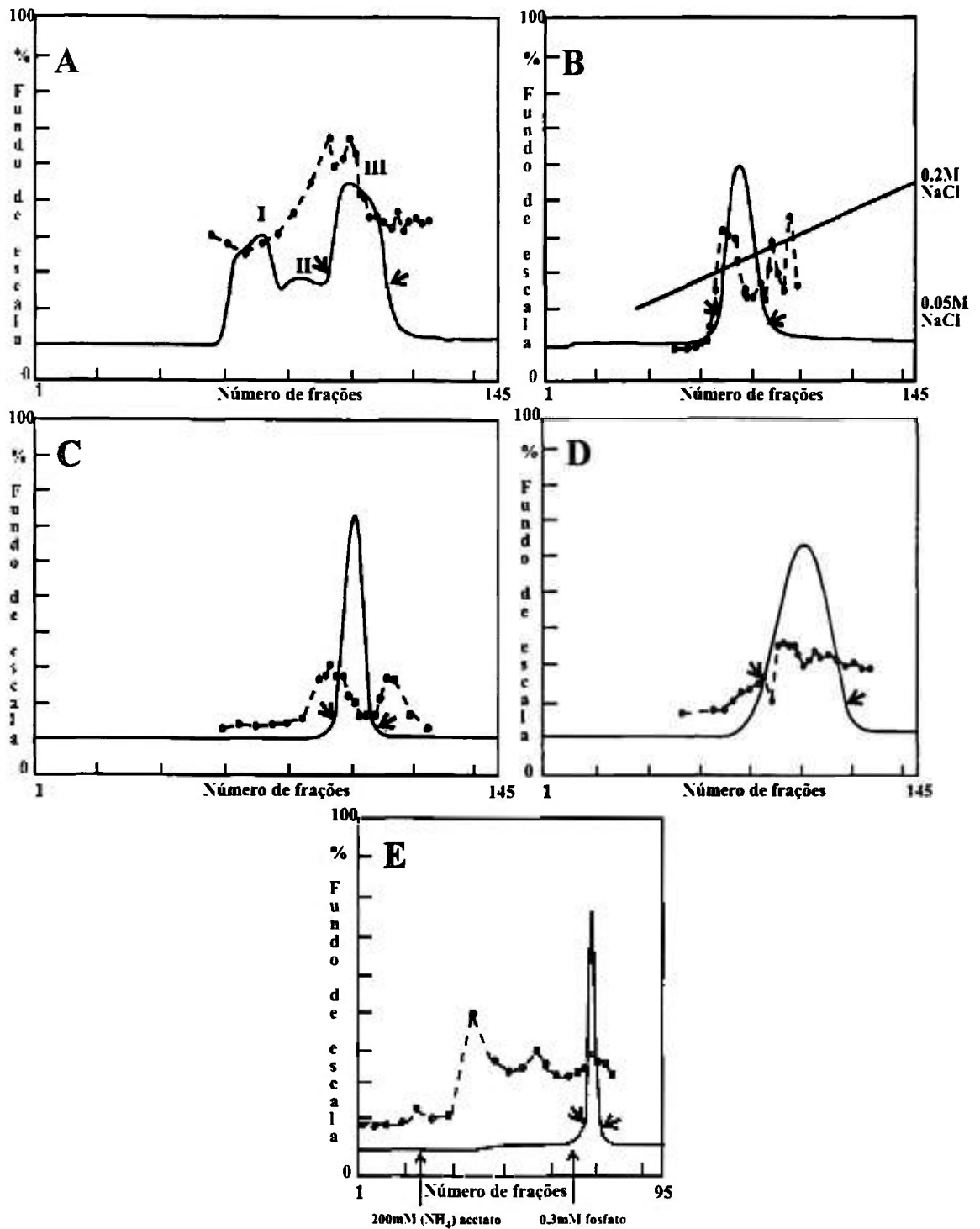


Figura 5 – Sequência completa de cromatografias de uma purificação típica de rec-hGH. As setas indicam a região selecionada em cada etapa

- A) Sephacryl I; B) DEAE-FF; C) Sephacryl II;
 D) Q-FF; E) Phenyl CL4B
 — A₂₈₀
 -.-.- ECP-IRMA (cpm)

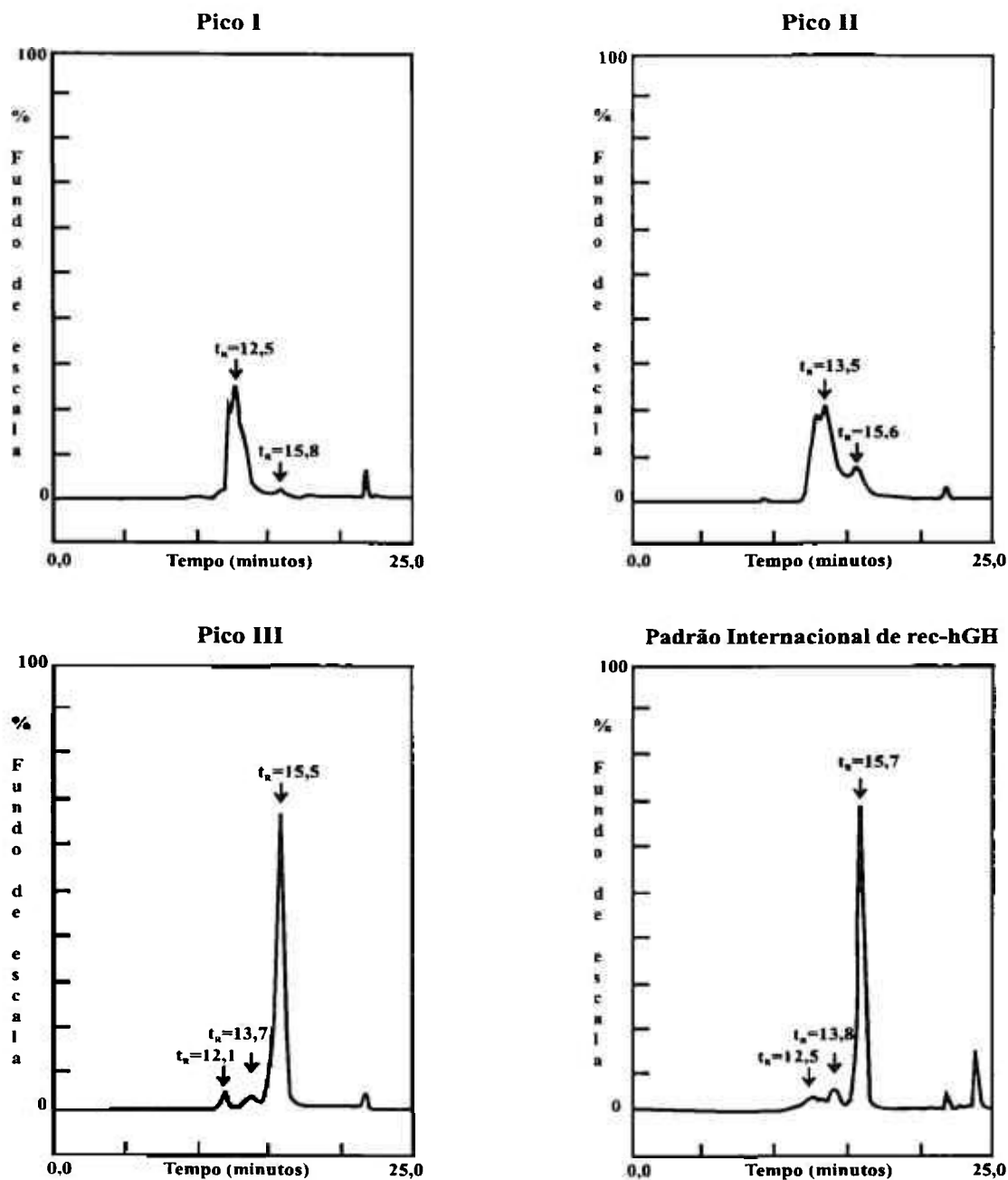


Figura 6 – Análise dos picos eluídos da Sephacryl I em HPSEC

Tabela 4 : Análise dos produtos eluídos da Sephacryl I em HPSEC e RP-HPLC

PICO	Proteína*¹ total (mg)	Conteúdo de hGH (mg)	Distribuição de hGH entre os diferentes picos (%)
Pico I	161	10,8 *²	2,9
Pico II	303	12,1 *²	3,2
Pico III	448	367 *² 354 *³	97,4 93,9

***¹ Determinado por Lowry**

***² Determinado por RP-HPLC**

***³ Determinado por HPSEC**

enquanto que a maior parte do pico II (68 %) aparece na posição correspondente ao tempo de retenção do dímero do hGH. Entretanto, estes picos não aparentam ser formas relacionadas de hGH, como ficou demonstrado em análise de RP-HPLC (Figura 7).

Analisando o perfil da Figura 5A observa-se que a área do pico I corresponde a 33 % da área total, entretanto a estimativa de proteína total deste pico pelo método de Lowry, corresponde a apenas 18 % de toda a proteína eluída. Provavelmente esta diferença é devida à interferência causada por uma pigmentação amarela e/ou a uma turbidez que aparece nas frações imediatamente após o volume de exclusão molecular. Uma outra interpretação errônea poderia também ser tirada a partir dessa figura com relação ao pico II. Por determinação do K_d, este pico poderia ser considerado dímero de hGH, mas

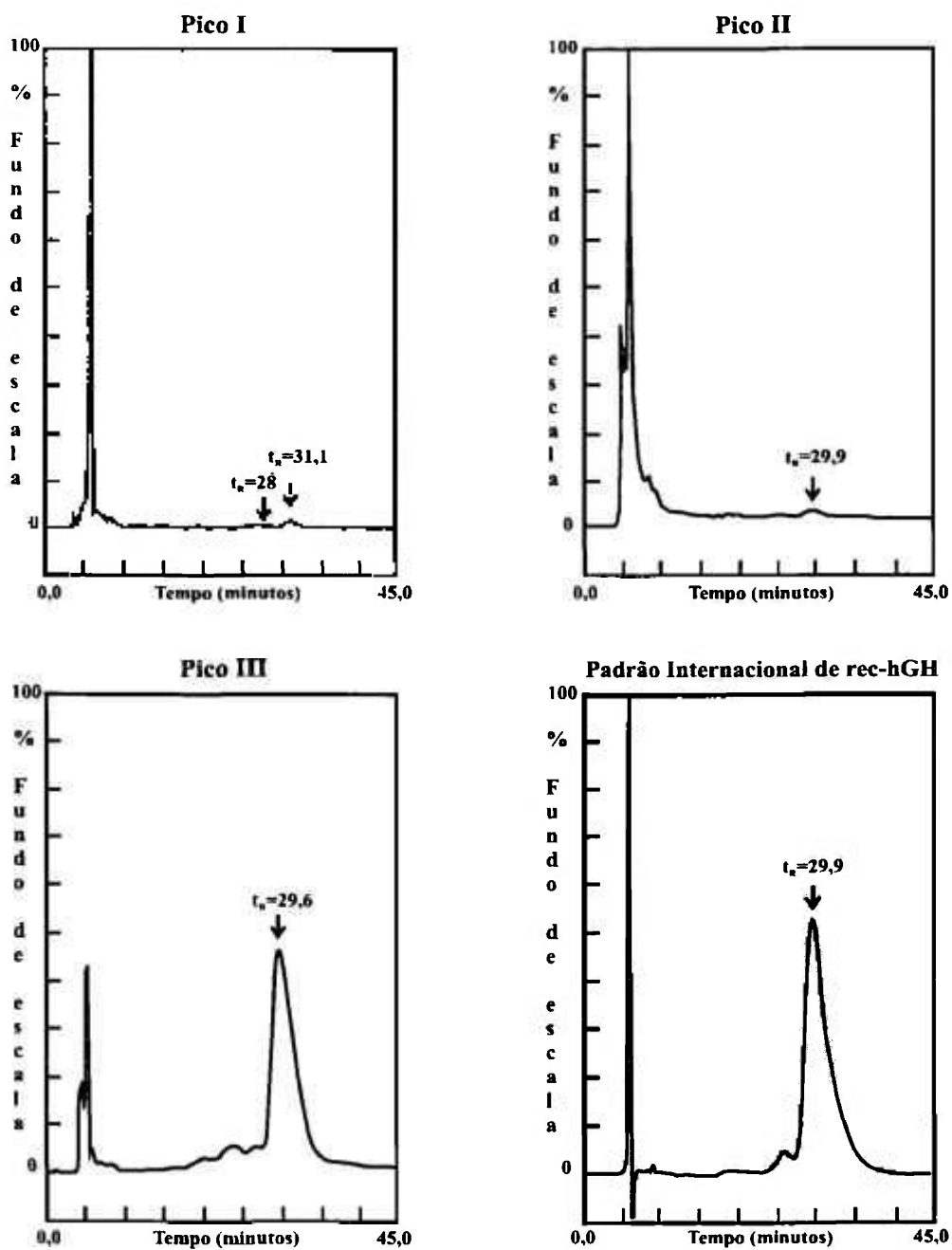


Figura 7 – Análise dos picos eluídos da Sephacryl I em RP-HPLC

essa forma praticamente não existe ou é presente em quantidade extremamente limitada, conforme demonstrado nas análises por RP-HPLC (Figura 7). O pico III contém praticamente todo o hGH, 88 % do qual na forma monomérica. Quanto melhor a resolução entre os picos II e III mais eficiente será a purificação do rec-hGH nesta etapa. Isto é ilustrado na Figura 8, que mostra os perfis cromatográficos de preparações obtidas com um conteúdo alto de pico II, eluídas em diferentes resinas de exclusão molecular, onde fica evidenciada uma melhor separação entre os dois picos quando é utilizada a resina de Sephacryl.

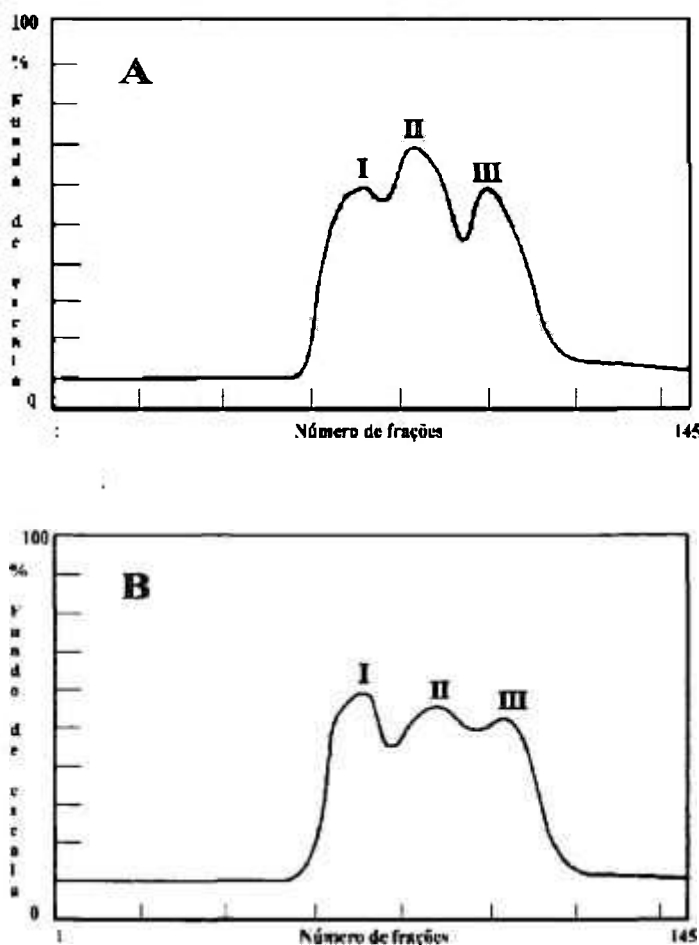


Figura 8 – Cromatogramas obtidos para extratos bacterianos contendo rec-hGH purificados em resinas de exclusão molecular
A) Sephacryl S-100 high resolution
B) Sephadex G-100 medium

A eluição do pico de hGH na cromatografia em DEAE Sepharose (Fig. 5B) ocorreu no intervalo correspondente a 80 mM - 130 mM NaCl. O gradiente pouco inclinado utilizado (50 mM - 200 mM NaCl), permitiu a eliminação de dois picos de ECP sem muita perda de hGH. Esta inclinação foi adotada após estudo prévio em que diferentes gradientes foram aplicados para a eluição do rec-hGH, sendo analisada a distribuição das ECP nessas diferentes condições (Figura 9). A maior resolução entre as ECP e o rec-hGH foi observada quando a concentração de NaCl variou de 50 mM a 150 mM. Nesse último caso, o pico de hGH acaba porém perto do final do gradiente. Para evitar possíveis perdas optou-se em trabalhar com um gradiente de 50 mM a 200 mM NaCl.

Um pico perfeitamente simétrico de hGH foi obtido após a segunda Sephacryl (Fig. 5C), caracterizando de forma macroscópica, a presença de um único componente ao contrário do que é sugerido pela assimetria do pico III da primeira Sephacryl. Esta etapa de purificação foi a que apresentou a maior resolução entre o rec-hGH e as ECP.

Aparentemente a purificação em Q-Sepharose Fast Flow (Fig. 5D) parece dispensável, uma vez que nesta etapa a atividade específica já é praticamente 100 % e a eluição do hGH e ECP ocorrem similarmente. Entretanto, realizando um processo de purificação sem esta coluna, obtivemos um produto muito mais impuro em termos de ECP, o que confirmou sua utilidade. No caso da Q-FF um maior fator de purificação da ECP foi conseguido quando o rec-hGH é eluído em condições de equilíbrio com 100 mM NaCl (Tabela 5). Entretanto, comparando-se esta condição em pHs diferentes (7,0 e 8,0) (Figura 10) observa-se uma maior discriminação entre o pico do rec-hGH e o pico do contaminante ECP, quando a eluição acontece em pH 7,0.

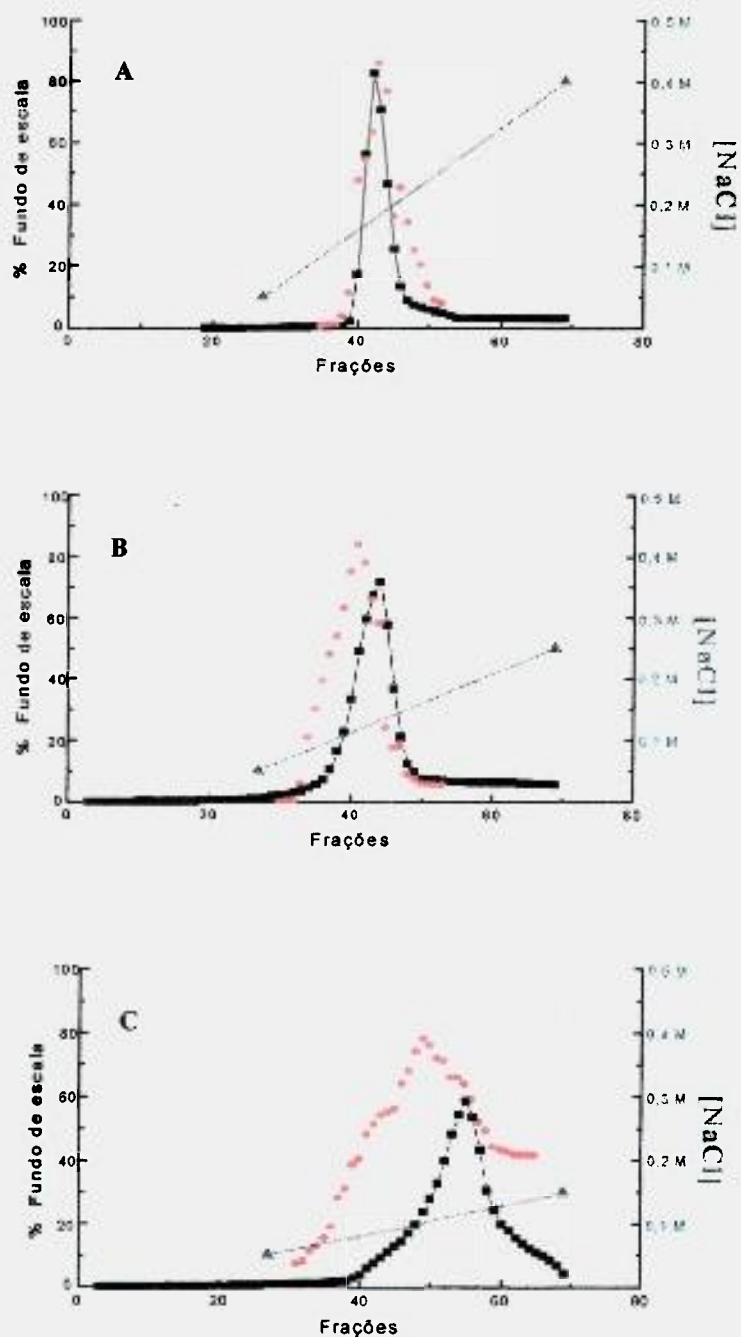


Figura 9 – Perfis cromatográficos obtidos para o rec-hGH eluído de DEAE-FF com diferentes gradientes lineares de NaCl e distribuição das ECP, estimada por IRMA, ao longo desses perfis

- A) [NaCl]: 50 mM – 400 mM
 B) [NaCl]: 50 mM – 250 mM
 C) [NaCl]: 50 mM – 150 mM

—■— A_{280} rec-hGH
 ● cpm ECP
 ▲ [NaCl]

Tabela 5 – Proteínas de *E. coli* (ECP) presentes após purificação do rec-hGH em Q-FF em diferentes condições de eluição

Condição de eluição	Contaminação por ECP (ppm) ^{*1}	Fator de purificação
Gradiente (50 – 400 mM NaCl)	11709	2,3
Gradiente (50 – 250 mM NaCl)	9585	2,8
Gradiente(50 – 150 mM NaCl)	11936	2,2
Equilíbrio (100 mM NaCl – pH8,0)	6462	4,1
Equilíbrio (100 mM NaCl – pH7,0)	3209	8,3

***¹ Estimada por IRMA**

Contaminação por ECP*¹ na amostra aplicada na Q-FF: 26651 ppm

A maioria das proteínas de *E. coli* que eluem junto com o hGH, após todas as etapas de purificação descritas acima, são menos hidrofóbicas do que o hGH (Figura 5E). Elas eluem em 200 mM e 50 mM de acetato de amônio, enquanto o rec-hGH elui em fosfato de sódio 0,3 mM. Isto permitiu praticamente a completa eliminação de ECP após uma purificação em coluna de hidrofobicidade (Phenyl Sepharose CL4B).

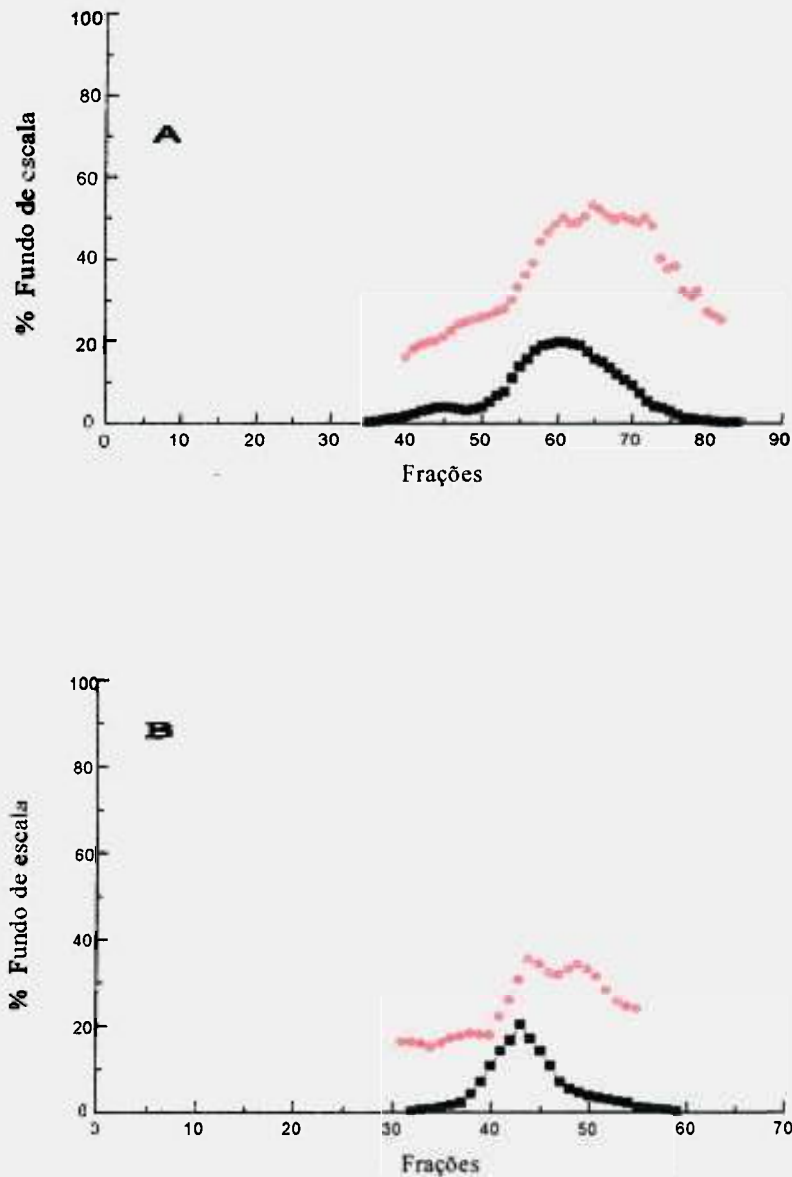


Figura 10 – Perfis cromatográficos obtidos para o rec-hGH purificado em Q-FF mediante eluição com 10 mM acetato de amônio 100 mM NaCl em pHs diferentes e distribuição das ECP ao longo desses perfis

A) pH 8,0

B) pH 7,0

—■— A280 rec-hGH

—●— cpm ECP

3.3 – Conteúdo de proteínas de *E. coli* após cada etapa cromatográfica

Com a estratégia adotada para a eliminação máxima possível de ECP, sacrificando uma parte do produto após cada etapa (Tabela 6 e Figura 5), sem considerar a primeira etapa cromatográfica para a qual o IRMA de ECP é extremamente inexato, foi possível eliminar com a DEAE-FF 39 % das ECP. Cortando as bordas do pico da Sephacryl II foi possível, com perda mínima de rec-hGH, eliminar 45 % das ECP presentes no “pool”. O mesmo procedimento não parece ser muito eficiente na Q-FF desde que apenas 14 % das ECP puderam ser eliminadas dessa maneira. Entretanto esta etapa apresenta um fator de purificação alto e, como já ressaltado anteriormente, sem Q-FF nunca foi possível obter um produto com proteínas de *E. coli* < 10 ppm. A cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl CL4B pareceu ser a técnica mais eficiente para eliminar as proteínas de *E. coli*. Entretanto o alto fator de purificação conseguido com esta coluna é certamente devido ao bom desempenho de todas as etapas prévias.

Tabela 6 : Conteúdo de proteínas de *E. coli* (ECP) nas frações selecionadas após cada etapa de um processo típico de purificação.

ETAPA	Fração Selecionada				Fração Descartada		
	hGH (mg)	ECP (mg)	ECP (ppm)	Fator de Purificação (— vezes)	hGH (mg)	ECP (mg)	ECP (ppm)
Sephacryl I	354	44,9	126911	----	82	17,8	217574
DEAE-FF	285	12,4	43664	2,9	52	7,8	148856
Sephacryl II	273	1,99	7299	6,0	28	1,6	56564
Q-FF	229	0,11	480	15	27	0,018	681
Phenyl CL4B	177	0,00013	0,71	676	-----	-----	-----

3.4 – Análise das formas relacionadas de hGH durante o processo de purificação

Com relação às formas relacionadas ao rec-hGH (polímeros, sulfóxidos e desamidados), a Tabela 7 mostra o progresso de eliminação destes contaminantes e a Figura 11 a qualidade do produto final liofilizado. Nesta tabela as formas relacionadas ao rec-hGH são reportadas como porcentagem sobre o rec-hGH total (fundamental + formas relacionadas) determinadas por HPSEC (Figura 12) ou RP-HPLC (Figura 13).

Com relação aos agregados e dímeros (Figura 12), podemos observar que a partir da segunda coluna de exclusão molecular (Sephacryl II), o produto já apresenta impurezas bem abaixo dos 6 % recomendados pela farmacopéia (1,6 %).

Tabela 7 – Formas relacionadas ao hGH determinadas por HPSEC e RP-HPLC após cada etapa de purificação do rec-hGH

ETAPA	FORMAS RELACIONADAS DE hGH	
	HPSEC (%)	RP-HPLC (%)
Choque osmótico	52,4	11,1
Precipitação	30,2	8,3
Sephacryl I	11,9	5,2
DEAE-FF	7,7	4,9
Sepahcryl II	1,6	10,4
Q-FF	0,58	6,9
Phenyl CL4B	0,56	4,9

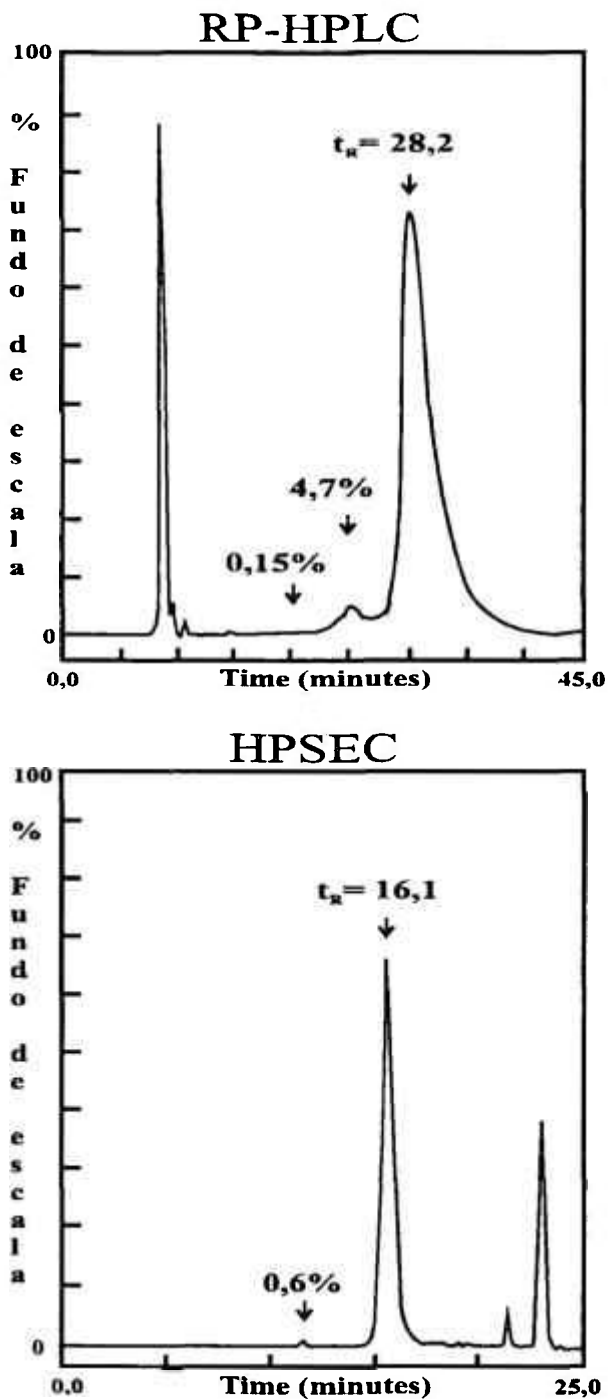


Figura 11 – Análise do rec-hGH liofilizado (produto de grau farmacêutico) em RP-HPLC (C4 Vydac 214 TP54) e em HPSEC (G 2000 SW). As porcentagens de produtos alterados são indicadas. O tempo de retenção obtido no mesmo dia para o padrão internacional de rec-hGH em RP-HPLC e HPSEC é respectivamente de 28,4 e 16,2 minutos.

HPSEC

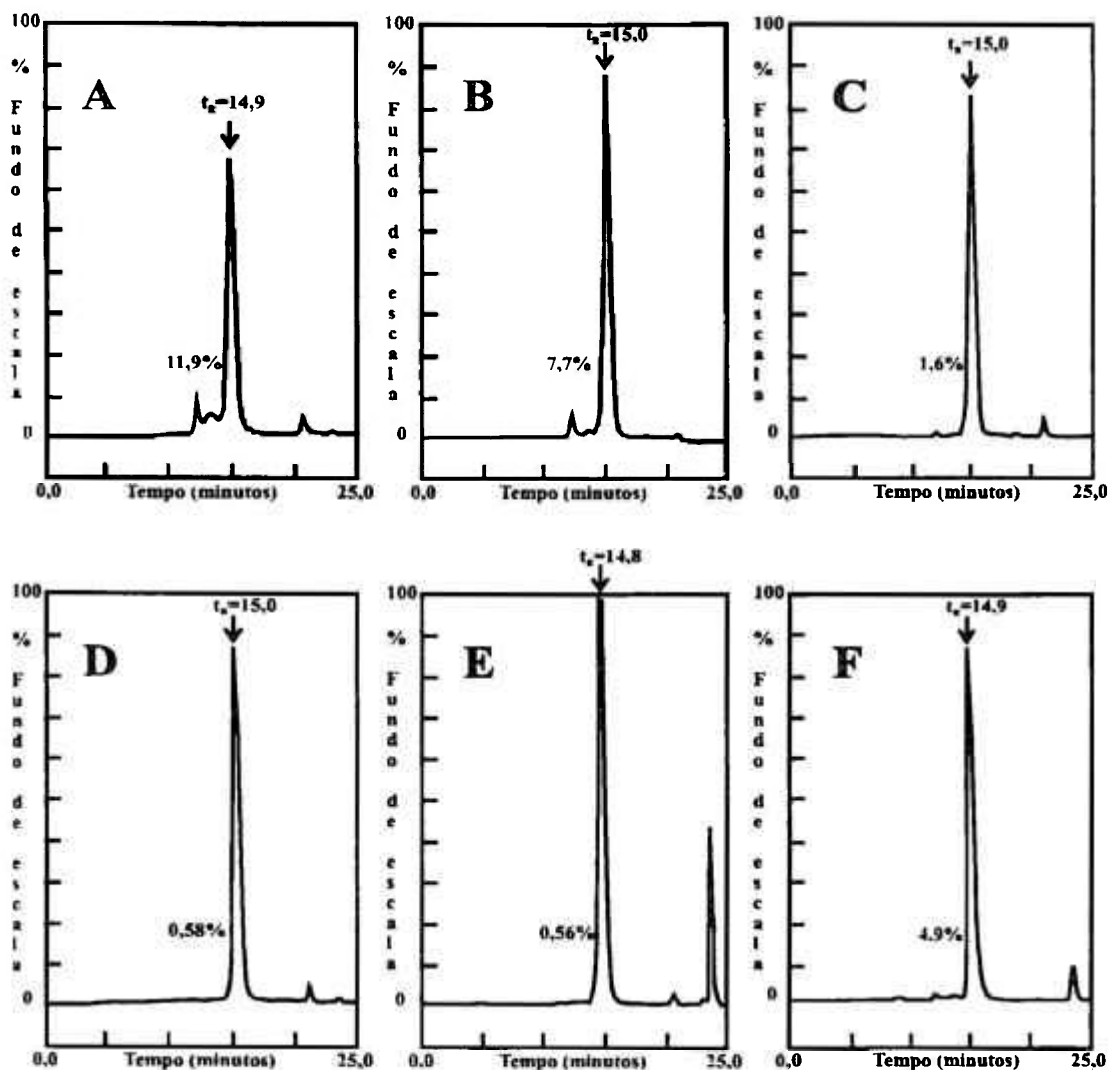


Figura 12 – Análise em HPSEC isocrática em coluna Tosohaas G 2000 SW dos produtos obtidos em diferentes etapas de um processo típico de purificação do rec-hGH

**A) Sephacryl I; B) DEAE-FF; C) Sephacryl II; D) Q-FF;
E) Phenyl CL4B; F) Padrão Internacional de rec-hGH**

RP-HPLC

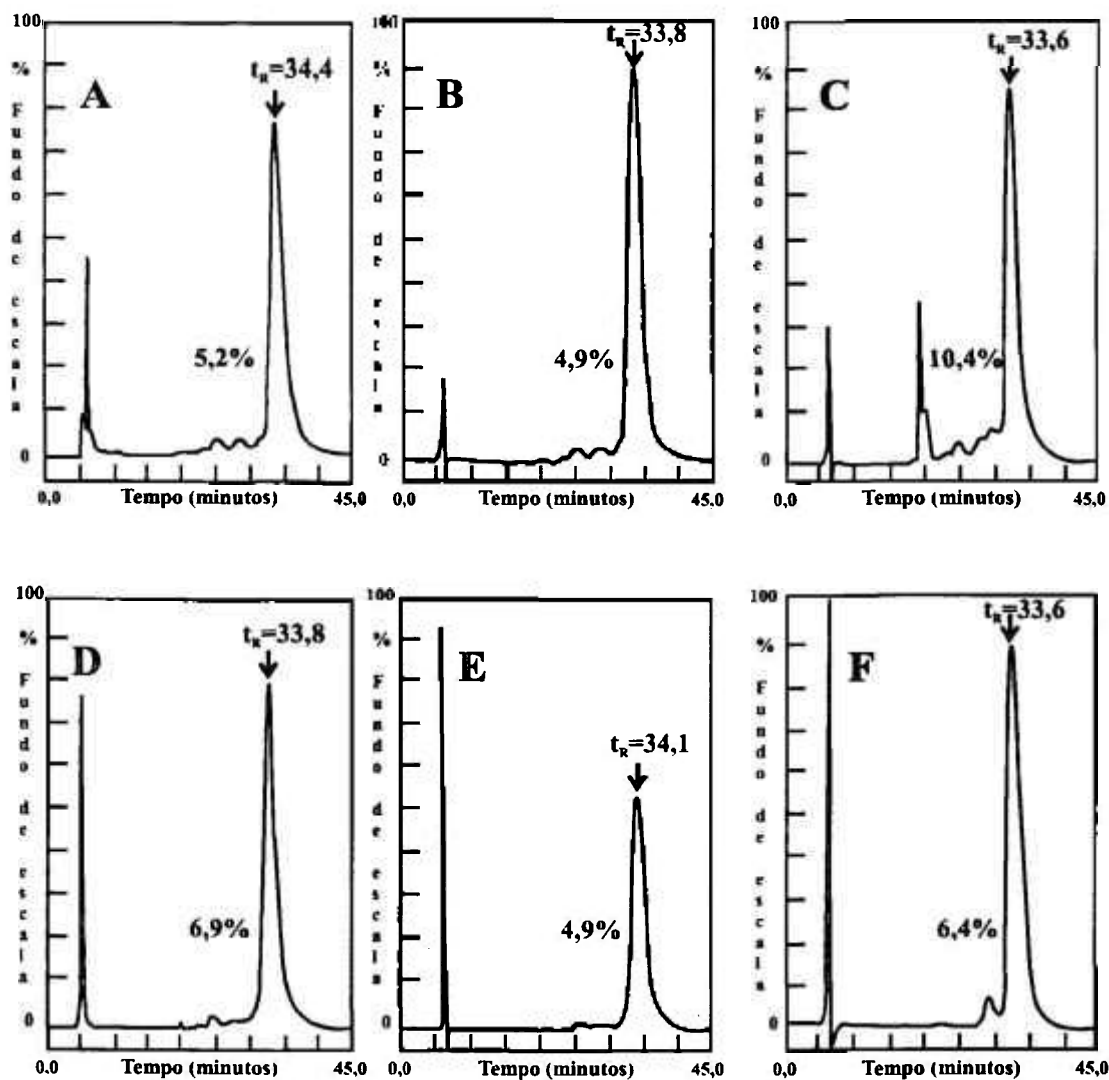


Figura 13 – Análise em RP-HPLC isocrática em coluna C₄ Vydac 214 TP54 dos produtos obtidos em diferentes etapas de um processo típico de purificação do rec-hGH

**A) Sephacryl I; B) DEAE-FF; C) Sephacryl II; D) Q-FF;
E) Phenyl CL4B; F) Padrão internacional de rec-hGH**

Quanto às formas desamidadas e aos sulfóxidos (Figura 13), observa-se que elas não são removidas etapa por etapa como outros tipos de impurezas, podendo também reaparecer durante o processo de purificação. Para eliminação das mesmas, além de um rígido controle da manipulação do material, também foi realizado um estudo comparando três sistemas cromatográficos (DEAE-FF, Q-FF e Phenyl CL4B) que, pelo menos em princípio, são capazes de eliminar estas formas. Um produto com 15 % de formas alteradas foi usado, em todos os casos, determinando a quantidade de impurezas remanescentes na fração central do pico bem como a quantidade de rec-hGH (Tabela 8). Obteve-se um melhor desempenho por parte da Q-FF, que reduziu essas impurezas para 8,5 %, confirmando ser esta de fato a etapa cromatográfica mais eficiente para eliminação de formas desamidadas e sulfóxidos e que a cromatografia de interação hidrofóbica tem de fato pouco efeito na eliminação destas formas. Essa é, portanto, uma razão a mais para não eliminar a coluna de Q-FF do esquema de purificação.

Tabela 8 : Eliminação de formas desamidadas e sulfóxidos por diferentes colunas cromatográficas

Coluna	Formas alteradas* (%)	Total de hGH recuperado (%)	Total de hGH recuperado na fração central (%)
DEAE-FF	8,9	69	35
Q-FF	8,5	75	56
Phenyl CL4B	12,7	81	34

* Antes da purificação, o produto continha 15 % de formas alteradas

Tabela 9: Purificação do rec-hGH a partir do extrato periplásmico

ETAPA	Proteína total (Lowry) (mg)	Conteúdo de hGH (HPLC) (mg)	Atividade específica $\left(\frac{\text{mg hGH}}{\text{mg proteína}}\right)$	Recuperação de hGH nas frações selecionadas (%)	Recuperação total de hGH (%)
Choque osmótico	5724	412*¹	0,072	100	100
Precipitação	1213	385*¹	0,318	93,5	93,5
Sephacryl I	448	354*²	0,790	85,9	93,4
DEAE-FF	328	285*²	0,869	69,2	78,2
Sephacryl II	298	273*²	0,916	66,3	77,7
Q-FF	239	229*²	0,958	55,6	69,2
Phenyl CL4B	173	177*²	1,022	43,0	60,5

***¹ Determinação realizada mediante RP-HPLC**

***² Determinação realizada mediante HPSEC**

3.6 - Avaliação da atividade biológica do produto final

Após adotada a estratégia de purificação acima descrita fez-se necessário verificar se o produto final manteve a atividade biológica.

A Figura 14 apresenta as curvas de crescimento de camundongos anões após administração, durante dez dias, de quatro preparações de rec-hGH e de solução fisiológica. Observa-se que, para as preparações de rec-hGH, existe uma alta e significativa correlação (r) entre a variação de peso e o tempo, enquanto para a solução fisiológica não há variação significativa (Tabela 10). Quanto às inclinações (aumento de peso diário), também mostradas nesta tabela, o teste “t Student” mostrou não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre a atividade biológica dos lotes preparados em nosso laboratório e a do padrão internacional de Somatropina (rec-hGH WHO), altamente purificada.

A potência biológica média “*in vivo*” obtida para as preparações analisadas foi de 2,96 IU/mg, praticamente igual à estabelecida para o padrão WHO 88/624 em Estudo de Colaboração Internacional (3 IU/mg) ⁽¹⁴⁾, do qual participou também o nosso laboratório.

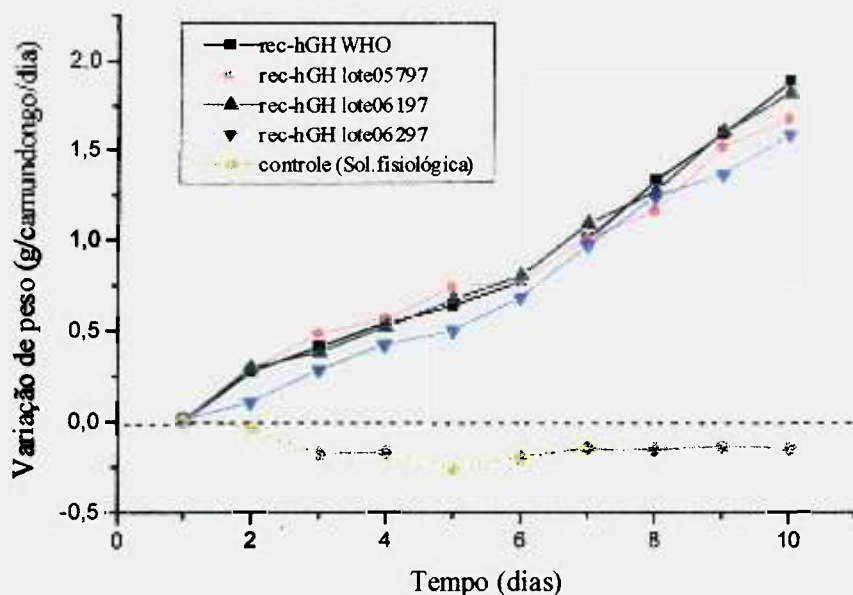


Figura 14 - Curvas da variação de peso de camundongos anões após administração de 10 μ g/dia de rec-hGH em ensaio de 10 dias

Tabela 10: Variação de peso diário de camundongos anões tratados com 10 μ g/dia de rec-hGH

PREPARAÇÃO	CRESCIMENTO MÉDIO \pm SD g/camundongo/dia	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)	N ^o DE ANIMAIS	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA (p)
rec-hGH lote 05797	0,183 \pm 0,039	0,971	10	p < 0,001
rec-hGH lote 06197	0,203 \pm 0,063	0,969	10	p < 0,001
rec-hGH lote 06297	0,192 \pm 0,040	0,945	10	p < 0,001
rec-hGH WHO	0,195 \pm 0,045	0,960	11	p < 0,001
Controle (Sol.fisiológica)	-0,009 \pm 0,020	-0,259	12	N.S.

3.7 - Avaliação dos níveis de pirogênio no produto final

O conteúdo de endotoxina detectado no produto final de um dos lotes de rec-hGH preparados em nosso laboratório (3,6 EU/mg) é mostrado na Tabela 11, sendo inferior ao limite permissível (5 EU/mg) recomendado pelas Farmacopéias Européia e Brasileira ^(21, 22).

Tabela 11: Concentração de endotoxina bacteriana no rec-hGH liofilizado e dissolvido em solução fisiológica (1,4 mg/mL)

Diluição do hGH	Concentração de rec-hGH (mg/mL)	Resposta
1:20	0,07	Positiva
1:40	0,035	Positiva
1:56	0,025	Negativa
1:80	0,018	Negativa
1:160	0,0088	Negativa

Máxima diluição positiva: 1:40

Concentração de hGH nesta diluição: 0,035 mg/mL

Sensibilidade do LAL = 0,125 EU/mL

$$X = \frac{0,125}{0,035} = 3,6 \text{ EU/mg}$$

3.8 - Determinação de DNA residual no produto final

Fez-se necessário avaliar se, após todo o esquema de purificação adotado, há presença de DNA de *E. coli* no produto final. A Figura 15 mostra que no caso de DNA cromossômico foi possível detectar um sinal correspondente a 100 pg, enquanto as amostras de hGH com conteúdo em proteína de até 5 µg não apresentaram sinal radiográfico. O nosso produto contém, portanto, menos de 2 ppm de DNA cromossômico (100/50.000.000). No caso da curva de DNA plasmídico foi possível detectar um sinal correspondente a 0,8 pg. O nosso produto contém, portanto, menos de 0,016 ppm de DNA plasmídico (0,8/50.000.000). Esse ensaio foi repetido para várias preparações, tendo sido sempre o conteúdo de DNA bem abaixo das 5 ppm consideradas aceitáveis.

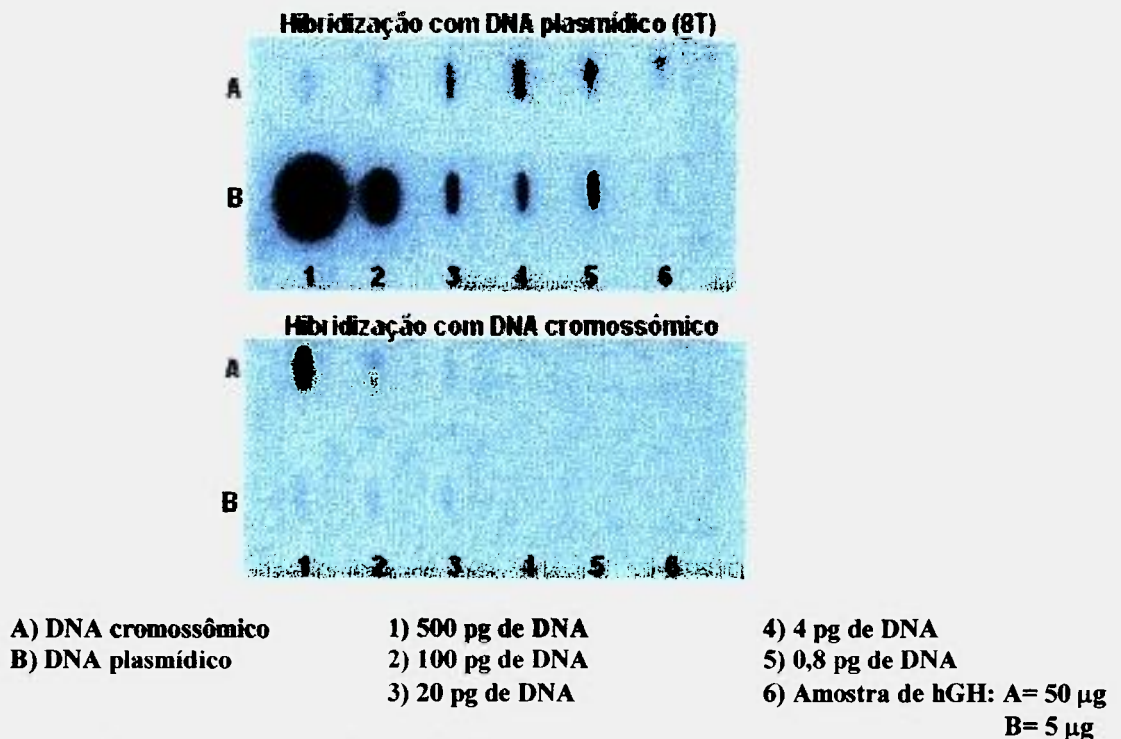


Figura 15 - Hibridização em "slot blot" para determinação de DNA contaminante

3.9 - Determinação de tetraciclina no produto final

Uma vez que adiciona-se tetraciclina ao meio de fermentação, faz-se necessário testar se após todo o processo de purificação ela ainda está presente. A Tabela 12 mostra a determinação de tetraciclina em diferentes amostras. Apenas na fase imediatamente após a fermentação (choque osmótico) foi detectada a presença de tetraciclina. A partir da primeira etapa de purificação (Sephacryl I) já não se detecta mais a presença do antibiótico.

Tabela 12: Determinação de tetraciclina em amostras de diferentes etapas do processo de produção do rec-hGH

AMOSTRA	TETRACICLINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Choque osmótico	0,49
Sephacryl I	< 0,15
Produto final	< 0,15

Sensibilidade do ensaio: 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4 - DISCUSSÃO

O processo de purificação descrito neste trabalho permitiu a obtenção de hormônio de crescimento humano recombinante (rec-hGH) altamente purificado, secretado no espaço periplásmico bacteriano, com conteúdo de proteínas contaminantes da célula hospedeira (ECP) inferior a 10 ppm e atividade biológica comparável àquela da preparação internacional de referência.

O esquema de purificação padronizado, de seis etapas, mostrou-se eficiente para alcançar o nível de pureza necessário para este produto farmacêutico, possuindo a vantagem de ser rápido, relativamente simples e economicamente vantajoso.

As proteínas de *E. coli* foram o contaminante cuja presença representou a maior dificuldade na purificação do rec-hGH para utilização em humanos, opinião também expressa na literatura por vários autores^(20, 23, 24, 26, 38, 62).

Para se obter a pureza desejada foi essencial o acompanhamento, por imunensaio (IRMA), do perfil das ECP nas diversas etapas de purificação. Isto permitiu otimizar as condições de eluição do rec-hGH, como por exemplo é mostrado na Figura 9 e Figura 10, além de permitir uma escolha mais restrita dos “pools”, aumentando o fator de eliminação destes contaminantes.

Mesmo com um grande número de etapas e sacrificando propositadamente parte do produto durante a escolha dos “pools”, para reduzir as ECP, a recuperação total do nosso processo foi de aproximadamente 40 %. Este valor está entre os mais altos reportados para a purificação do rec-hGH, seja a partir de bactéria que de células de mamífero^(7, 43, 50). Apenas o trabalho

de Niimi e colaboradores ⁽⁵⁰⁾ está, como o nosso, direcionado à eliminação de ECP. Estes autores reportam uma recuperação em metionil-hGH de extração citoplásmica de 19 % para um processo de purificação de seis etapas. O rendimento da nossa purificação de aproximadamente 60 %, no caso em que as perdas de hGH devidas aos cortes não sejam consideradas, indica que foi alcançada uma otimização altamente satisfatória de todas as etapas, praticamente com uma recuperação média superior a 90 % por etapa. De fato não encontramos na literatura nenhum artigo que descreva detalhadamente uma estratégia para eliminação das ECP comprovando o seu funcionamento.

Cabe aqui observar que nessa otimização foi importante a seqüência das etapas cromatográficas adotadas, alternando colunas de princípios cromatográficos diferentes, troca iônica sempre após exclusão molecular, interação hidrofóbica como última etapa após uma segunda troca iônica ⁽⁵²⁾. Este esquema permitiu também um eficiente aproveitamento das amostras a serem aplicadas com relação a volume e força iônica e evitou a necessidade de etapas adicionais de concentração, diálise ou acondicionamento das amostras.

A reprodutibilidade interprocessos (CV = 8 %) do rendimento da purificação, em sete ensaios diferentes, reflete claramente a robustez do processo, bem como a confiabilidade do alto rendimento alcançado. Salienta-se que essa variação não se deve somente ao processo de purificação mas também ao processo de fermentação das bactérias transformadas e à extração do hGH do periplasma bacteriano realizado mediante técnica de choque osmótico.

O método de determinação de hGH no extrato periplásmico, por HPLC em fase reversa, previamente padronizado em nosso laboratório ⁽¹⁸⁾, revelou-se um instrumento bastante importante que nos permitiu acompanhar eficientemente e com suficiente exatidão as recuperações parciais de cada etapa.

Este método também nos permitiu selecionar o material de partida para a purificação, descartando aqueles produtos de fermentação em que o nível de secreção de hGH foi muito baixo e, portanto, de mais difícil purificação, especialmente no que se refere à eliminação de ECP.

Importante e até certo ponto insubstituível foi também a utilização das técnicas analíticas de HPLC, de exclusão molecular e fase reversa, durante todas as etapas da purificação, para determinar as impurezas relacionadas ao hGH (formas poliméricas, desamidados e sulfóxidos). Estas técnicas permitiram acompanhar a eliminação ou eventualmente até o aparecimento destes contaminantes ao longo do processo.

Particularmente interessante mostrou-se a análise feita, mediante essas duas técnicas, para a etapa de Sephacryl I (Figuras 6 e 7) através das quais foi possível avaliar as perdas de hGH ocorridas durante essa cromatografia, identificando as formas eliminadas.

Ressaltamos também o estudo realizado mediante RP-HPLC para identificar qual das etapas cromatográficas melhor elimina as formas desamidadas e os sulfóxidos. Este estudo, além de confirmar que a eliminação destas formas é extremamente ineficiente, indicou inesperadamente que a Q-FF Sepharose, nas condições por nós padronizadas, é a técnica que mais é capaz de reduzi-las. Os resultados desse estudo, apresentado na Tabela 8, mostram a dificuldade de separar formas relacionadas ao hGH como desamidados e sulfóxidos da forma não alterada do hormônio, em virtude da similaridade de suas propriedades físico-químicas. Portanto o ideal é prevenir sua formação. Sendo que os principais agentes responsáveis pelo aparecimento destas formas são o oxigênio, a luz e alto pH ⁽⁸⁾ um alto controle destes fatores deve ser observado, evitando assim o aparecimento destas formas de difícil eliminação.

Ênfase foi dada também à quantificação de hGH e de proteína nas etapas iniciais do processo, um estágio no qual estas determinações são particularmente críticas e inexatas, especialmente devido à heterogeneidade das amostras. Salientamos que é praticamente impossível obter dados confiáveis de recuperação total do rec-hGH ou fornecer fatores de purificação reais quando a proteína total e o conteúdo de hGH no material de partida e nas primeiras etapas não são conhecidos de maneira exata. Esta limitação tem sido mencionada também por outros autores, especialmente no que se refere a resultados de imunoenaios, uma técnica bastante inexata quando usada para quantificar uma proteína em matrix complexa ⁽³⁴⁾. Na nossa experiência a determinação da proteína de interesse no choque osmótico, por radioimunoensaio, é freqüentemente super estimada. Provavelmente isso ocorre devido ao enorme efeito diluição observado neste tipo de determinação.

Finalmente, quando possível, utilizamos cromatografias e resinas de fluxo rápido para abreviar a duração do processo que, excluindo a fermentação e a liofilização, nunca excede cinco dias. Além da vantagem econômica ao usar metodologias convencionais relativamente simples e de baixo custo, nossa experiência confirma, como enfatizado numa revisão recente deste tópico ⁽⁴⁰⁾, que a obtenção de proteínas recombinantes de alta qualidade está também muito relacionada à velocidade do processo de purificação.

Em síntese, rapidez de processamento, flexibilidade e mínima alteração do produto de interesse juntamente com a otimização de cada etapa e a varredura sempre realizada para eliminar as ECP foram condições sumamente importantes para que o método de purificação proposto neste trabalho fosse capaz de proporcionar altos rendimentos de rec-hGH, com o grau de pureza necessário para sua utilização como produto injetável.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANICETTI V.R., FEHSKENS E.F., REED B.R., MOORE P., GEIER M.D. and JONES A.J.S. Immunoassay for the detection of *E. coli* proteins in recombinant DNA derived human growth hormone. **J. Immunol. Meth.**, v. 91, p. 213-224, 1986.
- 2- ANICETTI V.R., MARTIN A.S., BLACKWOOD L.L., JONES A.J.S. and CHEN A.B. Immunization procedures for *E. coli* proteins. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 22, p. 151-168, 1989.
- 3- BANGHAM D.R. Scientific aspects of the licensing and control of products made by r-DNA procedures. **BIRA J.**, v. 5 (3), p. 20-23, 1986.
- 4- BARTOLINI P. and RIBELA M.T.C.P. Influence of Chloramine T iodination on the biological and immunological activity or the molecular radius of the human growth hormone molecule. **J. Immunoassay**, v. 7 (3), p. 129-138, 1986.
- 5- BARTOLINI P., DIAS L.M. and MURATA Y. Produção de hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 45, p. 241-243, 1990.

6- BARTOLINI P., MORGANTE L.E., MURATA Y., RIBELA M.T.C.P., SCHWARZ I., BELLINI M.H. AND SOARES C.R.J. Utilization of DNA recombinant techniques for the preparation of radioimmunoassay reagents for pituitary hormones. *Developments in radioimmunoassay and related procedures. IAEA-SM-324/67.*; p. 197-204, 1992.

7- BECKER G.W. and HSIUNG H.M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies -FEBS.*, v. 204, p. 145-150, 1986.

8- BECKER G.W. TACKITT P.M., BROMER W.W., LEFEBER D.S. and RIGGIN R.M. Isolation and characterization of a sulfoxide and a desamido derivate of biosynthetic human growth hormone. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 10, p. 326-337, 1988.

9- BELLINI M.H. and BARTOLINI P. *In vivo* bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf "little" mice. *Endocrinology*, v. 132, p. 2051-2055, 1993.

10- BELLINI M.H., MATHOR M.B., DE LUCA M., CANCEDDA R. and BARTOLINI P. Ultrasensitive *in vivo* bioassay detects bioactive human growth hormone in transduced primary human keratinocytes. *J. Endocrinol. Invest.*, v. 21, p. 1-6, 1998.

11- BOLLAG D.M., ROZYCKI M.D. and EDELSTEIN S.J. Ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and affinity chromatography. In: John Wiley & Sons, Inc (Ed.). **Proteins Methods**, 2nd ed., p. 229-347. New York, NY: Wiley Liss, 1996.

12- BRIGGS J., KUNG V.T., GOMES B., KASPER K.C., NAGAINIS P.A., MASINO R.S., RICE L.S., ZUK R.F. AND GHAZAROSSIAN V.E. Sub-femtomole quantitations of proteins with threshold, for the biopharmaceuticals industry. **Biotechniques**, v. 9, p.598-606, 1990.

13- BRIGGS J. and PANFILI P.R. Quantification of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 850-859, 1991.

14- BRISTOW A.F., GAINES-DAS R., JEFFCOATE S.L. and SCHULSTER D. The first international standard for somatropin: Report of an International Collaborative Study. **Growth Regulation**, v. 5, p. 133-141, 1995.

15- BRITISH PHARMACOPEIA, Appendix XIV A, p. 147-148, 1988.

16- CHANG C.N., REY M., BOCHENER B., HEYNEKER H. and GRAY G. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. **Gene**, v. 55, p. 189-196, 1987.

- 17- DALBÖGE H., DAHL H.M., PEDERSEN J., HANSEN J.W. and CHRISTENSEN T. A novel enzymatic method for production of authentic hGH from an *Escherichia coli* produced hGH precursor. **Biotechnology**, v. 5, p. 161, 1984.
- 18- DALMORA S.L., OLIVEIRA J.E., AFFONSO R., GIMBO E., RIBELA M.T.C.P. and BARTOLINI P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr A**; v. 782, p. 199-210, 1997.
- 19- DYR J.E. and SUTTNAR J. Separation used for purification of recombinant proteins, **J. Chromatogr. B**, v. 699, p. 383-401, 1997.
- 20- EATON L.C. Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals **J. Chromatogr. A**, v. 705, p. 105-114, 1995.
- 21- EUROPEAN PHARMACOPEIA 3rd ed, Council of Europe, Strasbourg, p. 1518-1525, 1977.
- 22- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a ed. São Paulo: Atheneu. 1996.
- 23- FEDERICI M.M. The quality control of biotechnology products. **Biologicals**, v. 22, p. 151-159, 1994.

24- FLODH H. Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: Development and production. **Acta Paediatr. Scand.**, v. 325, p. 1-9, 1986.

25- FRIEDMAN J.S., COFFER C.L., ANDERSON C.L., KUSHNER J.A., GRAY P.P., CHAPMAN G.E., STUART M.C., LAZARUS M., SHINE J. and KUSHNER P.J. High expression in mammalian cells without amplification. **Biotechnology**, v. 7 (4), p. 359-362, 1989.

26- FRYKLUND L.M., BIERICH J.R. and RANKE M.B. Recombinant human growth hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 15, p. 511-535, 1986.

27- GARNICK R.L. SOLLI N.J. and PAPA P.A. The role of quality control in biotechnology: an analytical perspective. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 2546-2557, 1988.

28- GOEDEL D.V. HEYNEKER H.L., HOZUMI T., ARENTZEN R., ITAKURA K., YANSURA D.G., ROSS M.J., MIOZZARI G., CREA R. and SEEBURG P.H. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. **Nature**, v. 281, p. 544-548, 1979.

29- GOODING R.P. and BRISTOW A.F. Detection of host-derived contaminants in products of recombinant DNA technology in *E. coli*: a comparison of silver-staining and immunoblotting. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 37, p. 781-786, 1985.

30- GRAY G.L., BALDRIDGE J.S., McKEOWN K.S., HEINEKER H.L. and CHANG C.N. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. **Gene**, v. 39, p. 247-254, 1985.

31- HSIUNG H.M., MAYNE N.G. and BECKER G.W. High level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. **Biotechnology**, v. 4, p. 991-995, 1986.

32- HSIUNG H.M., CANTRELL A., LUIRINK J., OUDEGA B., VEROS A.J. and BECKER G.W. Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. **Biotechnology**, v. 7, p. 267-271, 1989.

33- IKEHARA M., OHTSUKA E., TOKUNAGA T., TANYIAMA Y., IWAI S., KITANO K., MIYAMOTO S., OHGI T., SAKURAGAWA Y., FUJIYAMA K., IKARI T., KOBAYASHI M., BABA H., MIKI T., SAKURAI A., OISHI T., CHISAKA O. and MATSUBARA K. Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 5956-5960, 1984.

34- JACOBSON F.S., HANSON J.T., WONG P.Y., MULKERRIN M., DEVENEY J., REILLY D. and WONG S.C. Role of high-performance liquid chromatographic protein analysis in developing fermentation processes for recombinant human growth hormone, relaxin, antibody fragments and lymphotoxin. **J. Chromatogr. A**, v. 76 (3), p. 31-48, 1997.

35- JENSEN E.B. and CARLSEN S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. **Biotechnol. Bioeng.**, v.36, p. 1-11, 1990.

36 – JONES A.J.S. and O'CONNOR J.V. Control of recombinant DNA produced pharmaceuticals by a combination of process validation and product specifications. **Dev. Biol. Stand.**, v. 59, p. 175-180, 1985.

37- JÓNSDÓTTIR I., SKOOG B., EKRE H-P.T., PAVLU B. and PERLMANN P. Purification of pituitary and biosynthetic human growth hormone using monoclonal antibody immunoabsorbent. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 46, p. 131-135, 1986.

38- JUNGBAUER A. and BOSCHETTI E. Manufacture of recombinant proteins with safe and validated chromatographic sorbents. **J. Chromatogr. B**, v. 662, p. 143-179, 1994.

- 39- KATO C., KOBASHI T., KUDO T. and FURUSATO T. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. **Gene**, v. 54, p. 197-201, 1987.
- 40- KAUFMAN M. Unstable proteins: How to subject them to chromatographic separation for purification procedures. **J. Chromatogr. B**, v. 699, p. 347-369, 1997
- 41- KINET S., GOFFIN V., MAINFROID V. and MARTIAL J.A. Characterization of lactogen receptor-binding site 1 of human prolactin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 14353-14360, 1996.
- 42- KOSHLAND D., BOTSTEIN D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell**, v. 20, p. 749-760, 1980.
- 43- LEFORT S. and FERRARA P. Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures. **J. Chromatogr.**, v. 361, p. 209-216, 1986.
- 44- LESER E.W. and ASENJO J.A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. **J. Chromatogr.**, v. 584, p. 43-57, 1992.
- 45- LOWRY D.B., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

46- LUPKER J.H., ROSKAM W.G., MILOUX B., LIAUZUN P., YANIV M. and JOUANNAU J. Abundant excretion of human growth hormone by recombinant-plasmid-transformed monkey kidney cells. **Gene**, v. 24, p. 281-287, 1983.

47- MANIATIS T., FRITISCH E.F. and SAMBROOK J. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 2nd edition. 1989.

48- McNERNEY T.M., WATSON S.K., SIM J. and BRIDENBAUGH R.L. Separation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli* pellet extract by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 744, p. 223-229, 1996.

49- MUKHIJA R., RUPA P., PILLAI D. and GARG L.C. High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 165, p. 303-306, 1995.

50- NIIMI S., HAYAKAWA T., OSHIZAWA T., UCHIDA E., YAMAHA T. TERAO T., OHTSUKA E. and IKEHARA M. Purification and characterization of the product of chemically synthesized human growth hormone gene expression in *Escherichia coli*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 4221-4228, 1987.

51- OLSON K.C., FENNO J., LIN N., HARKINS R.N., SNIDER C., KOHR W.H., ROSS M.J., FODGE D., PRENDER G. and STEBBING N. Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active. **Nature**, v. 293, p. 408-411, 1981.

52- PHARMACIA BIOTECH. The recombinant protein handbook, principles and methods. **Pharmacia Biotech**, Uppsala, Sweden, 1994.

53- RIBELA M.T.C.P. and BARTOLINI P. Stokes radius determination of radioiodinated polypeptide hormones by gel filtration. **Anal. Biochem.**, v. 174, p. 693-697, 1988.

54- RIBELA M.T.C.P., MURATA Y., MORGANTI L., TONIOLO D. and BARTOLINI P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J. Immunol. Meth.**, v. 159, p. 269-274, 1993.

55- RIGGIN R.M., DORULLA G.K. and MINER D.J. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Anal. Biochem.**, v. 167, p. 199-209, 1987.

56- RIGGIN R.M., SHAAR C.J., DORULLA G.K., LEFEBER D.S. and MINER D.J. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. **J. Chromatogr.**, v. 435, p. 307-318, 1988.

57- ROSS M.J., in: J.L. Gueriguian (Ed.), *Insulins, Growth Hormone and Recombinant DNA Technology*. **Raven Press**, New York, v. 33, p. 48, 1981.

58- ROSWALL E.C., MUKKU V.R., CHEN A.B., HOFF E.H., CHU H., McKAY P.A., OLSON K.C., BATTERSBY J.E., GEHANT R.L. MEUNIER A. and GARNICK R.L. Novel assays based on human growth hormone receptor as alternatives to the rat weight gain bioassay for recombinant human growth hormone. **Biologicals**, v. 24, p. 25-39, 1996.

59- SOARES C.R.J. Ensaio imunorradiométrico para determinação de proteínas bacterianas contaminantes em lotes de hormônio de crescimento humano recombinante produzido no IPEN-CNEN/SP. **Dissertação (Mestrado) IPEN-CNEN/SP**, 1995.

60- TOKUNAGA T., IWAI S., GOMI H., KODAMA K., OHTSUKA E., IKEHARA M. CHISAKA O. and MATSUBARA K. Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. **Gene**, v. 39, p. 117-120, 1985.

61- UHLÉN M. MOKS T. and ABRAHMSÉN L. Protein engineering to optimize recombinant protein purification. 623rd Meeting, Canterbury. **Biochem. Society Transactions**, v. 16, p. 111-115, 1988.

62 - WHITMIRE M.L. and EATON L.C. An immunoligand assay for quantitation of process specific *Escherichia coli* host cell contaminant proteins in a recombinant bovine somatotropin. **J. Immunoassay**, v. 18, p. 49-65, 1997.