



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ENSAIO IMUNORRADIOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO
DE PROTEÍNAS BACTERIANAS CONTAMINANTES
EM LOTES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO
HUMANO RECOMBINANTE PRODUZIDO
NO IPEN-CNEN/SP**

CARLOS ROBERTO JORGE SOARES

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

Orientador:
Dr. Paolo Bartolini

São Paulo
1995

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ENSAIO IMUNORRADIOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
PROTEÍNAS BACTERIANAS CONTAMINANTES EM LOTES DE
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE
PRODUZIDO NO IPEN-CNEN/SP.**

CARLOS ROBERTO JORGE SOARES

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

**Orientador:
Dr. Paolo Bartolini**

**SÃO PAULO
1995**



Dedico esse trabalho

Aos meus pais, **João Jorge Soares** e
Maria Senhora Soares, pela dedicação e
carinho que sempre tiveram,

Ao meu irmão e grande amigo
Claudemir,

À **Eleonora**, pela paciência e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do TB pela participação e apoio na realização deste trabalho;

Ao Dr. José Roberto Rogero pelo apoio;

À Irene pelo incentivo e pelas correções;

À Teresa pela colaboração e apoio nas mais diversas situações;

Ao IPEN-CNEN/SP, pela oportunidade de desenvolver este trabalho;

Ao Dr. Paolo Bartolini meu especial agradecimento, não só pela orientação mas por todo apoio e incentivo que sempre demonstrou;

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ENSAIO IMUNORRADIOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS BACTERIANAS CONTAMINANTES EM LOTES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE PRODUZIDO NO IPEN-CNEN/SP.

Carlos Roberto Jorge Soares

RESUMO

Um ensaio imunorradiométrico (IRMA) para múltiplos antígenos foi desenvolvido para a quantificação de proteínas de *E. coli* (ECP) presentes como contaminantes em extratos de hormônio de crescimento recombinante humano (rec-hGH) purificado. Análises complementares com SDS-PAGE e "Western Blotting" foram realizadas confirmando os resultados obtidos no IRMA e fornecendo maiores informações sobre os contaminantes. Os anticorpos anti-ECP foram produzidos em coelhos inoculados com as ECP que passaram por todas as etapas de purificação utilizadas para o hGH, com exceção da última, caracterizando um ensaio específico para a cepa e o processo utilizado. O antissoro obtido foi purificado com uma coluna de afinidade preparada com as mesmas ECP utilizadas na imunização, resultando em um ensaio com alta sensibilidade (0,03 ng de ECP/mL). O IRMA demonstrou ser específico, não dando reação cruzada com hGH pituitário e os estudos sobre precisão, exatidão e linearidade de resposta com a diluição confirmaram a validade desse ensaio como um dos testes fundamentais para o controle da pureza do rec-hGH produzido no IPEN-CNEN/SP, cujos princípios poderão ser facilmente estendidos à análise de outros produtos análogos. Os estudos realizados demonstraram que a utilização de uma coluna de afinidade preparada com o antissoro anti-ECP foi efetiva na eliminação das proteínas bacterianas, resultando em lotes de hGH com uma concentração de contaminantes inferior a 10 partes por milhão (0,001 %).

**IMMUNORADIOMETRIC ASSAY FOR THE DETERMINATION OF *E. coli*
PROTEINS IN RECOMBINANT DNA DERIVED HUMAN GROWTH HORMONE
PRODUCED AT IPEN-CNEN/SP.**

Carlos Roberto Jorge Soares

ABSTRACT

An immunoradiometric assay (IRMA) for the determination of multiple antigens was set up in order to quantify *E. coli* (ECP) in lots of purified recombinant human growth hormone (rec-hGH). SDS-PAGE and Western Blotting techniques were carried out, in parallel, to confirm the results obtained by IRMA and to provide more informations about the contaminants. Anti-ECP antibodies were obtained by rabbit immunization with ECP, which were submitted to the same purification process utilized for rec-hGH with the exception of the last step. A strain-process-specific assay was thus set up. The antiserum obtained was purified through an affinity column prepared with the same ECP used for immunization, this provided an highly sensitive assay (0,03ng ECP/mL). This IRMA was shown to be specific, not presenting any cross reaction with hGH and studies carried out on precision, accurancy and linearity of response with dilution confirmed its validity as one of the fundamental purity tests for rec-hGH produced at IPEN-CNEN/SP, whose principles can be easily extended to the analysis of other similar products. These studies have also shown that the utilization of an affinity column, prepared with the described anti-ECP antiserum was very effective, providing rec-hGH lots with less then 10 parts per million (0,001%) of contaminating proteins.

SUMÁRIO

Página

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	12
MATERIAIS	13
1. Preparação da cepa produtora de hGH	13
2. Preparação das proteínas de <i>E.coli</i> (ECP)	14
3. Material radioativo	14
4. Placas de microtitulação	14
5. Tubos	14
6. Contador	15
7. Preparações de hGH e antissoros	15
8. Resinas utilizadas nas colunas de purificação	15
9. Animais utilizados nos experimentos	15
10. Outros reagentes	16
11. Meios de cultura e soluções	16
MÉTODOS	18
1. Produção das ECP ₁	18
1.1. Choque osmótico	19
2. Preparação da cepa não produtora de hGH ("8T _{Blank} ")	19
2.1. Extração do DNA plasmídico da cepa 8T-hGH	19

2.2. Digestão parcial do DNA com a enzima ECO RI	20
2.3. Transformação e clonagem	21
2.3.1. Preparação de bactérias competentes	21
2.3.2. Reação de ligase	21
2.3.3. Transformação e clonagem	21
3. Produção de Proteínas de <i>E. coli</i> “purificadas” (ECP _{2-G100} , ECP _{2-DEAE})	22
3.1. Determinação de biomassa	22
3.2. Produção de biomassa bacteriana	22
3.3. “Purificação” das ECP ₂	23
3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio	23
3.3.2. Purificação em colunas de exclusão molecular e troca iônica	24
4. Preparação das colunas de afinidade	24
4.1. Coluna de afinidade para purificação de IgG	25
4.2. Coluna de afinidade para purificação do hGH	25
5. Preparação de antissoros	25
6. Análise dos antissoros obtidos	26
6.1. Marcação das ECP ₁ ou ECP _{2-DEAE} com ¹²⁵ I	26
6.2. Determinação do título aproximado dos antissoros obtidos	27
7. Purificação do antissoro	27
8. Marcação da IgG purificada	27
9. Adsorção de IgG às placas de microtitulação	29
10. Preparo do padrão e amostras de controle de qualidade	29
11. Protocolo do ensaio	30
12. Estudos de sensibilidade, precisão e exatidão do ensaio	30
12.1. Cálculo da sensibilidade	30
12.2. Precisão	31
12.2.1. Preparo das “amostras falsas”	32
12.3. Exatidão	32
12.3.1. Testes de recuperação	32
13. SDS-PAGE e “Western Blotting”	33

13.1. SDS-PAGE	33
13.2. "Western Blotting"	34
14. Dosagem de proteínas totais	35
15. Estudo do processo de purificação	36
RESULTADOS	37
1. IRMA I	37
1.1. Análise dos antissoros obtidos após imunização de coelhos com proteína total de <i>E. coli</i> de choque osmótico (ECP ₁)	37
1.2. Ensaio baseado na utilização de proteína total de choque osmótico da cepa RRI (ECP ₁)	38
1.3. Ensaio baseado na titulação de um padrão de ECP ₁ "purificadas" (ECP _{1-G100})	40
2. IRMA II	43
2.1. Preparação da cepa bacteriana contendo o vetor de expressão sem o gene do hGH	43
2.2. Fermentação	47
2.3. "Purificação" das ECP ₂	47
2.4. Análise dos antissoros obtidos após imunização dos coelhos com ECP _{2-DEAE}	50
2.5. Validação do ensaio	51
2.5.1. Sensibilidade	51
2.5.2. Precisão	53
2.5.3. Linearidade	55
2.5.4. Exatidão	56
2.5.4.1. Teste de recuperação	56
3. Avaliação da exatidão em comparação com a análise por "Western Blotting"	60

4. Aplicação da metodologia desenvolvida ao processo de purificação de hGH recombinante	62
4.1. Estudo do processo de purificação mediante SDS-PAGE e WB	62
4.2. Eliminação de ECP mediante cromatografia por afinidade	64
4.3. Determinação de ECP mediante o IRMA II em vários lotes de hGH recombinante produzidos no IPEN	65
DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO

Biotecnologia é um termo que tem sido amplamente utilizado para descrever o uso de seres vivos para obtenção de produtos para pesquisa, diagnóstico e aplicações farmacêuticas (18).

O desenvolvimento da metodologia do DNA recombinante, a qual possibilita que o gene de um organismo seja transplantado para um outro organismo, tem permitido a produção de macromoléculas de grande utilidade e numa forma bastante pura. O uso destes organismos como pequenas fábricas tem sido explorado para a produção de proteínas de uso terapêutico tais como a insulina, o hormônio de crescimento (hGH), o ativador de plasminogênio (rt-PA), a eritropoetina e muitas outras (18).

A Coordenadoria de Bioengenharia do IPEN-CNEN/SP tem realizado a preparação de hormônio de crescimento humano em bactérias mediante técnicas de DNA recombinante (engenharia genética) (8, 35) e está se dedicando também à preparação de prolactina (hPRL) (33) e tireotrofina (hTSH) (37). Estes produtos, quando produzidos em bactérias, são obtidos em forma purificada após várias etapas de processamento que partem de um lisado bacteriano ou do fluido periplasmático obtido através do denominado "choque osmótico" (27, 31), que mantém a integridade da célula. Neste último caso, que é também o método utilizado por nós, a proteína de interesse atravessa a membrana interna da célula colocando-se entre esta e a parede externa (espaço periplasmático), devido à presença da sequência sinalizadora ("leader sequence") no DNA, cuja função é levar à secreção uma proteína em tudo idêntica ao produto natural (forma "autêntica"). O resultado é que a proteína recombinante obtida é extraída a partir de uma solução na qual ela

pode ter uma concentração de até 30-40 % (9, 14), o que facilita enormemente o processo de purificação. Tratando-se de extrato periplasmático ou citoplasmático, em ambos os casos as proteínas bacterianas sempre estão presentes em grande quantidade e para que o produto possa ser injetado em seres humanos sem o perigo de provocar reações adversas, elas devem ser eliminadas da maneira mais completa possível (20). Algumas normas e informações bibliográficas disponíveis sugerem como critério de aceitabilidade uma concentração, inferior a 10 ppm (partes por milhão) na proteína injetável (4, 19, 23).

Existem vários trabalhos publicados a respeito da detecção de proteínas de *E. coli* (ECP) em produtos recombinantes, sendo o conteúdo dos principais deles resumido a seguir.

Baker e cols. e Ross e cols., pesquisadores da "Lilly Research Laboratories" (Indianápolis, IN, EUA) em 1981 (5) e 1982 (40) publicaram trabalhos sobre contaminantes bacterianos na insulina humana biosintética (BHI). Preparações de BHI foram analisadas em um ensaio imunorradiométrico (IRMA) para determinação de ECP, apresentando concentrações inferiores à sensibilidade do ensaio (1 ppm), calculada de acordo com a definição de Rodbard (39). Um outro radioensaio foi usado para medir os anticorpos contra ECP em pacientes tratados por seis meses com BHI, não havendo indicação de aumento na produção destes mesmos anticorpos.

Em um trabalho publicado por Jones e cols. em 1982 (26), foram relatados vários testes para a caracterização de metionil-hGH, a forma de hormônio de crescimento humano produzido no citoplasma bacteriano, com uma metionina N-terminal adicional. Estes autores também realizaram a análise da pureza do produto final por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-

PAGE), eletroforese em duas dimensões, focalização isoeétrica (IEF) e teste de identidade imunológica mediante técnica de "immunoblotting", também conhecida como "Western Blotting" (WB). Na SDS-PAGE revelada com prata, foram detectados níveis de ECP da ordem de 0,1 ng quando aplicados 20 µg de material, correspondendo, portanto, a 5 ppm de proteínas contaminantes. Amostras analisadas mediante WB, usando antissoro anti-ECP, apresentaram porém bandas não detectadas na revelação por prata, dando indicação que a primeira técnica pode apresentar maior sensibilidade para alguma proteína específica.

Em 1985, Gooding e cols. (23) publicaram um trabalho comparando a coloração com prata na SDS-PAGE com o "Western Blotting", usando um antissoro anti-ECP na detecção de proteínas derivadas de *E. coli* K 12 e um antissoro anti-hGH pituitário. Foram analisadas em SDS-PAGE amostras de lisado de *E. coli* e três amostras de met-hGH recombinante com diferentes graus de pureza, tendo sido observadas bandas correspondentes a proteínas de *E. coli* na amostra mais impura. O WB demonstrou neste caso ter uma sensibilidade da ordem de 180 ppm, aproximando-se da mesma ordem daquela obtida no mesmo trabalho pela técnica de SDS-PAGE com coloração em nitrato de prata. Porém, para chegar a isso foi necessário aplicar uma amostra com 0,5 mg de hGH em 20 µl, portanto com concentração de 25 mg/mL. Utilizando a coloração com nitrato de prata ficou claro que há pelo menos 30% de chances de perder bandas de ECP encobertas pelas bandas de hGH e de seus isômeros de massa. Concluindo, Gooding e cols. observaram que a técnica de SDS-PAGE com coloração mediante nitrato de prata talvez detecte um número maior de contaminantes proteicos, enquanto que proteínas altamente antigênicas podem chegar a ser detectadas com sensibilidade maior pela técnica de "Western Blotting". Estes autores também declaram acreditar numa indiscutível superioridade do imunoensaio quanto à sensibilidade de detecção de ECP, avaliando-a em aproximadamente 4 ppm e concluem que somente as três

técnicas em conjunto forneceriam uma prova satisfatória de pureza para um produto obtido em *E. coli*.

Anicetti e cols. (1), em trabalho de 1986, descrevem um ensaio imunoenzimométrico (ELISA) e um IRMA para detecção de ECP em met-hGH recombinante. Foram realizados estudos para a validação do ensaio, utilizando principalmente o ELISA. Esses estudos foram agrupados nas seguintes categorias: limites de detecção, precisão, exatidão, especificidade e linearidade. O sistema ELISA apresentou uma sensibilidade de 2 ng/mL, também de acordo com a definição de dose mínima detectável de Rodbard (39), na análise de amostras com 2 mg de hGH por mL, correspondendo, portanto, a uma sensibilidade de 1 ppm. O IRMA padronizado por estes autores demonstrou ter uma sensibilidade bem inferior ao ELISA que, com base nos dados apresentados, estimamos ser aproximadamente de 5 ppm. Anicetti e cols. apresentaram também dados relativos à precisão do ELISA: intra-ensaio com 6 a 9 % de coeficiente de variação (CV) ao longo de toda a curva padrão e inter-ensaio com 6 a 10 % de CV para amostras determinadas na porção alta e média da curva e 19% para amostras com valores mais baixos. Estudos sobre a exatidão demonstraram uma boa recuperação das ECP, apresentando valores de 95 a 100 % no inter-ensaio e de 100 a 129% no intra-ensaio. O ensaio mostrou ser suficientemente específico, uma vez que não foi observada reação cruzada com hGH pituitário e apresentou uma baixa reatividade para amostras de ECP derivadas de outros processos de produção, introduzindo, assim o conceito de "ensaio com especificidade de processo". Estudos de linearidade demonstraram que produtos derivados do processo mais atualizado apresentaram valores em ppm independentes da diluição, enquanto que lotes mais antigos, baseados em processamento diferente, apresentavam um incremento nesses valores de acordo com a diluição. Estes autores também realizaram estudos utilizando "Western Blotting" e SDS-PAGE com o objetivo principal de confirmar o

espectro de proteínas detectadas e demonstrar a especificidade do anticorpo no reconhecimento das ECP.

Outros dois trabalhos foram publicados sobre este tema pelo mesmo grupo, em 1989 (2) e em 1990 (3). No primeiro foram comparados três diferentes procedimentos de imunização para produção de anticorpos contra ECP. Para a caracterização do antissoro resultante foram utilizadas as técnicas de SDS-PAGE em duas dimensões revelado com prata, WB e ELISA. Com base nos dados do ELISA, o título máximo de anticorpo foi obtido 60 dias após imunização. Análises dos antissoros por SDS-PAGE em duas dimensões e WB demonstraram que a reatividade dos anticorpos para os componentes presentes na mistura em menor quantidade e com baixo peso molecular não foram produzidos antes de 112 dias e que o método de imunização mais eficiente foi o da imunização em cascata, de Thalhamer e Freund (44). Neste método, após a imunização primária com ECP, as amostras subsequentes, antes de serem inoculadas, passam por uma coluna de afinidade preparada com as IgG coletadas recentemente do próprio animal. Dessa forma, as proteínas que produziram uma menor resposta imunológica são selecionadas e usadas para aumentar a eficiência da resposta.

No segundo trabalho são revistas estratégias gerais para o desenvolvimento de imunoensaios para a dosagem de impurezas bacterianas em produtos farmacêuticos, no qual os aspectos críticos desses ensaios são discutidos. Os resultados mostram que a purificação das IgG por imunoafinidade junto com a eletroforese em duas dimensões são ferramentas muito importantes no desenvolvimento de ensaios para dosagem de impurezas proteicas, contribuindo para melhorar a pureza dos produtos. Os dados apresentados sugerem a utilização do método "blank run" para a obtenção das ECP a serem utilizadas no ensaio. Por esse método a fermentação, seguida da purificação, é realizada a partir de uma cepa bacteriana em tudo idêntica mas, que não apresenta o gene que expressa a

proteína de interesse. Estes autores, mediante uso de fragmentos $F(ab)_2$ no lugar de IgG intactas, diminuíram as ligações inespecíficas e chegaram a desenvolver um ELISA com sensibilidade da ordem de 0,02 ppm.

Briggs, em 1991 (12), discutiu vários aspectos da quantificação de DNA e impurezas proteicas em produtos biofarmacêuticos, fazendo uma série de considerações sobre as diferentes técnicas usadas para detecção de ECP, com suas vantagens e limitações. Nesse mesmo trabalho é citada uma referência de 1990 do mesmo autor (11), descrevendo um sistema imunométrico bastante sensível denominado "Threshold ILA" que utiliza um marcador fluorescente e que pode ser aplicado a uma grande variedade de analitos. Como exemplo de aplicação foi citado um ensaio para determinação de ECP no qual a curva padrão apresenta um intervalo de leitura de 10 até 2000 pg de ECP/ mL, o que permite uma sensibilidade de detecção de até 0,05 ppm.

Em 1992, Chen e cols (15), todos pesquisadores da Genentech Inc., publicaram um trabalho sobre quantificação de ECP por ELISA em γ -interferon humano recombinante (γ -IFNr). Análises mediante WB mostraram que os anticorpos reagiam com uma grande quantidade de ECP utilizadas na curva padrão e presentes nos lotes de produção. Foi utilizada uma curva padrão no intervalo de 1,3 a 40,0 ng de ECP/mL, sendo o menor ponto da curva (1,3 ng ECP/mL) considerado próximo do limite de sensibilidade do ensaio. Como foram analisadas amostras de 1 mg de γ -IFNr/mL, essa sensibilidade pode ser estimada em aproximadamente 1,3 ppm. O ensaio foi considerado preciso (os controles de ECP apresentaram uma precisão inter-ensaio com $CV \leq 4,1 \%$) e exato, com recuperações de 111 - 115 % das ECP esperadas (15 - 40 ng/mL), quando adicionadas a amostras de 1 mg/mL de γ -IFNr; apresentando também linearidade com a diluição ($r = 0,999$). Em vários lotes de

γ -IFN α purificado não foram detectadas ECP, e assim esses lotes foram considerados ter conteúdos em ECP < 1,3 ppm.

Com base na literatura analisada podemos concluir que as técnicas usadas para a determinação de ECP são fundamentalmente três: eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), "Western Blotting" (WB) e imunoensaio.

O método clássico é a separação das impurezas protéicas contaminantes mediante PAGE, sendo as bandas relativas reveladas por coloração. A SDS-PAGE (28) é rápida e de execução relativamente fácil, além de fornecer informações sobre o tamanho das moléculas contaminantes. Existe somente uma pequena probabilidade de alguns dos analitos serem perdidos durante a separação e revelação e não requer o uso de um antissoro específico. A revelação pode ser feita utilizando o corante "Coomassie Blue" ou por precipitação mediante nitrato de prata que chega a ser 100 vezes mais sensível (34). A revelação por nitrato de prata melhora significativamente o limite de detecção de uma única banda protéica, chegando a valores de 0,2-2,0 ng, dependendo da proteína (21). Isto determina um limite de sensibilidade de 40 - 400 ppm para uma amostra de 5 μ g de proteína. Dados relatados por Jones e cols. (26) também apresentam sensibilidades dessa ordem para amostras de hGH recombinante. A técnica SDS-PAGE apresenta, porém, a desvantagem de não detectar as impurezas que migram com o produto analisado, como já mencionado. Sendo geralmente necessária a aplicação de uma grande quantidade de produto, os contaminantes com propriedades eletroforéticas semelhantes à(s) banda(s) do produto não são detectados (23).

O uso de um único método eletroforético é claramente insuficiente para uma determinação adequada de pureza. Portanto, dois ou mais métodos, que separem proteínas por combinação de tamanho molecular e carga, são frequentemente

empregados para avaliar o nível de pureza de uma forma mais completa (12, 21, 26). Alguns métodos alternativos de separação incluem focalização isoelétrica (IEF) com separação baseada somente na carga (ponto isoelétrico) (38); a eletroforese em gel de duas dimensões, que combina separação por carga e tamanho (26) e HPLC (12, 21).

O WB tem sido usado para demonstrar se a banda observada mediante a coloração com prata no SDS-PAGE é uma molécula relacionada com o hGH (isoforma) ou uma impureza de *E.coli*, servindo também como um teste de identidade (21, 26). Este teste também aumenta a detectabilidade de proteínas no gel, podendo atingir, de acordo com alguns autores (26), sensibilidade análoga às obtidas em radioensaios. Porém, apresenta algumas limitações como, por exemplo, o fato da intensidade da banda depender da resposta imunológica produzida no animal por cada proteína de *E.coli* injetada. A resposta, portanto, nem sempre está relacionada com a quantidade de contaminante presente, podendo uma proteína pouco imunogênica não ser detectada. Uma outra limitação é devida ao fato de que esse método só detecta determinantes antigênicos que resistiram ao aquecimento e desnaturação em presença de SDS e sofreram renaturação quando o SDS foi retirado durante a eletro-transferência ou nas etapas de lavagem (1).

Os imunoenaios têm várias características que são complementares aos métodos baseados somente na separação eletroforética. Em primeiro lugar, eles são muito mais sensíveis e quantitativos, permitindo uma exata avaliação da pureza do produto com limites de detecção para impurezas proteicas da ordem de picogramas. Em segundo lugar, eles são baseados na reação específica antígeno-anticorpo, permitindo a detecção e determinação de impurezas e contaminantes na presença do enorme excesso de produto analisado (12).

Desta maneira, tanto o SDS-PAGE como o WB, mesmo representando fontes válidas de informações, não podem competir com técnicas de imunoensaio do tipo enzimático (ELISA) ou radioimunológicas como radioensaio (RIA) e ensaio imunorradiométrico (IRMA), que apresentam alta sensibilidade, especificidade e uma resposta quantitativa muito mais precisa.

Considerando que a região crítica de determinação ("cutting point") no nosso caso é de 10 ppm, uma sensibilidade de 1 ppm seria mais que aceitável. No caso de uma solução hormonal de 1 mg/mL, isto representa a necessidade de um limite de detecção de 1 ng de ECP/mL, o que está perfeitamente dentro da potencialidade destas técnicas.

A finalidade do presente trabalho é a padronização de uma técnica precisa, sensível e suficientemente exata para permitir a detecção de proteínas contaminantes de *E.coli* em extratos de hGH ou de outros produtos obtidos em bactérias mediante técnicas de DNA recombinante. Como o nosso laboratório já possui toda uma estrutura voltada para radioensaios, a técnica IRMA foi a escolhida por ser considerada uma das mais sensíveis e práticas.

O IRMA para ECP será utilizado como uma das principais técnicas de controle de qualidade de hGH e de outros hormônios recombinantes produzidos no IPEN e também será de extrema utilidade no estudo desse tipo de contaminação e da sua eliminação durante as várias etapas do processo de purificação.

Para a padronização desse radioensaio torna-se crítico ter anticorpos específicos para cada proteína potencialmente contaminante. Por essa razão, um

antissoro anti-ECP foi produzido especificamente contra as proteínas da mesma cepa que produz hGH, sem conter este gene e que acompanham o hormônio durante as várias etapas de purificação. Para essa finalidade foi necessário realizar um trabalho de biologia molecular que levou à construção de um plasmídeo, derivado daquele utilizado na produção da proteína recombinante, sem a presença do gene correspondente ao hormônio. A mesma cepa de *E. coli* utilizada na produção do hormônio (RRI), foi transformada com esse plasmídeo, obtendo-se uma bactéria idêntica em tudo, mas não produtora de hGH.

O extrato de ECP injetado nos coelhos para produção do antissoro foi obtido através de uma “purificação” parcial do fluido periplasmático que, sendo submetido às mesmas etapas realizadas para a purificação do hormônio, com exceção da última, chegou a uma fase em que o grau de pureza do hormônio seria da ordem de 90 a 95%. Desta maneira, é esperada a produção de um antissoro contra todas as proteínas contaminantes que, com grande probabilidade, estarão presentes no produto final. A realização deste trabalho relativamente complexo se fez necessária devido às diferenças existentes entre cepas e entre métodos de purificação, não existindo no mercado nenhum kit nem antissoro que possa ser usado a não ser aquele preparado por nós, com a nossa cepa e em nossas condições de processamento.

O título dos antissoros obtidos foi determinado mediante um radioimunoensaio (RIE) padronizado especificamente para essa finalidade, em que foram marcadas as ECP. Aqueles antissoros que apresentaram maiores títulos tiveram as imunoglobulinas anti-ECP purificadas mediante cromatografia de afinidade (1, 5), sendo subsequenteemente marcadas com ^{125}I e utilizadas na montagem de um IRMA do tipo “sandwich” (two site) (16). Como técnica de separação foi utilizada a adsorção do antissoro a placa de microtitulação como realizado por Anicetti e cols. (1).

Durante o processo de padronização do método foram realizados vários estudos relacionados à precisão, sensibilidade e exatidão dos ensaios. Por isso foram produzidos diferentes lotes de anticorpos a partir de ECP correspondentes a duas diferentes etapas de purificação do hGH, ou seja, utilizando como antígeno uma solução proteica mais heterogênea (início do processo de purificação) ou uma solução muito menos heterogênea (final do processo de purificação). Na prática, este trabalho resultou no desenvolvimento de dois IRMAs: um mais genérico, independente do processo de purificação, que serviu para padronizar a técnica e compreender melhor a dinâmica da reação (mas que não levou à exatidão e sensibilidade necessárias) e um outro mais específico, ligado ao processo de purificação utilizado nesta produção do hGH e de maior interesse prático.

OBJETIVOS

A finalidade do presente trabalho é a padronização de uma técnica precisa, sensível e suficientemente exata que permita a detecção de proteínas contaminantes de *E.coli* em extratos de hGH obtidos em bactérias mediante técnicas de DNA recombinante.

A técnica escolhida foi o IRMA por ser considerada uma das mais sensíveis e práticas, somado ao fato do nosso laboratório já possuir toda uma estrutura voltada para radioensaios.

O IRMA para ECP será utilizado como uma das principais técnicas de controle de qualidade de hGH recombinante produzido no IPEN e também será de extrema utilidade no estudo desse tipo de contaminação e da sua eliminação, durante as várias etapas do processo de purificação.

O domínio dessa técnica possibilitará também a aplicação dos conhecimentos adquiridos no desenvolvimento de outros ensaios para determinação de contaminantes bacterianos em diferentes hormônios recombinantes ou do mesmo hormônio proveniente de diferentes cepas e/ou construções e processos de purificação.

MATERIAIS

1. Preparação da cepa não produtora de hGH

- Cepas de *E. coli* utilizadas:

- RRI (pRK248clts): sup E44 hsdS20(r_B - m_B) ara 14 oriA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5mtl-1

- RRI (p8T-hGH), mesma cepa supracitada, que contém o vetor de expressão para hGH.

- Enzimas de restrição e outras enzimas usadas em procedimentos de Biologia Molecular:

Foram usadas as enzimas de restrição Eco RI, Hind III, Ssp I e a enzima T4 DNA ligase adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia ou da New England Biolabs, Beverly, MA, E.U.A..

- Sistema de purificação de fragmentos de DNA:

Na extração e purificação de bandas de DNA a partir de gel de agarose foi utilizado o "Sephaglas Bandprep Kit" da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

- Micro centrífuga Eppendorf, modelo 5415 C da Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N. Y., E.U.A..

2. Preparação das proteínas de *E.coli* (ECP):

- Agitador/incubador "series 25" da New Brunswick Scientific CO, Edson, New Jersey, E.U.A..
- Bioreator da MBR BIO REACTOR AG, modelo IMCS 2000 - 20 L, Zurique, Suíça.
- Coletor de frações FRAC-200 (Pharmacia, Uppsala, Suécia).
- Espectrofotômetro da marca Carl-Zeiss, modelo PMQII (Oberkochen, República da Alemanha).
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorvall, (Newtown, Connecticut, E.U.A.).

3. Material radioativo

Na^{125}I comercial, livre de carregador e oxidantes, fornecido pela Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica) em concentração de aproximadamente 18,5MBq/ μl (500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$).

4. Placas de microtitulação

Placas de cloreto de polivinil flexível para microtitulação, 96 poços por placa (8 x 12 poços), com fundo em "U" (0,270 mL/poço) da Dynatech Laboratories, (Chantilly, Va, E.U.A.).

5. Tubos

Tubos de poliestireno tipo RIE (7,5 x 1,2 cm) da EMTEL (São Paulo, Brasil).

6. Contador

Contador gama tipo "poço" modelo COBRA auto-gamma, com troca automática de amostra, da Packard Instrument Company (Illinois, E.U.A.), cuja eficiência aproximada para o ^{125}I é de 80%.

7. Preparações de hGH e antissoros

- Primeiro Padrão Internacional de hGH recombinante, WHO, 88/624
- Segundo Padrão secundário de hGH pituitário produzido no IPEN-CNEN/SP
- Lotes de hGH recombinante produzidos no IPEN-CNEN/SP
- Antissoro liofilizado anti ECP, WHO, 84/658
- Segundo anticorpo anti-IgG de coelho (ICN)

8. Resinas utilizadas nas colunas de purificação.

Sephadex G - 25; G - 100; G - 150; DEAE - Sepharose CL - 6B e Sepharose 4B ativada com CNBr, adquiridos da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

9. Animais utilizados nos experimentos

Coelhos da linhagem Nova Zelândia (fêmeas de cor branca), mantidos do biotério da Coordenadoria de Bioengenharia do IPEN-CNEN/SP, mantidos em

gaiolas, recebendo ração comercial (adquirida da firma Nuvital - SP) e água *ad libitum*.

10. Outros reagentes

Leite desnatado em pó Molico, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%).

Os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de qualidade P.A..

11. Meios de cultura e soluções

Meio LB

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

LB/Agar

Agar.....	1,5g
Meio LB..... qsp.....	1000 ml

PBS 10x

NaCl.....	80 g
KCl.....	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O.....	11,5 g
H ₂ O.....qsp.....	1 L

MÉTODOS

Como o processo de purificação do hGH ainda estava indefinido na seqüência de suas etapas e com o objetivo de familiarizar melhor com a técnica, foi inicialmente desenvolvido um primeiro tipo de ensaio (IRMA I) para detectar proteínas de *E. coli* (ECP), usando como padrão e para produção de antissoro as proteínas totais obtidas por choque osmótico de uma cepa bacteriana sem conter o vetor de expressão do hGH, proteínas essas por nós denominadas de ECP₁.

Um segundo esquema de ensaio, sempre utilizando os reagentes do IRMA I, foi montado com a utilização de um padrão preparado a partir da "purificação" das ECP₁ em colunas de troca iônica e Sephadex G-100 (ECP_{1-G100}).

Tendo observado na literatura (1, 11, 21), que um ensaio genérico para ECP é difícil de se obter com suficiente sensibilidade e exatidão, foi desenvolvido em paralelo, após a definição da estratégia de purificação do hGH, o ensaio identificado como IRMA II, utilizando proteínas de *E. coli* derivadas da cepa "8T_{Blank}". As ECP obtidas no choque osmótico desta cepa foram denominadas de ECP₂ e acompanharam o processo de purificação utilizado para o rec-hGH.

1. Produção das ECP₁

Na preparação do IRMA I foi utilizada a mesma cepa de *E. coli* RRI, não produtora de hGH, proveniente de uma fase intermediária da preparação da cepa 8T. O crescimento bacteriano foi realizado em erlenmeyers de um litro com 300 mL de meio LB incubado sob agitação (300 rpm) a 30 °C, durante 10 horas. Das bactérias obtidas foram extraídas as proteínas presentes no espaço periplásmico

através de choque osmótico. Essas proteínas foram utilizadas para imunização dos coelhos e como padrão de ECP do IRMA I.

1.1. Choque osmótico

Com o material obtido na fermentação foi realizado o choque osmótico para a extração das proteínas presentes no espaço periplasmático (27, 31). A técnica de choque osmótico consiste em centrifugar a amostra, ressuspender as bactérias precipitadas em tampão com Sacarose 20%, Tris HCl 0,03M pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0; deixando em repouso por 10 min em gelo. Após nova centrifugação o precipitado é ressuspenso em tampão Tris HCl 10mM pH 8,0, deixando em repouso por 10 min em gelo e novamente centrifugado, sendo coletado o sobrenadante onde estão as proteínas periplasmáticas.

2. Preparação da cepa não produtora de hGH ("8T_{Blank}")

Uma nova cepa bacteriana foi preparada a partir do vetor de expressão (p8T-hGH) utilizado na produção do rec-hGH. Técnicas de biologia molecular foram necessárias para retirar deste vetor o gene do hGH.

2.1. Extração do DNA plasmídico da cepa 8T-hGH (32, 42)

Colônias de bactérias *E. coli* (RRI) contendo o plasmídeo p8T-hGH foram coletadas de placa contendo LB/Agar com o auxílio de uma alça de platina, semeadas em 3 ml de LB com antibiótico, a 30 °C, por 16 h. De cada tubo, 1,5 ml foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados por 1 min. O sedimento foi ressuspenso em 100 µl de solução Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM e incubado por 5 min em temperatura ambiente (t.a.). A seguir foram adicionados 200 µl de uma solução de NaOH 0,2 N, SDS 1% e após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados em gelo por 5 min. Foram

adicionados então 150 µl de uma solução gelada de acetato de potássio 3M pH 4,8 incubando-se por 5 min em gelo. Os tubos foram centrifugados por 5 min em t.a. na minicentrífuga e o sobrenadante foi extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio 1:1. Após homogeneização em vortex por 1 min, centrifugou-se por 4 min e adicionaram-se 2 volumes de etanol à fase aquosa, deixando por 5 min em gelo. Depois de centrifugar por 10 min em t.a., o precipitado foi lavado com etanol 70%, recentrifugado, seco a vácuo e ressuspenso em 50 µL de TE (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e EDTA 10mM pH 8,0) contendo 1,5 µg de RNase e deixado incubar a 37 °C por 30 min.

2.2. Digestão parcial do DNA com a enzima Eco RI

Analisando o mapa de restrição do plasmídeo, observou-se que o gene do hGH está presente entre dois sítios Eco RI e que existe um terceiro sítio no meio do plasmídeo, portanto para a obtenção do fragmento de DNA plasmídico sem o gene do hGH (3985 par de bases), optou-se pela digestão parcial ou incompleta do plasmídeo (33) seguida da isolamento e purificação desse fragmento. Para essa purificação foi utilizado o kit "Sephaglas Bandprep" seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Dessa forma os vários segmentos de DNA na amostra são separados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 5µg de brometo de etídio por mL, sendo as bandas reveladas durante exposição à luz ultravioleta. A região do gel contendo a banda de interesse é recortado e dissolvido num tampão com alta força iônica (NaI 6 M; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; Na₂SO₃ 0,05 % e ácido trans-1, 2-diaminoácidoexano N, N, N',N', tetra-acético (CDTA) 10 mM) . Em seguida adicionou-se uma outra suspensão de resina com alta afinidade para o DNA. Essa resina após centrifugação foi lavada com etanol e seca; logo após o DNA foi eluído em um tampão com baixa força iônica (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; CDTA 1 mM).

2.3. Transformação e clonagem

2.3.1. Preparação de bactérias competentes

Uma colônia de *E. coli* RRI retirada de placa LB/Agar foi inoculada em 2 ml de meio LB e crescida com agitação por 16 h a 30 °C. Esta cultura foi diluída em 200 ml de LB e crescida com agitação até atingir a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (A_{600}) de 0,4-0,5. Esta suspensão de bactérias foi resfriada em banho de gelo por 10 min. Após centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 100 ml de solução de CaCl_2 gelada (CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e glicerol 15%), com incubação em gelo por 15 min. Após nova centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 13 ml da mesma solução de CaCl_2 gelada, divididas em alíquotas de 200 μl e guardadas a -80°C.

2.3.2. Reação de Ligase

A banda de DNA plasmídico purificada foi circularizada mediante ligação covalente, incubando-se esse material com 1 unidade da enzima T4 DNA ligase durante 1 hora a 24 °C, o volume de reação sendo 10 μL .

2.3.3. Transformação e Clonagem

A transformação das bactérias competentes foi realizada com a adição de toda a mistura de ligação contendo o DNA, depois destas terem sido descongeladas em gelo. Foram incubados em gelo por 20 min e depois colocadas por 2 min em banho a 37 °C para um choque térmico. Após o choque foram adicionadas 0,8 ml de meio LB, incubando-se por 1 h a 30 °C. Em seguida foi feita a clonagem, espalhando-se alíquotas de 300 μl destas bactérias em placas, usando como meio seletivo LB/Agar com tetraciclina (12,5 $\mu\text{g/ml}$). A cepa obtida teve o seu DNA plasmídico extraído, sendo sua identidade confirmada mediante análise de restrição e passando a ser identificada como cepa "8T_{Blank}".

3. Produção das proteínas de *E.coli* "purificadas" (ECP_{2-G100}, ECP_{2-DEAE})

3.1. Determinação da biomassa

Com a utilização de um espectrofotômetro mediu-se a densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm. Uma unidade de absorbância (1 unidade de DO ou A_{600}) corresponde a $0,25 \pm 0,05$ g de peso seco por litro ou $8,8 \times 10^{11}$ bactérias por litro (32) (dependendo da cepa, fase de crescimento e tamanho da célula). As amostras foram diluídas em NaCl 0,9% até a medida da absorbância ficar no intervalo de 0,1 a 0,6 unidades ópticas (u.o.) (25).

3.2. Produção de biomassa bacteriana

Com base no conteúdo total de DNA no seu genoma, a *E.coli* poderia codificar de 3000 a 4000 proteínas diferentes (3). No entanto as proteínas produzidas variam em função da fase de crescimento da célula e da composição do meio de cultura (1). Com base nessa informação foi realizado o crescimento da cepa "8T_{Blank}" procurando manter as mesmas condições de fermentação e ativação utilizadas no processo de produção do hGH recombinante.

A cepa original, estocada a -80°C , foi semeada em placa de Petri usando o meio LB/Agar com tetraciclina ($12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$), incubada em estufa a 30°C ; após crescimento das colônias, a placa foi estocada a 4°C .

Dois erlemmeyers com 400 mL de meio LB/tetraciclina cada, foram semeados com uma colônia extraída da placa de Petri e incubados sob agitação (300 rpm) a 30°C até atingir aproximadamente 1 u.o. (cerca de 24 horas).

A fermentação ou crescimento bacteriano foi realizada no bioreator contendo 5 litros de meio de cultura (25), onde a partir da adição do inóculo foi feito o acompanhamento do crescimento bacteriano, com controle de pH, agitação, fluxo de ar, porcentagem de oxigênio dissolvido, temperatura, nível de espuma e concentração de glicose. A densidade óptica foi medida a cada hora. Ao fim da fermentação, o meio de cultura foi coletado e acondicionado em banho de gelo, aguardando a extração e purificação das proteínas.

3.3. "Purificação" das ECP₂

O processo da "purificação" das proteínas seguiu as mesmas etapas do hGH. A seqüência foi a mesma até uma fase em que o hGH se encontraria com grau de pureza superior a 90%.

3.3.1. Precipitação com sulfato de amônio (41)

O volume total do choque osmótico foi medido e um volume igual de uma solução saturada de sulfato de amônio preparada a 4 °C, foi adicionado lentamente sob agitação contínua. A solução final resultou 50 % saturada em sulfato de amônio. Após terminada a adição, a agitação continuou por mais uma hora, sendo o precipitado coletado por centrifugação a 10.000 g por 20 minutos.

3.3.2. Purificação em colunas de exclusão molecular e troca iônica

O precipitado foi ressuspensão e aplicado em uma coluna de exclusão molecular (Sephadex G-100; 2,5 x 100 cm). O tampão de corrida utilizado foi o bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0; o fluxo foi ajustado para 40 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Baseado nos dados obtidos em trabalhos anteriores relativos a essa coluna e ao coeficiente de distribuição (K_d) do hGH (6), foi selecionada uma fração denominada de ECP_{2-G100} que deveria conter todo o hormônio, caso o mesmo estivesse presente. Parte dessa fração, 25%, foi utilizada no preparo da coluna de afinidade para purificação da IgG obtida do coelho imunizado e os 75% restantes foram aplicados numa coluna de troca iônica (DEAE - Sepharose CL - 6B) e eluídos em tampão de acetato de amônio 0,01 M, pH 8,0 com um gradiente de NaCl de 0,05 a 0,4 M. As proteínas que eluíram na concentração de NaCl correspondente à eluição do hGH foram coletadas e denominadas ECP_{2-DEAE}. Essas proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (30) e utilizadas na imunização dos coelhos e preparo do padrão interno e das amostras para o controle de qualidade.

4. Preparação das colunas de afinidade

Com a utilização de uma resina de Sepharose 4B ativada mediante CNBr (Pharmacia fine Chemicals, Uppsala, Suécia) foram preparadas colunas de afinidade acoplando as proteínas de interesse, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.1. Coluna de afinidade para purificação de IgG

Dessa forma foram preparadas duas colunas de afinidade: uma com um extrato de proteínas de *E. coli* obtido diretamente do choque osmótico (ECP₁) e outra coluna utilizando proteínas de *E. coli* "purificadas" (ECP_{2-G100}). Para cada coluna foram utilizadas cerca de 5 mg de proteína e 350 mg de resina. Essas colunas foram usadas na segunda etapa de purificação das imunoglobulinas (1, 5).

4.2. Coluna de afinidade para purificação de hGH

Seguindo a mesma técnica preparou-se colunas de afinidade acoplando IgG anti-ECP_{2-DEAE}, obtidas através da purificação do antissoro por precipitação com ácido caprílico. Essas colunas foram preparadas objetivando estudos sobre sua possível utilização na eliminação das ECP residuais na purificação do hGH.

5. Preparação de antissoros

Os antissoros contra ECP₁ (IRMA I) e contra ECP_{2-DEAE} (IRMA II) foram produzidos em coelhos, sendo imunizadas duas fêmeas da linhagem Nova Zelândia. O esquema de imunização foi praticamente o mesmo seguido por Gooding e cols. (23), com a diferença que na primeira inoculação foi utilizada também a via intramuscular. A dose inicial foi de 1600 µg de ECP₁ ou 360 µg de ECP_{2-DEAE}, aplicados em múltiplos sítios, com adjuvante de Freund completo, sendo 50 % das injeções subcutâneas e 50 % intramusculares. A cada 30 dias aplicaram-se ulteriores injeções subcutâneas com a mesma quantidade de material e com adjuvante de Freund incompleto.

6. Análise dos antissoros obtidos

6.1 Marcação das ECP₁ ou ECP_{2-DEAE} com ¹²⁵I

Para montar um RIE capaz de avaliar com boa aproximação o título dos antissoros obtidos, as proteínas de *E. coli* (ECP₁ ou ECP_{2-DEAE}) foram marcadas pela técnica da Cloramina-T (24) modificada (10) utilizando 18,5 - 25,9 MBq (0,5-0,7 mCi) de radioisótopo, 5 µg de proteína em 30 µL de tampão fosfato de potássio 0,3 M, pH 7,4 e 0,8 µg de Cloramina-T em 12 µL de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. A reação procedeu por 5 minutos em t.a., sendo então adicionado 1 µg de metabisulfito de sódio em 5 µL do mesmo tampão fosfato 0,05 M. A purificação do traçador foi realizada por gel filtração em Sephadex G-25 (1,3 x 15 cm; fluxo = 3 mL/h), sendo que a eluição foi realizada com tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 com BSA 1% e azida sódica 0,1%. O traçador foi estocado em freezer a -20 °C. As proteínas marcadas apresentaram atividade específica média de 126 KBq/µg (3,4 µCi/µg), sendo o cromatograma relativo a sua purificação mostrado na Figura 1.

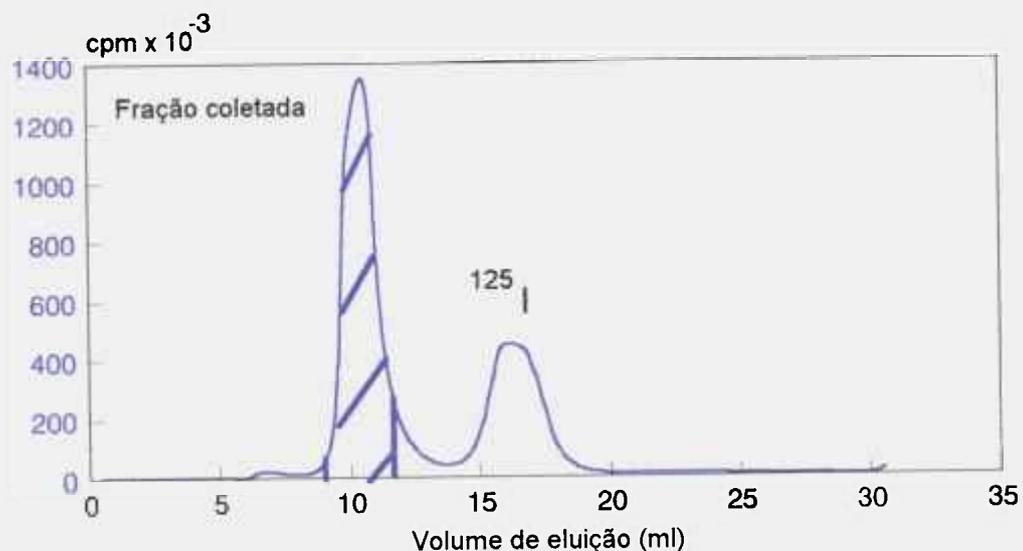


Figura 1: Separação das ECP₁ marcadas com ¹²⁵I (¹²⁵I-ECP₁) do ¹²⁵I livre, utilizando uma coluna de Sephadex G-25 (1,3 x 15,0 cm). Fluxo = 3 mL/h; volume das frações = 1,0 mL).

6.2. Determinação do título aproximado dos antissoros obtidos

A partir do 2^o mês após a imunização os soros foram colhidos periodicamente e submetidos a uma avaliação comparativa do título em função do tempo de imunização por meio de um radioimunoensaio que foi desenvolvido para esta finalidade utilizando ECP₁ ou ECP_{2-DEAE} marcadas com ¹²⁵I. A separação da fração ligada foi feita por precipitação com 2^o anticorpo anti-IgG de coelho.

7. Purificação do antissoro

Entre os soros coletados, os que apresentaram um melhor título frente ao RIE foram purificados por precipitação com ácido caprílico (43) e por afinidade, sendo utilizada a coluna de afinidade acoplada com ECP₁ para purificar a IgG anti-ECP (IRMA I) e coluna de afinidade acoplada com ECP_{2-G100} para purificar a IgG anti-ECP_{2-DEAE} (IRMA II).

8. Marcação da IgG purificada

As imunoglobulinas anti-ECP₁ ou anti-ECP_{2-DEAE} purificadas por precipitação com ácido caprílico e por afinidade foram marcadas com ¹²⁵I e usadas como traçador no IRMA que, como é sabido, é um ensaio baseado na adição de um excesso de anticorpo marcado.

A IgG foi marcada utilizando 50 µg da preparação em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4, pelo método clássico de oxidação química com Cloramina-T (24). Foram utilizados 37 MBq (1 mCi) de ¹²⁵I em aproximadamente 2 µL e 10 µg de cloramina-T em 10 µL do mesmo tampão fosfato, num volume total de reação de 30 µL, obtidos

mediante adição de tampão fosfato 0,5 M. A reação foi interrompida após 30 segundos com a adição de 10 μg de metabissulfito de sódio em 10 μL de fosfato 0,05 M. As condições foram ajustadas para obtenção de um reagente com atividade específica ao redor de 15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (35), que corresponde aproximadamente a 1 átomo de ^{125}I por molécula de IgG.

O produto obtido foi purificado em colunas cromatográficas de filtração em gel de Sephadex G-150 (0,9 x 60 cm; fluxo = 3 mL/h), sendo que a eluição foi realizada com tampão NaH_2PO_4 0,05 M pH 7,4 com soroalbumina bovina (BSA) 1% e azida sódica 0,1%. A estocagem foi realizada a 4°C. Um perfil típico dessa purificação de ^{125}I -IgG é mostrado na Figura 2.

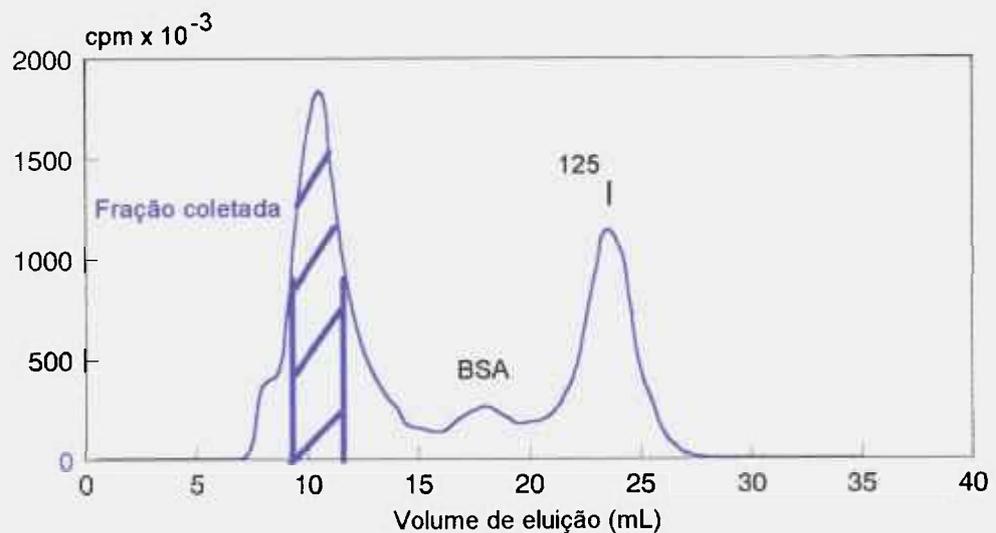


Figura 2: Perfil da purificação de ^{125}I -IgG em coluna de Sephadex G-150 (0,9 x 60,0 cm). Fluxo = 3 mL/h, volume das frações = 0,5 mL.

9. Adsorção de IgG às placas de microtitulação

Para ser usadas como fase sólida foram escolhidas placas de microtitulação da Dynatech (ver materiais), seguindo-se basicamente a metodologia usada por Anicetti e cols. (1). Em cada poço foram incubados 100 μ L de uma solução com 5 μ g/mL de IgG em tampão carbonato 0,01 M, pH 9,6, durante 24 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBST), sendo os sítios que possivelmente não adsorveram IgG bloqueados com 200 μ L de PBS contendo 0,1 % de gelatina e 0,05 % de Tween 20 (PBSTG) e incubando 1 hora em t.a. As placas foram lavadas novamente com PBST e guardadas a 4 °C.

10. Preparo do padrão e amostras de controle de qualidade

As ECP foram diluídas em PBSTG (até uma concentração de 1.000 ng de ECP/mL), aliqüotadas em tubos "eppendorf" e armazenadas a -20 °C para serem usadas na construção da curva padrão, sendo utilizado como dose zero o próprio tampão de ensaio (ligação inespecífica, Bo). Da mesma forma foram separadas alíquotas para serem utilizadas como amostra de controle de qualidade identificadas como CQA , CQB, CQC e CQD, com concentrações estimadas de ECP de 1, 2, 4, e 8 ng por mL, respectivamente.

11. Protocolo do ensaio

O ensaio seguiu basicamente a metodologia descrita por Anicetti (1):

- Aplicar 100 μ l das amostras (desconhecidos, controle de qualidade ou padrão) no poço correspondente, já previamente tratado com IgG.
- Incubar por 24 horas a 4 °C.
- Lavar uma vez com PBST, usando 200 μ l por poço.
- Aplicar 100 μ l de IgG marcada com 125 I, diluída em PBSTG (cerca de 200.000 cpm/poço).
- Incubar por 24 horas a 4 °C.
- Lavar 3 vezes com PBST, usando 200 μ L por poço.
- Recortar cada poço e colocar em um tubo de RIE.
- Medir a radioatividade (cpm) num contador gama calibrado para detectar eventos simples e em coincidência (7), 5 minutos/tubo.

12. Estudos de sensibilidade, precisão e exatidão do ensaio

12.1. Cálculo da sensibilidade

O cálculo da sensibilidade foi baseado na formulação de Rodbard (39), que se baseia em um teste-"t" não pareado ($p=0,05$) realizado comparando-se as respostas relativas à dose zero (ligação inespecífica, B_0) com as respostas relativas à dose experimental mais baixa, significativamente diferente da dose zero. Para cada dose foi utilizado um $n = 8$. Segundo Rodbard, a dose mínima detectável (DMD) é dada por:

$$DMD = \frac{Y_{min} - Y_0}{tg\alpha}$$

sendo que:

$$Y_{min} = Y_0 + t \times s_p \sqrt{\frac{1}{N_0} + \frac{1}{N_1}}$$

$$s_p = \sqrt{\frac{s_0^2 \times (N_0 - 1) + s_1^2 \times (N_1 - 1)}{N_0 + N_1 - 2}}$$

Y_{min} = resposta mínima detectável;

Y_0 = resposta da dose zero;

$tg\alpha$ = tangente da curva em correspondência à dose zero;

t = "t" de Student para nível de significância 95% e $(N_0 + N_1 - 2)$ graus de liberdade;

N_0 = número de medidas da dose zero;

s_0 = desvio-padrão das respostas relativas à dose zero;

N_1 = número de medidas da dose experimental mais baixa;

s_1 = desvio padrão das respostas relativas à dose experimental mais baixa;

12.2. Precisão

Foi realizada uma série de ensaios, cujos dados foram analisados quanto à precisão inter- e intra-ensaio. Os gráficos dos perfis de imprecisão foram obtidos a partir do programa para radioimunoensaio PC/RIA da Agência Internacional de Energia Atômica denominado (IAEA-TECDOC-509).

Outros estudos relacionados à precisão e também à exatidão foram realizados analisando amostras construídas a partir de hGH pituitário, adicionando quantidades conhecidas de ECP_{2-DEAE} (“amostras falsas”).

12.2.1. Preparo das “amostras falsas”

Definimos como “amostras falsas” aquelas preparadas com quantidades conhecidas de ECP_{2-DEAE} e hGH pituitário (livre de ECP), que foram misturados em diferentes proporções de forma a se obter, no final, amostras de 0, 10, 100 e 1000 partes por milhão (ppm) de ECP_{2-DEAE}, em relação à massa de proteína total.

12.3. Exatidão

Pelo fato do IRMA desenvolvido ser específico para a cepa e para o processo utilizado, não existe um padrão ou referência que possa ser usado e, devido à variabilidade e heterogeneidade das possíveis proteínas contaminantes, também seria praticamente impossível usá-lo, de acordo com os critérios aceitos de exatidão. Portanto todo um estudo foi desenvolvido nesse sentido, procurando confirmar a exatidão do método mediante testes de recuperação.

12.3.1. Testes de recuperação

Foram adicionadas quantidades diferentes e conhecidas de ECP_{2-DEAE} em amostras de hGH rec-IPEN e hGH pit-IPEN. A recuperação das diversas alíquotas adicionadas foi avaliada pela relação entre o valor medido no IRMA II, subtraindo-se as ECPs presentes na amostra inicial, e o valor teórico correspondente às ECP_{2-DEAE} adicionadas.

13. SDS-PAGE e "Western Blotting"

Com o objetivo de se conhecer melhor o perfil de distribuição das ECP, assim como fazer uma comparação com os dados quantitativos do IRMA, foram realizados estudos de amostras de ECP_{2-DEAE} e hGH rec-IPEN em SDS-PAGE e "Western Blotting", assim como foi realizada uma análise das diferentes etapas do processo de purificação.

13.1. SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % (com 2 mm de espessura) na presença de 0,1 % de dodecil sulfato de sódio (28), sob condições não redutoras. Durante a corrida eletroforética (4 a 5 horas) a corrente foi de 20 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas utilizando uma solução de metanol a 40% e ácido acético glacial 10%, deixando "overnight" (ON) e revelando com "Coomassie Brilliant Blue R-250". A revelação foi efetuada imergindo o gel fixado em uma solução com "Coomassie Blue R-250" 0,25 %; metanol 45 %; ácido acético 8 %, mantendo sob agitação por aproximadamente 8 horas. A seguir o gel foi descorado em uma solução com metanol 40% e ácido acético glacial 10%, sendo feitas trocas sucessivas , até ser obtida a claridade desejada, por um tempo aproximado de 8 horas. O gel foi conservado em uma solução de glicerol 1 % em água.

Na revelação com nitrato de prata, o gel inicialmente foi lavado por imersão e sob agitação alternando-se uma solução metanol 50 % e água destilada deionizada, o tempo de cada lavagem sendo de aproximadamente 10 minutos (lavando-se por pelo menos 6 vezes). A seguir o gel foi mergulhado em uma solução com NaOH 7,5 %; NH₄OH 1,4 % e nitrato de prata 0,8 % por 15 minutos sob agitação; foi lavado novamente com água destilada e deionizada por 5 minutos e mergulhado na solução reveladora (ácido cítrico 0,005 %; formaldeído 0,05%) sendo agitado manualmente até as bandas serem visualizadas (6 a 8 minutos). Quando necessário adicionou-se

metanol para diminuir a velocidade da reação. Após a revelação, o gel foi lavado 2 vezes ou mais com solução de metanol 50 %, ácido acético 10 % e conservado em metanol 40 %, glicerol 1 %.

TABELA I: Preparação do gel de poliacrilamida 12% para corrida eletroforética.

SOLUÇÕES	GEL DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA volume (mL)	GEL DE SEPARAÇÃO volume (mL)
Acrilamida/Bisacrilamida*	1,40	8,00
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	5,00
SDS 20%	0,05	0,10
Água destilada	6,80	6,80
TEMED**	0,03	0,03
Persulfato de amônio 10%	0,10	0,10

*Solução com 30% de acrilamida e 0,8 % de bisacrilamida em água.

**TEMED = N, N, N', N' tetrametil etilenodiamina

13.2. "Western Blotting"

Para a realização do WB, seguiu-se basicamente a técnica de transferência semi-seca, utilizando o antissoro anti-ECP_{2-DEAE} produzido em coelhos e ¹²⁵I-Proteína A (13, 22, 29, 45).

As amostras para serem analisadas no WB foram submetidas a uma SDS - PAGE e em seguida foi realizada uma transferência semi-seca para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) da firma Biorad, Hercules, CA. E.U.A.. A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se 7 folhas de papel de filtro 3MM pré-umedecido em tampão de transferência (glicina 0,3 %, Tris-base 0,6 %, SDS 0,04 %, metanol 20 %) e em seguida, do polo positivo para o polo negativo, a membrana de PVDF, o gel e mais 7

folhas de papel 3MM pré umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, sendo calculada da seguinte forma: Corrente aplicada (mA) = área (cm²) x 0,85. A transferência foi realizada em 1 hora.

Após a transferência a membrana foi tratada por 10 minutos com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5 % de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico) e incubada por 18 horas em t.a. com 50 mL de antissoro diluído 1:100 em PBS com 5 % de leite em pó. Após a incubação com o antissoro foram realizadas 5 lavagens com PBS-5 % de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS-5 % de leite contendo 200.000 cpm/mL de proteína A (Pharmacia, Uppsala, Suécia) marcada com ¹²⁵I (¹²⁵I-Prot. A). Ao final dessa incubação a membrana foi lavada com PBS contendo 0,01 % de Tween 20 por pelo menos 6 vezes. Na sequência, foi deixada em t.a. até secar e envolvida numa folha transparente de PVC, estando pronta para a autoradiografia. A exposição autoradiográfica utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80 °C, o tempo dependendo da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da ¹²⁵I-Prot A, da afinidade e título dos anticorpos e da riqueza em produto a ser analisado.

14. Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry e cols (30), utilizando-se como padrão proteico a soroalbumina bovina fração V (SIGMA), sendo o intervalo de leitura de 15 a 500 µg de proteínas/mL.

15. Estudo do processo de purificação

Com o objetivo de estudar uma forma prática de eliminação de contaminantes bacterianos do produto final, uma fração de rec-hGH contendo ainda altos níveis de ECP, foi aplicada sucessivamente em 3 colunas de afinidade de 1 mL cada, tendo como ligante IgG anti-ECP_{2-DEAE} purificada por precipitação com ácido caprílico, sendo coletadas amostras após cada coluna para quantificação no IRMA II.

RESULTADOS

1. IRMA I

1.1. Análise dos antissoros obtidos após imunização de coelhos com proteína total de *E. coli* de choque osmótico (ECP₁)

Os dois coelhos imunizados apresentaram resultados muito semelhantes. Na Figura 3 podemos observar as curvas de título usando como traçador ¹²⁵I-ECP₁; os valores foram obtidos para diferentes soros, coletados de um mesmo animal, desde o tempo 0 até 100 dias de imunização. A ligação máxima apresentou um valor relativamente baixo em porcentagem, provavelmente por se tratar de uma imunização, marcação e curva de ligação relativa a múltiplos antígenos.

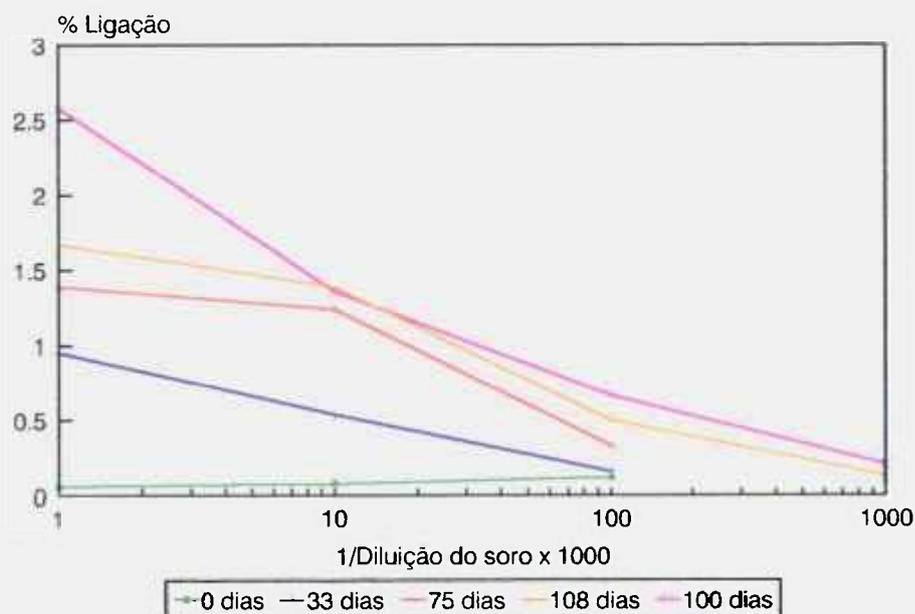


Figura 3: Curvas de título para antissoros obtidos de um mesmo animal, imunizado com ECP total de choque osmótico. São analisados soros coletados em diferentes intervalos após a imunização.

1.2. Ensaio baseado na utilização de proteína total de choque osmótico da cepa RRI (ECP_1).

Os primeiros estudos realizados no IRMA I utilizaram como padrão a proteína total de choque osmótico obtida da cepa RRI não produtora de hGH e que não contém o vetor plasmídico de expressão desse hormônio. Os anticorpos utilizados foram IgG purificadas derivadas da imunização contra estas proteínas totais. Um exemplo desse ensaio pode ser visto na Figura 4.

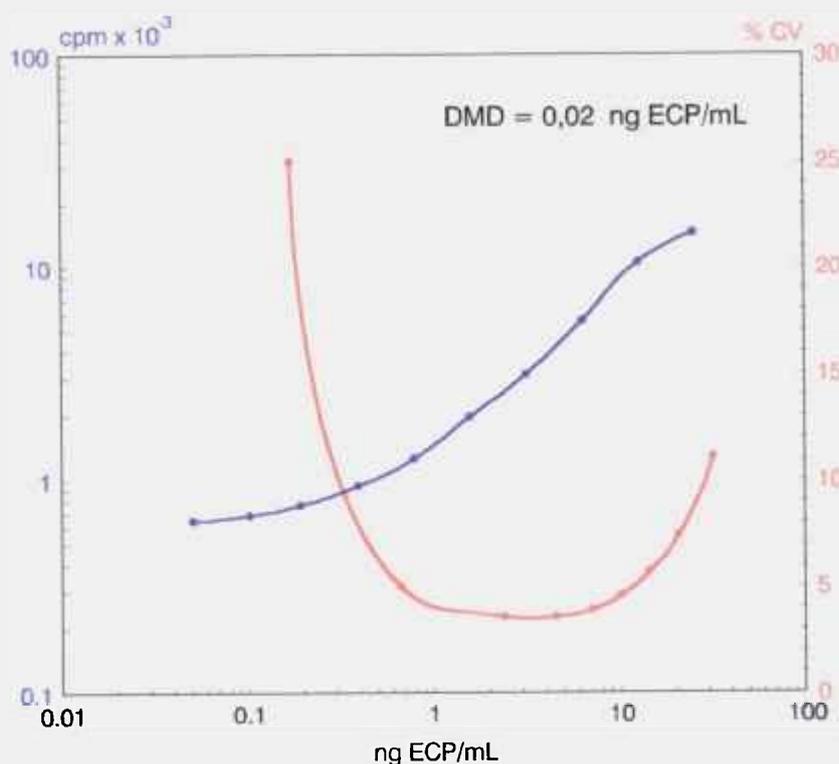


Figura 4: Exemplo de curva dose-resposta e perfil de imprecisão no IRMA I, tendo como padrão a proteína total de choque osmótico obtida de uma cepa RRI não produtora de hGH, e como anticorpos as IgG derivadas da imunização de coelhos com ECP_1 .

Foram analisados produtos derivados de uma cepa bacteriana que não contém o vetor de expressão do hGH, usando choque osmótico total (ECP_1) ou o choque "purificado" em diferentes colunas: troca iônica (ECP_{1-DEAE}) e troca iônica

seguida de exclusão molecular (ECP_{1-G100}), assim como extratos purificados do hormônio recombinante. Um resumo dos resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1: Análise de diferentes amostras no IRMA I, usando como padrão um choque osmótico total sem hGH, quantificado pelo método de Lowry e cols. (30)

AMOSTRA	F.D. * ¹	valor lido na curva (ng/mL)	ECP μg/mL IRMA I	proteína μg/mL (Lowry)	ppm
choque osmótico sem hGH A	4 x 10 ⁵ 8 x 10 ⁵ 16 x 10 ⁵	2,80 1,40 0,76	1.120 1.120 1.216	1.537	-
choque osmótico sem hGH purificado em DEAE	4.200 8.400 16.800	0,82 0,64 0,44	3,4 5,4 7,4	178	-
choque osmótico sem hGH purificado em DEAE e G-100	160 320 640	0,30 0,21 0,13	48,2 x 10 ⁻³ 67,2 x 10 ⁻³ 83,2 x 10 ⁻³	8	-
extrato de hGH purificado (P9) (129 μg hGH/mL)	32 64 128 256 512	0,90 0,50 0,33 0,20 0,12	28,8 x 10 ⁻³ 32,0 x 10 ⁻³ 41,6 x 10 ⁻³ 51,2 x 10 ⁻³ 58,9 x 10 ⁻³	- - - - -	223 248 252 398 458

*¹ F.D. = Fator de diluição das amostras

Com base na Tabela 1 podemos observar, ao fazer uma comparação entre proteína total medida pelo método de Lowry e cols. (30) e a proteína medida pelo IRMA I, que as amostras de choque osmótico total apresentaram valores bastante próximos nos dois métodos, demonstrando portanto uma certa exatidão de

determinação, enquanto que as amostras dos choques purificados apresentaram valores muito menores no IRMA. Uma outra observação importante é que tanto as amostras de choque purificado como o extrato de hGH não apresentaram linearidade, uma vez que os valores em ng de ECP/mL, e consequentemente em ppm, tendem a aumentar com a diluição, o mesmo não ocorrendo com as amostras de choque osmótico. Isto nos levou a pensar que na incubação das amostras purificadas não existia o necessário excesso de anticorpo com relação a algumas das proteínas contaminantes, produzindo este, por nós denominado, "efeito diluição".

1.3. Ensaio baseado na utilização de um padrão de ECP₁ "purificadas" (ECP_{1-G100})

Com a intenção de minimizar os problemas observados, foi testado o uso de um padrão de ECP₁ "purificadas" em colunas de exclusão molecular Sephadex G-100 (ECP_{1-G100}), para quantificar de forma mais fiel as prováveis proteínas contaminantes do produto final. O resultado foi um ensaio bem menos sensível, conforme pode ser visto na Figura 5. Isto é obvio, pois a sensibilidade é determinada pelo título e constante de afinidade dos anticorpos que, neste caso, tinham sido produzidos contra uma amostra em que a concentração destas "proteínas purificadas" era muito pouco representativa.

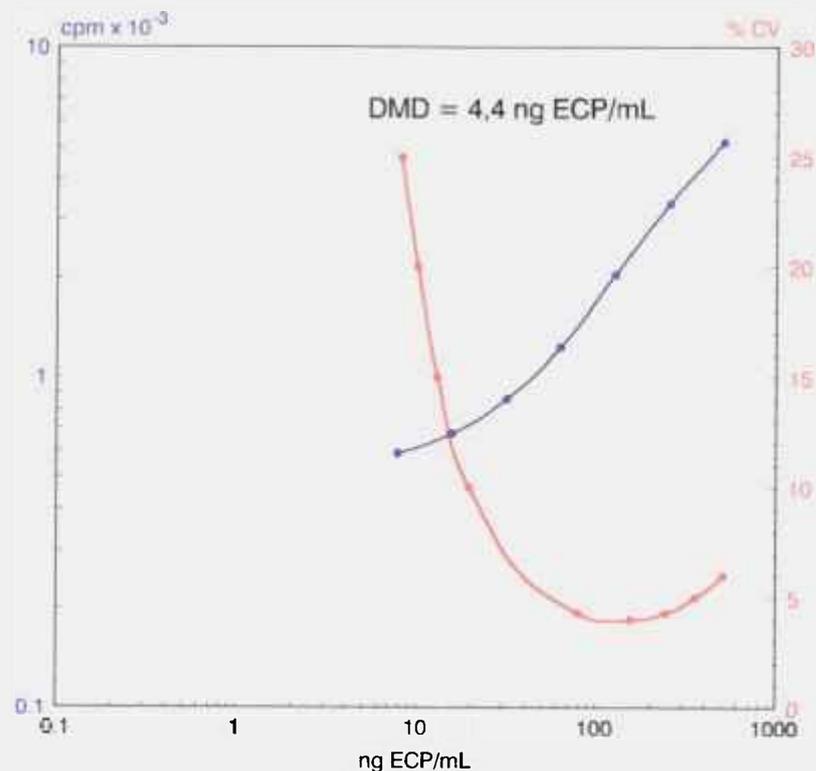


Figura 5: Exemplo de curva dose-resposta e perfil de imprecisão no IRMA I, tendo como padrão proteínas de *E. coli* "purificadas" em colunas de troca iônica, DEAE e de exclusão molecular, Sephadex G-100, (ECP_{1-G100}) e como anticorpos as IgG derivadas de imunização com ECP₁.

Analisando os dados da Tabela 2 relativos a este segundo sistema analítico, verificamos que o extrato de hGH purificado (P9) apresentou desta vez cerca de 16.000 ppm, uma concentração aproximadamente 64 vezes maior dos aproximados 250 ppm, não lineares, observados quando a mesma amostra foi analisada conforme apresentado na Tabela 1. As amostras mais impuras dessa vez apresentaram valores bem maiores que os medidos pelo método de Lowry. Com base nesses resultados ficou caracterizada a importância de se obter um soro mais específico para as proteínas contaminantes que acompanham o produto até as etapas finais da purificação. Só assim é possível obter um ensaio suficientemente sensível e exato, válido porém somente para amostras purificadas de acordo com o

processo escolhido. De fato, resultados obtidos posteriormente com o IRMA II mostraram que as amostras P9 e P18 contém quantidades de ECP bem maiores daquelas encontradas com o IRMA I, mesmo com a utilização do padrão ECP_{1-G100}.

Tabela 2: Análise de diferentes amostras no IRMA I, usando um padrão de ECP_{1-G100}, quantificado pelo método de Lowry.

AMOSTRA	F.D.* ¹	valor lido na curva (ng/mL)	ECP µg/mL IRMA I	proteína µg/mL (Lowry)	ppm
choque osmótico sem hGH	5 x 10 ⁶	24,0	120.000	1.537	-
	10 x 10 ⁶	8,2	82.000		
choque osmótico sem hGH purificado em DEAE	16.000	40,0	640	178	-
	32.000	12,3	394		
extrato de hGH purificado (P9) (129 µg hGH/mL)	32	65,0	2,1	-	16.174
	64	33,0	2,1	-	16.423
	128	11,0	1,4	-	10.949
extrato de hGH purificado (P18) (1000 µg hGH/mL)	1	< DMD* ²	< DMD	-	< DMD

*¹ F.D. = Fator de diluição das amostras

*² DMD = Dose mínima detectável

2. IRMA II

2.1. Preparação da cepa bacteriana contendo o vetor de expressão sem o gene do hGH

Enquanto no IRMA I tinha sido utilizada a mesma cepa (RRI) usada na produção do hGH sem conter o vetor de expressão, no IRMA II resolveu-se também utilizar essa cepa, porém contendo o vetor de expressão para o hGH do qual tivesse sido deletado este gene específico. O resultado seria a obtenção de uma mistura de proteínas contaminantes mais próxima da situação real.

A partir da cepa 8T foi feita a extração do DNA plasmídico relativo ao vetor de expressão: um plasmídio circular dupla fita com 4753 pares de bases (pb), que contém 3 sítios para a enzima Eco RI. Um esquema simplificado desse vetor pode ser visto na Figura 6.

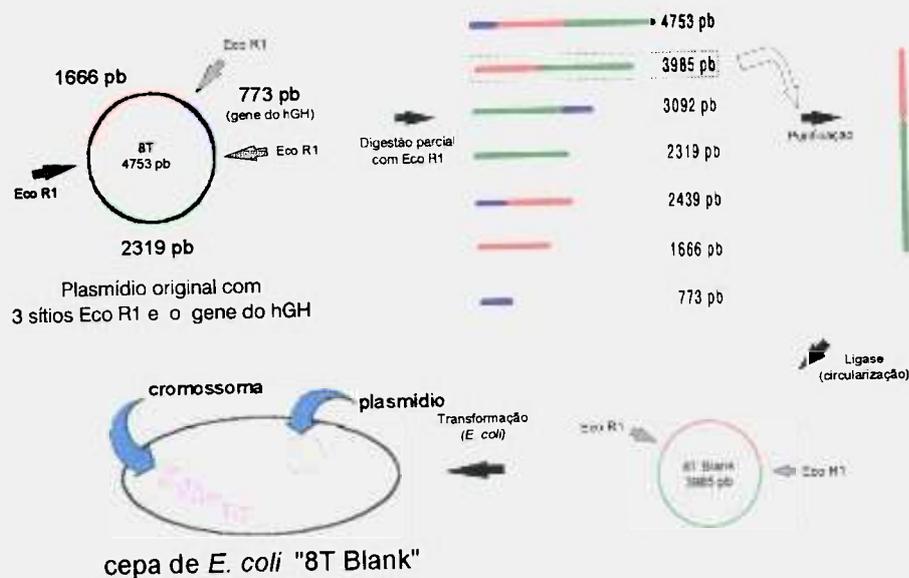


Figura 6: Esquema simplificado para obtenção da cepa não produtora de hGH (8T_{Blank}) a partir do vetor de expressão do hGH.

Foi realizada uma digestão parcial com a enzima Eco RI, dirigida à obtenção da maior quantidade possível da banda de 3985 pb (2319 + 1666), correspondente ao plasmídeo sem o segmento de DNA do hGH. Foram feitos alguns testes usando como variáveis o tempo e a temperatura de incubação, chegando-se à conclusão que a condição mais favorável seria incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (t.a.) (33), usando aproximadamente 20 unidades de enzima para 1,5 µg de DNA, em 20 µL de volume de reação. A amostra digerida parcialmente foi aplicada em gel de agarose e teve a banda correspondente a 3985 pb extraída e purificada pelo kit "Sephaglas Bandprep" (Pharmacia, Uppsala, Suécia), obtendo-se no final aproximadamente 60 ng de DNA. Com esse material foi feita a reação de ligase (circularização do plasmídeo), a transformação da cepa RRI e a clonagem em meio seletivo, obtendo-se sete colônias. É esperado que o segmento de DNA de 3985 pb com duas extremidades Eco RI circularize facilmente na presença da enzima ligase, gerando um plasmídeo com as mesmas características do original (mesmo promotor, origem de replicação, resistência à tetraciclina etc.), faltando apenas o gene do hGH.

Para confirmar que a nova construção está correta o plasmídeo obtido deve apresentar 2 sítios Eco RI: aquele que não foi digerido e um outro que foi recriado no lugar do gene extraído. Uma digestão com essa enzima deve portanto resultar em 2 bandas, uma com 1666 e outra com 2319 pb derivadas de um plasmídeo de 3985 pb sem o segmento de DNA correspondente ao gene do hGH. A análise do DNA plasmídico extraído dessas colônias em gel de agarose após digestão com Eco RI é mostrada na Figura 7A. Somente as colônias 1, 2 e 7 apresentaram as bandas esperadas (1666 e 2319 pb).

Com base nesses resultados foi escolhido um dos plasmídios, no caso o da colônia 2, para testes de confirmação utilizando outras enzimas e o plasmídeo derivado da cepa 8T (Figura 7B). Utilizando a enzima Eco RI, se observa a presença da banda correspondente ao gene do hGH (772 pb) apenas no plasmídeo da cepa 8T, ao contrário das bandas de 1666 e 2319 pb presentes nos dois plasmídios

relativos às cepas 8T e colônia 2. A enzima Ssp I que lineariza as duas amostras possibilitando a comparação direta do tamanho dos dois segmentos, confirma a diferença esperada, ou seja, a nova construção é menor em cerca de 750 pb com relação ao plasmídeo original (amostras 4 e 5). Por fim a enzima Hind III, que no caso da nova construção apresenta dois sítios de restrição bem próximos dos sítios Eco RI, confirma a obtenção de bandas quase idênticas às obtidas com Eco RI.

Após esses resultados foi preparado um inóculo da nova cepa obtida e as bactérias resultantes foram aliquotadas, estocadas a -80° C e identificadas como cepa "8T_{Blank}".

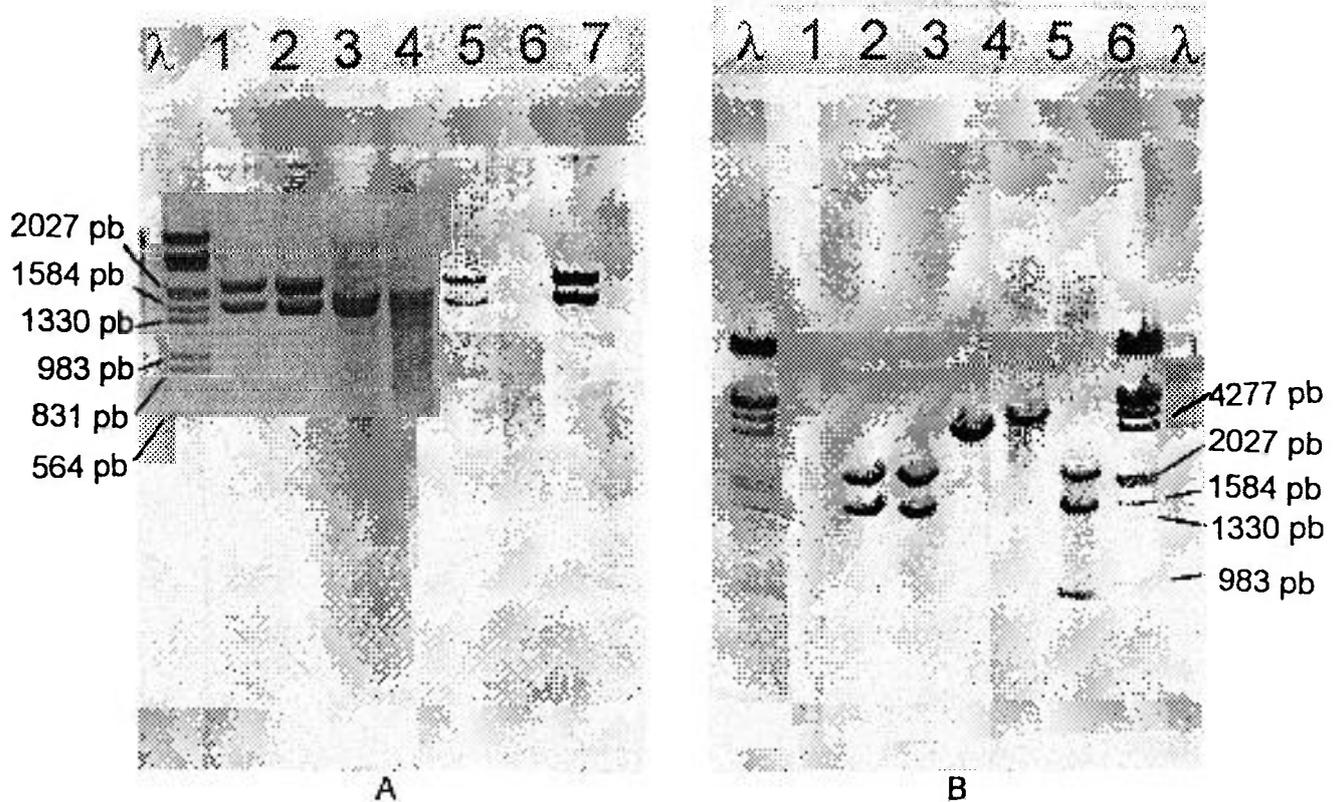


Figura 7:

A - Análise das amostras de DNA plasmídico extraído das colônias transformadas com o vetor "8T_{Blank}", após digestão com Eco RI. Nas amostras 1, 2 e 7 são observadas as duas bandas esperadas, com 1666 e 2319 pb. O padrão de tamanho molecular (λ) é um DNA de bacteriófago λ digerido com Eco RI e Hind III. A amostra 5 corresponde ao DNA da colônia 5 digerido com Eco RI, onde foi observada a presença de uma outra banda com ~ 750 pb: o gene correspondente ao hGH.

B - O λ corresponde ao padrão de tamanho molecular. As amostras 1, 2, 3 e 4 correspondem ao DNA plasmídico da colônia 2 não digerido, digerido com Eco RI, com Hind III e com Ssp I respectivamente. As amostras 5 e 6 correspondem ao DNA plasmídico da cepa 8T linearizado com a enzima Ssp I (5) e digerido com Eco RI (6).

2.2. Fermentação

A partir da cepa "8T_{Blank}" foi feita uma fermentação e os resultados foram comparados com dados obtidos da cepa 8T, usada na produção do hGH (Figura 8). As curvas apresentaram uma grande diferença quanto à densidade óptica (A_{600}) máxima atingida. A cepa 8T atingiu uma $DO_{máx} = 12$ u.o. (unidades ópticas) enquanto a cepa "8T_{Blank}" uma $DO_{máx} = 19$ u.o.. Isso pode ser explicado pelo dispêndio maior de energia e metabólitos necessários para a produção de uma proteína sem nenhuma utilidade para essa bactéria, resultando num menor crescimento da cepa que produz hGH (8T).

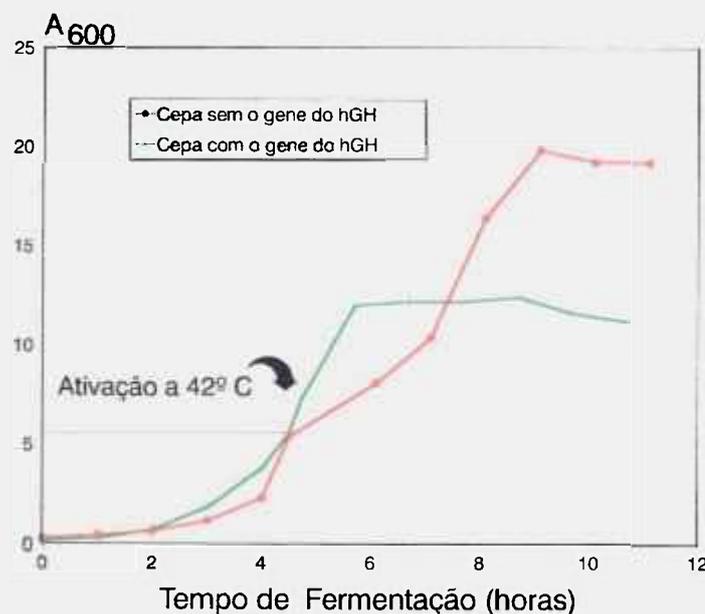


Figura 8: Comparação do crescimento das duas cepas de *E. coli* com e sem o gene do hGH. As condições foram as mesmas nos dois casos: fermentação inicial a 30° C e ativação do promotor aumentando a temperatura para 42° C quando a A_{600} atingiu 5,5 unidades ópticas.

2.3. "Purificação" das ECP₂

A partir do material obtido da fermentação da cepa "8T_{Blank}" foi realizada a extração das proteínas presentes no espaço periplasmático mediante "choque

osmótico" e subsequente precipitação por sulfato de amônio. O precipitado foi ressuspenso em 35 mL de água destilada deionizada e passado por coluna de exclusão molecular (Sephadex G-100) com o mesmo tampão de corrida, fluxo e volume de coleta já padronizados para a purificação do hGH.

Com base no coeficiente de distribuição (K_d) do hGH (6), foi definida uma fração cromatográfica correspondente às proteínas com peso molecular próximo de 22 k Dalton (Figura 9).

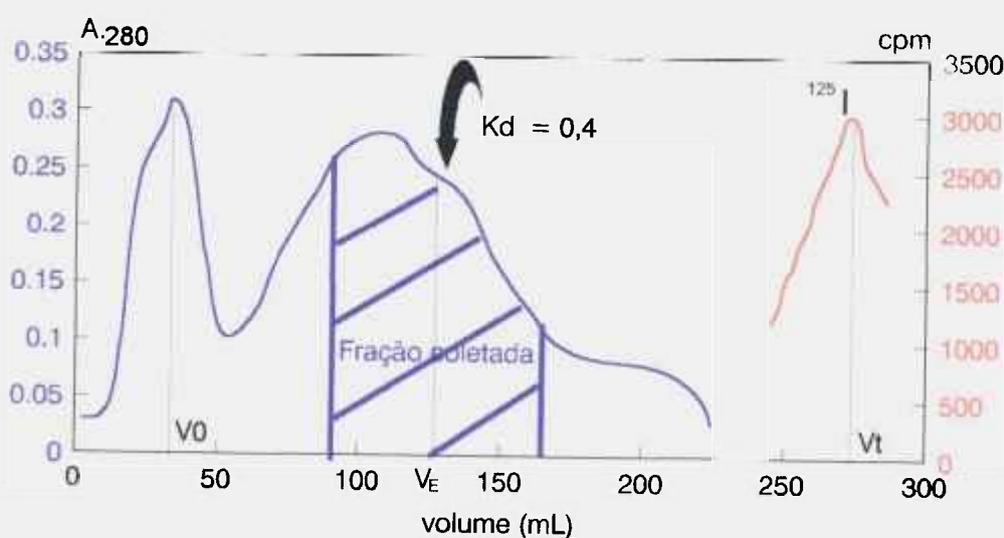


Figura 9: Etapa de "purificação" das ECP na coluna de exclusão molecular Sephadex G - 100 (2,5 x 100 cm). Fluxo = 40 mL/h, volume das frações = 3 mL.

O volume da fração coletada foi determinado com base na relação:

$$K_d = \frac{V_E - V_0}{V_t - V_0} = 0,4,$$

correspondendo ao $V_E \pm 15\%$.

Essas proteínas denominadas de ECP_{2-G100} por sua vez foram aplicadas numa coluna de troca iônica (DEAE Sepharose CL - 6B) com gradiente de NaCl,

sendo coletada uma fração final maior daquela que normalmente contém as proteínas que eluem na mesma concentração de NaCl que elui o hGH.

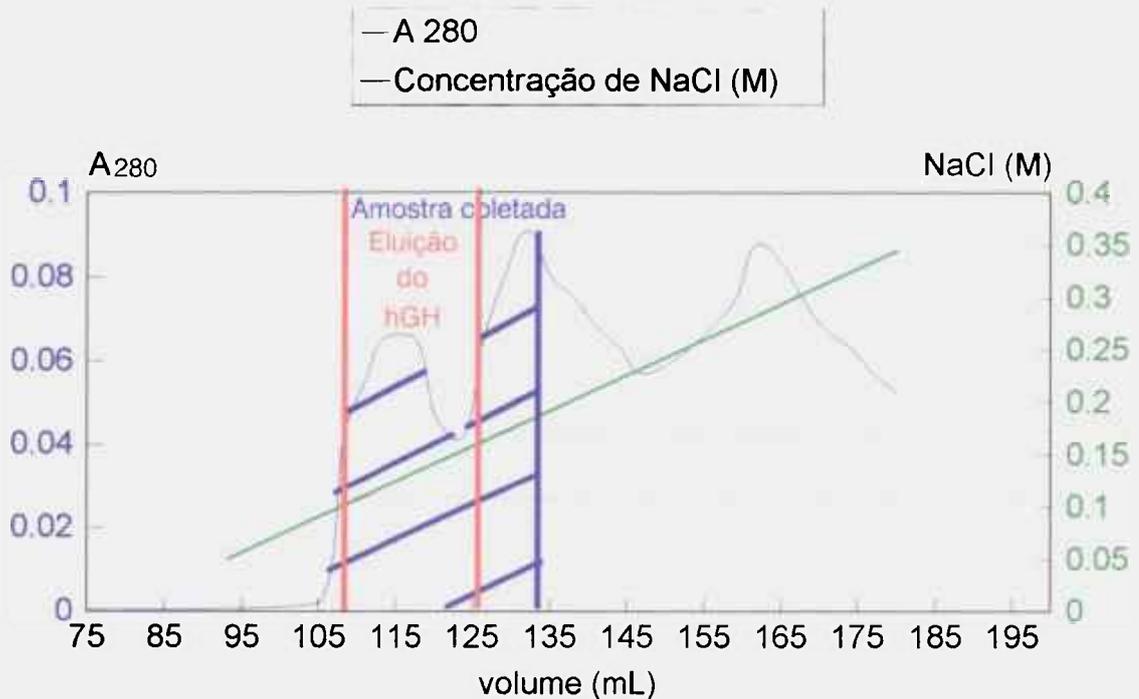


Figura 10: Etapa de purificação das ECP na coluna de troca iônica DEAE Sepharose CL - 6B, (1,2 x 6,0 cm). Fluxo = 60 mL/h, volume das frações = 3 mL).

A esse ponto obtivemos um grupo de proteínas semelhantes ao hGH, tanto no tamanho molecular como na carga, que constituem os mais prováveis contaminantes de nossos lotes.

Nessa etapa de purificação o hGH apresentaria um grau de pureza superior a 90%, conforme demonstrado subsequentemente. Assim, essas proteínas designadas de ECP_{2-DEAE} (correspondentes a 0,3% das proteínas presentes no choque inicial), foram usadas para a imunização dos coelhos e preparo do padrão para o IRMA II.

Durante todas as etapas foram coletadas amostras cujas proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e cols. (30), os resultados sendo apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Redimentos das várias etapas de purificação do choque osmótico obtido a partir da cepa "8T_{Blank}".

Etapa de purificação	volume (mL)	proteína (µg/mL)	proteína total (mg)	proteína total (%)
Choque Osmótico	450,0	2350,0	1057,5	100,0
precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄	35,0	1800,0	63,0	6,0
Sephadex G-100 (exclusão molecular)	82,0	219,2	18,0	1,7
DEAE - Sepharose (troca iônica)	32,5	91,4	3,0	0,3

2.5. Análise dos antissoros obtidos após imunização de coelhos com ECP_{2-DEAE}

Na Figura 11 podemos observar as curvas de título obtidas mediante um RIE usando como traçador ¹²⁵I-ECP_{2-DEAE}. Foram analisados diferentes soros coletados de um mesmo animal desde o tempo 0 até 4 meses de imunização. As curvas de título de um 2º coelho foram muito semelhantes (dados não apresentados). Apesar da ligação máxima novamente não ser muito alta (5%), observa-se uma diferença significativa entre a ligação (inespecífica) apresentada pelo soro antes (T = 0) e aquela específica após a imunização (T > 70 dias).

Parece ocorrer um certo aumento do título com o tempo, sendo dada preferência à utilização dos soros obtidos após 100 dias ou mais de imunização que,

como já mencionado, deveriam ser mais representativos de todas as proteínas presentes.

Neste ensaio foi também incluído um antissoro anti-ECP da WHO (84/658) que, mesmo tendo sido produzido contra outra cepa, poderá ser usado no futuro como preparação interna de referência.

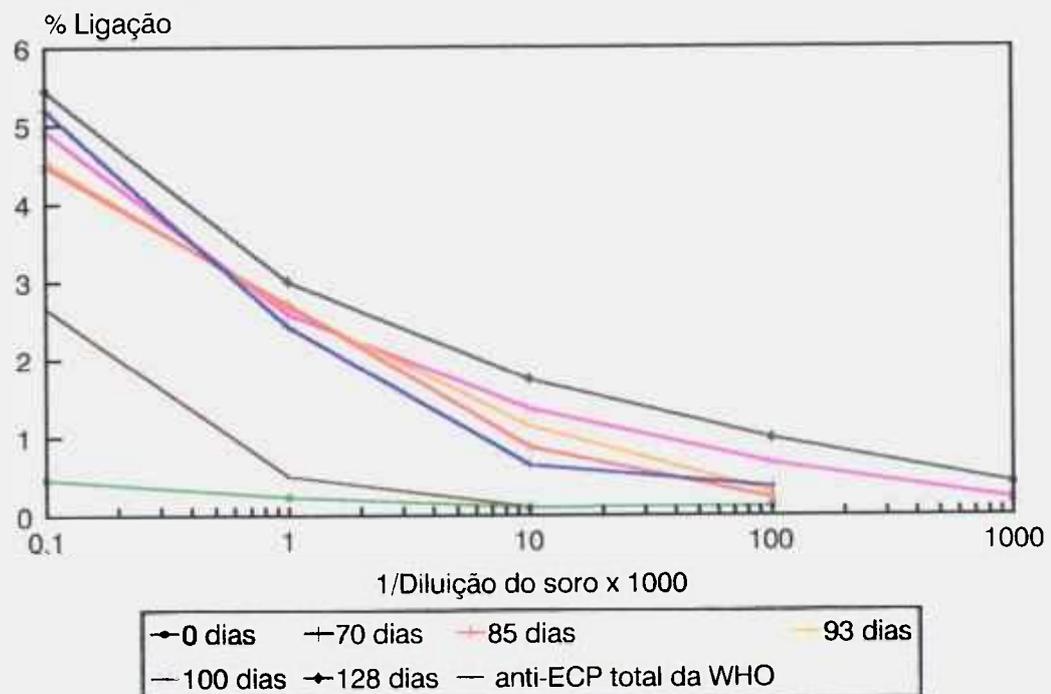


Figura 11: Curva de título para soros de um mesmo animal imunizado com ECP "purificadas" seguindo as primeiras etapas utilizadas para o hGH. São analisados soros coletados após diferentes dias de imunização. Uma amostra de antissoro anti-ECP total da WHO(84/658) também foi analisada.

2.5. Validação do ensaio

2.5.1. Sensibilidade

Utilizando uma solução de ECP_{2-DEAE} com 1 µg de proteínas por mL, foram feitas diluições seriadas a partir de 10 ng/mL até 0,156 ng de ECP/mL e utilizadas para a construção da curva padrão com duplicatas em cada ponto. As ligações

inespecíficas (0 ng ECP/mL) são da ordem de 200 cpm (0,1 %). O perfil de uma curva típica pode ser visto na Figura 12.

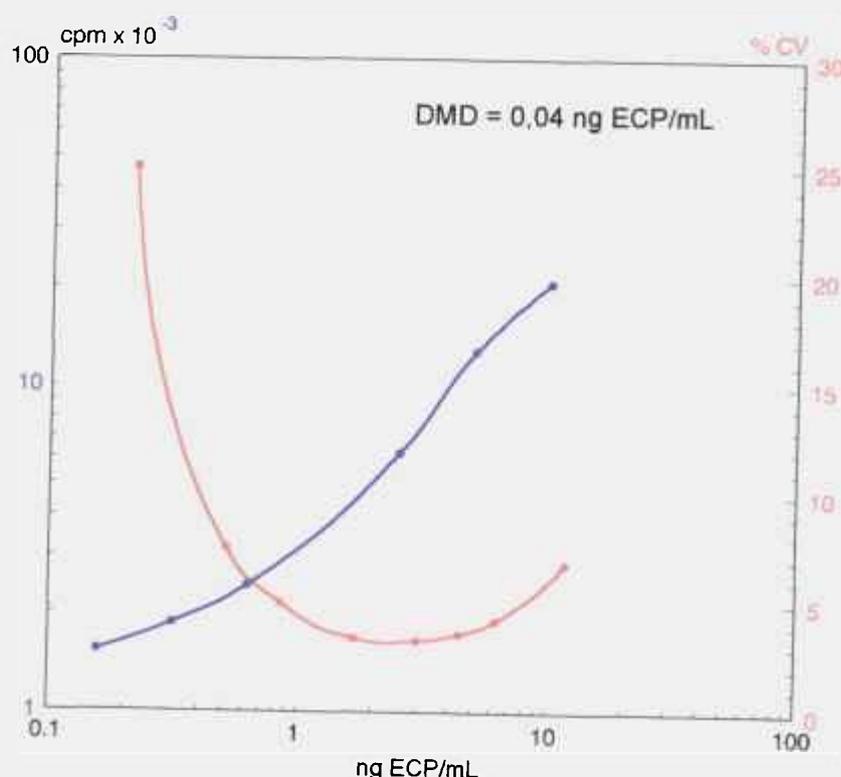


Figura 12: Exemplo de curva dose-resposta e respectivo perfil de imprecisão intra-ensaio para o IRMA II usando como padrão ECP_{2-DEAE} e como anticorpos IgG derivadas da imunização de coelhos com as mesmas ECP_{2-DEAE} .

Com base no perfil de imprecisão apresentado na Figura 12 e sendo adotada uma região de corte de 10 ppm, a concentração mais adequada de hGH para ser analisada deverá ser da ordem de 250 μ g hGH/mL, onde 10 ppm corresponderiam a 2,5 ng de ECP/mL, dose que estaria em uma região ótima de leitura na curva (CV < 10%). A sensibilidade do ensaio em ppm depende da concentração de hGH na amostra e da dose mínima detectável (DMD). Considerando uma concentração de hGH de 1 mg/mL e uma DMD de 0,03 ng/mL (Figura 13), a sensibilidade do ensaio em ppm é calculada em 0,03 ppm.

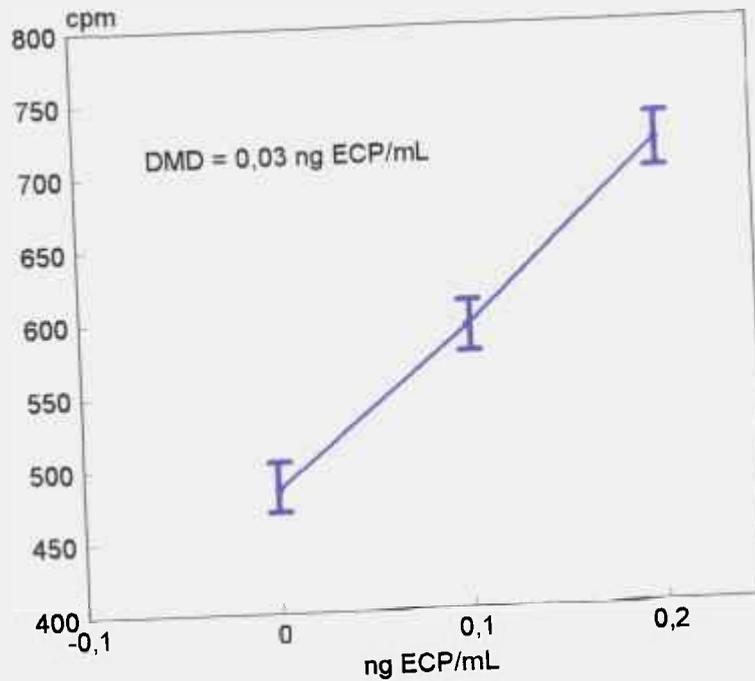


Figura 13: Região de cálculo da sensibilidade do IRMA II com base no método da dose mínima detectável (39). As barras representam ± 2 desvios padrão, para $n = 8$.

2.5.2. Precisão

Dados sobre a precisão são mostrados nas Tabelas 4 e 5 e na Figura 12 (perfil de imprecisão). O estudo foi realizado com amostras de controle de qualidade preparadas a partir das ECP_{2-DEAE} sendo denominadas CQA, CQB, CQC e CQD com concentrações conhecidas de 1, 2, 4 e 8 ng de ECP por mL, determinadas pelo método de Lowry e cols. (30).

Tabela 4: Estudo de precisão intra-ensaio, analisando amostras em diferentes pontos da curva, n = 8 replicatas para cada amostra.

	CQA (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQC (ng/mL)	CQD (ng/mL)
valor nominal	1,00	2,00	4,00	8,00
valor médio	0,94	2,65	4,50	10,00
desvio padrão	0,04	0,15	0,27	0,47
CV (%)	4,5	6,0	6,1	4,7

Tabela 5: Estudo da precisão inter-ensaio (n = 5 ensaios independentes) com duplicatas intra-ensaio de cada ponto.

	CQA (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQC (ng/mL)	CQD (ng/mL)
valor nominal	1,00	2,00	4,00	8,00
valor médio	1,04	2,07	4,24	8,31
desvio padrão	0,07	0,22	0,35	1,17
CV (%)	6,4	11,0	8,3	14,0

Considerando que neste tipo de ensaio as amostras controle de qualidade deveriam mais propriamente conter hGH, simulando exatamente a condição das amostras desconhecidas, foi também realizado um estudo de precisão utilizando amostras controle de qualidade preparadas a partir de hGH pituitário ao qual foram adicionadas quantidades diferentes de ECP (amostras "falsas"). Isto permitiu também, juntamente com um controle de precisão, um primeiro tipo de controle da exatidão. Os resultados relativos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Análise das “amostras falsas”.

valor nominal (ppm)	Valores determinados (ppm)				média	desvio padrão	CV (%)
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4			
0	< DMD	< DMD	< DMD	< DMD	< DMD	-	-
10	10,8	9,5	7,4	11,1	9,7	1,7	17,4
100	89,4	102,5	75,6	128,0	98,9	22,3	22,6
1000	1092	1192	968	1384	1.159,0	175,8	15,2

2.5.3. Linearidade

A demonstração da linearidade de resposta é um dos requisitos principais para a validação desse tipo de ensaio, especialmente considerando os resultados obtidos com o IRMA I, que evidenciaram em muitos casos que não estávamos na presença de excesso de anticorpo para todas as proteínas, uma condição necessária neste esquema de ensaio. Para testar se essa condição é respeitada, vários lotes de hGH recombinante foram analisados em diluições seriadas. Os resultados, derivados de um ensaio realizado especificamente para esta finalidade, são mostrados na Tabela 7, onde os valores colocados entre parênteses indicam a falta de linearidade, ou seja, na diluição utilizada o anticorpo não está em excesso para todas as proteínas.

Tabela 7: Análise da linearidade intra-ensaio em diferentes lotes de hGH recombinante, utilizando IRMA II

Fator de diluição	concentração de ECP (ppm)						
	P18	P19	P20	P21A	P21B	P22	P22R
1	540	(56000)	52800	(11300)	65600	(20000)	(190)
2	580	72000	51200	12200	62400	(28000)	310
4	640	72000	52800	12500	68800	34400	344
8	432	75200	-	12200	-	33600	336
\bar{X}	548	73066	52267	12300	65600	34000	330
DP	88	1847	924	173	3200	566	18
CV (%)	16	2,5	1,8	1,4	4,9	1,7	5,4

2.5.4. Exatidão

2.5.4.1. Teste de recuperação

A obtenção de uma exatidão satisfatória é, com certeza, um dos problemas principais deste tipo de ensaio em que, além de estarmos medindo uma mistura heterogênea de diferentes componentes proteicos, não podemos facilmente ter nenhuma confirmação do valor real mediante comparação, inter ou intra-laboratorial, baseada em metodologia diferente. Por esta razão foram realizados dois estudos de recuperação. No primeiro foram adicionadas quantidades conhecidas de ECP_{2-DEAE} , determinadas pelo método de Lowry, a uma amostra de hGH rec-IPEN e no segundo, as mesmas quantidades de ECP_{2-DEAE} foram adicionadas a amostras de hGH pituitário também extraído e purificado no IPEN (pit-IPEN), Tabelas 8 e 9. As ECP_{2-DEAE} adicionadas foram as mesmas utilizadas na construção da curva padrão.

Tabela 8: Estudo da recuperação de ECP adicionadas em amostras de hGH rec - IPEN resultando em conteúdo de aproximadamente 8.000 - 20.000 ppm.

hGH rec - IPEN ($\mu\text{g/mL}$)	ECP adicionada (ng/mL)	ECP medida (ng/mL) (ppm)		Recuperação (%)
1,0	0	7,9	7900	-
1,0	1,0	8,6	8600	70
1,0	2,5	10,2	10200	92
1,0	5,0	13,0	13000	102
1,0	10,0	17,6	17600	97
0,5	0	4,8	9600	-
0,5	0,5	5,4	11000	120
0,5	1,3	6,2	12340	110
0,5	2,5	7,7	15400	116
0,5	5,0	10,1	20200	106

Na Tabela 8 podemos observar os resultados obtidos no estudo da recuperação. É interessante observar que a quantidade de ECP adicionada é da mesma ordem do conteúdo intrínseco em ECP da amostra original, o que aumenta a confiança relativa à exatidão neste nível de determinação. Lembramos, porém, que o conteúdo intrínseco não possui, necessariamente, a mesma composição das ECP adicionadas.

Tabela 9: Estudo da recuperação de ECP adicionadas em amostras de hGH pit-IPEN.

hGH pit - IPEN ($\mu\text{g/mL}$)	ECP adicionada (ng/mL)	ECP medida (ng/mL) (ppm)		Recuperação %
0	0,0	< DMD	< DMD	-
0	1,0	1,08	-	108
0	2,5	2,90	-	116
0	5,0	5,60	-	112
0	10,0	11,1	-	111
250	0,0	< DMD	< DMD	-
250	1,0	1,19	4,76	119
250	2,5	2,83	11,32	113
250	5,0	5,91	23,64	118
250	10,0	11,18	44,72	112
500	0,0	< DMD	< DMD	-
500	1,0	1,14	2,28	114
500	2,5	2,76	5,52	110
500	5,0	5,90	11,80	118
500	10,0	11,27	22,54	113
1000	0,0	< DMD	< DMD	-
1000	1,0	1,16	1,16	116
1000	2,5	3,11	3,11	124
1000	5,0	5,80	5,80	116
1000	10,0	10,33	10,33	103
2000	0,0	< DMD	< DMD	-
2000	1,0	1,17	0,59	117
2000	2,5	2,99	1,50	112
2000	5,0	5,48	2,74	110
2000	10,0	9,71	4,86	97

Na Tabela 9, foram analisadas amostras com quantidades de ppm conhecidas, simulando extratos purificados. A determinação dessas amostras funciona como um teste de especificidade, confirmando-se a não interferência do hGH presente no ensaio e também de exatidão, pois se refere a amostras simuladas

de conteúdo conhecido, determinado por outro método. Infelizmente todos estes estudos de exatidão apresentam uma grande limitação: o fato que as ECP adicionadas são as mesmas usadas na construção da curva padrão, mas não correspondem necessariamente à mesma distribuição em ECP presente nas preparações em análise. Na Tabela 9 temos também uma confirmação da sensibilidade do ensaio que na presença de hGH, pode facilmente medir quantidades inferiores a 1 ppm.

3. Avaliações da exatidão em comparação com a análise por "Western Blotting"

Para poder comparar estas determinações por IRMA com aquelas derivadas de um método diferente, foi realizado um WB utilizando o soro contra ECP_{2-DEAE}, no qual foram analisados diferentes extratos de hGH recombinante (Figura 14). O método chegou a detectar quantidades menores que 5 ng de ECP, demonstrando ser útil para as análises qualitativa e com uma certa aproximação também quantitativa. Apesar de ser um método relativamente impreciso, também pode ser usado numa ulterior avaliação de exatidão e no acompanhamento da eliminação das impurezas durante o processo de purificação. De fato avaliamos aproximadamente que, mesmo com as limitações quantitativas próprias do WB, a amostra 1 possui ECP < 5 ng no volume de 40 µL aplicado ao gel, o que corresponderia a uma contaminação em ECP < 10.000 ppm, confirmando dentro de uma certa aproximação, o valor de 4000 ppm já determinado mediante IRMA. Também a amostra 2 pelo WB apresentaria entre 20-30 ng de ECP e portanto entre 40.000-60.000 ppm, o que de novo confirma com boa aproximação o valor de 65.000 ppm do IRMA.

Com relação à sensibilidade da técnica de WB, é teoricamente possível que, colocando uma amostra de 500 µg de hGH (o que representa, em 40 µL, uma concentração de 12,5 mg de hGH/mL) se chegue até uma sensibilidade de aproximadamente 10 ppm. Lembramos que Gooding e cols. (23) chegaram a usar hGH em concentrações de 25 mg/mL para uma finalidade análoga.



Figura 14 : "Western Blotting" realizado utilizando antissoro anti-ECP_{2-DEAE}. As amostras 1, 2 e 3 correspondem a 500 ng de hGH recombinante de diferentes extratos, com 4.000, 65.000 e 400 ppm de ECP, respectivamente, medidas mediante IRMA II. As amostras 4, 5 e 6 correspondem à 5 ng, 50ng e 500 ng de ECP_{2-DEAE} medidos pelo método de Lowry.

4. Aplicação da metodologia desenvolvida ao processo de purificação de hGH recombinante

4.1. Estudo do processo de purificação mediante SDS-PAGE e WB.

O acompanhamento das várias etapas de purificação do hGH recombinante a partir do choque osmótico, mediante SDS-PAGE não reduzida, é apresentado na Figura 15A. Podemos observar que, a partir de uma mistura heterogênea de proteínas em que o hGH não passa de 10-20 %, chegamos a um produto com uma porcentagem de hGH monomérico > 95%. A banda com maior peso molecular presente em pequena quantidade também no padrão da WHO, é provavelmente devida a uma forma clivada ("two-chain form") de hGH, cuja atividade biológica "in vivo" é praticamente idêntica àquela da forma monomérica de 22 KD.

A Figura 15B se refere ao mesmo SDS-PAGE, porém revelado mediante precipitação com nitrato de prata. Como é sabido, esta técnica é muito mais sensível e, de fato, além das bandas evidenciadas mediante "Coomassie", apareceram muitas outras bandas de ECP. O WB revelado com anticorpo anti-ECP (Figura 15C) confirmou os dados obtidos com prata, mesmo sendo evidenciado um número menor de proteínas. Lembramos que, se já a revelação mediante "Coomassie" não é quantitativamente muito confiável, menos ainda são as revelações mediante WB. Neste último caso além de existirem diferenças quantitativas relacionadas com a eletroeluição e a fixação na membrana, também existem diferenças de intensidade de bandas devidas ao título e afinidade dos anticorpos presentes no antissoro usado na revelação.

Em conclusão, o presente estudo nos mostrou que um produto aparentemente puro, pode apresentar grandes quantidades de ECP no momento em que, no mesmo gel, somente alteramos a técnica de revelação. De fato, já era de nosso conhecimento que o lote aqui analisado (P22) continha aproximadamente 30.000 ppm de ECP (Tabela 7).

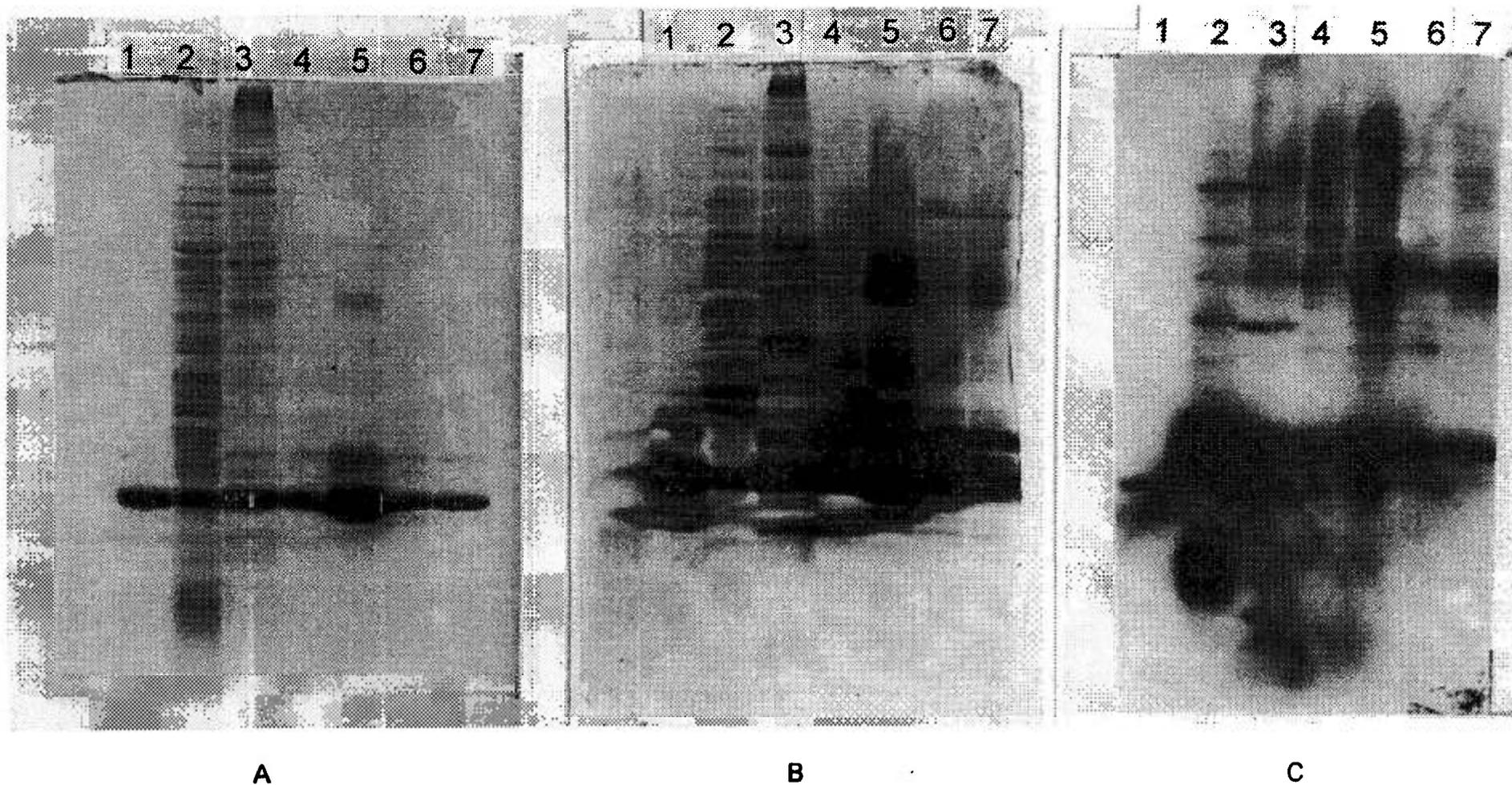


Figura 15: Análises das etapas de purificação do hGH recombinante (lote P22). A, SDS-PAGE revelada com "Coomassie Blue R". B, SDS-PAGE revelada mediante precipitação com nitrato de prata. C, WB com antissoro anti-ECP_{2-DEAE} (autoradiografia com 24 horas de exposição). 1, padrão de rec-hGH (WHO 88/624): 10 µg; 2, 3, 4, 5, 6 e 7: etapas consecutivas do processo de purificação.

4.2. Eliminação de ECP mediante cromatografia por afinidade.

Considerando os resultados obtidos nos estudos anteriores, ficou evidente que, para reduzir as ECP a um nível < 10 ppm, deveria ser introduzida uma técnica de purificação específica para esta finalidade. Com este objetivo, foram realizados alguns estudos, utilizando o IRMA II, na análise de amostras de hGH passadas por uma coluna de afinidade, tendo como ligante IgG anti- ECP_{2-DEAE}, purificada por precipitação com ácido caprílico. O objetivo foi utilizar essa coluna como uma etapa adicional na purificação do hGH, no qual grande parte das ECP ficariam retidas, resultando em produto mais puro e com níveis aceitáveis de ECP, de acordo com as normas declaradas por algumas entidades internacionais de controle. Foram realizados vários testes em pequena escala em diferentes condições, cujos resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Purificação do hGH recombinante com o uso da coluna de afinidade anti-ECP_{2-DEAE}.

amostras	fator de diluição	concentração de ECP (ppm)
Extrato de rec-hGH purificado (P21A)	1	11300
	2	12200
	4	12500
	8	12200
P21A após a 1ª coluna de afinidade	1	32,8
	2	55,4
	4	98,5
	8	123,1
P21A após a 2ª coluna de afinidade	1	1,1
	2	3,2
	4	7,1
	8	12,4
P21A após a 3ª coluna de afinidade	1	< 1
	2	< 1
	4	< 1
	8	< 1

Analisando os resultados, observa-se uma queda significativa na concentração de ECP (ppm). Observa-se também que algumas amostras não apresentam linearidade e isso pode ser justificado pelo fato dessas proteínas contaminantes serem justamente aquelas que não foram retidas pela coluna, muito provavelmente pelo fato de não estarem na presença de excesso de anticorpo. Isto pode ser devido à baixa imunogenicidade ou baixa afinidade das mesmas ou simplesmente à insuficiência de IgG. Seguindo esse raciocínio, essas proteínas, que inicialmente não evidenciavam este fenômeno devido à presença de uma quantidade enorme de outras proteínas, agora, por se encontrarem mais isoladas, apresentam uma influência significativa que é refletida na não linearidade dos valores obtidos em diluições diferentes. Em primeira aproximação podemos porém afirmar que, após a terceira coluna de afinidade, o produto resultou perfeitamente livre de ECP. Estão portanto alcançadas as duas metas principais do trabalho: padronização de uma técnica de detecção e eliminação das ECP dos nossos extratos.

4.3. Determinação de ECP mediante o IRMA II em vários lotes de hGH recombinante produzidos no IPEN.

Os resultados definitivos de análise de ECP em diferentes lotes de hGH recombinante produzidos no IPEN podem ser visto na Tabela 11.

Tabela 11: Determinação de ECP, mediante IRMA II, em vários extratos de hGH recombinante.

Lote	ENSAIOS (ppm)				média	SD	CV(%)
	1	2	3	4			
P9	59100	52100	63504,4		58234	5751	9,9
P14	13200	11225	11689		12038	1032	8,6
P18	340	544	656	432	493	137	27,8
P19	46171	42666	73067		53968	16632	30,8
P22	30600	31200	32000	36000	32450	2435	7,5
P21Ar* ¹	10,6	7,8	13,3	16,4	12	3,7	30,6

*¹ lote de rec-hGH purificado também por cromatografia de afinidade utilizando IgG anti- ECP_{2-DEAE}.

Nesta tabela podemos observar como, e de que nível foi a contaminação por ECP das nossas preparações rotineiras de rec-hGH. Ressaltamos que a precisão inter-ensaio das determinações, desta vez aplicadas a amostras verdadeiras é perfeitamente aceitável para a finalidade do ensaio. Podemos também observar que o nível rotineiro das contaminações era geralmente, com uma única exceção, acima de 10.000 ppm (equivalente a 1% de ECP), até que a introdução da purificação por afinidade reduziu estes valores a aproximadamente 10 ppm, permitindo alcançar uma das metas principais de nosso trabalho.

DISCUSSÃO

Antes de discutir os resultados obtidos achamos oportuno mencionar brevemente as enormes dificuldades relacionadas com este método analítico, dificuldades que já conhecíamos teoricamente mas que, ao longo do desenvolvimento da metodologia, mostraram toda sua complexidade. Consideramos esta progressiva e prática conscientização também um resultado de grande interesse, especialmente devido aos seus aspectos didáticos e de experiência insubstituível para o planejamento futuro de esquemas análogos de ensaio.

Trata-se, em nosso caso, de uma técnica dirigida à dosagem de múltiplos antígenos (ECP) presentes em produtos recombinantes. Os imunoensaios clássicos sempre foram dirigidos à detecção de um único analito e mesmo assim sua validade analítica foi freqüentemente questionada (17), devido à freqüente e incontrolada heterogeneidade molecular das formas presentes no padrão e nas amostras desconhecidas. O título e a afinidade variável dos anticorpos, juntamente com as possíveis alterações introduzidas na presença do traçador produzem necessariamente ulteriores fatores de incerteza que afetam consideravelmente a validade analítica dos ensaios, especialmente em relação à exatidão. Podemos facilmente imaginar como toda essa incerteza pode ser enormemente aumentada ao padronizar-se um sistema, que dificilmente podemos definir como analítico, dirigido à detecção de centenas de proteínas extremamente diferentes em tamanho, carga, características físico-químicas, com propriedades imunológicas diferentes e, obviamente, sem a possibilidade de utilizar um padrão apropriado. Acrescentamos a esta situação o fato, já mencionado várias vezes, de se tratar de método específico para uma certa cepa e para um processo de purificação, e que portanto não permite, ou permite com extrema dificuldade, comparações e padronizações inter-laboratoriais.

O IRMA I possibilitou o primeiro contato e o aprimoramento da técnica para dosagem de múltiplos antígenos de CEP mesmo antes da completa definição da estratégia de purificação do hGH recombinante produzido no IPEN. Este ensaio confirmou a boa sensibilidade e exatidão do método no caso da análise de amostras com a mesma distribuição proteica daquela apresentada pela preparação usada como padrão. Demonstrou dessa forma a sua viabilidade como instrumento útil no estudo das ECP em extratos com alto grau de impureza no início do processo de purificação.

Todavia com esse ensaio não foi possível conseguir o objetivo principal do trabalho: a avaliação da pureza do produto final. Esse fato não foi surpresa, pois a literatura é bastante clara na dificuldade de se produzir um ensaio genérico para múltiplos antígenos, uma vez que cada proteína recombinante requer um processo único e específico para sua purificação (1, 21) e especialmente pelo fato que se demonstrou impossível, pelas imunizações com extrato total de choque osmótico, obter anticorpos com título e afinidade suficiente para detectar os contaminantes no fim do processo.

Com base na literatura (1, 2), uma grande importância foi dada à preparação das ECP usadas na produção do antissoro para o desenvolvimento do IRMA II. Uma série de cuidados foram tomados, desde a preparação de um plasmídeo não produtor de hGH, mas pelo restante idêntico ao encontrado na cepa 8T, até a "purificação", seguindo as mesmas etapas do hGH, após passar por um processo de fermentação o mais semelhante possível com o verdadeiro. Tudo isso com o objetivo básico de se obter no final uma fração de proteínas cuja concentração, proporção, imunogenicidade e propriedades físico-químicas fossem as mais próximas daquelas que podem ser encontradas no produto final.

Para ter uma maior segurança de que todas as proteínas presentes no produto final estariam representadas, as frações coletadas durante a purificação simulada foram definidas com uma margem maior do que aquelas

frações normalmente coletadas na purificação real e as ECP foram "purificadas" até a penúltima etapa de purificação do processo, após a qual o hGH estaria no mínimo 90% puro.

Sempre com o intuito de detectar possivelmente todas as proteínas contaminantes presentes, foram escolhidos os antissoros obtidos com um período mais longo de imunização, mesmo apresentando títulos semelhantes, possibilitando assim que proteínas menos imunogênicas tivessem um tempo maior para estimular uma resposta (2).

Uma técnica que provavelmente melhora a reatividade, afinidade e homogeneidade dos anticorpos é a purificação do soro por imunoafinidade contra ECP imobilizadas (1, 5). De fato o antissoro resultante da imunização com as ECP depende da natureza imunogênica dos componentes proteicos e da resposta do animal assim como da concentração de cada proteína (1). Sem essa purificação normalmente um componente da ECP que é particularmente imunogênico poderia dominar a resposta desse tipo de imunoensaio. Utilizando a cromatografia por afinidade as moléculas de IgG em excesso atravessam a coluna e são removidas. Ao mesmo tempo, ECP menos imunogênicas acumulam IgG e enriquecem a população relativa a estes anticorpos. Idealmente, as IgG que subsequentemente eluem da coluna deveriam estar em equivalência estequiométrica com as ECP ligadas. O uso dessas imunoglobulinas purificadas por afinidade deveria levar a uma situação ideal onde cada ECP é detectada com aproximadamente igual sensibilidade. A purificação por imunoafinidade também resulta claramente em uma população de anticorpos que é altamente específica para as ECP "purificadas". Lembremos, porém, que a situação está longe do ideal, especialmente porque as proteínas presentes na curva padrão e para as quais foram produzidos e purificados os anticorpos, não têm a mesma distribuição quantitativa das proteínas contaminantes eventualmente presentes no produto final.

A sensibilidade do ensaio, que nós preferimos avaliar em ng de ECP/mL e não em ppm, por ser este último um valor dependente da quantidade de proteína recombinante analisada, foi da ordem de 0,03 ng/mL, a mais alta até agora apresentada na literatura para um ensaio de ECP que utiliza marcador radioisotópico e uma das maiores em geral. Querendo avaliar a sensibilidade em ppm, para poder realizar uma comparação com vários dados da literatura, podemos considerar que uma DMD de 0,03 ng/mL e uma concentração de hGH de 2 mg/mL definem uma sensibilidade para o IRMA II de 0,015 ppm. A avaliação comparativa das sensibilidades dos diferentes ensaios para ECP descritos na literatura exige uma série de considerações que nem sempre possibilitam uma comparação direta. É interessante observar porém, que a maioria dos autores, cujas sensibilidades obtidas foram mencionadas na Introdução, calcularam os limites de detecção mediante a definição de Rodbard (39) permitindo portanto uma comparação válida com os nossos ensaios, mostrando que a sensibilidade obtida no IRMA II é uma das melhores. Talvez isto seja devido ao título e afinidade dos anticorpos obtidos e aos cuidados utilizados na padronização do ensaio, procurando sempre reduzir ao mínimo as ligações inespecíficas. Do ponto de vista prático a sensibilidade por nós obtida é plenamente satisfatória, possibilitando a análise de amostras com concentração de hGH relativamente baixa, economizando dessa forma material e minimizando de maneira significativa uma possível interferência de agentes presentes na amostra quais como hGH, sais e excipiente.

O IRMA padronizado demonstrou ser específico, não dando reação cruzada com hGH pituitário e nas análises de precisão também apresentou resultados satisfatórios.

Uma condição essencial para validar um imunoenensaio de múltiplos antígenos como este, é provar que os anticorpos estão em excesso para todas as proteínas presentes. Essa condição pode ser demonstrada através da determinação da mesma amostra em diferentes diluições. Aquelas proteínas para as quais existe um

excesso de anticorpos mostrarão um valor constante, em ppm, independente da diluição da amostra, enquanto aquelas proteínas que estão em déficit de anticorpos mostrarão um aumento das ppm com a diluição, até alcançar aquela diluição em que ocorre o excesso de anticorpos, passando a apresentar então um número de ppm constante. Esta condição, que não conseguimos alcançar no IRMA I, foi plenamente alcançada no IRMA II, mostrando no intra-ensaio (Tabela 7) uma estabilização dos valores obtidos com diferentes diluições e uma reprodutibilidade inter-ensaio (Tabela 11) que, para este tipo de determinação , podemos definir mais que satisfatória.

O IRMA apresenta uma informação quantitativa precisa, porém não fornece nenhuma informação qualitativa sobre as impurezas. Objetivando obter maiores informações sobre as impurezas e aproveitando o mesmo antissoro produzido foi padronizado um "Western Blotting" para detectar ECP. Esse ensaio, que apresenta uma sensibilidade relativamente alta e que calculamos da ordem de pelo menos 5 ng de ECP aplicadas no gel, demonstrou assim sua utilidade como um teste complementar usando uma metodologia diferente, embora baseada nos mesmos princípios da resposta imunológica. O WB foi também usado para analisar a eficiência de uma certa etapa de purificação, fornecendo algumas informações quantitativas que, analisadas com as devidas cautelas, serviram para estudos sobre a exatidão. Com relação a estes estudos queremos ressaltar que a exatidão, por ser o aspecto mais crítico e delicado deste tipo de ensaio, sempre foi a nossa preocupação principal. Esta avaliação se desenvolveu empregando pelo menos quatro testes diferentes. O primeiro teste consistiu na preparação e avaliação de amostras falsas com teor conhecido em ECP. Os resultados foram altamente satisfatórios mas estas "amostras falsas", tendo sido preparadas com as mesmas ECP da curva padrão, em última análise sempre deixam a dúvida relativa ao comportamento das verdadeiras amostras desconhecidas, que facilmente apresentam quantidades e distribuição diferentes de ECP. O mesmo podemos dizer, basicamente, com relação aos testes de recuperação. Eles mostraram que quantidades crescentes de ECP são detectadas com boa precisão na presença de

uma quantidade aparentemente similar, mas qualitativamente diferente, de ECP reais contaminantes e também na presença de grandes quantidades de hGH pituitário que, portanto, mostrou não interagir na determinação. O terceiro teste de exatidão foi o "Western Blotting". Pela primeira vez um método diferente foi usado em comparação com o IRMA de ECP. Como apresentado na Figura 14, a grosso modo os valores que podem ser deduzidos pela autoradiografia são da mesma ordem daqueles determinados por IRMA. Não se trata de uma demonstração legítima de exatidão, uma vez que os dois métodos são baseados numa técnica imunológica que se utiliza do mesmo anticorpo. Uma proteína que não é detectada por um sistema pode também escapar ao segundo igualmente, uma banda superestimada num sistema será facilmente superestimada também no segundo. A única técnica verdadeiramente diferente usada neste estudo foi o SDS-PAGE, cujos princípios de separação e detecção são estritamente físico-químicos. O gel SDS-PAGE, quando corado com "Coomassie Blue", não mostrou praticamente nenhum contaminante no produto purificado. Quando corado mediante precipitação com nitrato de prata, uma técnica que aumenta enormemente a sensibilidade, o gel mostrou muitas outras bandas, confirmando aproximadamente o nível de contaminação já detectado mediante "Western Blotting" e IRMA. Na realidade como era esperado, no SDS-PAGE aparece um número maior de bandas que no WB e esta comparação deverá ser melhor estudada, especialmente em relação a amostras mais puras.

Analisando os diferentes lotes de hGH recombinante observou-se uma quantidade relativamente alta de ECP, com valores entre 200 e 400 ppm para as amostras mais puras. Amostras com conteúdo em ECP de até 700 ppm já foram descritas na literatura (23, 19, 20) tendo sido inclusive, utilizados clinicamente. A quantidade máxima de ppm permitida não está claramente definida, e por exemplo a monografia sobre a Somatropina (hGH recombinante) publicada pela Farmacopeia Européia em 1994, deixa para a autoridade competente de cada país a definição de seus valores limites. Para nosso controle interno preferimos porém estabelecer um

limite de 10 ppm, baseando-nos na definição de alguns autores e laboratórios de controle.

Os contaminantes de *E. coli* são de fato importantes por causa da natureza crônica da terapia com hGH, que pode gerar uma resposta imune, sendo difícil estimar a dose imunogênica mínima, pois cada proteína pode estimular uma resposta imunogênica particular. Por exemplo é possível que uma dose tão baixa como 1 ng de uma proteína altamente imunogênica possa provocar uma resposta alérgica, mesmo representando somente 1 ppm relativa a uma dose de 1 mg. Outras proteínas necessitariam de doses bem mais altas para apresentar o mesmo efeito (12). Dessa forma mesmo para um produto recombinante injetável que apresente valores baixos de ECP, é aconselhável o acompanhamento dos primeiros pacientes tratados com relação à produção de anticorpos anti-ECP. Nesse sentido o radioimunoensaio utilizado para avaliar o título dos antissoros produzidos nos coelhos pode ser uma ferramenta bastante útil.

É claro que quanto menos ECP contaminantes, mais seguro é o produto. Tendo isso em mente e com o IRMA II e o WB padronizados, ficou mais fácil a otimização ou a introdução de alterações no processo, de produção de rec-hGH objetivando uma maior pureza.

Convém lembrar que modificações no processo que ocorram a partir da etapa da DEAE não necessariamente invalidam o ensaio pois todas as proteínas remanescentes foram injetadas nos coelhos para a produção de anticorpos. Dessa forma a condição de excesso de anticorpos para as proteínas contaminantes ainda pode ser respeitada tornando válida a metodologia aplicada.

Outro objetivo relevante alcançado no presente trabalho foi a obtenção de lotes praticamente puros de hGH (ECP < 1 ppm) a partir de uma técnica de purificação mediante cromatografia por afinidade em coluna rica de IgG anti-ECP. Este resultado foi possível graças à disponibilidade de um ensaio sensível qual o

IRMA II e aos conhecimentos e tecnologia desenvolvidos durante sua otimização. De fato as colunas preparativas cujos resultados são mostrados na Tabela 10, nada mais são que uma modificação do princípio e da tecnologia já utilizadas na montagem do ensaio.

A sistemática adotada para o controle das proteínas contaminantes originárias das células hospedeiras mediante esse IRMA apresenta algumas limitações. Primeiro, são detectadas somente aquelas proteínas que estimularam uma resposta imune no animal. Segundo, entre aquelas proteínas, a resposta do imunoensaio é governada pela combinação da quantidade de um dado tipo de proteína contaminante, sua imunogenicidade, a concentração e afinidade relativa dos anticorpos para aquela proteína particular na mistura dos anticorpos policlonais, resultando um ensaio de difícil interpretação. Terceiro, o imunoensaio não fornece nenhuma informação a respeito da distribuição de impurezas, como ocorre nas técnicas de eletroforese e cromatografia. Quarto, também deve ser considerado que a falta de hGH no processo de purificação simulado pode provocar um comportamento diferente das ECP nas várias etapas cromatográficas (12). Finalmente, no caso de ensaios dirigidos à dosagem de contaminantes processo-específicos, é necessário que o processo seja completamente definido antes da validação poder começar; essa validação é um processo contínuo que deve ser monitorado de perto, principalmente após introduzir alguma alteração no processo (18). Mesmo assim, após estudos realizados sobre a linearidade da resposta e a exatidão do método, e a comparação, em paralelo, com as técnicas de SDS-PAGE e WB, chegamos à conclusão que a técnica padronizada permite uma avaliação confiável da pureza do produto quanto à presença de ECP. Os resultados apresentados na Tabela 11 em que, juntamente com vários lotes com contaminações diferentes, o hGH purificado por afinidade apresenta uma concentração em ECP de aproximadamente 10 ppm, demonstram que foram alcançadas as duas metas principais do presente trabalho: padronização de uma técnica sensível e exata para determinação de ECP em lotes de um produto

recombinante e, não menos importante, obtenção de lotes absolutamente puros. De fato o problema analítico e aquele preparativo são extremamente interligados.

Em conclusão, os dados obtidos demonstraram a viabilidade do ensaio aqui padronizado para detectar e quantificar as ECP apropriadamente e de acordo com as exigências práticas deste tipo de determinação. Outras técnicas complementares também utilizadas por nós, como o WB e SDS-PAGE, demonstraram ser ferramentas de extrema utilidade na monitoração e aperfeiçoamento do processo de purificação, como também na confirmação da exatidão das nossas determinações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - ANICETTI, V.R.; FEHSKENS, E.F.; REED, B.R., MOORE, P.; GEIER, M.D.; 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.; CHEN, A.B. Immunization procedures for *E. coli* proteins. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 22, p. 151-168, 1989.
- 3 - ANICETTI, V.R.; Improvement and experimental validation of protein impurity immunoassay for recombinant DNA products. **Anal. Biotech.**, p. 127-40, 1990.
- 4 - BANGHAM, D.R.; Scientific aspects of the licensing and control of products made by r-DNA procedures. **BIRA Journal**, v. 37, p. 781-786, 1986.

*DE ACORDO COM:

ABNT-NBR-6023/IHD-RB-2

Normas extraídas da NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), adaptadas para o uso do IPEN.

- 5 - BAKER, R.S.; ROSS, J.M.; SCHMIDKTE, J.E., SMITH, W.C. Preliminary studies on the immunogenicity and amount of *Escherichia coli* polypeptides in biosynthetic human insulin produced by recombinant DNA technology. **Lancet**, v. 2, .p. 1139-1142, 1981.
- 6 - BARTOLINI, P.; 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, p. 129-138, 1986.
- 7 - BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P.; CAMILLO, M.A. Improvement of reproductibility and quality control of human growth hormone radiodination. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 42, p. 43-100, 1988.
- 8 - BARTOLINI, P.; DIAS, L.M.F.; 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.
- 9 - BECKER, G.W.; HSIUNG, H.M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. **FEBS**, v. 205, p. 145-150, 1986.
- 10 - BISCAYART, P.L.; PALADINI, A.C.; VITA, N.; ROGUIN, L.P. Preparation of ¹²⁵I-labelad human growth hormone of high quality binding properties endowed with long-term stability. **J. Immunoassay**, v. 10, p. 37-56, 1989.

- 11 - BRIGGS, J.; KUNG, V.T.; GOMES, B.; KASPER, K.C.; NAGAINIS, P.A.; MASINO, R.S.; RICE, L.S.; ZUK, R.F.; GHAZAROSSIAN, V.E. Sub-femtomole quantitations of proteins with threshold, for the biopharmaceutical industry. **Biotechniques**, v. 9, p. 598-606, 1990.
- 12 - BRIGGS, J.; PANFILI, P.R. Quantification of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 850-859, 1991.
- 13 - BURNETTE, W.N. "Western Blotting": eletrophoretic transfer of proteins from sodium duodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.
- 14 - CHANG, C.N.; REY, M.; BOCHENER, B.; HEYNEKER, H.; GRAY, G. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. **Gene**, v. 55, p. 189-196, 1987.
- 15 - CHEN, A.B.; CHAMPIONSMITH, A.A.; BLANCHARD, J.; GORRELL, J.; NIEPELT, B.A.; FEDERICI, M.M.; FORMENTO, J.; SINICROPI, D.V. Quantitation of *E.coli* protein impurities in recombinant human interferon- γ . **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 36, p. 137-152, 1992.
- 16 - EDWARDS R. Immunoradiometric assay - In: EDWARDS, R. **Immunoassay - An introduction**. London: William Heinemann Medical Books, 1985. p. 40-54.

- 17 - EKINS, R.P. Future developments in radioimmunoassay with particular reference to the needs of developing countries. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures**. Vienna, 1992. p. 3-51.
- 18 - FEDERICI, M.M. The quality control of biotechnology products. **Biologicals**, v. 22, p. 151-159, 1994.
- 19 - FRYKLUND, L.M.; BIERICH, J.R.; RANKE, M.B. Recombinant human growth hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 15, p. 511-535, 1986.
- 20 - FRYKLUND, L.; SKOOG, B.; FRIBERG, J.; BRANDT, J.; FHOLENHAG, K. Methionyl human growth hormone: characteristics and analytical criteria for human pharmaceuticals. In: JOYEUX, A; LEYGUE, G.; MORRE, M.; RONCUCCI, R.; SCHMELCK, P.H. **Therapeutic agents produced by genetic engineering "Quo Vadis ?"** Montpellier: Sanofi Recherche, 1986. p. 131-136. (Simpósio do Grupo Sanofi. 29-30 de maio, Toulouse - Labège, França).
- 21 - GARNICK, R.L.; SOLLI, N.J.; PAPA, P.A. The role of quality control in biotechnology: an analytical perspective. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 2546-2557, 1988.
- 22 - GERSHONI, J.M., PALADE, E.P. Protein blotting: principles and applications. **Anal. Biochem.**, v. 131, p. 1-15, 1983.

- 23 - GOODING, R.P.; 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, 781-786, 1985.
- 24 - GREENWOOD, C. & HUNTER, W.M. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific activity. **Biochem. J.**, p. 89, 114-23, 1963.
- 25 - JENSEN, E.B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetato and salts. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 36, p. 1-11, 1989.
- 26 - JONES, A.J.S.; O'CONNOR, J.V. Chemical characterization of methionyl human growth hormone. In: GUERIGUIAN, J.L.; BRANSOME, E.D.; OUTSCHOOM, A.S. **Hormone drugs**. Rockville MD: USP Convetion, 1982. p. 335-351.
- 27 - KOSHLAND, D.; BOTSTEIN D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell**, v. 20, p. 749-760, 1980.
- 28 - LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.
- 29 - LAURIÈRE, M. A semidry electroblotting sistem efficiently transfers both high- and low- molecular -weight proteins separated by SDS-PAGE. **Anal. Biochem.**, v. 212, p. 206-211, 1993.

- 30 - LOWRY, O.H.; ROSGBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 31 - NEU, H.C.; HEPPEL, L.A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 3685-3692, 1965.
- 32 - MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning - A laboratory manual**. 2. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor, 1989. p. 1.90-1.104, B-15.
- 33 - MORGANTI, L.; HUYER, M.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Production and characterization of biologically active ALA-SER-(HIS)₆-ILE-GLU-ARG-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 1995, In Press.
- 34 - OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamid gels. **Anal. Biochem.**, v. 105, p. 361-363, 1980.
- 35 - RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; BARTTOLINI,P. Setting up a Latin American reference preparation of human thyrotropin and its validation through an international inter-laboratory study. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Developmentes in radioimmunoassay and related procedures**. Vienna, 1992. p. 213-217.

- 36 - RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTE, L.; TONIOLO, D.; 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.
- 37 - RIBELA, M.T.C.P.; BIANCO, A.C.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human thyrotropin produced by chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** In Press.
- 38 - RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; GELFI, C.; CHIARI, M. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. **Anal.Chem.**, v. 61, p. 1602-1612, 1989.
- 39 - RODBARD, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. **Anal. Biochem.**, v. 90, p. 1-12, 1978.
- 40 - ROSS, J.W.; BAKER, R.S.; HOOKER, C.S.; JOHNSON, I.S.; SCHMIDTKE, J.R.; SMITH, W.C. Procedure for detection of potential *E. coli* peptides (ECPs) in In: GUERIGUIAN, J.L.; BRANSOME, E.D.; OUTSCHOOM, A.S. biosynthetic human insulin (BHI), antibodies to ECPs in patients treated with BHI, and measurement of bacterial endotoxins in BHI. In: GUERIGUIAN, J.L.; BRANSOME, E.D.; OUTSCHOOM, A.S. **Hormone drugs**. Rockville, M.D.: USP, Conventional, 1982. p. 127-138.

- 41 - ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 74, p. 525-531, 1963.
- 42 - SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSTON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-7, 1977.
- 43 - STEINBUCH, M.; ANDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. **Arch. Biochem Biophys.**, v. 134, p. 279-284, 1969.
- 44 - THALHAMER, J.; FREUND, J. Cascade immunization: a method of obtaining polyspecific antisera against crude fractions of antigens. **J. Immunol. Meth.**, v. 66, p. 245-251, 1984.
- 45 - TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.