

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Flávia Furtado Mulinari

**Produção e caracterização físico-química e biológica da proteína recombinante
Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hrG-CSF)**

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Mulinari Fontana

Brasília - DF

2012

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia Molecular
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**Produção e caracterização físico-química e biológica da proteína recombinante
Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hrG-CSF)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina
da Universidade de Brasília como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Mulinari Fontana

Brasília - DF

2012

*Dedico este trabalho ao meu marido Eduardo,
por todo apoio, orientação, amor, carinho
e paciência que teve comigo
durante esses dois anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha família. Pelo amor, pela paciência, pelo incentivo, pelas palavras de conforto nas horas de desespero. `

Ao meu marido, Eduardo Mulinari. Passamos por muitos momentos difíceis, até chegarmos aqui e termos mais essa vitória. Obrigada por ter sido meu porto seguro, por ter sempre segurado em minhas mãos, pelo amor incondicional, pela paciência, pelas risadas nas horas mais difíceis, por ser meu companheiro de trabalho, inclusive nas madrugadas e finais de semana. Te amo!!!

À minha mãe pela insistência em me fazer estudar, por todas as vezes que me deixou de castigo por algumas notas baixas, pela preocupação em sempre me dar um futuro melhor, pelo amor incondicional, pela paciência, pelo apoio, por todas as orações e por ser a melhor mãe do mundo. Te amo Mamãe!

À minha Maiazinha por sempre ter acreditado no meu potencial, por ir contra tudo e contra todos quando diziam que eu nunca chegaria a lugar nenhum, pelas palavras de conforto nas horas mais difíceis, pelas comidinhas e por ser a melhor segunda mãe do mundo.

Ao meu irmão, que apesar de me encher a paciência, de certa forma me influenciou.

Às minhas queridas “irmãs” Mônica, Nádia e Bruna, pela força, pelas brigas, e discussões e por terem feito essa caminhada mais divertida.

À minha nova família: Sogra, Sogro, Fofó, Manú, Lucas, Fernanda, Leomar, Luíza, Lauro, Márcia, Pri e Dani. Obrigada a todos pela torcida e pela confiança.

À minha cunhada Fernanda, pelo apoio e orientação nessa fase final.

À minha querida orientadora, Dra. Sueli, pela confiança, por todo apoio financeiro, pelas várias portas que me abriu, pelos ensinamentos, pelas poucas broncas e acima de tudo, por ter sido um exemplo de profissional, fazendo com que eu nunca desistisse do meu objetivo e nunca desista do sonho de fazer ciência.

Á Dra. Fátima, pelo apoio, pelas broncas e por ter me recebido no laboratório de braços abertos.

Ao Dr. Carlos Bloch e a Dra. Maura Prates. Obrigada por terem me recebido de braços abertos no laboratório, por confiarem no meu trabalho e por me apoiarem. Muito obrigada de coração.

À Dra. Anamélia Bocca e à Dra. Viviane Furlan pelo apoio nos experimentos com os camundongos.

Aos amigos do laboratório por tornarem meus dias de trabalho mais felizes. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas risadas, pelas pipocas na mesa de reunião e pelos “congressos”. Vocês vão ficar guardados pra sempre no meu coração.

Aos amigos Dijair e Roberta. Minha querida amiga Roberta pelas palavras sábias, pelas broncas, por não ter medo de bater de frente comigo nas vezes eu que eu estava errada, pelas risadas, pelos “fugidinhas” do laboratório. E ao meu querido amigo Dijair por me perturbar sempre que pode, mesmo longe.

Aos queridos amigos Raquel e Firmino pela amizade, apoio, pelas risadas que me fizeram dar nos momentos mais tensos do trabalho.

À Lecir e a Sineide pelos conselhos sábios e amizade.

Ao Ministério Guerreiros por Amor ao Próximo, em especial a Pastora Daia pelas orações, broncas e apoio.

À FAP-DF e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por último à Deus. Não por ser menos importante, mas por ser responsável por tudo e por todos citados acima. Obrigada Senhor por tudo que fez em minha vida nesses dois anos, te louvo pelas dificuldades e pela vitória, te louvo todos os minutos pelos Teus feitos e pela Tua fidelidade. Obrigada Jesus.

RESUMO

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) é um fator de crescimento hematopoiético cuja função é estimular a proliferação, diferenciação e ativação de células precursoras de neutrófilos da medula óssea. É caracterizado como uma proteína de massa molecular de 18,8 KDa, constituída de 175 resíduos de aminoácidos. A proteína é estabilizada por duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições Cys⁽³⁶⁾-Cys⁽⁴²⁾ e Cys⁽⁶⁴⁾-Cys⁽⁷⁴⁾ e apresenta um resíduo de Cisteína (Cys) livre na posição 17. O hrG-CSF (Filgrastima) foi aprovado em 1991 pelo FDA para tratamento de neutropenia induzida por quimioterapia. Atualmente tem sido utilizado para tratamento de neutropenia oriunda de outras doenças como AIDS e Leucemia, com o objetivo de diminuir infecções oportunistas. O primeiro biofármaco recombinante do G-CSF foi produzido em *Escherichia coli* em 1986 pela empresa AMGEN, e teve sua patente expirada em 2006, tornando-se alvo de produção de biossimilares pelas indústrias farmacêuticas. Visto que o Brasil é um importador deste biofármaco, o que leva a gastos elevados para o Sistema Único de Saúde, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma tecnologia de produção, com custos reduzidos, em âmbito nacional. Para tanto, a região codificadora da proteína foi sintetizado utilizando-se códons preferenciais para *E. coli* e clonado em vetor de expressão pET28a+ por empresa especializada. Foram realizados testes de expressão utilizando-se a cepa BL21(DE3), onde a proteína foi expressa em corpos de inclusão e a melhor condição estabelecida foi utilizando-se o meio LB contendo Canamicina 30 µg.mL⁻¹, a 37 °C com agitação de 200 rpm por 4 horas. Na tentativa de solubilizar os corpos de inclusão e purificar a proteína, alguns protocolos foram testados, e neste trabalho foi desenvolvido um método inovador para lavagem e solubilização com solvente específico. A proteína foi purificada utilizando-se também um processo inovador, em apenas uma etapa. A identidade da proteína foi confirmada por western-blot e espectrometria de massa, e sua atividade foi confirmada por ensaio biológico *in vivo*, com diferentes concentrações do hrG-CSF purificado utilizado o medicamento comercial como referência. Neste trabalho foi estabelecido um processo simples e de baixo custo para produção e purificação de G-CSF humano recombinante ativo em células de *E. coli*, de extrema importância para o desenvolvimento da metodologia adequada visando o escalonamento para e produção do biossimilar em escala industrial.

Palavras Chave: Biofármacos, Biossimilares, hrG-CSF, proteínas recombinantes, *Escherichia coli*, Medicamentos Excepcionais, Sistema Único de Saúde.

ABSTRACT

The human recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (hrG-CSF) is a hematopoietic growth factor whose function is to stimulate the proliferation, differentiation and activation of neutrophil precursor cells from bone marrow. It is characterized as a 18.8 kDa molecular mass protein composed of 175 amino acid residues. The protein is stabilized by two intramolecular disulfide bonds at Cys (36) - Cys (42) and Cys (64)-Cys (74) positions, with free Cysteine residue (Cys) at position 17. The hrG-CSF (Filgrastim) was approved by the FDA in 1991 for neutropenia treatment induced by chemotherapy. Actually it has been used to treat neutropenia arising from other diseases such as AIDS and leukemia, with the aim of reducing opportunistic infections. The first recombinant G-CSF biopharmaceutical was produced in *Escherichia coli* in 1986 by the AMGEN company, which patent was expired in 2006, starting the production of filgrastim biosimilars by pharmaceutical companies. Since Brazil is an importer of biopharmaceuticals, which leads to high spending for the National Health System, the study aimed to develop a production technology with reduced costs, nationally. Therefore, the protein coding region was synthesized using *E. coli* preferential codons and cloned into the expression vector pET28a by a specialized company. Expression tests were performed using BL21 (DE3) strain. The protein was produced as inclusion bodies. The best expression condition was established using LB medium containing 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of Kanamycin at 37 °C, 200 rpm for 4 hours. Aiming to solubilize the inclusion bodies and purifying the protein, some protocols were tested, and a novel method for washing and solubilization of inclusion bodies with specific solvent was developed. The protein was purified also with an innovative process, on just one step. The protein identity was confirmed by Western blot and mass spectrometry, and its activity was confirmed by in vivo bioassay with different concentrations of purified recombinant HRG-CSF using commercial drug as reference. In this study, we established a simple and low cost process for production and purification of recombinant active G-CSF in *E. coli* cells, extremely important for the development of an appropriate methodology for production on industrial scale biosimilar drug.

Keywords: Biopharmaceuticals, Biosimilars, hrG-CSF, recombinant proteins, *Escherichia coli*, Exceptional Medicines, Unified Health System

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema representativo do processo de hematopoiese	2
Figura 2	Receptor tirosina-quinase do G-CSF	4
Figura 3	Rota de sinalização da ligação do G-CSF ao receptor específico ...	5
Figura 4	Estrutura primária do hrG-CSF	7
Figura 5	Estrutura tridimensional do hG-CSF	7
Figura 6	Etapas do processo de produção de biofármacos	10
Figura 7	Quantidade de biofármacos e o valor referente, gasto pelo Ministério da Saúde no ano 2010	12
Figura 8	Evolução dos gastos do Ministério da Saúde com Medicamentos Excepcionais do ano de 2003 a 2010	15
Figura 9	Representação gráfica do aumento das vendas de medicamentos de base biotecnológica de 2002 a 2011 e perspectivas até 2016	17
Figura 10	Demonstrativo do crescente índice de importações de biofármacos pelo Brasil do ano de 1998 a 2010	19
Figura 11	Alinhamento da sequencia nucleotídica codificadora do hrG-CSF sintético com o cDNA do hG-CSF humano	35
Figura 12	Alinhamento das sequências proteicas do hG-CSF e rhG-CSF	36
Figura 13	Vetor de Expressão pET28a+	36
Figura 14	Sequenciamento do gene sintético e tradução da proteína predita..	37
Figura 15	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 15% da expressão da proteína recombinante hrG-CSF em células BL21(DE3) pLysE/pET28a+.....	38
Figura 16	Avaliação gráfica do crescimento celular de <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE/pET28a+/hrG-CSF em meio LB/Km e 4YT/Km com diferentes concentrações de IPTG (0 mM, 0,4 mM e 1 mM)	41
Figura 17	Análise da expressão de hrG-CSF em meio LB/Km 30 µg/mL sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37°C, com diferentes concentrações de IPTG em gel de poliacrilamida SDS-Page 15% e análise densitométrica em 3D	43

Figura 18	Análise da expressão de hrG-CSF em meio 4xYT/Km 30 µg/mL sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37°C, com diferentes concentrações de IPTG em gel de poliacrilamida SDS-Page 15% e análise densitométrica em 3D	45
Figura 19	Análise do percentual de hrG-CSF em relação ao conteúdo proteico total de cultura de células por densitometria de gel de poliacrilamida 15%	47
Figura 20	Análise do teste de lise mecânica e lavagem e solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos Uréia e GuHCl	50
Figura 21	Análise do teste de lise mecânica e lavagem e solubilização dos corpos de inclusão com GuHCl	51
Figura 22	Teste segundo Vanz e colaboradores, (2008), com modificações ...	53
Figura 23	Leitura da absorbância a 280 nm dos pontos coletados no teste de purificação com cromatografia de troca aniônica utilizando amostra resultante do teste segundo Vanz e colaboradores, (2008), com modificações	56
Figura 24	Teste de purificação com cromatografia de troca aniônica utilizando amostra resultante do teste segundo Vanz e colaboradores, (2008), com modificações	57
Figura 25	Purificação do hrG-CSF e do medicamento Filgrastine [®] , em cromatografia líquida de fase reversa	59
Figura 26	Análise em gel SDS-PAGE 15% do hrG-CSF purificado por cromatografia de fase reversa, utilizando uma coluna semi-preparativa (coloração com prata)	59
Figura 27	Western Blot	61
Figura 28	Espectrometria do ESI-Q-TOF da fração de concentração de eluição de acetonitrila 63%	62
Figura 29	Avaliação da atividade biológica do hrG-CSF.....	63
Figura 30	Fluxograma representando as etapas desenvolvidas neste trabalho para a produção do hrG-CSF em escala de 25 mL	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alguns Biofármacos com patentes expiradas atualmente	9
Tabela 2	Histórico do elenco de medicamentos excepcionais desde 2002	13
Tabela 3	Planejamento Fatorial para testes de Expressão do hrG-CSF em <i>E. coli</i>	23
Tabela 4	Grupos de animais para o experimento de teste de atividade biológica do hrG-CSF, separados de acordo com o peso	30
Tabela 5	Esquema de tratamento para o teste de atividade biológica do hrG-CSF utilizando-se o controle e o padrão	31
Tabela 6	Tabela de custos para processamento de hrG-CSF em 50 mL de expressão	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATP	Adenosina Trifosfato, <i>Adenosine Triphosphate</i>
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CFU	Unidades Formadoras de Colônias, do inglês <i>Colony-forming unit</i>
CHO	Linhagem celular derivada do ovário de <i>hamster</i> chinês, do inglês <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIPBR	Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnósticos
C-terminal	Região carboxiterminal de uma proteína
Cys	resíduo de aminoácido cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
Da	Daltons
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESI-MS	Espectrometria de Massa por ionização electrospray, do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
Funtec	Fundo Tecnológico
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos, do inglês <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
Hemobrás	Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia
hG-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano, do inglês <i>Human Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
hrG-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante, do inglês <i>recombinant human Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>

hrEpo	Eritropoietina humana recombinante, do inglês <i>recombinant Erythropoietin</i>
hrGH	Hormônio do Crescimento humano recombinante, do inglês <i>human recombinant Growth Hormone</i>
hrINF-β1b	Interferon Beta humano recombinante, do inglês <i>human recombinant Interferon Beta</i>
hrtPA	Fator Ativador de Plasminogênio humano recombinante, do inglês <i>human recombinant Activator Factor of Plasminogen</i>
IB´s	Corpos de Inclusão, do inglês <i>Inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo, do inglês <i>Isopropyl β-1-D-thiogalactopyranoside</i>
JAKS	<i>Janus Kinases</i>
kDa	Quilo Daltons (1.000 daltons)
Km	antibiótico Canamicina
min	minuto (s)
mL	mililitro
mM	milimolar
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetros
N-terminal	amino-terminal de uma proteína
NK	<i>Natural Killer</i>
OD ₆₀₀	Densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PITCE	Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior
PLC	Progenitores Linfóides Comuns
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Relação peso/volume

PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
rpm	rotações por minuto
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
s	segundo (s)
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS	Page - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SI	Sistema Imune
STATs	Transdutores de sinal e Ativadores da Transcrição, do inglês <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tween 20	Polioxietilenosorbitano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF)	1
1.1.1 - Aplicação Terapêutica.....	2
1.1.2 - Sinalização Molecular	4
1.1.3 - Caracterização molecular	6
1.2 - Biofármacos e Biossimilares	8
1.3 - Produção de biofármacos em Escherichia coli	9
1.4 - Biofármacos e Sistema Único de Saúde	11
1.5 - Mercado Biofarmacêutico	16
2 - OBJETIVOS	20
2.1 - Objetivo Geral	20
2.2 - Objetivos Específicos	20
3 - MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 - Síntese do gene e Clonagem em Vetor de Expressão pET28a+	21
3.2 - Sequenciamento do gene sintético	21
3.3 - Expressão de hrG-CSF em E. coli	22
3.3.1 - Transformação das células competentes para expressão	22
3.3.2 - Expressão do hrG-CSF em E. coli	22
3.3.3 - Otimização da Expressão em E. coli.....	23
3.4 - Testes de Lise Celular, Lavagem e Solubilização dos Corpos de Inclusão	24
3.4.1 - Teste 1: Lise celular mecânica e lavagem/solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos	24
3.4.2 - Teste 2: Lise celular mecânica, lavagem com detergentes e solubilização com agentes caotrópicos e variação de pH	25
3.4.3 - Teste 3: Lise celular química, lavagem com solução específica e solubilização.....	26
3.5 - Purificação da proteína recombinante	26
3.5.1 - Cromatografia de Troca Aniônica.....	26
3.5.2 - Metodologia de purificação	27

3.6 - Caracterização da proteína recombinante	27
3.6.1 - Western Blot	27
3.6.2 - Espectrometria de Massa por Electrospray (ESI-MS).....	28
3.8 - Teste de Atividade Biológica.....	29
3.8 - Análises Estatísticas	32
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 - Síntese do gene sintético e clonagem em vetor de expressão pET28a+34	37
4.2 - Sequenciamento do gene sintético.....	37
4.3 - Transformação de célula competente Escherichia coli e expressão do hrG-CSF	37
4.4 - Otimização da Expressão	39
4.5 - Lise Celular, Lavagem e Solubilização dos Corpos de Inclusão	49
4.5.1 - Teste com lise mecânica e lavagem/solubilização com agentes caotrópicos.....	50
4.5.2 - Teste segundo Vanz e cols, (2008) com algumas modificações	52
4.5.3 - Nova metodologia de lavagem e solubilização de corpos de inclusão....	54
4.6 – Purificação hr-G-CSF.....	54
4.6.1 - Cromatografia de Troca Iônica.....	55
4.6.2 – Metodologia Desenvolvida	57
4.5 – Análise da proteína hrG-CSF por western-blot	60
4.6 – Análise físico-química por espectrometria de massa	61
4.7 - Teste de Atividade Biológica.....	62
4.8 – Processo Desenvolvido e Análise de Custos	64
5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	67
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1- INTRODUÇÃO

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

O Sistema Imune (SI) é responsável pela homeostase do organismo, através de processos mediados por células e moléculas, que resultam na proteção contra partículas estranhas, sejam estas patogênicas ou não (ABBAS *et al.*, 2000; BIGAS e ESPINOSA, 2012). O corpo humano produz milhões de novas células sanguíneas diariamente para substituir células em processos biológicos normais ou em traumas e patologias (WEISSMAN, 2000; HOFER *et al.*, 2012). Essa produção ocorre pelo processo denominado hematopoiese que é responsável pela produção e maturação de células sanguíneas a partir de células-tronco pluripotentes comuns da medula óssea (LEMISCHKA, 2001; HUANG *et al.*, 2007). As células-tronco pluripotentes são definidas por sua função de reconstituir a hematopoiese, devido a capacidade de se dividirem e darem origem a uma nova célula-tronco (auto-regeneração), e células precursoras, denominadas Unidades Formadoras de Colônias (CFU – *colony-forming units*), as quais se caracterizam pela perda do potencial de auto-regeneração e pelo comprometimento com uma via de diferenciação específica, tais como linfócitos T e B, monócitos, granulócitos e plaquetas, como representado na **figura 1** (AKASHI, 2000; NATHAN, 2006 e BORREGAARD, 2010).

A existência de combinações específicas de algumas linhagens faz com que o comprometimento da célula com uma única linhagem ocorra segundo uma ordem específica. O primeiro estágio ocorre a partir de progenitores intermediários, como os progenitores linfóides comuns (PLC) e progenitores mielóides comuns (PMC). Em seguida ocorre a geração de células específicas onde, através dos PLC são geradas as células B, células T e células NK (*Natural Killer*) e, através dos PMC são geradas as células vermelhas, plaquetas, granulócitos e monócitos, com o controle realizado por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (**figura 1**) (ZHU e EMRSON, 2002; SMITH, 2003; BIGAS *et al.*, 2012; HOFER *et al.*, 2012).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos são proteínas de baixa massa molecular, que regulam a manutenção, proliferação e diferenciação de células progenitoras sanguíneas. Dentre os principais fatores de crescimento está o Fator

Estimulador de Colônias de Granulócitos, mais especificamente de neutrófilos (G-CSF - *granulocyte colony stimulating factor*) (KAUSHANSKY, 2006).

Os neutrófilos são células fagocitárias caracterizadas por um núcleo lobular segmentado e grânulos citoplasmáticos preenchidos de enzimas de degradação. Representam 70% do total de células presentes na circulação sanguínea e são os principais tipos de células mediadoras de respostas inflamatórias agudas às infecções bacterianas e outros patógenos (BORREGAARD, 2010). Os neutrófilos são produzidos a partir da linhagem celular mielóide onde o G-CSF é responsável pela conversão de uma célula formadora de granulócitos em granulócitos verdadeiros, mais especificamente neutrófilos (**figura 1**) (NATHAN, 2006).

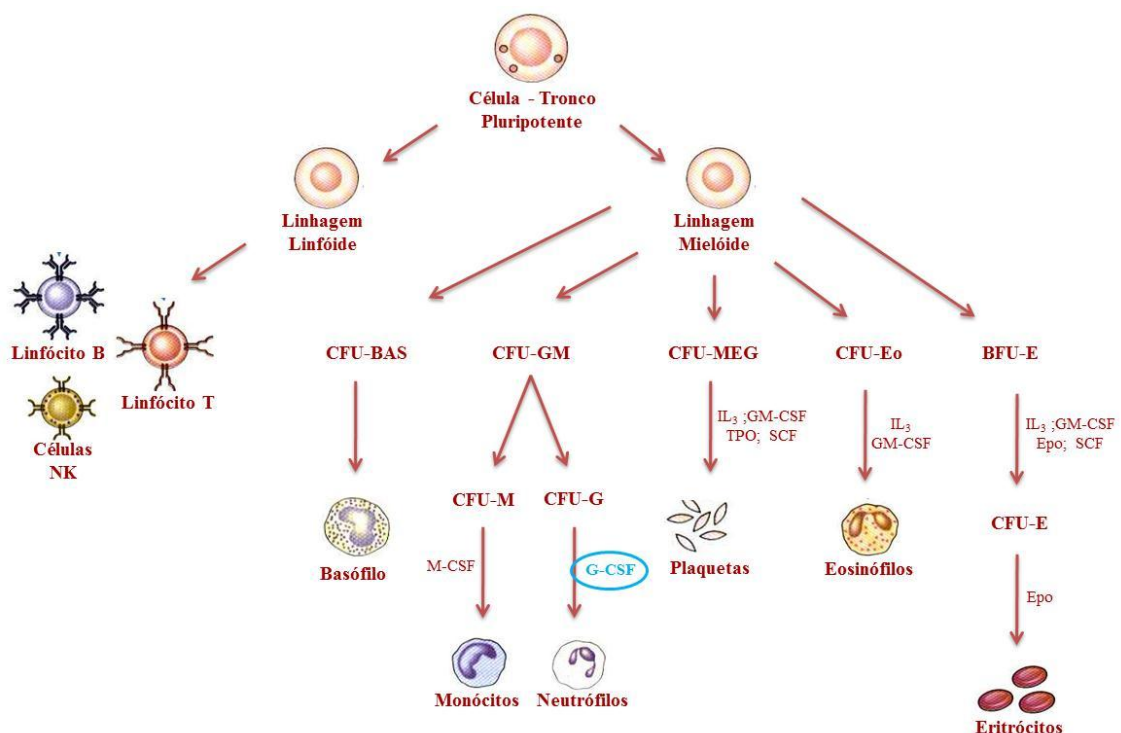


Figura 1: Esquema representativo do processo de hematopoiese. Adaptado de SMITH, 2003

1.1.1 - Aplicação Terapêutica

O G-CSF é um fator de crescimento hematopoiético, produzido por monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (SMITH, 2003). Este representa um dos principais componentes envolvidos na estratégia de defesa do SI, já que seu papel é estimular a proliferação, diferenciação e ativação dos granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos) (BARREDA *et al.*, 2004; PANOPOULOS e

WATOWICH, 2008). Quando a contagem normal destas células está diminuída, o quadro é caracterizado como neutropenia, sendo que para um adulto em condições normais estes valores são de aproximadamente 1500 a 7000/mm³ (1,5 – 7,0 x 10⁹/L) (CORR e RODOK, 2001; NATHAN, 2006). A neutropenia associada a infecções é a maior causa de morbimortalidade em pacientes em tratamento quimioterápico e em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (HARTUNG et al., 1998; NATHAN, 2006). A partir disto, em 1991 o U.S. Food and Drug Administration (FDA), aprovou a utilização do biofármaco Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante (hrG-CSF), intitulado genericamente de Filgrastima, para tratamento de neutropenia em diversas patologias, principalmente oriunda da SIDA ou quimioterapia, visando a diminuição de infecções oportunistas, tanto em adultos, quanto em crianças, onde a dose utilizada é de 300 µg ao dia, durante um período de 5 a 7 dias de tratamento, dependendo da etiologia da neutropenia (GARCIA-CARBONERO et al., 2001).

O G-CSF possui também outras atividades, como mobilização de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea para a circulação e modulação da resposta inflamatória através da redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos ativados (PANOPOULOS e WATOWICH, 2008). Além disso, vários estudos têm sido realizados para demonstrar e avaliar a atividade do biofármaco em diversas situações, como Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e melhora da função cardíaca, já que demonstrou ser uma proteína terapêutica na melhora da função cardíaca e redução da taxa de mortalidade após infarto agudo do miocárdio em camundongos (HARADA, 2005).

No Brasil, a portaria n° 862 define as seguintes condições patológicas para a utilização do G-CSF, (BRASIL, 2002a):

- Mobilização de células progenitoras para transplante de medula óssea;
- Neutropenia associada ao Transplante de Medula Óssea;
- Neutropenia induzida por quimioterapia;
- Neutropenia Crônica Grave;
- AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) com neutropenia;
- Anemia aplásica grave em terapia com tripla imunossupressão;
- Mielodisplasia com neutropenia grave e infecção de repetição.

1.1.2 - Sinalização Molecular

Os efeitos do G-CSF são mediados via ativação de receptores enzimáticos homodímeros do tipo tirosina-quinase, associados a uma classe de proteínas citoplasmáticas denominadas JAKs (*Janus Kinases* - JAK1, JAK2, TYK2). Tais receptores JAKs possuem domínio de ligação para proteínas citoplasmáticas reguladoras da expressão gênica, denominadas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Em mamíferos, os receptores JAK/STAT são os principais responsáveis pelo mecanismo de sinalização de citocinas e fatores de crescimento, como o G-CSF (WARD *et al.*, 2000; TOUW e VAN DE GEIJN, 2007). A ativação destes receptores pelo G-CSF estimula a proliferação e diferenciação de colônias de granulócitos, mais especificamente neutrófilos (TOUW e VAN DE GEIJN, 2007).

Os receptores JAK/STAT possuem um domínio de ligação específico ao ligante na superfície extracelular, conhecidas como subunidades α . As subunidades β são compostas por um domínio transmembrana, um sítio de ligação para as proteínas JAKs e um sítio de fosforilação que catalisa a fosforilação dependente de ATP de proteínas-alvo em resíduos de tirosina específicos (**figura 2**) (NELSON e COX, 2002; ALBERTS, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2007).

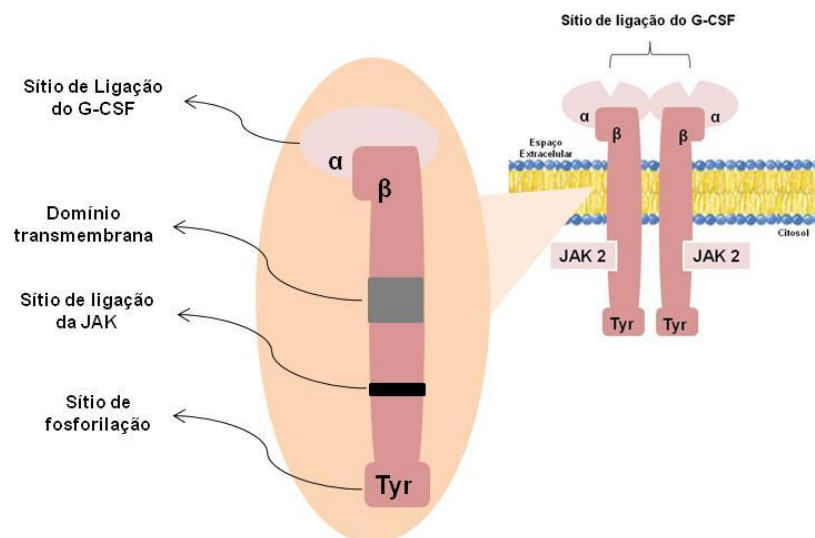


Figura 2: Receptor tirosina-quinase JAK/STAT do G-CSF. Representando duas subunidades α localizadas no espaço extracelular, sendo o domínio de ligação do G-CSF; duas subunidades β transmembrana com sua porção carboxiterminal localizada no espaço intracelular, contendo a atividade da proteína quinase que se autofosforila e que também transfere um grupo fosforil do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de tirosina em proteínas alvo. Adaptado de WARD *et al.*, 2000; NELSON E COX, 2002; ALBERTS, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2007.

A via de sinalização inicia-se com a ligação do G-CSF na subunidade α , o que ocasiona a dimerização dos homodímeros (**figura 3A**). Com isso, ocorre a aproximação das JAKs, ocorrendo então uma transfosforilação, aumentando a atividade de seus domínios de tirosina-quinase. As JAKs então fosforilam as tirosinas do receptor criando assim sítios de ancoragem para as proteínas reguladoras citoplasmáticas, as STATs (**figura 3B**) (RAWLINGS *et al.*, 2001; O'SULLIVAN *et al.*, 2007).

Em mamíferos, são conhecidas pelo menos cinco STATs (STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5), que possuem o domínio SH2 que realiza duas funções. A primeira consiste na mediação da ligação da proteína STAT a um sítio de ancoragem de fosfotirosina em um receptor ativado, e a segunda consiste na mediação, pelo domínio SH2 da STAT livre, da ligação desta a uma fosfotirosina de outra STAT formando um dímero de STAT, o qual se desloca para o núcleo estimulando a transcrição de genes controlados por esta via de transdução (**figuras 3C, 3D e 3E**), que vai regular a proliferação e a diferenciação de células progenitoras sanguíneas (WILLIAMS, 2000; RAWLINGS *et al.*, 2001; TOUW e VAN DE GEIJN, 2007).

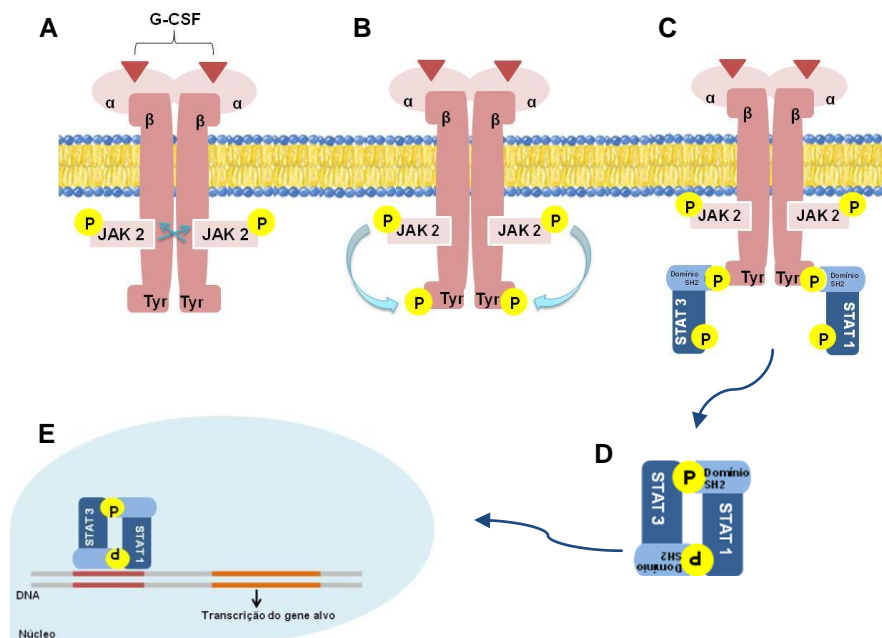


Figura 3: Rota de sinalização da ligação do G-CSF ao receptor específico. A - Aproximação das cadeias β após a ligação do G-CSF ao receptor e autofosforilação das JAKs; B - Fosforilação dos resíduos de Tyr pelas JAKs; C - Ligação das STATs ao receptor através do domínio SH2; D - Formação de dímeros das STATs; E - Direcionamento dos dímeros ao núcleo estimulando a transcrição do gene específico. Adaptado de WARD *et al.*, 2000; NELSON E COX, 2002; ALBERTS, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2007.

1.1.3 - Caracterização molecular

O G-CSF humano (hG-CSF) é uma proteína composta por 174 resíduos de aminoácidos, possui 5 resíduos de aminoácidos do tipo cisteína (Cys), sendo estabilizada por duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições Cys⁽³⁶⁾-Cys⁽⁴²⁾ e Cys⁽⁶⁴⁾-Cys⁽⁷⁴⁾, com um resíduo de Cisteína (Cys) livre na posição 17. Além disso a proteína secretada pelas células de mamíferos sofre glicosilação, o que confere uma massa molecular aproximada de 19,6 KDa (HILL *et al*, 1993; AHMED *et al.*, 2010).

O G-CSF humano recombinante (hrG-CSF) pode ser produzido tanto em células procarióticas (*Escherichia coli*), quanto em cultura de células eucarióticas (mamíferos e leveduras). Quando produzida em cultura de células de mamíferos é denominado de Lenograstima e apresenta modificações pós-traducionais, glicosilação e formação das pontes dissulfeto, da mesma forma que o hG-CSF (HOGLUND, 1998). Quando produzida em *E. coli*, a proteína apresenta a mesma sequência de resíduos aminoácidos do hG-CSF, com exceção das glicosilações e adição de um resíduo de metionina extra na extremidade N-terminal, o que confere a proteína recombinante uma sequência de 175 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 18,8 KDa (**figura 4**) (HILL *et al*, 1993; AHMED *et al.*, 201). Tal fato dá-se, pois a proteína humana possui um peptídeo sinal de secreção, que é removido da sequência polipeptídica do hrG-CSF para o processamento em *E. coli*. Como a bactéria não reconhece o peptídeo sinal de células humanas, a referida sequência nucleotídica codificadora do peptídeo sinal é removida e, para permitir a tradução do mRNA produzido pela bactéria, é adicionado um códon iniciador da tradução que insere a metionina. É importante ressaltar que, tais características não interferem na atividade biológica da proteína recombinante (HILL *et al*, 1993; HOGLUND, 1998; VARKI *et al*, 2009; AHMED *et al.*, 2010).

1.2 - Biofármacos e Biossimilares

O termo biofármaco foi utilizado pela primeira vez na década de 80, descrevendo uma classe de proteínas terapêuticas produzidas por técnicas biotecnológicas modernas, envolvendo clonagem de genes e expressão em sistemas heterólogos (WALSH, 2002). Ao contrário das moléculas dos medicamentos tradicionais, os biofármacos constituem uma classe distinta, devido à sua natureza mais complexa, já que, além de serem moléculas com maior massa molecular e estrutura espacial mais complexa, em geral proteínas, são produzidas em sistemas heterólogos tais como bactérias, leveduras, células animais ou vegetais em cultura, o que pode levar alterações no produto final (RADER, 2008). No início dos anos 80, o FDA aprovou a insulina humana recombinante produzida em *Escherichia coli* para o tratamento de diabetes, tornando-se assim a primeira proteína recombinante a entrar no mercado (FDA, 1982). A partir daí, surgiram outros biofármacos como a Eritropoetina - hrEpo (1983), o Interferon - β 1b - hrINF- β 1b (1993), o Hormônio do crescimento - hrGH (1985) e o hrG-CSF (1986) entre vários outros que são produzidos atualmente para uso terapêutico (MELLSTEDT, *et al.*, 2008).

Após a expiração das patentes que protegem estes medicamentos, surge então, uma segunda classe, denominada biossimilares (WALSH, 2003). Os biossimilares são produtos biológicos semelhantes, mas não idênticos aos biofármacos originais, entretanto, apresentam a mesma atividade biológica (CROMMELIN, 2005). Não são considerados medicamentos genéricos, visto que suas características moleculares estão intimamente relacionadas com o processo de produção, ou seja, podem ocorrer alterações na estrutura da proteína que não comprometem a sua atividade biológica, como é o do hrG-CSF (CROMMELIN, 2005; ROGER, 2006). Atualmente vários biofármacos tiveram suas patentes expiradas, abrindo assim, caminhos para o mercado biofarmacêutico, visando a produção de biossimilares como uma alternativa de reduzir os custos de produção, tornando-os mais acessíveis (**tabela 1**) (PISANI e BONDUELLE, 2012). O hrG-CSF foi produzido e patenteado em 1989 (Patente US 4,810,643), pela empresa AMGEN, com o produto intitulado Neupogen[®] sob nome genérico de Filgrastima, e sua patente expirou no ano de 2006 (SOUZA, 1989; PISANI e BONDUELLE, 2012).

Tabela 1: Alguns biofármacos com patentes expiradas.

Produto	Composto Ativo	Empresa	Expiração
Humulina [®]	Insulina Humana	Eli Lilly	2001
Novolina [®]	Insulina Humana	Novo Nordisk	2001
Intron - A [®]	Interferon - α 2b	Schering - Plogh	2002
Avonex [®]	Interferon - β 1a	Biogen Idec	2003
Epogen [®]	Eritropoietina	Amgen	2004
Neupogen [®]	Filgrastima	Amgen	2006

Adaptado de PISANI e BONDUELLE, 2012.

1.3 - Produção de biofármacos em *Escherichia coli*

A produção de biofármacos trata-se de um processo que divide-se basicamente em duas fases: *upstream* e *downstream* (**figura 6**). A fase *upstream* está relacionada com o desenvolvimento do clone recombinante, onde será escolhido e desenhado o vetor no qual será introduzido o gene que codifica a proteína de interesse, bem como o sistema de expressão adequado para este vetor (KLEINBERG e MOSDELL, 2004; WALSH, 2010). A fase *downstream* é fase de processamento do produto a partir de uma cultura de células, onde será realizado isolamento, purificação e a avaliação da atividade biológica da proteína de interesse (KLEINBERG e MOSDELL, 2004; MELLSTEDT, *et al.*, 2008).

Como já demonstrado, para a produção de um biofármaco faz-se necessário um sistema de expressão da proteína recombinante. Podem ser produzidos em células procarióticas (bactéria) ou em células eucarióticas (mamíferos, levedura e plantas) (KLEINBERG e MOSDELL, 2004). Dentre os diferentes tipos de sistema de expressão está a *Escherichia coli*, caracterizado como um dos sistemas de expressão mais utilizados na engenharia genética e na produção de proteínas heterólogas para fins terapêuticos, quando se trata de proteínas que não exigem modificações pós-traducionais para exibir sua respectiva atividade biológica (MELLSTEDT, *et al.*, 2008; WALSH, 2010). Tal fato dá-se pelas vantagens que ela oferece, pois fornece altos níveis de expressão de proteínas recombinantes, crescem em meio de cultivo de baixo custo, possuem acúmulo rápido de biomassa e

permitem processo de escalonamento simplificado (WALSH, 2010). Entretanto, apesar de todo conhecimento acumulado sobre o sistema de expressão de *E. coli*, não há garantias de que a expressão de uma determinada proteína será bem sucedida quanto a preservação da atividade biológica, já que esta possui algumas limitações em seu sistema, como a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais comuns em eucariotos e ausência de um eficiente sistema de secreção para a liberação da proteína recombinante para o meio de cultura no caso do hrG-CSF (DUILIO *et al.*, 2004).

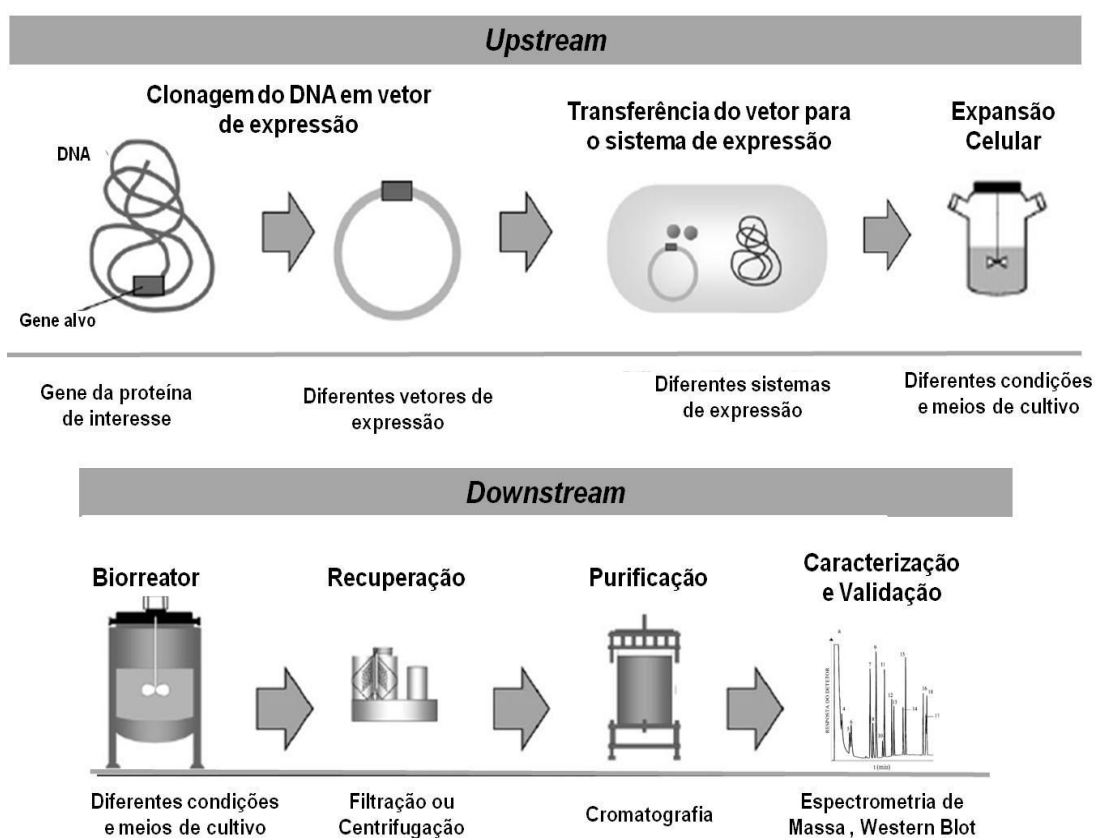


Figura 6: Etapas do processo de produção de biofármacos. Adaptado de MELLSTEDT, *et al.*, 2008.

Ao se utilizar *E. coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes, pode ocorrer o acúmulo das proteínas na forma de agregados insolúveis, denominados corpos de inclusão (*Inclusion bodies* - IB's), os quais podem levar a uma dificuldade do dobramento normal da proteína, tornando-a inativa e fazendo-se necessárias etapas adicionais de solubilização com agentes desnaturantes e *refolding* das proteínas (VILLAVARDE e CARRIO, 2003). Contudo, estudos mostraram que os IB's não são formados somente por proteínas inativas, visto que

em 2005, Jevsevar e cols., demonstraram que várias proteínas, inclusive o hrG-CSF são expressas em forma de IB's com atividade biológica (JEVSEVAR *et al.*, 2005; DE GROOT e VENTURA, 2006a; PETERNEL *et al.*, 2008, PETERNEL *et al.*, 2009;).

Por muito tempo, os IB's foram vistos como um aspecto negativo, fato este que pode ser confirmado pelas diversas tentativas de reduzir a sua formação. Tais tentativas estão relacionados com a força do promotor, estabilidade do mRNA, condições de temperatura, entre outros (MARTINEZ-ALONSO, *et al.*, 2009; GARCIA-FRUITOS, *et al.*, 2012). Todavia, estudos vêm demonstrando também controvérsias no que diz respeito às vantagens da expressão em IB's (JEONG, 2001; MARTINEZ-ALONSO, *et al.*, 2009; GARCIA-FRUITOS, 2010; GARCIA-FRUITOS, *et al.*, 2012):

- Facilidade de remoção da mistura proteica celular por uma simples centrifugação;
- Redução no volume de processo *downstream*;
- Alto rendimento de expressão;
- Quantidade reduzida de contaminantes, o que facilita a etapa posterior de purificação;
- Proteção contra degradação por proteases.

A clonagem molecular e expressão do gene do G-CSF humano foram descritas pela primeira vez em 1986, utilizando como sistema de expressão *Escherichia coli* sendo a proteína expressa em IB's (NAGATA *et al.*, 1986; SOUZA *et al.*, 1986)

1.4 - Biofármacos e Sistema Único de Saúde

Os produtos desenvolvidos por engenharia genética são em geral onerosos, pois estão sob controle de patentes e domínio de mercado por grandes empresas de biotecnologia, refletindo no valor final do biofármaco, o que torna difícil o acesso dos pacientes por estes medicamentos (SATAGINNUS, 2006). Exemplo disto está representado na **figura 7**, onde, para comprar uma pequena variedade de biofármacos, o Ministério da Saúde gastou cerca de 30% do total dos gastos em medicamentos no ano de 2010 (JUNIOR, 2011).

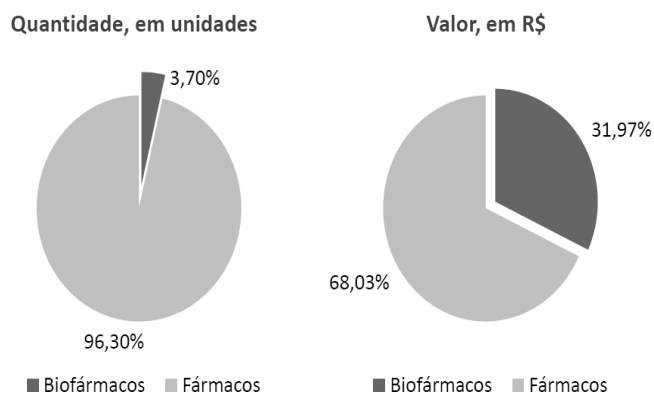


Figura 7: Quantidade de biofármacos e o valor referente, gasto pelo Ministério da Saúde no ano 2010. Retirado de JUNIOR, 2011.

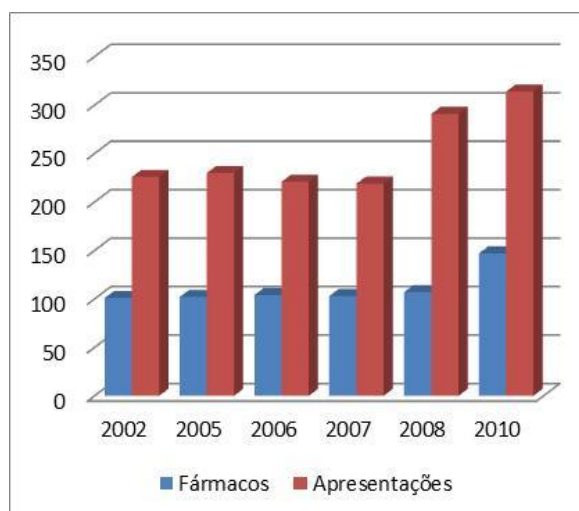
Neste contexto, sendo o acesso a medicamentos uma condição essencial para uma adequada política assistencial e um direito fundamental do ser humano sob responsabilidade do Estado, em 1990 foi criado no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 1990). O SUS foi criado pela Lei nº 8.080, onde foi definido como o conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo Poder Público (BRASIL, 1990) em prol da saúde da sociedade brasileira. Seu objetivo é o de reduzir o risco de doenças e de outros agravos e assegurar a todos o acesso universal e igualitário a ações e serviços para a promoção, proteção e recuperação da saúde (BRASIL, 1990). Após a criação do SUS houve mudanças e atualizações, para que através da assistência farmacêutica o acesso da população a medicamentos fosse cada vez maior, com segurança, qualidade, eficácia e com o menor custo possível (BRASIL, 1998).

Os biofármacos, por serem produtos de alto valor unitário, são classificados como Medicamentos Excepcionais. O termo foi utilizado pela primeira vez em 1982, por meio da Portaria Interministerial nº 3 MPAS/MS/MEC, a qual estabelecia como medicamento excepcional todo e qualquer tipo de medicamento que não estivesse na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 1982). Portanto, em 1993, mesmo sem atualização conceitual, foi criada a primeira lista de medicamentos excepcionais, onde constavam somente a ciclosporina e eritropoetina humana, indicados para tratamento dos pacientes transplantados e portadores de doenças renais crônicas, respectivamente (BRASIL, 1993). A partir de então foram

realizadas várias atualizações, inclusões e exclusões, onde em 1995 a lista constava de 18 medicamentos (BRASIL, 1995). Foi ampliada para 32 fármacos, com 55 apresentações farmacêuticas distintas em 1996, a partir da Portaria SAS nº 204, na qual já estava inclusa a Filgrastima (BRASIL, 1996). Em 1997, seguindo a mesma lógica, a Portaria SAS/MS nº 17, de 22 de janeiro de 1997 padronizou os medicamentos Interferon- β 1a (3.000.000UI, injetável) e Interferon- β 1b (9.600.000UI, injetável) como imunomoduladores indicados para tratamento da esclerose múltipla (BRASIL, 1997).

Desde a criação do programa em 1993, ocorreram várias atualizações, modificações inclusões e exclusões e, em sua última atualização em 2010, a lista de medicamentos excepcionais contava com 314 apresentações e 147 fármacos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006; BRASIL, 2007a; BRASIL 2008, BRASIL, 2009) **(tabela 2)**.

Tabela 2: Histórico do elenco de medicamentos excepcionais desde 2002



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010a.

O marco importante para os medicamentos excepcionais foi em 2002, onde através da Portaria GM/MS nº 1.318/2002, foi estabelecido um novo conjunto de medicamentos excepcionais, os quais, para serem dispensados deveriam ser levados em consideração critérios de diagnóstico, indicação, tratamento, entre outros parâmetros definidos nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), publicadas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002b). Além disso, foi

estabelecido um novo conceito para medicamentos excepcionais, pois o termo era empregado pela Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do MS para relatar tratamento de doenças crônicas que atingiam um número reduzido de pessoas. Entretanto, existem patologias crônicas, que, por possuírem alta prevalência, não são consideradas raras (BRASIL, 1998).

Na nova definição, os medicamentos excepcionais foram classificados como “aqueles destinados ao tratamento de moléstias crônicas, de caráter individual e cujo custo é elevado, seja pela própria cronicidade, seja pelo elevado valor unitário da substância medicamentosa” (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2002c). No ano de 2006, foi criada pelo Ministério da Saúde, a partir de uma revisão da Portaria GM/MS nº 1.318/2002, a Portaria GM/MS nº 2.577 que aprovou o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional, ou seja, é um Componente que, pelas suas características peculiares, é um conjunto de medicamentos cuja dispensação deve ser considerada “excepcional” (BRASIL, 2006). Entretanto, no ano de 2009, por meio da Portaria GM/MS nº 2.981, foi aprovado o Componente Especializado de Assistência Farmacêutica (CEAF), como uma estratégia para acesso a medicamentos, aprimorando e substituindo o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional (BRASIL, 2009b).

O financiamento federal para aquisição destes medicamentos, assim como de todas as ações e serviços de saúde, está atualmente regulamentado pela Portaria GM nº 204 de 29 de janeiro de 2007, onde o bloco de financiamento de assistência farmacêutica está dividido em três componentes: básico, estratégico e medicamentos de dispensação excepcional (BRASIL, 2007a) Para a aquisição de medicamentos excepcionais, os recursos são transferidos pelo Ministério da Saúde aos Estados e ao Distrito Federal através das suas respectivas Secretarias de Saúde (BRASIL, 2007a). No ano de 1995, quando eram fornecidos apenas dois medicamentos, foram atendidos em torno de 7 mil pacientes, representando um gasto aproximado de R\$ 74 milhões. Já no ano de 1998, foram atendidos em torno de 36,2 mil pacientes com gasto de R\$ 164,8 milhões, representado aumento ainda mais significativo nos anos seguintes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; CARIAS *et al.*, 2011). A partir de então, apesar da melhoria gerencial do programa, o controle de preços e a disputa de mercado entre os laboratórios, os recursos financeiros empregados pelo Ministério da Saúde para financiamento exclusivo dos medicamentos do Componente de

Medicamentos de Dispensação Excepcional têm crescido de forma exponencial (BRASIL, 2010a). É importante ressaltar que, somente no ano de 2008, 49% do total de gastos com medicamentos excepcionais pelo SUS foi com medicamentos de base biotecnológica, o que corresponde a aproximadamente R\$ 1,1 bilhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; CARIAS et al., 2011). No ano de 2010 os gastos representaram cerca de R\$ 2,6 bilhões, representando um crescimento de aproximadamente 130%, quando comparado ao ano de 2008 (**figura 8**) (BRASIL, 2010a).

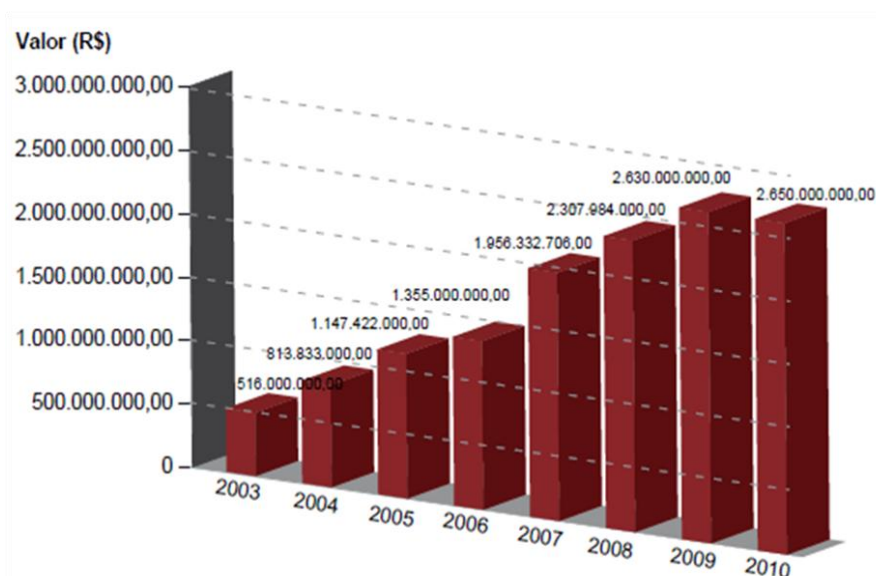


Figura 8: Evolução dos gastos do Ministério da Saúde com Medicamentos de Dispensação Excepcional do ano de 2003 a 2010. Retirado de BRASIL, 2010a.

Os gastos elevados se devem em grande parte ao fato de o Brasil ser um grande importador de biofármacos. Para reduzir a dependência externa é de interesse estratégico para o país o desenvolvimento de uma indústria nacional de biofármacos (FARDELONE, BRANCHI, 2006). Com grande potencial de desenvolvimento, a indústria brasileira de saúde foi beneficiada também como setor estratégico da Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior (PITCE), criado em 2003, com o intuito de aumentar o grau de inovação da indústria, particularmente através do aumento das atividades de Pesquisa e Desenvolvimento (LOBATO, 2012). Houve também o Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007, a partir do qual foi instituída pelo governo federal a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia e criação do Comitê Nacional de Biotecnologia para estimular a geração e controle de

tecnologias e a consequente produção nacional de produtos estratégicos na área de saúde humana (BRASIL, 2007b). O objetivo foi posicionar competitivamente a bioindústria brasileira na comunidade biotecnológica internacional, com potencial para gerar novos negócios, expandir exportações, integrar-se à cadeia de valor e estimular novas demandas por produtos e processos inovadores, levando-se em consideração as políticas de saúde (BRASIL, 2007b).

Para que todos os incentivos fossem válidos foram estabelecidas uma série de ações, que vão desde novas leis de incentivo fiscais, da melhoria da relação público-privado, do aumento substancial do crédito em condições favorecidas para atividades inovadoras nas empresas, do aumento de bolsas de pesquisa entre outros (SALERNO e DAHER, 2006). Dentre estes, foi criada, em 2008 uma lista de produtos estratégicos no âmbito do SUS, para facilitar o processo citado, na qual se encontra a Filgrastima (BRASIL, 2008).

1.5 - Mercado Biofarmacêutico

A indústria farmacêutica mundial até o ano de 2006 investiu de 50 a 60 bilhões de dólares no mercado biofarmacêutico. As vendas neste setor do ano de 2000 a 2005 aumentaram anualmente, onde somente os anos de 2003 e 2004 representaram lucros de US\$ 41,3 e US\$ 60,7 bilhões de dólares, respectivamente, observando as maiores vendas no ano de 2005 com US\$ 70,8 bilhões de dólares (FARDELONI E BRANCHI, 2006; PISANI e BONDUELLE, 2012). Já no ano de 2010 as vendas representaram cerca de US\$ 700 bilhões, dos quais US\$ 130 bilhões foram produtos de base biotecnológica (18,4%), números que são previstos para aumentarem até 2016, representando aproximadamente 21% das vendas (**figura 9**).

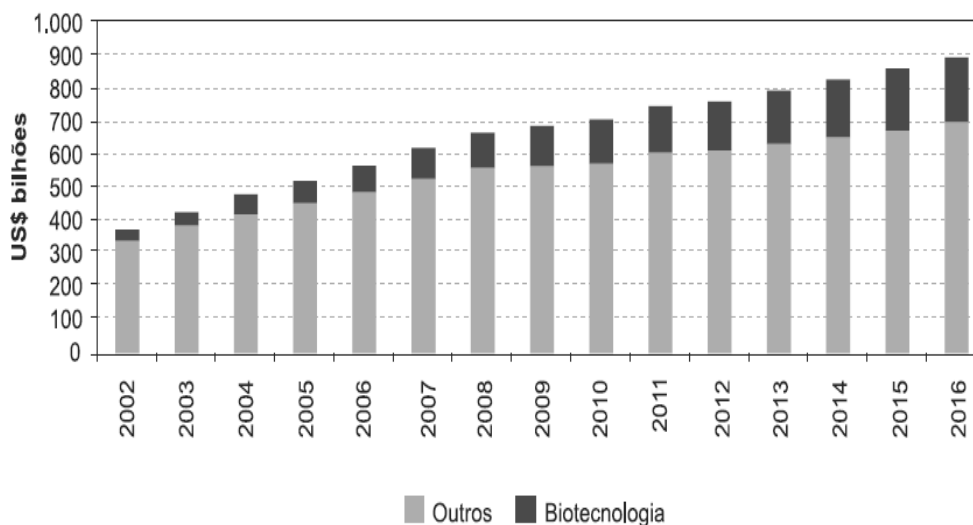


Figura 9: Representação gráfica do aumento das vendas de medicamentos de base biotecnológica de 2002 a 2011 e perspectivas até 2016. Retirado de REIS, LANDIM, PIERONI, 2011.

Dentre as principais empresas biofarmacêuticas mundiais encontra-se a Amgen que no ano de 2005 teve um faturamento de US\$ 583 milhões de vendas com medicamentos relacionados à quimioterapia, como a Filgrastima. Após a expiração da patente deste biofármaco em 2006 as vendas foram ainda maiores, representando US\$ 1.216 milhões (PISANI e BONDUELLE, 2012; RICHE, 2012; JARVIS, 2006). A indústria farmacêutica brasileira tem investido de maneira tímida em ciência, tecnologia e inovação, como a biotecnologia. As empresas que lideram este setor são empresas de grande porte e que atuam de forma globalizada, sendo a liderança o resultado de pesquisas com classes farmacêuticas mais complexas e que exigem tecnologias mais avançadas a exemplo da Filgrastima (REIS, LANDIM, PIERONI, 2011; REIS, PIERONI, SOUZA, 2009).

Com a expiração das patentes dos biofármacos originais, o mercado torna-se expressivo para a produção dos biossimilares, abrindo espaço para a formação de novas equipes, “novos” produtos e novas empresas (REIS, PIERONI, SOUZA, 2009). Pode também ser um marco inicial para um novo seguimento da indústria farmacêutica, como ocorreu com os medicamentos genéricos, os quais permitiram que as empresas nacionais conseguissem captar oportunidades, adquirindo competência na formulação e registro de produtos de síntese química e ganhando

participação de mercado (REIS, LANDIM, PIERONI, 2011; REIS, PIERONI, SOUZA, 2009).

A criação de indústrias biotecnológicas em saúde é estratégica sob vários pontos de vista. Para as empresas farmacêuticas nacionais, agrega competências para inovação e representa uma porta para a entrada em um mercado com elevado potencial de crescimento (REIS, PIERONI, SOUZA, 2009; REIS, LANDIM, PIERONI, 2011). Para o País, significa a possibilidade de produção de maior valor em um setor de alta complexidade tecnológica, com efeitos positivos em termos de competitividade, desenvolvimento industrial e outros efeitos indiretos. Além disso, agrega-se ainda o beneficiamento da população, onde o forte peso dos gastos com produtos biológicos entre as compras diretas do Ministério da Saúde seria diminuído, promovendo maior acesso da população à saúde (REIS, PIERONI, SOUZA, 2009).

Assim, o governo tem tomado medidas para promover o desenvolvimento da biotecnologia relacionada à saúde no Brasil. Como exemplo podemos citar em primeiro lugar a nova Lei de Compras Públicas (Lei nº 12.349/2010), que altera a Lei 8.666/93, e estabelece margem de preferência diferenciada em licitações públicas para produtos produzidos ou desenvolvidos no Brasil (BRASIL, 2010b). Há também a Portaria nº 1.284 de 2010, que apresenta a lista atualizada de produtos prioritários para o SUS, onde estão inclusos medicamentos de alto valor social, econômico e tecnológico (BRASIL, 2010c). E, por último e muito importante o aumento dos investimentos pelo governo federal e alguns estaduais no setor da biotecnologia. Os investimentos em biossimilares aumentam anualmente.

Em Fevereiro de 2007 o Ministério da Saúde concedeu a Fiocruz R\$ 30 milhões do Fundo Tecnológico do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (Funtec/BNDES) para desenvolvimento de vacinas virais e bacterianas, biossimilares e reativos para diagnóstico. Teve também um grande apoio governamental o futuro Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico (CIPBR) de Biomanguinhos, contribuindo para diminuição da dependência externa (ALMEIDA, 2007; LOBATO, 2009). As obras iniciaram-se no ano de 2007, sendo o investimento por parte do Ministério da Saúde de R\$ 17 milhões do total de R\$ 106 milhões necessários, que virão de outras fontes públicas ou privadas (ALMEIDA, 2007). No Ano de 2008, pesquisadores da UFRJ em parceria com Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás),

com investimento de R\$ 7,9 milhões do BNDES visaram a produção de 3 biossimilares, dentre eles a Filgrastima (ROMERO, 2012). No entanto, até o momento não existem dados da produção de biofármacos.

Não existem estatísticas específicas em relação ao mercado biofarmacêutico brasileiro. Entretanto, como o mercado de medicamentos biológicos no Brasil é majoritariamente público, a demanda desses produtos está muito concentrada no SUS, em função de muitos dos biológicos serem objeto de programas específicos do Ministério da Saúde, ter alto custo ou serem ligados a procedimentos hospitalares, como já explicitados anteriormente na figura 9 (BRASIL, 2010a). Além da demanda das compras pelo Ministério da Saúde, é importante ressaltar também as exportações de biofármacos, visto que, mesmo com todos os incentivos existentes até agora existe uma baixa produção nacional destes medicamentos, onde a demanda é suprida por importações (**figura 10**) (REIS et al., 2011).

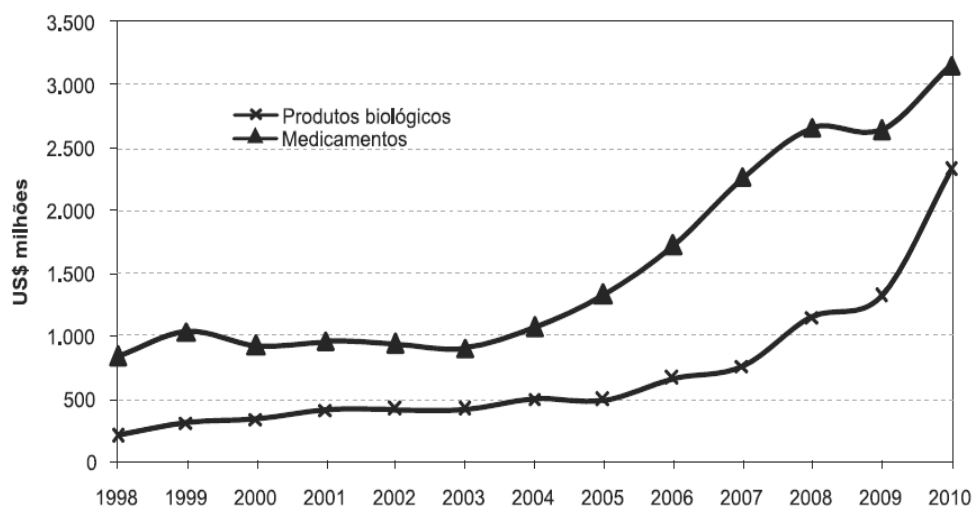


Figura 10: Demonstrativo do crescente índice de importações de biofármacos pelo Brasil do ano de 1998 a 2010. Retirado de REIS, LANDIM, PIERONI, 2011.

Em se tratando de hrG-CSF, um estudo de viabilidade técnico-econômica da implantação da produção deste biossimilar no Brasil, demonstrou que este pode ser produzido com custos reduzidos em até 90% dos valores pagos em compras governamentais, provando que é de se extrema importância o desenvolvimento da produção deste medicamento no País (ENCARNAÇÃO et al., 2005).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolvimento de tecnologia para a produção em escala laboratorial do biossimilar do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano recombinante (hrG-CSF), com atividade e nível de pureza adequados para futuro escalonamento industrial.

2.2 - Objetivos Específicos

- Desenhar e sintetizar quimicamente o gene do hG-CSF para expressão em *E. coli*;
- Clonar o gene sintetizado em vetor de expressão bacteriano da série pET28a⁺ (Novagen) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase;
- Expressar o hrG-CSF em células de *E. coli* BL21(DE3) pLysE em escala de 50 mL e 1 L;
- Otimizar as condições de expressão da proteína recombinante;
- Purificar a proteína recombinante presente em corpos de inclusão;
- Determinar a massa molecular e verificar a pureza da proteína recombinante por espectrometria de massa (Micro-TOF);
- Testar a atividade biológica em modelo experimental *in vivo*;
- Estimar os custos de produção em escala de bancada.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Síntese do gene e Clonagem em Vetor de Expressão pET28a+

A versão humana da sequência codificadora do G-CSF, após a remoção da região do peptídeo sinal, foi sintetizada quimicamente por empresa especializada (Epoch Biolabs - EUA), utilizando-se códons preferenciais para *E. coli*. Como vetor para expressão do hrG-CSF, foi escolhido o vetor pET28a+ (Novagen), um plasmídeo amplamente utilizado na expressão heteróloga de proteínas recombinantes. O gene foi então clonado neste vetor sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase, o qual também apresenta resistência ao antibiótico canamicina (Km), processo também realizado pela Epoch Biolabs.

3.2 - Sequenciamento do gene sintético

Para confirmar a sequência do gene sintético o plasmídeo pET28a+ com os gene clonado foi submetido ao sequenciamento automático de DNA utilizando os primers *T7 Forward* e *T7 Reverse*, que anelam em regiões conhecidas no vetor. As reações de sequenciamento foram realizadas com 150 ng de plasmídeo quantificados por espectrofotometria utilizando o GeneQuant RNA/DNA Calculator (Biochrom, UK) e analisadas no sequenciador automático *MegaBACE* 1000 (Molecular Dynamics), utilizando-se o kit "*MegaBACE Dye Terminator*". A tradução da proteína predita foi obtida utilizando-se a ferramenta de tradução do servidor gratuito Expasy (<http://www.expasy.org>). A qualidade do sequenciamento foi analisada utilizando as ferramentas de bioinformática PHRED (<http://www.unb.br/ib/cel/biomol>), e a análise da sequência foi feita por comparação com as sequências depositadas em banco de dados, com o auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), confirmando a sequência correta do gene sintético.

3.3 - Expressão de hrG-CSF em *E. coli*

3.3.1 - Transformação das células competentes para expressão

Células termocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysE (Invitrogen) foram transformadas por choque térmico (Micropulser – BioRad®). Adicionou-se 50ng dos vetores pET28a+/hrG-CSF em 100 µl de célula competente, as quais foram incubadas por 30 minutos no gelo. Para o choque térmico, a amostra foi imediatamente incubada por 30 segundos a 42°C, e colocadas novamente em gelo. Adicionou-se 1 mL de meio LB (Luria Bertani - 10 g/l triptona, 10 g/l NaCl e 5 g/l de extrato de levedura) a temperatura ambiente. Após agitação a 200 rpm durante 30 minutos, as células foram plaqueadas em Placa de Petri contendo meio LB-ágar (9.1 g/L triptona, 4.6 g/L extrato de levedura, 4.6 g/L NaCl e 13.7 g/L Agar) com Canamicina (Km) 30 µg/mL. A placa foi então incubada em estufa a 37° por aproximadamente 16 horas. Clones isolados foram estocados em meio LB/Km 30 µg/mL com glicerol 20% estéril em ultrafreezer – 80°C.

3.3.2 - Expressão do hrG-CSF em *E. coli*

Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia isolada nas condições descritas acima foram inoculadas em 25mL de meio LB/Km 30µg/mL e incubadas a 37°C sob agitação a 200 rpm por 16 horas. Para o inóculo, a cada 50 mL de meio foi adicionado 1% (500 µL) do pré-inóculo e mantido sob agitação de 200 rpm a 37°C. Após atingir a OD_{600nm} (*Optical Density of 600 nanometers*) de 0,7, caracterizada como fase exponencial, que ocorreu duas horas após a incubação, foi realizada indução com IPTG 1mM. Após 3 horas de indução as células foram centrifugadas a 5.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* de células foi adicionado tampão de lise (tris 50mM, EDTA 1mM e PMSF 1mM) na proporção de 1:10 (p/v). A amostra foi então sonicada em amplitude de 40% por 6 minutos (5 segundos ON e 5 segundos OFF) em sonicador (102 C – Branson®). O produto da sonicação foi centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4°C. As frações, solúvel e insolúvel, foram analisadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com azul brilhante de Comassie R250. Este protocolo foi utilizado em todas as etapas iniciais do trabalho até o

momento que este procedimento foi alterado para otimizar e facilitar a lise e isolamento dos corpos de inclusão contendo a proteína hrG-CSF e, a purificação final por cromatografia de fase reversa.

3.3.3 - Otimização da Expressão em *E. coli*

Para os testes de expressão foram analisadas as variações de agente indutor IPTG e meios de cultivo LB/Km 30µg/mL e 4xYT/Km 30µg/mL (32 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl e 20 g/L de Extrato de Levedura contendo Canamicina 30µg/ml) descritas na **tabela 3**.

Tabela 3: Planejamento Fatorial para testes de Expressão do hrG-CSF em *E. coli*.

Teste	Meio de Cultivo	[IPTG]
1	LB	0 mM
2	LB	0,4 mM
3	LB	1 mM
4	4xYT	0 mM
5	4xYT	0,4 mM
6	4xYT	1 mM

Foi obtido um pré-inóculo como descrito anteriormente e inoculado na mesma proporção em 50 mL dos meios a serem testados. Os testes foram realizados a 37°C com agitação de 200 rpm durante 9 horas após a indução. O crescimento celular foi acompanhado e avaliado através da coleta de 200 µL de suspensão de células a cada hora para leitura em espectrofotômetro (Biophotometer – Eppendorf®) a 600 nm.

Para avaliação da expressão do hrG-CSF foi coletado 1 mL da cultura de células a cada hora. Cada amostra foi centrifugada a 5.000xg a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e, à fração insolúvel foram adicionados 50µl de Tampão de Amostra 4X (glicerol 10%, β-Mercaptoetanol, SDS 2,3%, Tris 124 mM, azul de bromofenol 0,01%) e 5 µl (correspondendo à 100µl de expressão total) foram analisados utilizando-se gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com

azul brilhante de Comassie R250. Além da análise visual pela coloração foi realizada a análise densitométrica, utilizando-se o equipamento ImageScannerIII (GE[®]) e o *software* ImageMaster 2D Platinum (GE[®]).

3.4 - Testes de Lise Celular, Lavagem e Solubilização dos Corpos de Inclusão

3.4.1 - Teste 1: Lise celular mecânica e lavagem/solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos

Foram realizados vários testes de lavagens e solubilização dos corpos de inclusão. O primeiro teste realizado foi com a utilização de agentes caotrópicos (Uréia e Cloridrato de Guanidina - GuHCl) em diferentes concentrações. A cultura de indução de 50 mL foi lisada com tampão de lise (Tris 50mM, EDTA 1mM e PMSF 1mM) na proporção de 1:10 (p/v). A amostra foi então sonicada em amplitude de 40% por 6 minutos (5 segundos ON e 5 segundos OFF) em sonicador. O produto da sonicação foi centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4°C.

Após a lise celular foi realizada a lavagem da fração insolúvel utilizando-se tampão de lavagem (tris 50 mM pH 8, EDTA 0,5mM e Triton x-100 2%) na proporção de 1:10 (p/v). Depois de adicionado o tampão à amostra, a suspensão foi mantida sob agitação (agitador orbital) por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 10.000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para análise em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com azul brilhante de Comassie R250.

Seguindo o mesmo protocolo, utilizando-se as mesmas proporções de volume das soluções, 1:10 (p/v), condições de agitação (agitador orbital por 30 minutos) e centrifugação (10.000xg por 30 minutos a 4°C), foram feitos os tratamentos seguintes, alterando apenas a concentrações de Uréia e GuHCl. As concentrações testadas foram Uréia 2M, 4M, 6M, 8M e GuHCl 2M, 4M e 6M. Após o final de tratamentos das amostras as proteínas das frações solúveis (sobrenadante) foram quantificadas utilizando-se o Kit 2D-quant (Amersham Biosciences[®]) para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com azul brilhante de Comassie R250. Foram aplicados no gel 30µg de proteína total de cada amostra.

3.4.2 - Teste 2: Lise celular mecânica, lavagem com detergentes e solubilização com agentes caotrópicos e variação de pH

O segundo teste foi realizado conforme Vanz e cols (2008), com algumas modificações, utilizando-se 4 etapas de tratamento da amostra. A primeira etapa foi a lise celular mecânica realizada da mesma forma como descrita no teste 1. Após a lise foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem I (Tris 50mM pH 8, EDTA 0,5mM e Triton x-100 2%), tampão de lavagem II (Tris 50mM pH 8, EDTA 0,5mM e Deoxicolato de sódio 1%) e tampão de lavagem III (Tris 50mM pH 8, EDTA 5mM e NaCl 1M), todos na proporção de 1:10 (p/v), segundo Vanz e cols (2008). Após a adição dos tampões, as amostras foram agitadas a temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante coletado para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com azul brilhante de Comassie R250. Foram aplicados 30 μg de proteína total de cada amostra, quantificadas pelo método 2D-quant.

Para a solubilização da fração insolúvel onde se encontra a proteína hrG-CSF em corpos de inclusão, utilizou-se o agente caotrópico Uréia na concentração de 2M na proporção de 1:10 (p/v) em diferentes pH's (12, 13 e 14) regulados pela adição de NaOH 10mM. As amostras foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), corado com azul brilhante de Comassie R250. Foram aplicados 30 μg de proteína total de cada amostra, quantificadas pelo método 2D-quant.

As amostras solubilizadas com NaOH 10mM em pH 12 foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente por 30 min. e, posteriormente o pH foi reduzido para 8 com tampão Tris-HCl pH 8. Após centrifugação a 10.000 xg , por 30 minutos a 4°C, a fração insolúvel foi descartada e a fração solúvel foi utilizada para realização do teste em cromatografia de troca aniônica.

3.4.3 - Teste 3: Lise celular química, lavagem com solução específica e solubilização

Para a realização do terceiro teste, a lise celular, lavagens e solubilização dos corpos de inclusão foram realizadas a partir de um protocolo desenvolvido neste trabalho, o qual não pode ser descrito devido ao processo de patenteamento.

3.5 - Purificação da proteína recombinante

3.5.1 - Cromatografia de Troca Aniônica

Após as etapas de tratamento segundo Vanz e cols (2008) com algumas modificações (teste 2), a amostra foi submetida à cromatografia em coluna de troca iônica, utilizando-se 2 mL de resina (DEAE Sephacryl – Pharmacia®), com capacidade de retenção de 75 mg de proteína por mL. A coluna foi preparada em tubo de vidro e os 2mL de volume de resina foram empacotados por gravidade. Antes de dar início a qualquer processo a resina foi lavada utilizando-se 6mL (3 vezes o volume de resina) de Tris 50mM pH 8 e NaCl 1M com auxílio de bomba peristáltica (LKB pump-P1 – Pharmacia®) com o fluxo ajustado para 1 mL/ min. A partir disto, a resina foi equilibrada com 6 mL de tampão de equilíbrio (tris 50 mM, pH 8), com o fluxo ajustado para 1 mL.min⁻¹. Foi aplicado 4,5 mg de proteína total quantificada pelo método de Bradford®, obtida a partir do teste 2, equivalente a 3% da capacidade da resina. Após aplicada amostra na coluna, foi mantido um fluxo contínuo por 20 minutos para a ligação na resina.

Para os gradientes de eluição foram utilizados 2 procedimentos utilizando-se Gradient Makers HOEFER SG30 (Pharmacia®), sendo uma coluna composta de tampão de equilíbrio (tris 50 mM, pH 8) e a outra coluna com tampão de eluição, homogeneizados com agitador magnético. Para o primeiro teste utilizou-se como tampão de eluição tris 50 mM, pH 8 e NaCl 1 M. Para o segundo teste utilizou-se como tampão de eluição tris 50 mM, pH 8 e NaCl 0,5 M. Ambos os gradientes (0-1M NaCl e 0-0,5M NaCl) foram de 20 mL de tampão de eluição, 20 mL de tampão de equilíbrio, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e mantidos em gelo. Em ambos os testes foram coletadas manualmente frações de 1 mL a cada minuto em tubo *eppendorf* para

leitura de Abs_{280nm} e posterior análise em eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata.

3.5.2 - Metodologia de purificação

O método utilizado para purificação está em fase de patenteamento, não podendo de tal forma ser descrito. Após a purificação o material coletado foi liofilizado e estocado a $-20^{\circ}C$ para posteriores análises por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (15%), análises bioquímicas e testes de atividade biológica.

3.6 - Caracterização da proteína recombinante

3.6.1 - Western Blot

Para a realização do western-blot, 1 ml de cultura de células em meio LB com indução de IPTG 0,4 mM, foi centrifugada a 4.000 xg a $4^{\circ}C$ por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e, à fração insolúvel foram adicionados 50 μ l de Tampão de Amostra 4X (glicerol 10%, β -Mercaptoetanol, SDS 2,3%, Tris 124 mM, azul de bromofenol 0,01%) e 5 μ l (correspondendo à 100 μ l de cultura de células) foram corridos em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 15%. Como controle positivo foram utilizados 3,5 μ g do medicamento Filgrastine[®] e como controle negativo a célula BL21(DE3) pLysE sem o vetor. Após a eletroforese foram cortados membrana de nitrocelulose e 4 papéis de filtro, de forma que ficassem ambos com tamanho compatível ao SDS-Page.

O gel de poliacrilamida foi então incubado em tampão de transferência (33 mM de glicina, 48 mM de Tris Base, 0,037% SDS, 20% metanol a pH 8,3) por 10 minutos sob agitação lenta. Nesse tempo, os papéis filtro e a membrana de nitrocelulose foram imersos no mesmo tampão de transferência e introduzidos no equipamento de transferência semi-seco (Trans-Blot[®], Bio-Rad). Assim, passados os 10 minutos o gel, os papéis de filtro e a membrana de nitrocelulose foram dispostos no aparelho. O hrG-CSF em SDS-Page 15% foi então transferido para a membrana de nitrocelulose em sistema-seco com uma voltagem de 0,5 V por 15

min. Após a transferência, a membrana foi lavada com tampão TBST (Tris Base 50mM pH 7.6, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%) por três vezes sob agitação manual por aproximadamente 20 segundos cada lavagem. Para o bloqueio da membrana utilizou-se 50 mL de solução de bloqueio (Leite em pó desnatado 5%, Tween 0,05% em 50 mL de TBST) *Over Night* (O.N). Passadas aproximadamente 18 horas, a membrana foi novamente lavada por três vezes sob agitação manual por aproximadamente 20 segundos cada lavagem.

A membrana foi incubada com anticorpo primário, anticorpo monoclonal anti-G-CSF (100 µg/mL) sintetizado pela empresa Santa Cruz Biotechnology, na proporção de 1:2000 em solução de bloqueio por duas horas no escuro a temperatura ambiente sob agitação (agitador orbital - 15 rpm). Após a incubação a membrana foi lavada uma vez com solução de bloqueio (agitação manual de 20 segundos) e duas vezes com TBST (agitação manual de 20 segundos cada lavagem).

A incubação da membrana de nitrocelulose com anticorpo secundário foi realizada utilizando-se o anticorpo anti-mouse conjugado com Fosfatase Alcalina (AP) em 50mL de TBS (Tris Base 50mM pH 7.6 e NaCl 150mM) na proporção de 1:2000 por duas horas a temperatura ambiente sob agitação (agitador orbital - 15 rpm). A membrana foi então lavada uma vez com solução de bloqueio (agitação manual de 20 segundos) e duas vezes com TBST (agitação manual de 20 segundos cada lavagem). A revelação foi realizada utilizando-se Fosfatase Alcalina (400µl de tampão, 100µl de Reagente A, 100µl de Reagente B e 940 µL de água destilada).

3.6.2 - Espectrometria de Massa por Electrospray (ESI-MS)

A análise da massa exata bem como da pureza da proteína purificada obtida por cromatografia líquida de fase reversa (como descrito no item 3.6.2) foi realizada por espectrometria de massa, no Laboratório de Espectrometria de Massa, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando o equipamento MicrO-TOF Q II™ ESI-Qq-TOF (Brucker Daltonics). A amostra foi analisada após injeção em uma solução aquosa contendo 50% de acetonitrila e 1% de ácido fórmico.

3.8 - Teste de Atividade Biológica

Para o teste de atividade biológica *in vivo* do hrG-CSF, foram utilizados como modelos camundongos machos de 8-9 semanas de idade da raça Balb/C com peso entre 17-22g, obtidos a partir do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno autoclaváveis, com uma área de aproximadamente 65 cm². As gaiolas foram cobertas por maravalha autoclavada para acomodação e maior higiene dos animais. Tais gaiolas foram mantidas dentro de estantes ventiladas com controle de temperatura de 21-22°C (\pm 2°C), umidade entre 50-55% e dupla filtragem do ar, evitando o acúmulo de substâncias tóxicas no ambiente. A ração utilizada para a alimentação dos animais foi específica para animais de laboratório em uma dieta já padronizada, evitando assim suplementação. A dieta foi oferecida em comedouros localizados na tampa das gaiolas e apresentada em “pellets”. A água filtrada foi oferecida em bebedouros estéreis. Os animais foram distribuídos em 8 grupos cada grupo contendo 5 animais separados por peso (**tabela 4**).

Tabela 4: Grupos de animais para o experimento de teste de atividade biológica do hrG-CSF, separados de acordo com o peso.

Grupo	Tratamento	N° de Animais	Peso Médio
Grupo 1	Não Imunossuprimidos (NI)	5 animais	21,42g
Grupo 2	Controle Negativo	5 animais	19,4g
Grupo 3	4µg Proteína	5 animais	18,96g
Grupo 4	4µg Medicamento	5 animais	18,49g
Grupo 5	12 µg Proteína	5 animais	20,33g
Grupo 6	12 µg Medicamento	5 animais	20,23g
Grupo 7	36 µg Proteína	5 animais	20,6g
Grupo 8	36 µg Medicamento	5 animais	21,06g
Total		50 animais	

O grupo NI foi tratado somente com solução salina tamponada (0,5 mL de PBS), não recebendo Ifosfamida[®] pra induzir a imunossupressão. O grupo do controle negativo recebeu o imunossupressor no primeiro dia e nos 4 dias seguintes recebeu somente 0,5 mL de PBS. O teste foi realizado durante 5 dias de

experimento. De tal forma, no primeiro dia (dia 1), foi induzida a imunossupressão nos animais utilizando-se como agente imunossupressor o medicamento Ifosfamida[®] 500mg da Eurofarma[®], gentilmente cedido pelo Setor de Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Foi utilizada uma dose única de 4,3 mg/0.5 mL por animal (VANZ et al, 2008; LU et al, 1999; CODEVILLA et al., 2004) a qual foi diluída em água para injeção estéril também da Eurofarma[®].

Após 24 horas da imunossupressão, iniciou-se então o tratamento com injeções múltiplas (dia 2 ao dia 5) com o hrG-CSF (amostra) e com o medicamento comercial Filgrastine[®] 300µg/mL da empresa Blaú Farmacêutica (medicamento comercial), também gentilmente cedido pelo Setor de Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário de Brasília (HUB), foram diluídos para as concentrações finais de 4, 12 e 36 µg.mL⁻¹ em 0,5mL de tampão fosfato salino (PBS), para injeção por via intraperitoneal nos animais (LU et al., 1999; CODEVILLA et al., 2004), conforme demonstrado na **tabela 5**. O grupo controle foi tratado somente com 0,5 mL de veículo (PBS) no mesmo esquema de administração da amostra e do padrão.

Tabela 5: Esquema de tratamento para o teste de atividade biológica do hrG-CSF utilizando-se o controle e o padrão.

Dia	Tratamento
Dia 1	Solução Salina (0,5ml) Grupo1
	Imunossupressor 4,3mg/0,5ml Grupos 2 ao 10
Dia 2	Proteína (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Medicamento (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Grupos 3 ao 8
	Solução Salina (0,5ml) Grupos 1 e 2
Dia 3	Proteína (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Medicamento (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Grupos 3 ao 8
Dia 4	Solução Salina (0,5ml) Grupos 1 e 2
	Proteína (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Medicamento (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Grupos 3 ao 8
	Solução Salina (0,5ml) Grupos 1 e 2
Dia 5	Proteína (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Medicamento (0,12 µg, 4 µg, 12 µg, 36 µg / 0,5 ml) Grupos 3 ao 8
	Solução Salina (0,5ml) Grupos 1 e 2

Seis horas após as injeções do último dia de tratamento (dia5), os animais foram anestesiados com xilasina (2% m/p) e quetamina (10% m/p) na proporção de 1:1 e 0,5ml de sangue periférico foram coletados pelo seio venoso orbital, utilizando um capilar contendo heparina. Foram realizados esfregaços em lâminas de vidro e coradas pelo método de *May-Grunwald-Giemsa* (GARTNER & HIATT, 2003).

Após a realização dos experimentos a eutanásia dos animais foi realizada utilizando-se o método químico através do agente inalante dióxido de carbono (CO₂) na proporção de 70% com oxigênio. Nessa proporção, ocorre a rápida perda de consciência sem hipóxia. Isto resulta na rápida anestesia, seguido de morte, com efeitos reduzidos de irritação das vias aéreas. Após a eutanásia dos animais, os mesmos serão mantidos a -20°C e posteriormente incinerados, por empresa especializada, previamente contratada pela Universidade de Brasília. Todos os

procedimentos laboratoriais utilizando animais foram conduzidos de acordo com as leis nacionais de proteção e bem-estar animal (BRASIL, 1979).

3.8 - Análises Estatísticas

Os resultados foram da contagem total de leucócitos e da % de neutrófilos foram apresentadas como média \pm SD de 5 animais. A comparação estatística dos dados foi feita por meio da análise de variância (ANOVA) seguido por Bonferroni pós-teste, por meio de Programa GraphPad Prism[®] versão 5.0. Valores de P menores que 0,05 (P <0,05 ou menos) foram considerados significativos.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de produção e purificação influencia diretamente os níveis de produção, atividade biológica e os custos de obtenção do produto final, tornando-se imprescindível a escolha de metodologia adequada, especialmente devido à maior competitividade de mercado alcançada pelos biossimilares (RATHORE e WINKLE, 2009). Para tal, é necessário o desenho de estratégias de produção viáveis, sendo que a escolha do sistema de expressão de proteínas recombinantes é uma etapa essencial para o sucesso da estratégia e viabilidade do processo. Deve-se considerar uma série de fatores, incluindo custos, biossegurança e aspectos técnicos, sendo os últimos principalmente em relação às características estruturais da molécula e exigência de modificações pós-traducionais das proteínas recombinantes. Em se tratando da indústria biofarmacêutica, os sistemas de expressão mais utilizados são: bactéria (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) e células de mamífero como a de ovário de hamster chinês - CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e BHK (*Baby Hamster Kidney*) (FRIENSEN & AN, 1983; SCHELLEKENS, 2009).

Entre os sistemas de produção de proteínas heterólogas, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos mais atrativos, sendo o sistema procariótico mais utilizado. Comparado aos demais, *E. coli* oferece diversas vantagens, como fácil manipulação, habilidade de crescimento rápido em altas densidades celulares, elevada produção de proteína recombinante utilizando meios de baixo custo, além do conhecimento da sua genética e elevado número de vetores e linhagens disponíveis (BANEYX, 1999). Este sistema também facilita o processo de escalonamento, sendo uma etapa crucial no desenvolvimento de biossimilares, sendo de tal forma o sistema escolhido para o desenvolvimento do trabalho (KLEINBERG e MOSDELL, 2004).

A principal limitação deste sistema está relacionada à produção de proteínas oriundas de organismos eucariontes, que possuem modificações pós traducionais, que não são realizadas pelos procariontes como a bactéria *E. coli*. Nestes casos, é necessário utilizar sistemas de produção em células eucariontes, como células de mamíferos (ovário de *hamster*) ou leveduras (*Pichia pastoris*) (DUILIO *et al.*, 2004). Estes sistemas são relativamente mais complexos, sendo a *E. coli* o sistema de

escolha para proteínas que não necessitam de modificações pós-traducionais complexas, como as glicosilações e pontes dissulfeto (KLEINBERG e MOSDELL, 2004).

A proteína G-CSF produzida pelas células humanas apresenta duas pontes dissulfeto intramoleculares e sofre glicosilação. Porém, já é sabido que, quando expressa em células de *E. coli*, o medicamento filgrastima é ativo biologicamente, apesar de apresentar uma metionina inicial, adicionada para permitir a expressão da proteína recombinante em bactéria e não necessitar de sofrer a glicosilação para apresentar atividade biológica (VANZ et al., 2008; JEVSEVAR e MENART, 2006). Desta forma, a estratégia eleita para produção de hrG-CSF foi a expressão em *E. coli*.

4.1 - Síntese do gene sintético e clonagem em vetor de expressão pET28a+

A *E. coli*, como em todas as células, utiliza 61 códons, dos quais alguns são mais frequentemente utilizados, chamados códons preferenciais, e ainda os códons pouco utilizados denominados raros (GAO et al., 2004). Esta bactéria possui enorme capacidade de produzir grande quantidade de proteínas, no entanto, quando o mRNA é de um gene de eucarioto que possui diferentes frequências de códons, ocorrem entaves na tradução da proteína predita ocasionando redução na quantidade e qualidade desta proteína (MALDONADO et al., 2007).

Para facilitar a obtenção de altos níveis desta proteína em bactérias, visto que a superexpressão é importante para viabilidade do processo, a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína hG-CSF foi obtida através de síntese química, realizada pela empresa especializada Epoch BioLabs. Como estratégia, visto que se trata de uma proteína de origem humana, foi realizado um estudo para otimização de códons preferenciais para o sistema de expressão escolhido, a bactéria *E. coli*, visando facilitar a tradução da proteína heteróloga (GAO et al., 2004).

A partir da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína, a versão sintética do gene foi desenhada e sintetizada, com otimização de códons para *E. coli*, assim como remoção de estruturas secundárias desestabilizadoras. A sequência sintética para expressão em *E. coli* foi comparada à sequência humana, disponível no banco de dados GeneBank, sob o número de acesso NM_172219.2 e

como pode ser observado na **figura 11**, vários nucleotídeos foram substituídos visando otimizar os códons, sem alteração na sequência primária da proteína recombinante



Figura 11: Alinhamento da sequência nucleotídica codificadora do hrG-CSF sintético com o cDNA do hG-CSF humano. Os nucleotídeos marcados em caixa não foram substituídos e os códons de iniciação estão representados em cinza.

O cDNA do hG-CSF codifica uma proteína de 204 resíduos de aminoácidos. Esta proteína possui um peptídeo sinal hidrofóbico de 30 resíduos de aminoácidos, que é clivado durante o processo de secreção celular. Desta forma, para expressão da proteína recombinante em bactéria, a sequência codificadora deste peptídeo sinal foi removida e adicionou-se um códon de iniciação (ATG) para permitir a tradução da proteína “madura”. Este resíduo de aminoácido (metionina) adicionado não interfere na atividade biológica da proteína **figura 12** (SOUZA et al., 1986).

```

hrG-CSF -----MTPLPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAA 31
hG-CSF  MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEA TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAA 60
          *****

hrG-CSF  LQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSOLHSGFLFYQGLLQ 91
hG-CSF  LQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSOLHSGFLFYQGLLQ 120
          *****

hrG-CSF  ALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGG 151
hG-CSF  ALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGG 180
          *****

hrG-CSF  VLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP 175
hG-CSF  VLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHAQP 204
          *****

```

Figura 12: Alinhamento das sequências proteicas do hG-CSF e rH-CSF. O peptídeo sinal da proteína expressa em humanos está marcado na caixa. Em cinza, está identificada a metionina adicionada ao N-terminal da proteína recombinante. (-): representam a parte ausente na proteína recombinante, pois refere-se ao peptídeo sinal; (*): representa a identidade da proteína recombinante em relação ao G-CSF humano.

Para o sucesso da estratégia de expressão da proteína recombinante, além de avaliar as características do gene e da proteína, a escolha de um vetor adequado é um fator relevante. O vetor de expressão escolhido foi o pET28a+. Os vetores pET foram originalmente construídos por Studier e Moffat (1986), no qual os genes de interesse são clonados sob controle de um promotor forte de transcrição da T7 RNA polimerase de alta capacidade de processamento, visto que a expressão gênica precisa ser regulada por um sistema de indução ou de repressão (**figura 13**) (SHUMANN e FERREIRA, 2004).

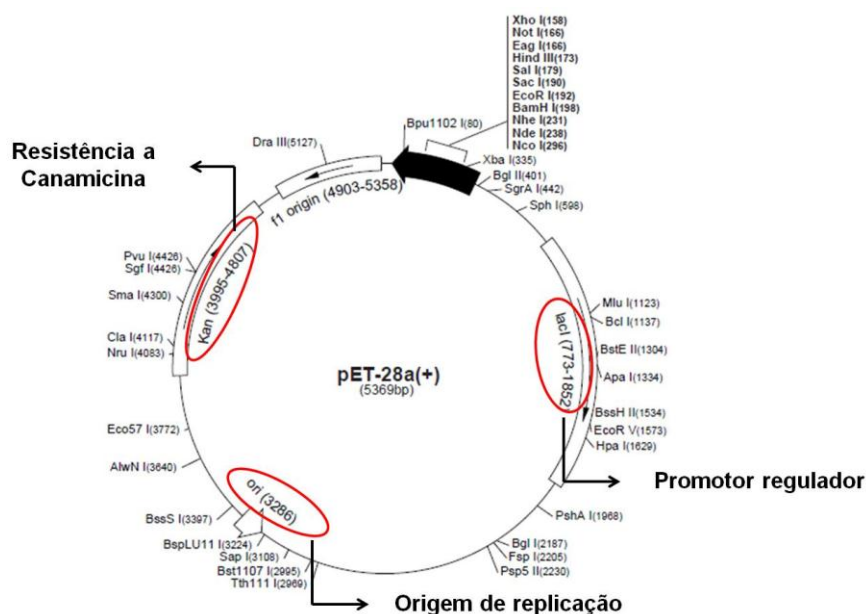


Figura 13: Vetor de Expressão pET28a+ (Novagen)

4.2 - Sequenciamento do gene sintético

A sequência do gene sintético foi confirmada por sequenciamento, utilizando-se o plasmídeo contendo o gene clonado, utilizando os *primers T7 Forward e T7 Reverse*, os quais se anelam na região do promotor T7. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *MegaBACE 1000* (Molecular Dynamics), utilizando-se o kit *MegaBACE Dye Terminator*. A tradução da proteína predita foi obtida utilizando-se a ferramenta de tradução Expasy (**figura 14**). A análise da sequência proteica predita foi realizada por comparação com as sequências depositadas em banco de dados, com o auxílio do programa BLAST, confirmando a sequência correta do gene sintético e obtendo-se uma identidade de 100% em relação ao G-CSF humano.

```

atgaccccgctgggaccggccagttcattaccccagagctttctgctgaaatgtctggaa
M T P L G P A S S L P Q S F L L K C L E
caagttcgtaaaatacagggagatggagcggctctgcaagagaaactgtgcgcgacctat
Q V R K I Q G D G A A L Q E K L C A T Y
aagctgtgccaccctgaagaattagtgctgctggggcactcactgggcatcccgtgggca
K L C H P E E L V L L G H S L G I P W A
ccattatctagttgtccgtctcaagcactgcagctggctgggtgtctgagccaattacat
P L S S C P S Q A L Q L A G C L S Q L H
tcaggtctgtttctgtatcaaggtctgctgcaagcgttagagggtatttctcctgaatta
S G L F L Y Q G L L Q A L E G I S P E L
ggcctacgtttagacactctgcagctggatggtgctgatttcgcaacgacaatttggcag
G P T L D T L Q L D V A D F A T T I W Q
cagatggaggaactgggcatggcgccagcgtgcagccaacacagggcgcaatgccggca
Q M E E L G M A P A L Q P T Q G A M P A
ttcgctagcgcctttcagcgcgcggcgggtggtggttagtagccagccatctgcagagc
F A S A F Q R R A G G V L V A S H L Q S
tttctggagggttagctaccgtgtcttacgtcatttag
F L E V S Y R V L R H L

```

Figura 14: Sequenciamento do gene sintético e tradução da proteína predita. Os sítios de iniciação e terminação estão grifados.

4.3 - Transformação de célula competente *Escherichia coli* e expressão do hrG-CSF

As células termo-competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysE (Invitrogen) foram submetidas ao processo de transformação por choque térmico em presença do vetor pET28a+/hrG-CSF e incubadas em meio LB-ágar/Km a 37° por aproximadamente 16 horas. Os clones isolados foram selecionados e estocados para análise de expressão heteróloga da proteína hrG-CSF. Os testes iniciais de expressão foram

feitos em meio LB/Km e após indução com IPTG 1 mM, conforme descrito em materiais e métodos. A detecção da expressão da proteína foi confirmada pela presença de uma banda diferencial de aproximadamente 20 KDa, o que confere com o tamanho aproximado esperado da proteína hrG-CSF, que é de 18,8 KDa (**figura 15**). Além disso, observou-se que a proteína não apresenta expressão na fração solúvel, sendo a totalidade expressa em agregados insolúveis de proteína denominados corpos de inclusão (*inclusion bodies* – IB's).

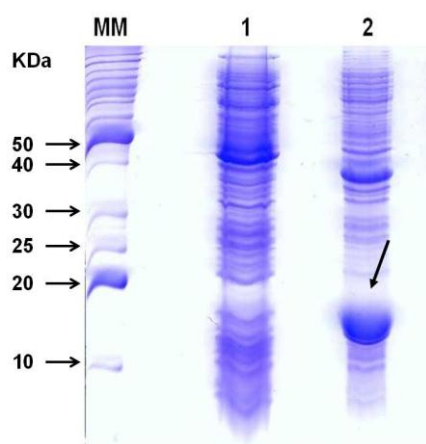


Figura 15: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page 15% da expressão da proteína recombinante hrG-CSF em células BL21(DE3) pLysE/pET28a+. 50 mL de cultura em meio LB/Km com 3 horas de crescimento após a indução de IPTG 1 mM foram lisados com tampão de lise, submetidos à sonicação e centrifugados para a separação das frações, as quais foram tratadas com tampão de amostra e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Marcador de massa molecular (MM), Solúvel da Lise (poço 1); Insolúvel da Lise (corpos de inclusão) (poço 2).

A super-expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pode levar à formação de agregados proteicos insolúveis, denominados corpos de inclusão. A proteína hG-CSF foi obtida em altos níveis intracelulares, porém agrupou-se formando IB's. Estas estruturas intracelulares inicialmente podem ser consideradas como uma limitação do sistema. Porém, como são constituídos de 50 a 95% (SORENSEN e MORTENSEN, 2005) de proteína recombinante, podem ser facilmente separadas do restante das proteínas solúveis na bactéria, podendo ser utilizados como uma estratégia de pré-purificação das proteínas (GARCÍA-FRUITÓS, 2010).

Outro aspecto extremamente relevante na expressão do hrG-CSF em IB's foi a quantidade reduzida de contaminantes, possibilitando a realização de vários testes de lavagem dos corpos inclusão, com o objetivo de reduzir a presença de proteínas

contaminantes/endotoxinas, bem como os demais resíduos da célula hospedeira. Além disso, a expressão em IB's pode proteger a proteína recombinante da degradação por endoproteases bacterianas presentes no citoplasma, permitindo acúmulo de grande quantidade da mesma (GARCÍA-FRUITÓS, 2010).

4.4 - Otimização da Expressão

A maioria das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* são consideradas de alto-custo e baixa produção, sendo então necessária alta densidade celular associada a alta produtividade para que o produto seja economicamente viável (SHILOACH e FASS, 2005). Além da escolha de códons preferenciais para *E. coli*, existem outros parâmetros que devem ser avaliados, pois também podem ser responsáveis pela baixa produção, como meio de cultivo, concentração de indutor, crescimento celular e temperatura (SCHUMANN e FERREIRA, 2004).

O meio Luria Bertani (LB) é largamente empregado para crescimento de bactérias heterotróficas, as quais utilizam como fonte de energia a matéria orgânica, sendo utilizado na pesquisa e produção de proteínas heterólogas por ser um meio complexo que apresenta como fonte de carbono a triptona bacteriológica, e como fonte de nitrogênio e vitaminas o extrato de levedura (LOSEN *et al.*, 2004). Portanto, para otimização da expressão, foram avaliados diferentes concentrações de agente indutor, níveis de crescimento celular e meios de cultivo. Para avaliações de meio de cultivo, além do meio LB foi utilizado o meio 4xYT, devido a literatura relatar a expressão do hrG-CSF sem adição de agente indutor (VANZ *et al.*, 2008).

Com base nos estudos realizados por Riesenber *et al.* (1990), a composição dos meios de cultivo é uma das variáveis mais avaliadas para obtenção de altos níveis de expressão heteróloga de proteínas recombinantes com interesse terapêutico. Deve ser formulada e monitorada uma vez que tem impacto significativo no metabolismo para o crescimento celular e produção de proteínas recombinantes, visto que a síntese proteica é fortemente afetada pela mudança do meio de cultura (JANA e DEB, 2005; CORISDEO e WANG, 2004). A temperatura ótima de crescimento para *E. coli* é 37 ° C, sendo escolhida para proceder os testes, já que temperaturas menores influenciam negativamente no crescimento celular e

expressão de hrG-CSF, pois ocorre redução na captação de nutrientes, na velocidade de crescimento do microrganismo, diminuição da formação de metabólitos secundários e redução na demanda de oxigênio (LEE, 1996). A *E. coli* é geralmente cultivada sob condições aeróbicas, já que o crescimento anaeróbio fornece menos energia para os processos metabólicos, tais como a síntese de proteínas (SALMON *et al.*, 2003). Por isso foi utilizado um sistema de frascos agitados com 200 rpm para oxigenação do meio.

As células de *E. coli* BL21(DE3) pLysE (Invitrogen), transformadas com o vetor pET28a+/hrG-CSF, foram cultivadas em 50 mL dos meios LB e 4YT, ambos contendo triptona como fonte de nitrogênio e extrato de levedura como fonte de carbono, em concentrações diferentes, para análise da expressão do hrG-CSF, com diferentes concentrações de agente indutor IPTG (0 mM, 0,4 mM e 1 mM). O IPTG é um forte indutor químico utilizado largamente na pesquisa básica para indução de promotores *lac*, *tac* e *trc* e representa uma das moléculas mais utilizadas na expressão heteróloga em *E. coli* (MENZELLA *et al.*, 2003). O agente indutor foi utilizado então em diferentes concentrações, onde foram coletadas amostras de hora em hora durante 10 horas após indução com IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), para avaliação das condições de crescimento e expressão.

O crescimento celular bacteriano é caracterizado por conter quatro fases. A primeira fase conhecida como fase *lag*, que se caracteriza por ser o período de adaptação do microrganismo com intensa atividade metabólica. Passado o período de adaptação, o crescimento chega a uma fase exponencial, onde ocorre divisão celular intensa e progressão geométrica do crescimento bacteriano, seguido de uma fase estacionária com a escassez de nutrientes, levando a diminuição do crescimento celular e morte celular (LEE, 1996; JANA e DEB, 2005). Para análise do crescimento celular, 200 µL da cultura de células foram coletados para a realização da leitura da absorbância da OD_{600nm}. A partir disso, foi possível gerar as curvas de crescimento de todos os testes em diferentes condições como demonstrado na **figura 18**.

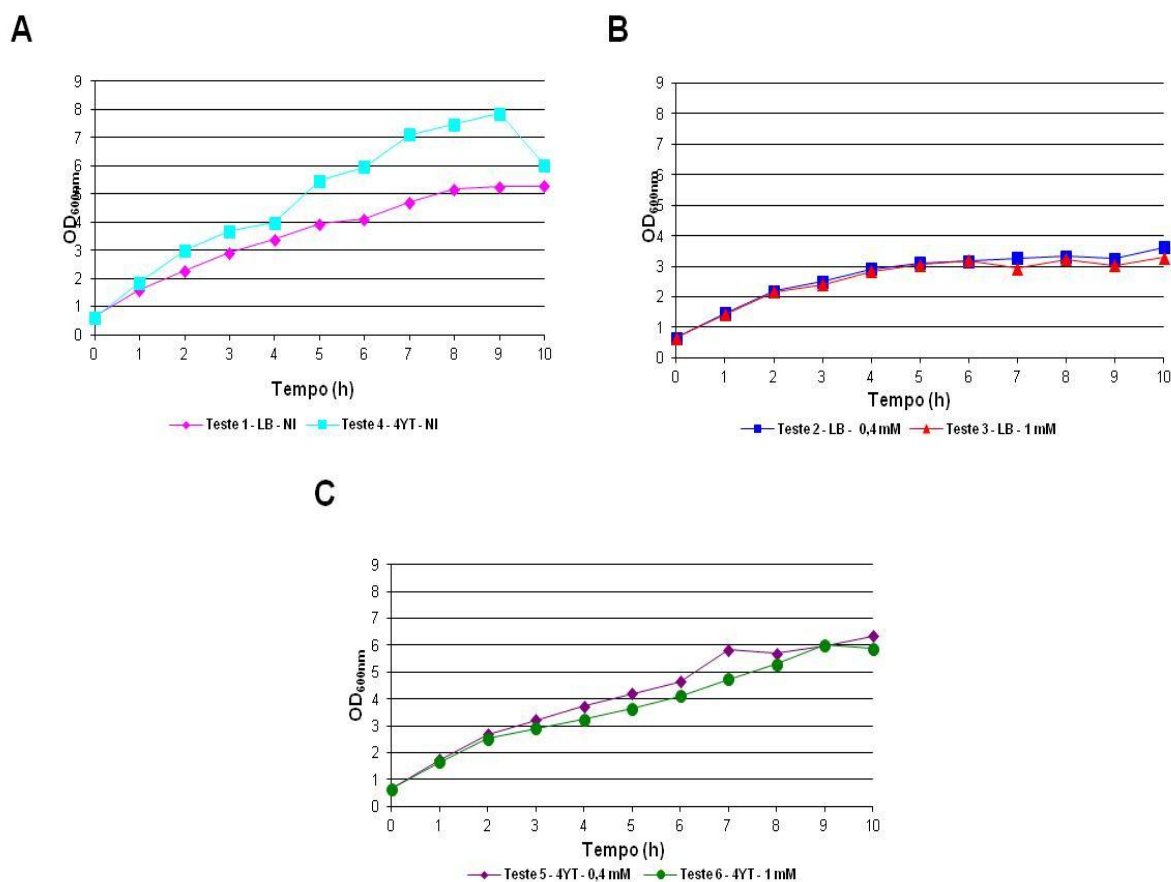


Figura 16: Avaliação do crescimento celular de *E. coli* BL21(DE3) pLysE/pET28a+/hrG-CSF em meio LB/Km e 4xYT/Km em diferentes concentrações de IPTG (0 mM, 0,4 mM e 1 mM). 200 μ L de suspensão de células foram coletados a cada hora durante 10 horas de indução e o crescimento avaliado em OD_{600nm}. Avaliação do crescimento celular: meios LB e 4xYT sem adição de IPTG (**A**); meio LB com adição de IPTG nas concentrações de 0,4 mM e 1 mM (**B**); meio 4xYT com adição de IPTG nas concentrações de 0,4 mM e 1 mM (**C**).

Nos testes utilizando o meio de cultivo 4xYT (**figuras 16 A e C**) observou-se claramente um maior crescimento celular, chegando a uma densidade óptica de até 7,8 ao final do teste sem indução (**figura 16 A**). Tal fato dá-se devido ao meio 4xYT possuir nutrientes em maiores concentrações do que o meio LB, elevando significativamente o acúmulo de biomassa no processo (LEE, 1996; LEE, 2003). Foi possível observar também que, nos testes em que as bactérias não foram submetidas à indução por IPTG (**figura 16 A**), as absorvâncias foram maiores que os demais testes do respectivo meio. Isso ocorre porque a adição de IPTG força a maquinaria metabólica do microrganismo a produzir a proteína codificada pelo vetor exógeno, que contém um forte promotor, desviando energia que seria utilizada na multiplicação celular (KOSINSKI *et al.*, 1992; ANDERSSON, *et al.*, 1996). Já nos

testes contendo agente indutor nas concentrações de 0,4 e 1 mM, não houve variação significativa do crescimento celular em seus respectivos meios de cultura, mostrando que o aumento da concentração de agente indutor não influenciou negativamente o crescimento celular (**figuras 16 B e C**).

Em seguida, foram avaliados os níveis de expressão da proteína recombinante nas diferentes condições testadas já citadas. Para tanto, 1 mL de suspensão de células de cada teste foi coletado e centrifugado. O *pellet* de células foi tratado com 50 μ L de tampão de amostra e o total de 5 μ L, representando 100 μ L de cultura de células, foram aplicados para análise da expressão em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, corados com azul brilhante de Coomassie R250. Posteriormente, os géis foram avaliados por densitometria para determinação do percentual de hrG-CSF em relação a proteína total bacteriana e análise em 3D, objetivando a visualização da intensidade da banda correspondente a cada hora. A **figura 17** representa o teste realizado em meio LB/Km com diferentes concentrações de IPTG.

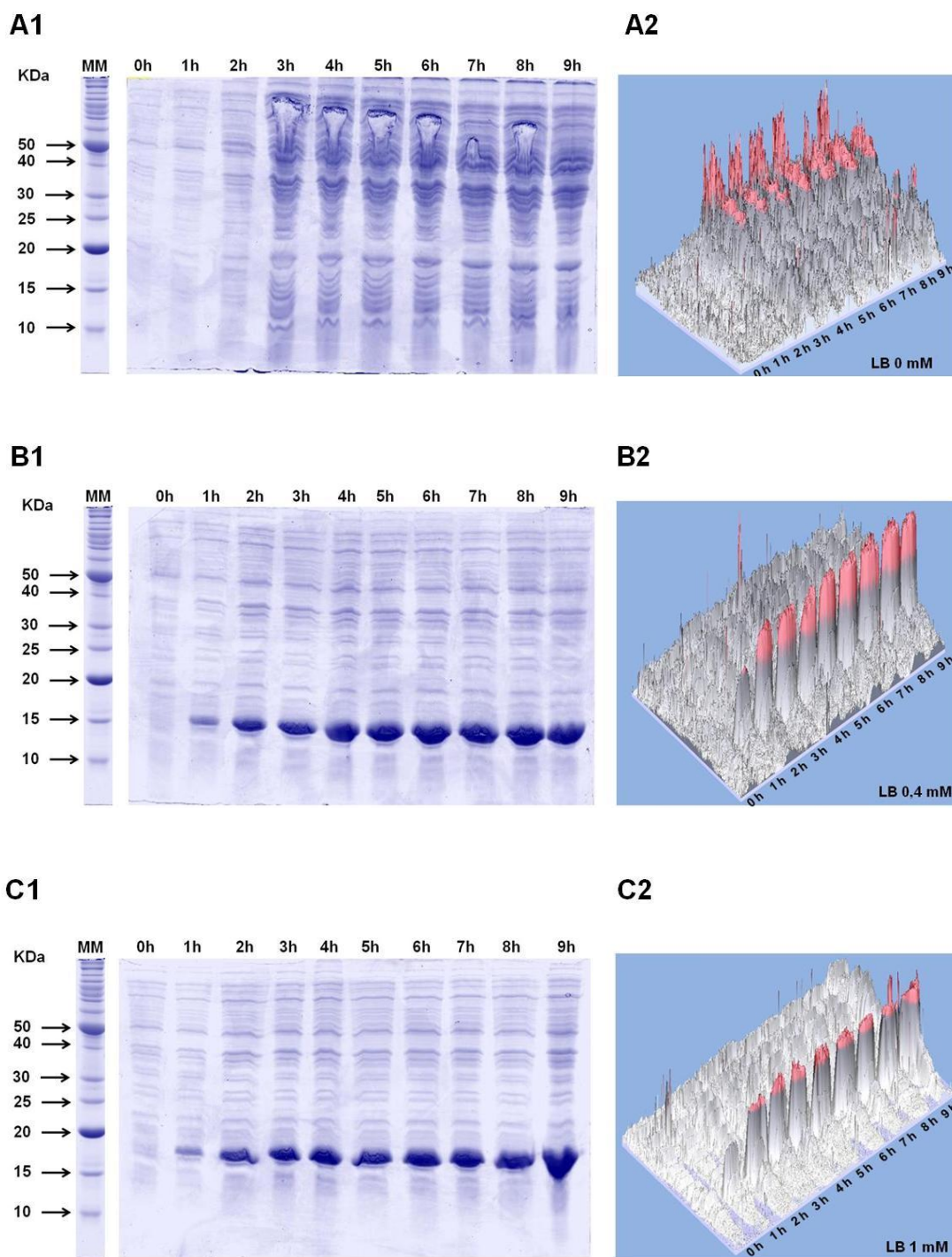


Figura 17: Análise da expressão de hrG-CSF em meio LB/Km 30 $\mu\text{g/mL}$ sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37°C, com diferentes concentrações de IPTG em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15% e análise densitométrica em 3D. 1 mL de cultura de células foi coletado, centrifugado e tratado com 50 μL de tampão de amostra, e 5 μL foram aplicados em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15%. Foram analisadas as condições de IPTG 0 mM (sem indução) (A1 e A2), IPTG 0,4 mM (B1 e B2) e IPTG 1 mM (C1 e C2), durante 9 horas de expressão após a indução.

Na expressão em meio LB/Km sem indução, ou seja, IPTG 0 mM não ocorre expressão de hrG-CSF (**figuras 17 - A1 e A2**). Já nas concentrações de 0,4 mM e 1 mM de IPTG notou-se um banda diferencial em torno de 19 KDa, o que corrobora com o tamanho esperado para o hrG-CSF que é de 18,8 KDa, a partir da primeira hora de indução, com aumento gradativo da expressão com o passar das horas, tornando-se praticamente constante a partir da sexta hora após a indução (**figuras 17 - B1 e B2; 19 - C1 e C2**). Além disso, é importante ressaltar que o aumento da concentração de IPTG (de 0,4 mM para 1 mM) não ocasionou aumento da expressão, como pode ser observado nas **figuras 17 - B2 e C2**, onde os picos correspondentes ao hrG-CSF na análise em 3D do gel de poliacrilamida do teste com indução de 0,4 mM de IPTG são maiores quando comparados ao teste utilizando 1 mM de IPTG.

O meio 4xYT possui maior quantidade de nutrientes, visto que é composto por concentrações aproximadamente 4 vezes maiores de extrato de levedura e triptona em relação ao meio LB. É comumente utilizado para expressão heteróloga de várias proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, inclusive o hrG-CSF, já que estudos demonstraram a expressão sem a necessidade da utilização de agente indutor (VANZ *et al.*, 2008; STUDIER, 2005). Portanto foi realizado um teste de expressão nas mesmas condições testadas para o meio LB/Km a fim de comparar os níveis de expressão entre eles (**figura 18**).

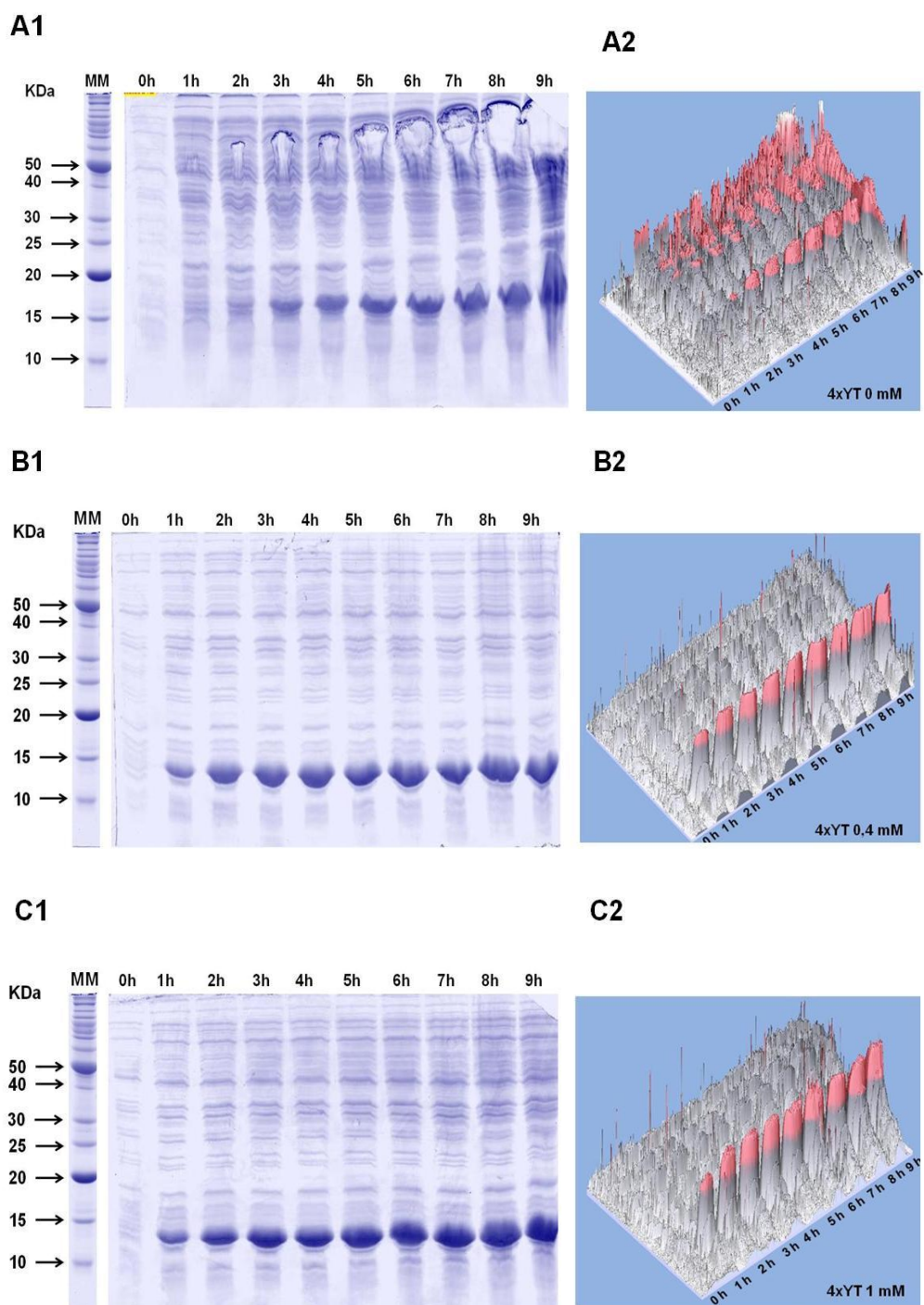


Figura 18: Análise da expressão de hrG-CSF em meio 4xYT/Km 30 µg/mL sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37°C, com diferentes concentrações de IPTG em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15% e análise densitométrica em 3D. 1 mL de cultura de células foi coletado, centrifugado e tratado com 50 µL de tampão de amostra para SDS-Page, e 5 µL foram aplicados em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15%. Foram analisadas as condições de IPTG 0 mM (sem indução) (A1 e A2), IPTG 0,4 mM (B1 e B2) e IPTG 1 mM (C1 e C2), durante 9 horas de expressão após a indução.

No teste com a utilização de meio 4YT/Km também com diferentes concentrações de IPTG, houve expressão nas três concentrações testadas. Mesmo em condições sem adição de IPTG (0 mM) a partir da terceira hora após a OD de indução, observou-se uma banda diferencial em torno de 19 KDa (**figuras 18 - A e A2**), sendo a expressão relativamente constante a partir da quarta hora. E, da mesma forma que ocorreu com meio LB/Km, no meio 4xYT/Km houve expressão a partir da primeira hora após indução com IPTG nas duas concentrações (0,4 mM e 1 mM), a qual manteve-se relativamente constante a partir da terceira hora (**figuras 18 - B2 e 21 C2**). Grossman *et al.* (1998), descreveu que em certos meios de cultura complexos, podem ocorrer a expressão de proteínas recombinantes em quantidades substanciais, na ausência de indutor, referida como auto-indução, como ocorreu no teste representado na **figura 18 - A**, onde provavelmente a presença de lactose contida nos digeridos proteicos de caseína da Triptona bacteriológica, foi suficiente para provocar a indução da expressão da proteína recombinante hrG-CSF. Para análise mais específica do nível de expressão, realizou-se a análise densitométrica, com a qual foi possível obter a porcentagem de hrG-CSF em relação ao conteúdo proteico total da cultura de células (**Figura 19**).

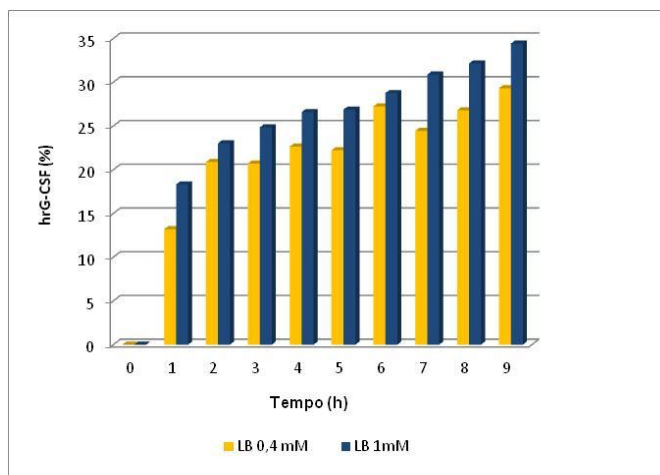
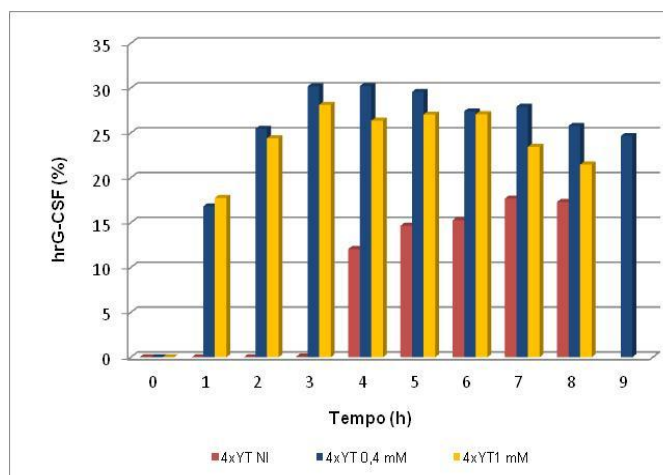
A**B**

Figura 19: Análise do percentual de hrG-CSF em relação ao conteúdo proteico total de cultura de células por densitometria de gel de poliácridamida 15%. 1 mL de cultura de células foi coletado, centrifugado e tratado com 50 μ L de tampão de amostra para SDS-Page, e 5 μ L foram aplicados em gel de poliácridamida SDS-Page 15%. Foram analisadas as condições em meio LB/Km (IPTG 0 mM, 0,4 mM e 1mM) **(A)** e em meio 4xYT/Km (IPTG 0 mM, 0,4 mM e 1mM) **(B)**, durante 9 horas de expressão após a indução.

Na **figura 19-A**, nota-se que a indução com IPTG em meio LB permitiu a superexpressão do hrG-CSF chegando à níveis superiores a 30% em relação á proteína total bacteriana, o que corresponde 6 vezes aos níveis produzidos no processo da AMGEN. Tal fato demonstra o êxito na estratégia de substituição de códons preferenciais para *E. coli*, bem como a utilização do promotor forte lac e expressão em corpos de inclusão.

É importante ressaltar que a análise de porcentagem não relata a quantidade final de proteína expressa, e sim, a proporção que esta representa em relação ao conteúdo proteico total. Analisando a **figura 19-A**, observou-se que a porcentagem de hrG-CSF na expressão em meio LB com indução de IPTG 1 mM é maior que a expressão no mesmo meio com IPTG 0,4 mM. Porém, na análise 3D (**figuras 17-B2 e C2**), nota-se que a quantidade de hr-GCSF é significativamente maior quando a indução é realizada com 0,4 mM. Tal fato ocorre porque, assim como a expressão de hrG-CSF é maior em 0,4 mM, a expressão de proteínas contaminantes também é maior, o que reduziu a proporção de hrG-CSF na análise densitométrica.

Na análise do percentual da expressão de hrG-CSF em meio 4xYT em diferentes concentrações de IPTG (**figura 19-B**) foi possível observar que, nos testes com indução, a proporção de hrG-CSF foi muito maior quando comparada com o mesmo meio sem adição de agente indutor, devido a ação do promotor forte que estimula a expressão da proteína de interesse em detrimento das proteínas bacterianas. Na expressão sem IPTG ocorreu produção significativa da proteína (**figura 20-A2**), porém, com maiores níveis de proteínas contaminantes, reduzindo assim a porcentagem de hrG-CSF em relação ao conteúdo total (**figura 19-B**). O fenômeno da auto-indução pode ser vantajoso, já que elimina a necessidade da utilização de IPTG, que é caracterizado como uma substância de alto custo e não é biodegradável.

Entretanto, mesmo o hrG-CSF sendo expresso sem adição de agente indutor em meio 4xYT (**figura 180-A**), os níveis de expressão foram aparentemente baixos quando comparados com o experimento utilizando meio LB contendo 0,4mM de IPTG (**figura 19-B**). Além disso, o custo de produção do meio 4xYT sem agente indutor quando comparado ao meio LB com IPTG 0,4 mM, não leva a uma diferença significativa no preço final do meio de cultivo para a expressão. Sendo assim, sabendo do elevado valor agregado da proteína de interesse (hrG-CSF), optou-se utilizar o meio de cultivo LB/Km 30 µL e indução com 0,4 mM de IPTG durante 6 horas, pois apresentou maior quantidade de hrG-CSF quando analisado por densitometria 3D. É importante ressaltar que, no escalonamento industrial deverão ser realizados novos testes em escala com o uso do meio 4YT sem indutor para avaliação dos custos do processo, além da utilização de lactose como agente indutor em meio LB em substituição ao IPTG.

4.5 - Lise Celular, Lavagem e Solubilização dos Corpos de Inclusão

Proteínas de eucariotos expressas em *E. coli* são frequentemente expressas em forma de agregados insolúveis de proteínas, os corpos de inclusão, fato que ocorre principalmente devido a associações intermoleculares entre domínios hidrofóbicos das proteínas (BANEYX, 1999). Com isso, a proteína hrG-CSF foi expressa majoritariamente em corpos de inclusão, característica que apresenta a desvantagem da necessidade de solubilização da proteína, que em alguns casos, pode não apresentar atividade biológica (VILLAVERDE e CARRIO, 2003). Entretanto, no caso do hrG-CSF estudos já demonstraram que mesmo expressa em corpos de inclusão a proteína apresenta atividade (JEVSEVAR, 2005). Em contraste, a expressão de proteínas em IB's apresenta algumas vantagens, como proteção contra degradação da proteína por proteases da bactéria, permitindo acúmulo de massa intracelular, bem como facilitam a expressão de proteínas potencialmente tóxicas às células procariontes. Adicionalmente, podem facilitar o processo de purificação, pois representam uma separação natural das proteínas recombinantes do restante de proteínas endógenas bacterianas, que são majoritariamente solúveis na célula (GARCIA-FRUITOS, 2010).

As células contendo os corpos de inclusão são rompidas com a utilização de tampões específicos e/ou processos enzimáticos e mecânicos, como a sonicação, processo no qual ondas sonoras transmitem energia para o rompimento celular (VILLAVERDE e CARRIO, 2003). Após o rompimento celular os corpos de inclusão podem ser separados por centrifugação.

Para solubilização da proteína expressa em corpos de inclusão, foram testados alguns protocolos de lavagem, visando a redução de proteínas contaminantes/endotoxinas e demais resíduos celulares da célula hospedeira, seguidos de protocolos de solubilização, visando restabelecer a estrutura da proteína, permitindo sua purificação e testes de atividade biológica (DE GROOT e VENTURA, 2006b). Para tal, foram realizados 3 diferentes tratamentos, dois dos quais foram modificados a partir da literatura e o terceiro foi desenvolvido neste trabalho.

4.5.1 - Teste com lise mecânica e lavagem/solubilização com agentes caotrópicos

O primeiro teste foi realizado utilizando tampão de lise comumente utilizado (tris 50 mM, EDTA 1mM e PMSF 1mM), tampão de lavagem contendo Triton X-100, um detergente fraco para retirada de proteínas de membrana e lipídeo celular. A solubilização foi realizada utilizando agentes caotrópicos como a Uréia e Cloridrato de Guanidina (GuHCl) em diferentes concentrações. Agentes caotrópicos são substâncias que desnaturam macromoléculas como proteína e ácidos nucleicos. São denominadas soluções caotrópicas por aumentar a entropia do sistema, através do rompimento de interações intramoleculares responsáveis pela estrutura da molécula, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, sendo amplamente utilizados para solubilização dos corpos de inclusão (VILLAVERDE e CARRIO, 2003).

As células obtidas pela centrifugação de 50 mL de cultura de células em meio LB/Km foram lisadas com a utilização de tampão de lise e sonicação. Foi realizada uma lavagem com tampão de lavagem (Tris 50 mM pH 8, EDTA 0,5mM e Triton x-100 2%) na proporção de 1:10 (p/v). Para as solubilizações subsequentes foram utilizados agentes caotrópicos em diferentes concentrações: Uréia 2M, 4M, 6M, 8M e GuHCl 2M, 4M e 6M e na proporção de 1:10 (p/v). As amostras foram quantificadas pelo método 2D Quanti[®] e 30 µg das proteínas totais da fração solúvel dos teste de solubilização foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida (15%) (**figura 22**).

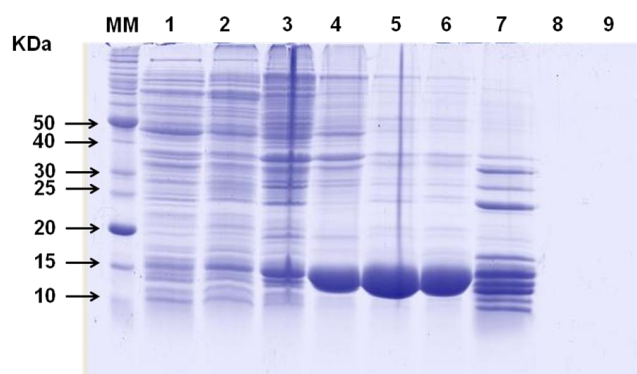


Figura 20: Análise do teste de lise mecânica e lavagem e solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos Uréia e GuHCl. 30 µg das proteínas totais da fração solúvel foram aplicadas no gel. Marcador de Massa Molecular (MM), solúvel da Lise (poço 1), solúvel da lavagem com tampão (poço 2), solúvel da lavagem/solubilização com Uréia 2 M (poço 3), 4 M (poço 4), 6 M (poço 5) e 8 M (poço 6), solúvel da lavagem/solubilização com GuHCl 2 M (poço 7), 4 M (poço 8) e 6M (poço 9).

Novamente foi confirmado que a proteína não está presente na fração solúvel, sendo de tal forma expressa em corpos de inclusão, ou seja, na fração insolúvel (**figura 20, poço 1**). Além disso, a lavagem com tampão possibilitou a retirada de proteínas contaminantes diferentes do hrG-CSF (**figura 20, poço 2**). Após a lise e as lavagens, foram testadas formas de solubilização distintas, onde as concentrações de agentes caotrópicos foram aumentadas gradativamente.

Ao se utilizar agentes caotrópicos como a Uréia, a partir da concentração de 2 M (poço 3) pode-se observar a solubilização da proteína (**Figura 20, poços 4, 5 e 6**). Como a totalidade da proteína já havia sido solubilizada, na lavagem/solubilização com GuHCl só houve solubilização das proteínas restantes na concentração de 2 M (poço 7), não havendo material nas concentrações de 4 M e 6 M (poço 8 e 9).

Para analisar se o hrG-CSF era solúvel também em GuHCl, foi realizado outro teste como o citado acima, porém utilizou-se como agente cotrópico somente o GuHCl (**figura 21**). Neste teste notou-se que a proteína hrG-CSF é solúvel somente em GuHCl nas concentrações de 4 M (**figura 21, poço 3**) e 6 M (**figura 21, poço 4**).

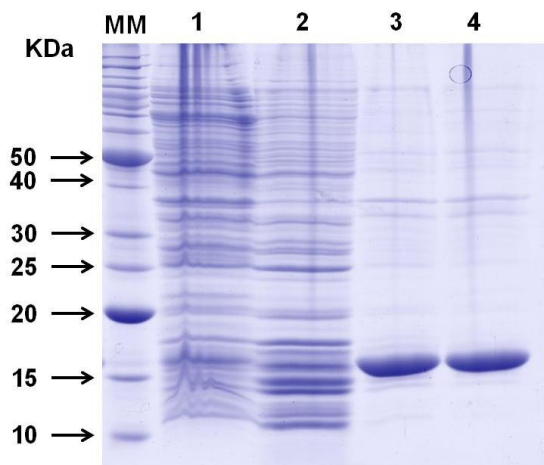


Figura 21: Análise do teste de lise mecânica e lavagem e solubilização dos corpos de inclusão com GuHCl. 30 µg das proteínas totais da fração solúvel foram aplicadas no gel. Marcador de Massa Molecular (MM), solúvel da lavagem com tampão (1), solúvel da lavagem/solubilização com GuHCl 2 M (2), 4 M (3) e 6 M (4).

A utilização de detergentes (Triton X-100) juntamente com os agentes caotrópicos (Uréia e GuHCl) (**figuras 20 e 21**), demonstrou um excelente meio de pré-purificação do hrG-CSF, já que possibilitaram a retirada de grande parte de proteínas contaminantes. Além disso, confirmou-se que a proteína pode ser

solubilizada utilizando-se agente caotrópicos, não só a Uréia, mas também o GuHCl (**figura 21**). Entretanto, apesar das lavagens com agentes caotrópicos terem mostrado resultados satisfatórios, estes agentes podem levar a desnaturação da proteína hrG-CSF necessitando de uma etapa adicional de *refolding*, já que esta é composta por duas pontes dissulfeto, fato que poderia levar a mudança na conformação da proteína, que poderia ocasionar perda da atividade biológica da proteína (VILLAVERDE e CARRIO, 2003). A utilização destes agentes caotrópicos levaria a um aumento dos custos de produção a nível industrial, tanto pelo valor elevado da Uréia e do GuHCl, quanto pelas etapas adicionais de centrifugação e para realização do *refolding* da proteína.

4.5.2 - Teste segundo Vanz e cols, (2008) com algumas modificações

O segundo teste foi realizado de acordo Vanz e cols (2008) com algumas modificações. O teste foi realizado em três etapas. A primeira etapa foi a lise celular e isolamento dos corpos de inclusão com tampão de lise e centrifugação respectivamente. A segunda etapa consistiu na lavagem dos corpos de inclusão com três tampões distintos contendo detergente não iônico, Triton X-100, para a retirada de componentes da membrana celular bacteriana, como proteína e lipídeos; EDTA (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) como agente quelante para impedir oxidação das cisteínas; deoxicolato de sódio para remover quaisquer partículas residuais bem como endotoxinas; inibidores de enzimas proteolíticas como PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoreto) e Cloreto de Sódio para retirada de ácidos nucleicos e ou quaisquer outros contaminantes não ligados especificamente ao G-CSF (VANZ *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2006).

Sendo assim, utilizou-se além do tampão de lise já utilizado no primeiro teste, os tampões de lavagem I (Tris 50mM pH 8, EDTA 0,5mM e Triton x-100 2%), tampão de lavagem II (Tris 50mM pH 8, EDTA 0,5mM e Deoxicolato de sódio 1%) e tampão de lavagem III (Tris 50mM pH 8, EDTA 5mM e NaCl 1M), todos na proporção de 1:10 (p/v). A última etapa foi realizada para possibilitar a solubilização da proteína recombinante, foram avaliados algumas metodologias previamente descritas na literatura, que utilizam etapas de lavagem dos corpos de inclusão, seguidas de solubilização com uréia em pH's extremos (CLARK, 2001). As frações

solúveis de todas as etapas de lavagem e as frações solúvel e insolúvel dos testes de solubilização foram analisadas, onde 30 µg foram aplicados em gel de poliacrilamida SDS-Page 15% (**figura 22**).

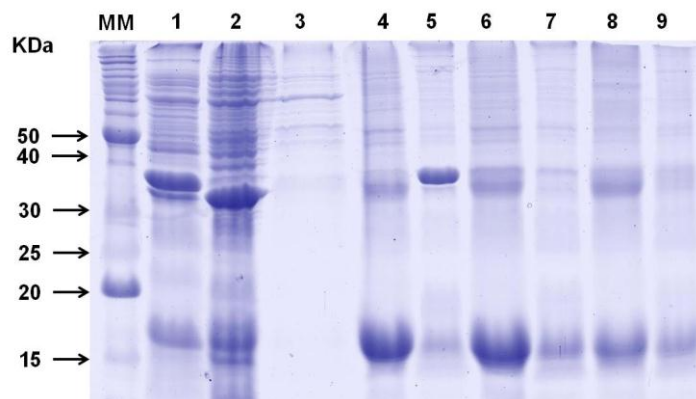


Figura 22: Teste segundo Vanz e cols., (2008), com modificações. 50 mL da expressão total em meio LB/Km foi lisado mecanicamente e a fração insolúvel lavada com tampões distintos e solubilizados com Uréia 2M em diferentes pH's. Marcador de massa molecular (MM); lavagem com tampão de lavagem I (1); lavagem com tampão de lavagem II (2); lavagem com tampão de lavagem III (3); solubilização com Uréia 2M em pH 12 (4); pellet restante após a centrifugação da mostra em pH 12 (5); solubilização com Uréia 2M em pH 13 (6); pellet restante após a centrifugação da mostra em pH 13 (7); solubilização com Uréia 2M em pH 14 (8); pellet restante após a centrifugação da mostra em pH 14 (9).

Foi observado que as lavagens solubilizaram apenas proteínas que não eram de interesse, onde houve perda de uma pequena fração do hrG-CSF nas lavagens com os tampões I e II (**figura 22, poços 1 e 2**). A solubilização do hrG-CSF ocorreu nos pH's 12, 13 e 14 (**figura 22, poços 4, 6 e 8**), sendo solubilizada em maior quantidade nos pH's 12 e 13 (**figura 22, poços 4 e 6**). Conforme demonstrado na **figura 22**, as lavagens foram satisfatórias. Porém a utilização destas em grande-escala elevaria o custo final da produção da proteína recombinante. Além disso, como explicitado, os reagentes utilizados são detergentes e sais, o que pode, além de desnaturar a proteína, necessitar de etapas adicionais para a retirada destes além de dificultar o processo de purificação da proteína. Em relação a solubilização, o tratamento da amostra com agentes para a regulagem de pH, podem desnaturar a proteína e também ter a necessidade da retirada destes agentes por diálise para a purificação, elevando os custos, podendo inviabilizar tecnicamente e/ou economicamente a produção um biossimilar.

4.5.3 - Nova metodologia de lavagem e solubilização de corpos de inclusão

Com o exposto, na tentativa de realizar um processo visando a diminuição dos custos de produção para uma futura produção industrial do hrG-CSF, a partir do terceiro teste realizado. Foi realizada a lise e lavagem dos corpos de inclusão utilizando-se solução específica, a qual demonstrou eficácia na lise celular sem a necessidade de lise mecânica e/ou enzimática e/ou por pressão elevada. De acordo com a literatura como descrito no processo patenteado pela AMGEN utiliza-se largamente a metodologia de pressão elevada e, como descrito por Rotondor e *cols.*, 1999, Vanz e *cols.*, 2008 e Khalilzadeh e *cols.*, 2008 a utilização de tampões de lise com lise mecânica, o que podem elevar o custo e tempo de produção.

A lavagem dos corpos de inclusão foi realizada também com solução específica em proporções menores ao que já descrito na literatura, permitindo a retirada de lipídeos e resíduos de meios de cultura, sem a utilização de detergentes iônicos descritos por Souza e *cols.*, 1986 e Vanz e *cols.*, 2008, o que possibilitou diminuição das etapas de purificação, fato que é de extrema importância para uma futura produção industrial.

É importante ressaltar que, o processo não é descrito detalhadamente devido ao processo de patenteamento.

4.6 – Purificação hr-G-CSF

Na purificação de biofármacos, as técnicas de cromatografia são muito utilizadas, pois apresentam alta resolução, significantes níveis de purificação, e de recuperação (PERAZZOLO *et al.*, 2005). A cromatografia separa, então, os componentes de uma mistura, presentes em uma fase móvel, de acordo com os diversos graus de interação com uma fase estacionária através da qual a fase móvel permeia, permitindo a separação das frações na saída do leito de fase sólida (SENGUPTA *et al.*, 2008). O processo de purificação a ser adotado depende do uso final da molécula alvo, de suas características físico-químicas e também das impurezas presentes no material de partida, podendo ser de interação hidrofóbica ou fase reversa, troca iônica, afinidade e exclusão molecular/gel filtração (SENGUPTA *et al.*, 2008).

Nas cromatografias de interação hidrofóbica e fase reversa explora-se a diferença entre as características hidrofóbicas das proteínas, isto é, as tendências de grupos alifáticos ou de outras estruturas apolares se associarem quando estão presentes em meio aquoso (DALMORA, 2006). A cromatografia de troca iônica baseia-se na diferença de cargas elétricas das proteínas em um determinado pH, podendo ser catiônica ou aniônica de acordo com a carga da coluna. As proteínas migram na coluna e as que possuem carga oposta a da coluna interagem com a coluna, sendo eluídas por sais que competem pela ligação à resina (NORTE, 2007).

Na cromatografia de afinidade a proteína interage com moléculas fixadas na coluna, onde as moléculas não fixadas passam livremente por esta (BEHME, 2009). E por último, a cromatografia de filtração em gel ou cromatografia de exclusão molecular trata-se de uma coluna de polímeros insolúveis, onde ocorre a migração diferencial de solutos dissolvidos através de géis que têm poros de tamanhos definidos, permitindo que a proteína seja ou não retida conforme o tamanho da mesma (DONDOS, 2006).

Proteínas recombinantes de interesse terapêutico provenientes de sistemas procariotos como *E. coli* necessitam passar por etapas de separação e purificação, a fim de se obter, ao final do processo, a proteína de interesse nos níveis de concentração e pureza requeridos pelas agências regulatórias para proteínas terapêuticas de uso humano. Essa etapa pode representar até 90% dos custos de produção de biofármacos (CHISTI, 1998).

Com a expiração das patentes dos biofármacos originais, como é o caso do hrG-CSF que teve sua patente expirada em 2006 e o surgimento de biossimilares o aumento da concorrência levou a alteração das estratégias de produção da proteína recombinante, buscando técnicas de cultivo e de purificação que possam atingir maior produtividade e maior rendimento com custo diminuídos (CLARK, 2001; RATHORE e WINKLE, 2009; WANG, 2011). Para tanto, foram realizados alguns testes de purificação do hrG-CSF.

4.6.1 - Cromatografia de Troca Iônica

Uma das características que devem ser avaliadas ao se escolher uma etapa cromatográfica é o ponto isoelétrico (PI) de uma proteína. O PI é o valor de pH onde

a proteína apresenta carga elétrica igual a 0, ou seja, há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas (Alberts *et al.*, 2002). Com isso, a primeira estratégia de purificação testada foi a cromatografia de troca iônica. A amostra de hrG-CSF utilizada foi a amostra resultante dos testes de lavagem e solubilização dos corpos de inclusão segundo Vanz e cols (2008), que teve seu pH diminuído para 8 com a utilização de HCl 10 mM. Desta forma, como a proteína hrG-CSF possui um ponto isoelétrico de 5,6, em pH 8 a mesma encontra-se na sua forma desprotonada, ou seja, carregada negativamente, fato que levou a utilização de uma cromatografia de troca catiônica (DEAE Sephacryl[®] Pharmacia[®]) para o primeiro teste de purificação do hrG-CSF.

O teste foi realizado utilizando-se dois gradientes distintos: NaCl 0-1 M e NaCl 0-0,5 M. Nas tentativas de purificação utilizou-se 4,5 mg de proteínas totais, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, que foram coletados para leitura em espectrofotômetro a 280 nm (**figura 23**) e para análise em gel do poliacrilamida SDS-Page 15% corado com prata (**figura 24**).

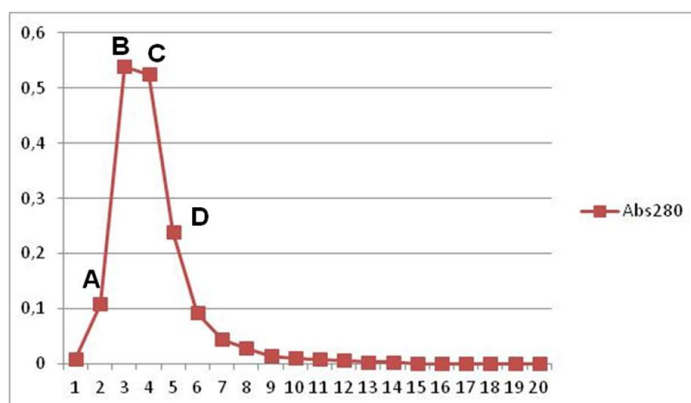


Figura 23: Leitura da absorbância a 280 nm dos pontos coletados no teste de purificação com cromatografia de troca aniônica utilizando amostra resultante do teste segundo Vanz e colaboradores, (2008), com modificações. Foram coletado 1 mL durante 20 minutos, e a leitura da absorbância realizada utilizando-se espectrofotômetro. Os pontos que obtiveram absorbância elevadas foram analisados (A, B, C e D) em SDS-PAGE 15% corados com prata.

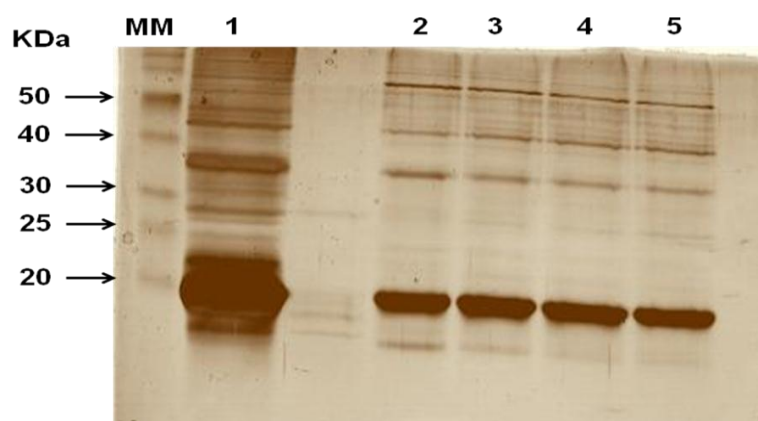


Figura 24: Teste de purificação com cromatografia de troca aniônica utilizando amostra resultante do teste segundo Vanz e colaboradores, (2008), com modificações. 4,5 mg de proteínas totais foram aplicadas em 2 mL de resina equilibrados com tampão de equilíbrio (tris 50 mM, pH 8). O gradiente foi realizado com 20 mL de tampão contendo tris 50 mM, pH 8 e NaCl 1 M e tampão de equilíbrio. Marcador de Massa Molecular (MM), Amostra aplicada na resina (1), fração A (2), fração B (3), fração C (4), fração D (5).

Com o teste, foi possível observar uma separação da hrG-CSF em comparação a amostra inicial, porém não com um nível de pureza aceitável para um biofármaco, que deve ser de 98-99% (RATHORE e WINKLE, 2009). Com o presente protocolo Vanz e cols (2008) obtiveram a proteína recombinante em níveis aceitáveis de pureza somente com esta etapa de purificação, porém não foi possível reproduzir os resultados descritos. Desta forma, foi desenvolvido um protocolo de purificação inovador, em uma única etapa, descrito no próximo item.

4.6.2 – Metodologia Desenvolvida

O desenvolvimento de um processo de purificação de proteínas recombinantes para fins terapêuticos dá-se de acordo com a necessidade de uma pureza elevada, visto que são utilizados em humanos. Para aumentar o rendimento global e a economia no processo de produção de um biofármaco o ponto crucial é a redução do número de etapas envolvidas (CHISTI, 1998, RATHORE e WINKLE, 2009). Desta forma, visando desenvolver uma metodologia de purificação, utilizou-se um método inovador, o qual se encontra em processo de patenteamento.

A partir da cultura de células foi realizada a purificação da proteína, utilizando-se um modo diferenciado para tratamento dos corpos de inclusão e purificação da proteína com apenas uma etapa, processo não descrito no trabalho devido ao

processo de patenteamento (**figuras 25 e 26**). A cultura de célula após as lavagens com solução específica, foi liofilizada e solubilizada. O material solúvel foi utilizada para a purificação. Para confirmar o tempo de retenção da proteína recombinante, o medicamento comercial Filgrastine[®] foi submetido ao mesmo processo. Observou-se que o pico correspondente ao medicamento e a proteína recombinante apresentam comportamento semelhantes, sendo eluídos em concentrações semelhantes de solução de eluição (**Figura 25**). A pureza da proteína foi comparada utilizando-se 150 µg do medicamento comercial Filgrastine[®] (**figura 25 B**).

A purificação do hrG-CSF utilizando-se apenas uma etapa cromatográfica altamente promissor para produção industrial, visto que os processos descritos na literatura utilizam mais de uma etapa para obtenção da pureza desejada do hrG-CSF. Para a produção do primeiro hrG-CSF produzido comercialmente pela AMGEN (patente US 4810643), foram utilizadas 4 etapas de purificação de troca iônica, as quais, devido a utilização de tampões contendo sais como Tris e NaCl, possuem uma etapa adicional de dessalinização da amostra. Yamasaki e *cols.*, 1998 e Rotondoro e *cols.*, purificaram o hrG-CSF com mais de três etapas cromatográficas, incluindo uma etapa de troca iônica e catiônica, e adicionalmente a dessalinização da amostra, processo realizado de semelhante modo por Khalilzadeh e *cols.*, 2008 e Vanz e *cols.*, 2008.

Além da utilização de somente uma etapa de purificação com o processo desenvolvido neste trabalho, outro aspecto positivo é, a proteína purificada obteve atividade biológica sem a realização do *refolding* (**figura 29**), processo realizado por todos os autores citados acima.

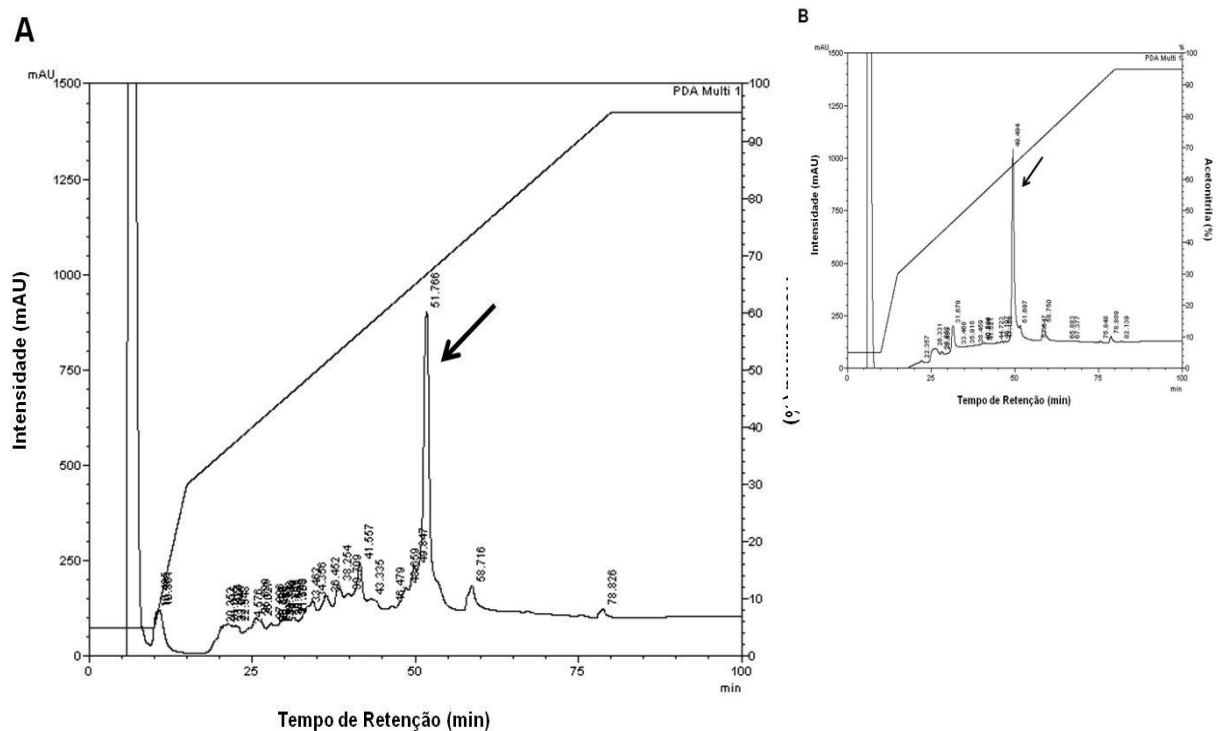


Figura 25: Purificação do hrG-CSF e do medicamento Filgrastine[®], em cromatografia líquida de fase reversa. Para análise da amostra (hrG-CSF) 5 mg da fração insolúvel resultante foram solubilizadas em GuHCl 6M e foi gerado um pico diferencial no cromatograma **A**, para análise do medicamento comercial, 150 µg foram solubilizados em GuHCl 6M, gerando um pico diferencial semelhante a amostra no cromatograma **B**, os quais foram analisados em SDS-Page 15%.

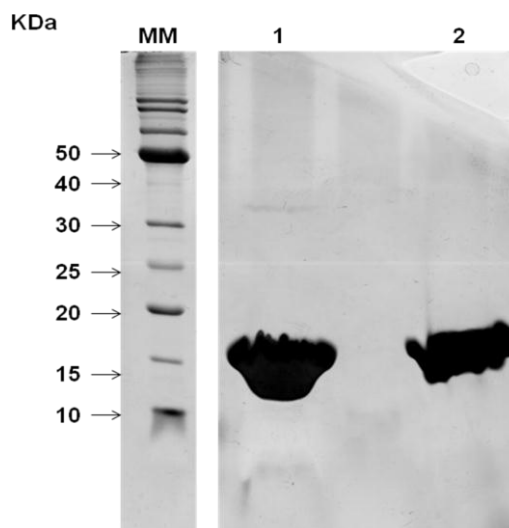


Figura 26: Análise em gel SDS-PAGE 15% do hrG-CSF purificado por cromatografia de fase reversa, utilizando uma coluna semi-preparativa (coloração com prata). 30 µg das amostras do medicamento comercial e do hrG-CSF purificado foram aplicadas em gel de poliácridamida. Marcador de Massa Molecular (MM), hrG-CSF (1), Filgrastine[®] (2).

A proteína foi purificada quando comparada ao medicamento comercial utilizando-se método inovador para lavagem dos corpos de inclusão e somente uma etapa cromatográfica também inovadora. Diversas publicações descrevem protocolos de purificação do hrG-CSF, os quais incluem várias etapas com utilização de diferentes colunas cromatográficas, o que torna o processo de purificação mais oneroso em planta industrial da proteína (NAGATA *et al.*, 1986; SOUZA, 1989; BOONE, 1998; POREKAR E MENART, 2005; VARKI *et al.*, 2009). Desta forma, o processo de purificação para o hrG-CSF descrito neste trabalho foi um processo também completamente inovador, onde utilizando apenas uma etapa de purificação foi possível obter um nível de pureza comparável ao medicamento disponível comercialmente (**figura 26**). Sendo assim, encontra-se em fase de patenteamento o processo de purificação de proteínas de corpo de inclusão, como resultado deste trabalho e do projeto Interinstitucional, apoiado pela FAP-DF.

4.5 – Análise da proteína hrG-CSF por western-blot

Para confirmar a expressão da proteína recombinante o hrG-CSF em células de *E. coli* foi realizada a análise de expressão por western-blot utilizando anticorpo monoclonal anti-G-CSF. Utilizou-se como amostra uma alíquota de 1 mL da cultura de células em meio LB com indução de IPTG 0,4 mM. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e, à fração insolúvel foram adicionados 50µl de Tampão de Amostra 4X e 5 µl (correspondendo à 100µl de expressão total) foram analisados. Com o experimento confirmou-se a correta expressão do hrG-CSF (**figura 27**).

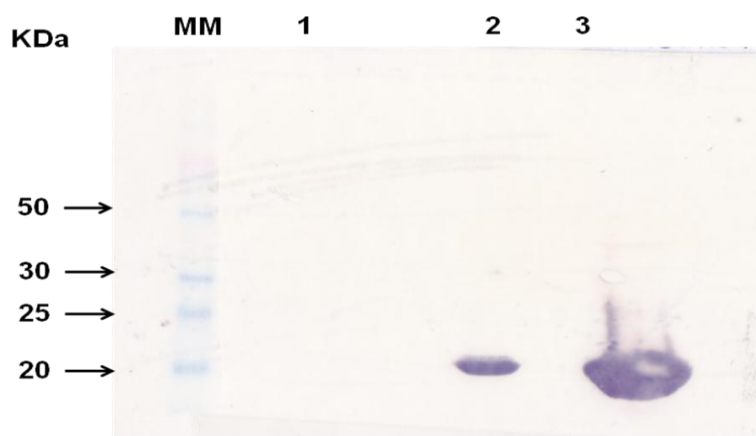


Figura 27: Western Blot. 1 mL da cultura de células foi coletado, centrifugado e tratado com 50 μ L de tampão de amostra para SDS-Page, onde 5 μ L foram aplicados em SDS-Page 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Como controle positivo foram utilizados 3,5 μ g do medicamento Filgrastine[®] e como controle negativo a célula BL21(DE3) pLysE sem o vetor. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-G-CSF na proporção de 1:2000 e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina na proporção de 1:2000. A revelação foi realizada utilizando-se fosfatase alcalina. Marcador de Massa Molecular (MM), Controle negativo (1), Controle Positivo (2) e hrG-CSF (3).

4.6 – Análise físico-química por espectrometria de massa

Os biofármacos compreendem uma classe distinta de moléculas, pois possuem natureza mais complexa que os medicamentos convencionais. Sendo assim, o método de produção biotecnológico, pode levar a modificações pós-traducionais, já citadas. Além disso, devido à natureza proteica da molécula, podem ocorrer modificações estruturais, as quais ocasionam a consequente perda de atividade, além de potencialmente poderem provocar imunogenicidade em pacientes (WALSH, 2010).

A estrutura correta da proteína é indispensável para eficácia e segurança dos biofármacos, o que leva a necessidade da análise estrutural detalhada. Para tanto, foram desenvolvidos métodos analíticos para determinação estrutural de uma proteína, dentre os quais pode ser citada a espectrometria de massa, a qual permite que a massa molecular de uma proteína possa ser determinada precisamente a partir da sequência de resíduos de aminoácidos, além de detectar possíveis modificações ou contaminantes presentes na proteína (ZHANG *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2010). Neste contexto, foi realizada a espectrometria de massa para analisar tanto a massa molecular do hrG-CSF quanto o nível de pureza obtido com o método

inovador de purificação desenvolvido neste trabalho, com a utilização do equipamento Micro-TOF Q II™ ESI-Qq-TOF (Brucker Daltonics) (**figura 28**). A análise mostra que a massa média da proteína encontrada foi de 18801,3391 Da, que confere com a massa esperada do hrG-CSF. Além disso, nota-se pela distribuição de cargas e pela intensidade do pico que o material possui pureza elevada.

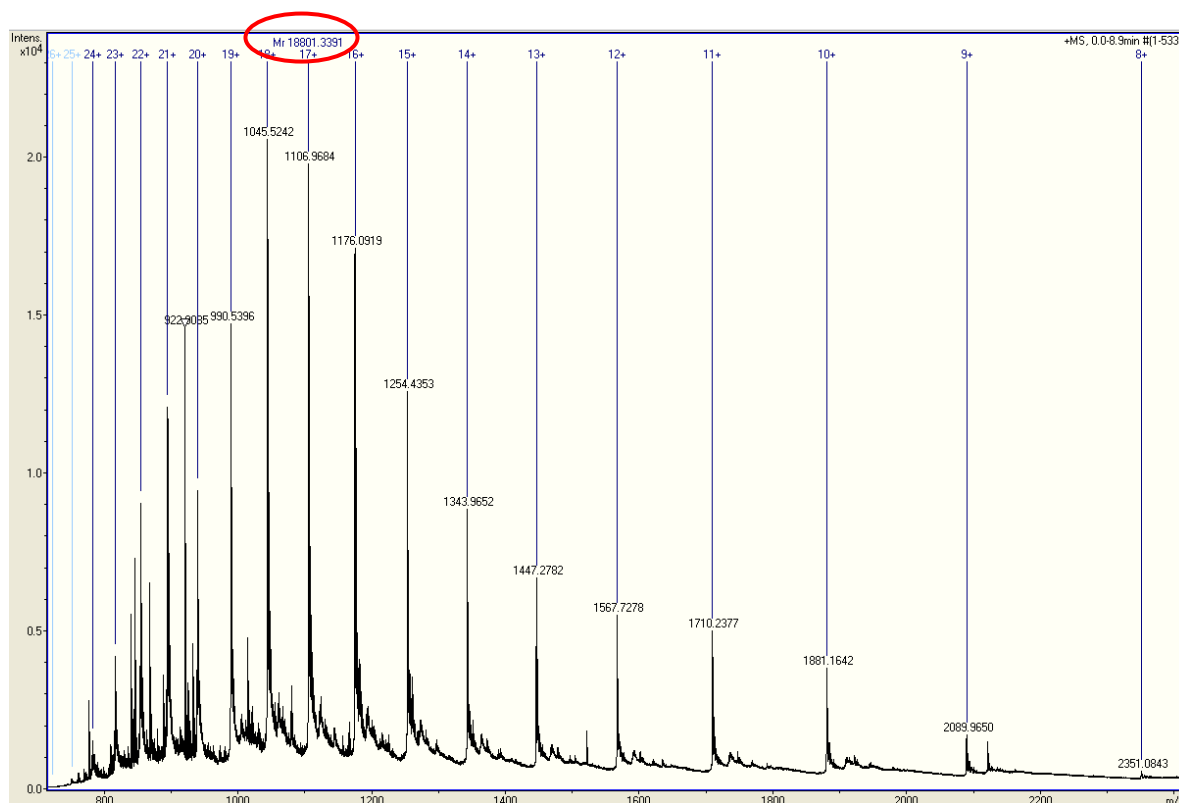


Figura 28: Espectrometria do ESI-Q-TOF da fração de concentração de eluição de acetonitrila 63%. A proteína analisada apresentou uma massa média de 18801,3391 Da.

4.7 - Teste de Atividade Biológica

O G-CSF é um fator de crescimento hematopoiético, que tem por finalidade estimular a proliferação, diferenciação e ativação dos granulócitos polimorfonucleares, mais especificamente os neutrófilos (BARREDA *et al.*, 2004). A partir disso, os testes para avaliação da atividade do hrG-CSF podem ser realizados utilizando-se modelos *in vivo*, camundongos, ou ensaios baseados na proliferação de células da linhagem mielóide de camundongos NFS-60 (CODEVILLA, 2004; HAMMERLING *et al.*, 1995).

Para a realização dos testes *in vivo*, são utilizados camundongos da linhagem Balb/C com idade entre 7 a 9 semanas. É induzida a imunossupressão com a utilização de medicamentos com posterior injeção intraperitoneal de hrG-CSF em diferentes concentrações (SHIMAMURA *et al.*, 1987; MATSUZAKI *et al.*, 1996; KANEKO *et al.*, 1999; CODEVILLA *et al.*, 2004; VANZ *et al.*, 2008). Foram utilizados camundongos machos de 8-9 semanas de idade da raça Balb/C com peso entre 17-22g. Os camundongos foram imunossuprimidos com a utilização do medicamento lfosfamida[®] com dose única de 4,3 mg por animal. Como controle negativo utilizou-se 0,5 mL de tampão fosfato salino (PBS) por animal. O medicamento utilizado como padrão foi o Filgrastine[®]. Todas as amostras foram aplicadas intraperitonealmente.

No experimento os grupos foram formados de acordo com o peso (tabela 4), onde foram testadas diferentes concentrações de rhG-CSF padrão (medicamento) hrG-CSF amostra (**figura 29**). Os resultados foram obtidos através da contagem do percentual de neutrófilos e foram apresentadas como média \pm SD de 5 animais. A comparação estatística dos dados foi feita por meio da análise de variância (ANOVA) seguido por Bonferroni pós-teste, por meio de Programa GraphPad Prism[®] versão 5.0. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$ ou menos) foram considerados significativos.

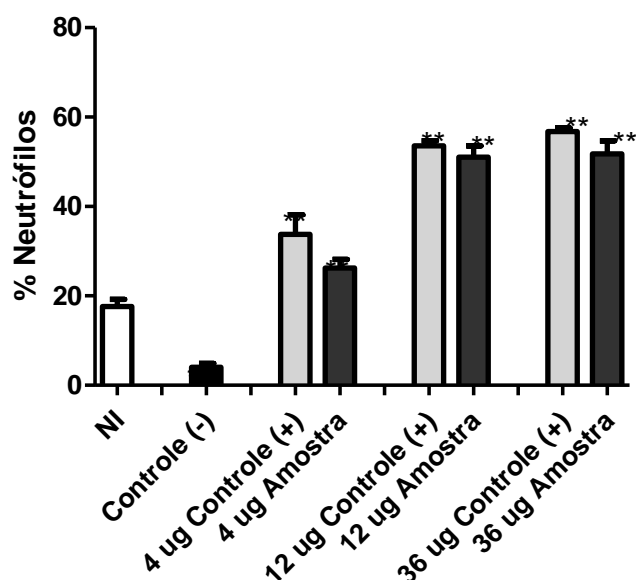


Figura 29: Avaliação da atividade biológica do hrG-CSF. Contagem diferencial de neutrófilos em porcentagem após o tratamento do hrG-CSF. Grupos de camundongos tratados com padrão (Filgrastine[®]) e amostra com diferentes doses (4, 12, and 36 $\mu\text{g}/0.5$ ml/camundongo), proporcionais ao peso. O grupo controle foi tratado com veículo (PBS pH 7,4). Os asteriscos representam diferenças na comparação com o grupo controle (** $P < 0.05$). N = 6 animais por grupo.

Foi possível confirmar que a proteína está com a atividade similar ao medicamento comercial, o que valida todo o processo desenvolvido neste trabalho (**figura 30**). Além disso, a atividade está similar à atividade descrita por alguns autores (VANZ *et al.*, 2008, CODEVILLA *et. al.*, 2004).

4.8 – Processo Desenvolvido e Análise de Custos

Após os experimentos realizados, foram selecionadas as melhores condições para cada etapa de produção *upstream* e *downstream* para o hrG-CSF. A melhor condição para expressão da proteína foi a utilização de meio LB com indução de IPTG 0,4 mM, por 6 horas. Visto que a proteína é expressa em forma de corpos de inclusão, as etapas de lise e lavagem foram realizadas utilizando-se o solvente orgânico acetonitrila 95%, com posterior solubilização com GuHCl 6M e purificação com a utilização de cromatografia de fase reversa, conforme demonstrado no fluxograma abaixo (**figura 30**).

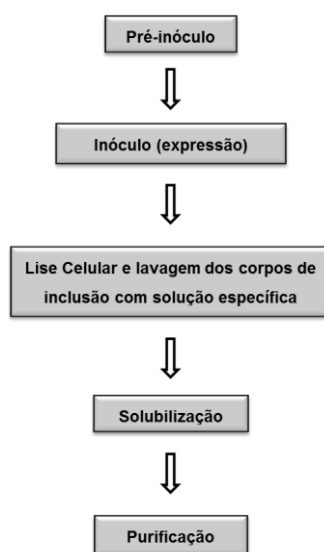


Figura 30: Fluxograma representando as etapas desenvolvidas neste trabalho para a produção do hrG-CSF em escala de 25 mL.

Como demonstrado anteriormente, a proteína foi superexpressa satisfatoriamente, confirmando a funcionalidade do gene proposto sintetizado quimicamente, com as devidas substituições de códons preferenciais para *E. coli*. A expressão em corpos de inclusão possibilitou a utilização de menores volumes de

trabalho, bem como maior concentração da proteína de interesse após as etapas de lavagens. A utilização da solução específica como agente para lavagem dos corpos de inclusão excluiu a necessidade da utilização de detergentes e inibidores de proteases, fato que é de extrema relevância para a produção industrial, devido à diminuição dos custos nesta etapa do processo.

As proteínas previamente extraídas, lavadas e solubilizadas podem então passar diretamente para o processo de purificação, sem necessidade de diálises ou diluições. Essa abordagem possibilita uma redução drástica no tempo final do processo *downstream*, já que a diálise demanda muito tempo de experimentação, além dos gastos com tampões específicos e inviabilidade de escalonamento, devido ao aumento significativo do volume de trabalho.

Além dessa simplificação no processo, somam-se algumas vantagens conferidas pela utilização de purificação, como: o tempo reduzido das análises, boa reprodutibilidade, alta resolução, bons resultados quantitativos e facilidade de automação do processo. Atualmente existem equipamentos de grande porte que podem ser utilizados em escala em processos de purificação em nível industrial (MELLSTEDT, *et al.*, 2008). A proteína purificada pode então ser liofilizada para evaporação total das soluções utilizadas na cromatografia, e estará livre do agente solubilizante e demais contaminantes, possibilitando o prosseguimento para análises bioquímicas, formulações, testes de atividade biológica e outras aplicações específicas (MELLSTEDT, *et al.*, 2008).

Com a definição do procedimento, foi realizada uma análise estimativa dos custos de produção do hrG-CSF, levando em consideração os reagentes, os materiais, o consumo de energia para cada etapa do processo (**tabela 5**). Para o orçamento dos reagentes e materiais utilizou-se os valores de compra em nível laboratorial. A energia foi calculada com base nos valores fornecidos pela Companhia Elétrica de Brasília (CEB), tomando-se por base os valores de consumo para o setor Comercial/Industrial, que é de R\$ 0,21297176 / kWh.

A partir do rendimento do processo, que foi de 2,49 mg de proteína pura a cada 50 mL de cultivo celular, equivalentes a 49,8 mg de proteína pura por litro e, levando-se em consideração os custos com reagentes, materiais e energia foi possível estipular que, para a produção de 1 mg de hrG-CSF purificada e liofilizada tem-se o custo aproximado de R\$ 20,14, o que representa o valor de R\$ 6,04 para

uma dose equivalente a 300 µg, dose ministrada em humanos, que atualmente custa em torno de R\$ 300,00.

Devido à necessidade de alto grau de pureza dos biofármacos, a etapa de purificação geralmente é um fator impactante no processamento destes, sobrepondo inclusive os custos com cultivo celular (CHISTI, 1998; CLARK, 2001; DONDOS, 2006). Tal fato foi comprovado neste trabalho como demonstrado na tabela 5, onde o custo referente à etapa de purificação desenvolvida para processamento de 50 mL de cultivo celular para expressão de hrG-CSF foi de aproximadamente R\$ 38,30, representado 64,7% do custo total do processo. Porém, no processo desenvolvido existe apenas uma etapa de purificação, o que torna este processo menos oneroso.

De acordo com dados do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, existem vários biossimilares da Filgrastima que são adquiridos para o Ministério da Saúde e distribuídos pelo SUS. Tomando-se por base o pregão n.º 692005 e analisando o menor preço pago por 300 µg do hrG-CSF, igual a R\$ 62,00, nota-se que o processo desenvolvido neste trabalho reduziu aproximadamente em 90% os custos de produção (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, 2012). Entretanto, é importante ressaltar que, na análise de custos não foram adicionados gastos com mão de obra, o qual representa grande parte do valor agregado do produto (ENCARNAÇÃO *et al.*, 2005). Os valores apresentados foram calculados a partir de experimentos realizados em escala laboratorial, os quais podem ser ainda mais reduzidos no processo de escalonamento, o qual está sendo desenvolvido para que, a partir de então seja estudada a viabilidade para a produção do produto em uma plataforma nacional.

Tabela 6: Tabela de custos para processamento de hrG-CSF em 50 mL de expressão

Etapa	Preço (R\$)	%
Pré-inóculo (25 mL)	4,99	8,4
Inóculo (50 mL)	5,45	9,2
Lise e Lavagem	7,74	13,07
Solubilização	2,66	4,49
Purificação	38,34	64,7
TOTAL	59,20	100

5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de biofármacos representa hoje a única alternativa para tratamento de algumas doenças crônicas, neste caso específico a neutropenia resultante de diversos processos patológicos. A rota biotecnológica tem sido uma estratégia eficiente para produção destas proteínas terapêuticas, que possuem alta relevância tanto econômica quanto social. A produção de biofármacos é caracterizada como um procedimento oneroso, que acaba refletindo no preço final do produto. O Brasil é um grande importador de biofármacos, somente no ano de 2010 os gastos representaram cerca de R\$ 2,6 bilhões. Este fato representa gastos relevantes para o Governo Federal através do Sistema Único de Saúde. De acordo com o SUS os biofármacos são classificados como medicamentos de alto valor unitário, denominados atualmente como Componente Especializado de Assistência Farmacêutica (CEAF). Com a expiração das patentes de vários dos biofármacos originais, surge uma segunda geração de medicamentos, os biossimilares. Estes representam um novo mercado farmacêutico, além de ser uma opção para diminuição dos gastos para o Brasil, através da produção nacional destes medicamentos. O hrG-CSF teve sua patente expirada em 2006, o que levou ao objetivo deste trabalho, de produzir uma tecnologia para a produção deste biossimilar com custos diminuídos em nível nacional.

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo eficiente de expressão e purificação da proteína recombinante hG-CSF em *E. coli*. O gene foi sintetizado utilizando-se códons preferenciais para *E. coli* e clonado em vetor de expressão pET28a+, o que permitiu altos níveis de expressão na melhor condição encontrada após vários testes: meio LB com indução por IPTG 0,4 mM por 4 horas, a 37° com agitação de 200 rpm. O protocolo desenvolvido para solubilização da proteína produzida em corpos de inclusão, sem a necessidade de *refolding* da proteína, bem como o processo de purificação do hrG-CSF foi totalmente inovador, utilizando-se apenas uma etapa de purificação. O produto final apresentou atividade imunológica e biológica comparável ao medicamento comercial em testes de modelos animais.

A utilização de apenas uma etapa para a lavagem dos corpos de inclusão e de purificação e diminui os custos para a produção em escala industrial do hrG-CSF. Nas próximas etapas deste trabalho, serão realizados testes em escala semi-piloto

em nível industrial (fermentadores de 15L e 120 L) utilizando-se biorreatores e meios de cultivo de baixo custo. Em escala comercial, a redução das etapas de purificação da proteína representa a diminuição dos gastos com a produção e praticidade no processo. O processo desenvolvido é econômico e simples, podendo ser reproduzido em escala industrial. Este é um importante projeto de desenvolvimento tecnológico concebido no Brasil para produção de biossimilares. Um dos principais impactos previstos será uma possível produção nacional, com uma conseqüente diminuição das importações, dado que esse medicamento é totalmente importado, além do impacto social aumentando o acesso da população a este medicamento.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4ª ed. Pensilvânia: Editora W.B Saunders Company, 2000. 580 p.

AHMED, K. E. A. M.; CHEN, W.; JOHN, J. P. P.; KANG, S. U.G; LUBEC, G. Complete sequencing of the recombinant granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim) and detection of biotinylation by mass spectrometry. **Amino Acids**. v. 38, n. 4, 1043-1049, 2010.

AKASHI K.; TRAVER D.; MIYAMOTO T et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**. v. 404, n. 6774, 193-197, 2000.

ALBERTS, B et al. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 2002.

ALMEIDA, D et al. **Comissão de trabalho, de administração e serviço público requerimento**. Requer a aprovação de envio de Indicação dessa Comissão, ao Ministro do Planejamento, Orçamento e Gestão, solicitando a abertura das negociações sobre a correção de tabela salarial dos servidores da Fundação Oswaldo Cruz, junto ao Ministério. Brasil, 2007.

ANDERSSON, L.; YANG, S.; NEUBAUER, P.; ENFORS, S. O. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed-batch cultures of Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*. v. 46, n. 3, 255- 263, 1996.

BARREDA, D.; HANINGTON, P.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n.5, 509-554, 2004.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

BIGAS, A.; ESPINOSA, L. Hematopoietic stem cells: to be or notch to be. **Blood**. v. 119, n. 14, 3226-3265, 2012.

BIGAS, A.; ROBERT-MORENO, A; ESPINOSA, L. The notch pathway in developing hematopoietic system. **International Journal of Developmental Biology**. v. 54, n.6-7, 1175-1188, 2012.

BOONE, T et al. Method for purifying granulocyte colony stimulating factor. **US n 584988-3**, 15 dez. 1998, 9 mai. 2016.

BRASIL. Lei 6.638, de 08 de maio de 1979. Dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 de Maio de 1979.

BRASIL. Lei 12.349, de 15 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos para licitações. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 14 de dezembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Previdência e Assistência Social, Ministério da Saúde e da Educação e Cultura. Portaria Interministerial nº 3, de 15 de dezembro de 1982. Dispõe sobre a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro de 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Sistemas e Redes Assistenciais. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas: medicamentos excepcionais.**- Brasília: Ministério da Saúde, 2002c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Da excepcionalidade às linhas de cuidado: o Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. 262 p. Brasília, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de fevereiro de 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 978, de 16 de maio de 2008. Dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde e institui a Comissão para Revisão e Atualização da referida lista. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 de maio de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/SAS nº 862, de 12 de novembro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretriz terapêutica – tratamento da neutropenia com estimuladores de colônias das células progenitoras da medula óssea – filgrastima, lenograstima, molgramostima. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de novembro de 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 106, de 22 de janeiro de 2009. Altera o Anexo II da Portaria nº 2.577/GM de 27 de outubro de 2006, que aprova o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 204, de 29 de janeiro de 2007. Regulamenta o financiamento e a transferência dos recursos federais para as ações e os serviços de saúde, na forma de blocos de financiamento, com o respectivo

monitoramento e controle. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de janeiro de 2007a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 1.318, de 23 de julho de 2002. Define, para o grupo 36, medicamentos, da Tabela Descritiva do Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde - SIA/SUS, a forma e a redação estabelecidas no anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de julho de 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.869, de 4 de setembro de 2008. Altera o Anexo II da Portaria no 2.577/GM de 27 de outubro de 2006, que aprova o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 de setembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.577, de 27 de outubro de 2006. Aprova o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de outubro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de novembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 17, de 22 de janeiro de 1997. Cria novos códigos para os medicamentos: interferon beta 1a dosagem 3.000.000UI injetável e interferon beta 1b dosagem 9.600.000UI, injetável. Exclui da tabela descritiva de procedimentos do sistema de informações ambulatoriais o código criado na PT MS/SAS 204/96 e altera as denominações dos códigos constantes na mesma Portaria, conforme anexo. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 102, de 6 de setembro de 1995. Publica nova redação de medicamentos excepcionais conforme anexo. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 de setembro de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 142, de 6 de outubro de 1993. Inclui na Tabela de Valor de Procedimentos do SIA/SUS os medicamentos considerados excepcionais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de outubro de 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 204, de 6 de outubro de 1996. Cria novos códigos de medicamentos excepcionais na Tabela Descritiva de Procedimentos do SIA/SUS. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de novembro de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 1.284, de 26 de Maio de 2010. Altera o anexo a Portaria nº 978/GM/MS, de 16 de maio de 2008. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília DF, 27 de maio de 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA nº 2981, de 26 de novembro de 2009. Aprova o Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de novembro de 2009.

BEHME, S. **Manufacturing of Pharmaceutical Proteins: From Technology to Economy**. Alemanha: Wiley-VCH, 2009. 389 p.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**. v. 33, n. 5, 657–670, 2010.

CARIAS, C. M.; VIEIRA, F. S.; GIORDANO, C. V.; ZUCCHI, P. Medicamentos de dispensação excepcional: histórico e gastos do Ministério da Saúde do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 45, n. 2, 233-40, 2011.

CHISTI, Y. Strategies in Downstream Processing. Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook. 1ª ed. Subramanian: Editora Wiley-VHC, Volume 2, Capítulo 11, 1998. 580p.

CHOI, J.; KEUM, K.; LEE, S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**. v. 61, n. 3, 876-885, 2006.

CLARK, E. Protein for industrial process. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, n. 2, 202-207, 2001.

CODEVILLA, C. F.; BRATH, T.; JÚNIOR, L.; B. FRONZA.; DALMORA, S. L. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n. 2, 104-108, 2004.

CORISDEO, S.; WANG, B. Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. **Protein Expression and Purification**. v. 34, n. 2, 270-279, 2004.

CORR, J. H.; RODOK, B. R. **Atlas de Hematologia Clínica**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2001. 212 p.

CROMMELIN, D.J.; BERMEJO, T.; BISSIG, M. et al. Pharmaceutical evaluation of biosimilars: important differences from generic low-molecular weight pharm. **European Journal of Hospital Pharmacy**. v. 11, n. 1, 11–17, 2005.

DALMORA, S.L.; MASSIERO, S.; OLIVEIRA, P.; SANGOI, M.; BRUM, L. Validation of an RP-HPLC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulation by liquid chromatography and biological assay. **Journal of liquid chromatography & related technologies**. v. 29, n. 12, 1753-1767, 2006.

DE GROOT, N.S.; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters**. v. 580, n. 27, 6471-6476, 2006a.

- DE GROOT, N.S.; VENTURA, S. Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates. **Journal of Biotechnology**. v. 125, n.1, 110-113, 2006b.
- DONDOS, A. Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins. **Journal of Chromatography A**. v. 1127, n.2, p. 183-186, 2006.
- DUILIO, A.; TUTINO, M. I.; MARINO, G. Recombinant protein production in Antarctic gram-negative bacteria. **Method in Molecular Biology**. v. 267, n. 2, 225-238, 2004.
- ENCARNAÇÃO, A.; ALMEIDA, C.; BRUM, P.; KARELE, S. **Projeto de uma planta para a produção de G-CSF recombinante**. 2005. Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- FARDELONE, L.C; BRANCHI, B.A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Revista da FAE**. Curitiba, v.9, n. 2, p. 29-38, 2006.
- FDA Drug Bull. **Human insulin receives FDA approval**. v. 12, n. 3, 18-19, 1982.
- FRIESEN, J.D.; AN, G. Expression vehicles used in recombinant DNA technology. **Biotechnology advances**. v.1, n.2, 205-227, 1983.
- GARCÍA-FRUITÓS, E. Inclusion bodies: a new concept. **Microbial cell factories**. v. 9, n. 80, 1-3, 2010.
- GAO, W.; RZEWSKI, A.; SUN, H.; ROBBINS, P. D.; GAMBOTTO, A. UpGene: Application of a web-based DNA codon optimization algorithm. **Biotechnology Progress**. v. 20, n. 2, 443-448, 2004.
- GARCIA-CARBONERO, R.; MAYORDOMO, J.; TORNAMIRA, M.; BREA, M.; RUEDA, A.; GUILLERM, V.; ARCEDIANO, A.; YUBERO, A.; RIBERA, F.; GOMES, C.; TRES, A.; PERES-GRACIA, J.; LUMBRERAS, R.; HORNEDO, J.; FUNES, H.; PAZ-ARES, L. Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized Trial. **Journal Natural Cancer Institute**, v. 3, n.93, 31-38, 2001.
- GARCIA-FRUITOS, E. et al. Bacterial inclusion bodies: making gold from Waste. **Trends in Biotechnology**. v. 30, n. 2, 65-70, 2010.
- GARCIA-FRUITOS, E. Inclusion Bodies: a new concept. **Microbial Cell Factories**. v. 9, n. 80, 1-3, 2010.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, E. S.; PUNREDDY, S. R.; OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase

plays a role in recombinant expression instability. **Gene**. v. 209, n. 1 e 2, 95-103, 1998.

HARADA, M et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jack-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**. v. 11, n. 3, 305-311, 2005.

HAMMERLING, U; KROON, R; SJODIN, L. In vitro bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 13, n. 1, p. 9-20, 1995.

HARTUNG, T.; AULOCK, S.; WENDEL, A. Role of granulocyte colony –stimulating factor in infection and inflammation. **Medical Microbiology and Immunology**. v. 187, n.2, 61-69, 1998.

HILL, C.; OSSLUND, T.; EISENBERG, D. The structure of granulocyte colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. **Biochemistry**. v. 90, n. 11, p. 5167-5171, 1993.

HOFER, M.; POSPISIL, M.; HOFEROVÁ, Z.; WEITEROVÁ, L. KOMURKOVÁ, D. Stimulatory action of cyclooxygenase inhibitors on hematopoiesis: a review. **Molecules**. v. 17, n. 5, 5615-5625, 2012

HOGLUND, M. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) - what is the difference? **Medical Oncology**. v. 15, n. 4, p. 229-233, 1998.

HUANG, X.; CHO, S.; SPANGRUDE, G. J. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. **Cell Death and Differentiation**. v. 14, n. 11, 1851-1859, 2007.

JARVIS, L. M. A steady start for biopharma companies. **Chemical & Engineering News**. V. 84, n. 21, p. 25-26, 2006.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, n. 3, 289-298, 2005.

JEONG K, LEE S: Secretory production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. v. 23, n.2, 311-318, 2001.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; PODOBNIK, B.; GRDADOLNIK, J.; MENART, V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**. v. 21, n. 2, 632-639, 2005.

JUNIOR, Z. M. A. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Nova Política de Compras Governamentais. **V Seminário Sobre Rotas Tecnológicas da Biotecnologia**. São Paulo, 7 de Junho de 2011.

KANEKO, M. et al. Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, *Hochu-ekki-to*. **Imunopharmacology**. v. 44, n. 3, 223-231, 1999.

KAUSHANSKY, M.D.K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. **The New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 16, 2034-2045, 2006.

KHALILZADEH, R. et al. Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n.12, 2008.

KLEINBERG, M.; MOSDELL, K. W. Current and future considerations for the new classes of biologicals. **American Journal of Health System Pharmacy**. United States, v. 61, n. 7, 695-708, 2004.

KOSINSKI, M. J.; RINAS, U & BAILEY. Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology**. v. 36, 782-784, 1992.

LEE, P. S.; LEE, K. H. *Escherichia coli*-a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. **Biotechnology Bioengineering**. v. 84, n. 7, 801-814, 2003.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trend in Biotechnology**. v. 14, n. 3, 98-105, 1996.

LEMISCHKA, I. Stem cell dogmas in the genomics era. **Reviews in Clinical & Experimental Hematology**. v.5, n. 1, 15-25, 2001.

LOBATO, Flávia. **Fiocruz recebe R\$ 30 milhões para centro de desenvolvimento de vacinas**. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=1084&sid=9> >. Acesso em: 12 Abr. 2012.

LOSEN, M.; FROLICH, B.; POHL, M.; BUCHS, J. Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. **Biotechnology Progress**. v. 20, n. 4, 1062-1068, 2004.

LU, H.; FAUSSET, P.; NARHI, L.; HORAN, T.; SHINAGAWA, K.; SHIMAMOTO, G.; BOONE, T. Chemical modification and site-directed mutagenesis of methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V.362, 1-11, 1999.

MALDONADO, L. M. T. P. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: The case of human interferon beta. **Biomolecular Engineering**. v. 24, n. 2, 217-222, 2007.

MARTINEZ-ALONSO, M.; GONZALEZ-MONTALBAN, N.; GARCIA-FRUITOS, E.; VILLAVERDE, A. Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. **Microbial Cell Factories**. v. 8, n. 4, 2009, 8:4.

MATSUZAKI, G.; LI, X.; OHYAMA, Y.; NOMOTO, K. Kinetics of serum granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) concentration and G-CSF receptor expression during G-CSF treatment of cyclophosphamide-treated mice. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 18, n. 6 e 7, 363-369, 1996.

MELLSTEDT, H.; NIEDERWIESER, D.; LUDWIG, G.; **Annals of Oncology**. The challenge of biosimilars. v. 19, n. 3, 2008.

MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 82, n. 7, 809-817, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Informe Ciência e Tecnologia em Saúde**. Brasil, v. 10, n. 7, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Distribuição de mais 41 medicamentos Vai triplicar população beneficiada. **Informe Saúde**. ano VI, n. 174, 2002.

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. Comprasnet: Portal de compras do Governo Federal. Disponível em: <<http://www.comprasnet.gov.br/livre/Pregao/propostas.asp?ipgCod=300158>>. Acesso em 26 de Abril de 2012.

NAGATA, S.; TSUCHIYA, M.; ASANO, S.; KAZIRO, Y.; YAMAZAKI, T.; YAMAMOTO, O. et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. **Nature**. v. 319, n. 6052, 415-418, 1986.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**. v. 6, n. 3, 173–182, 2006.

NELSON, D.L; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

NORTE, L.C. **Avaliação da utilização de membranas de troca iônica na purificação da eritropoietina humana recombinante**. 2007.115f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos – Área Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz.

O’SULLIVAN, L. A.; LIONGUE, C.; LEWIS, R. S.; STEPHENSON, S. E.; WARD, A. C. Cytokine receptor signaling through the jak-Stat-Socs pathway in disease. **Molecular Immunology**. v. 44, n. 10, 2497-2506, 2007.

PANOPOULOS, A.D.; WATOWICH, S.S. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and ‘emergency’ hematopoiesis. **Cytokine**. v. 42, n. 3, 277–288, 2008.

PERAZZOLO, L.M.; LORENZINI, D.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, n. 3 302-307, 2005.

PETERNEL, S.; GABERC-POREKAR, V.; KOMEL, R. Bacterial Growth Conditions Affect Quality of GFP Expressed Inside Inclusion Bodies. **Acta Chimica Slovenica**. v. 56, n. 4, 860-867, 2009.

PETERNEL, S.; GRDADOLNIK, J.; GABERC-POREKAR, V.; KOMEL, R. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microbial Cell Factories*, v. 7, n. 34, 2008.

PISANI J, BONDUELLE Y. **Opportunities and barriers in the biosimilar market: evolution or revolution for generics companies?** Disponível em: < <http://www.ableindia.org/biosimilars.pdf> >. Acesso em: 10 abr. 2012.

POREKAR, V. G.; MENART, V. Process for the purification and/or isolation of biologically active granulocyte colony stimulating factor. **Patente US 2005/01595589**, 2005.

RADER, R. A. (Re) defining biopharmaceutical. v. 26, n. 7, 743-751, 2008.
RAWLINGS, J. S; KRISTIN M. R; DOUGLAS A. H. The JAK/STAT signaling pathway. **Cell Science at a Glance**. v. 117, n. 8, 1281-1283, 2001.

RATHORE, A. S; WINKLE, H. Quality by design for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**. v. 27, n. 26-34, 2009

REIS, C.; LANDIM, A.; PIERONI, J. P. Lições da experiência internacional e propostas para incorporação da rota biotecnológica na indústria farmacêutica brasileira. **Complexo Industrial de Saúde: BNDES Setorial**. N. 34, 5-44, 2011.

REIS, C.; PIERONI, J. P.; SOUZA, J. O. B. Biotecnologia para saúde no Brasil. *BNDES Setorial: Tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica*. n. 32, 193-230, 2009.

RICHE, M. Opportunities for UK Companies in Biopharmaceuticals and Biotechnology in Brazil. **UK Trade and Investment**. UK Trade and Investment 2006. Disponível em < www.uktradeinvest.gov.uk/ukti/biotechnology >. Acesso em: 13 de abril 2012.

RIESENBERG, D.; MENZEL, K.; SCHULZ, V.; SCHUMANN, K.; VEITH, G.; ZUBER, G.; KNORRE, W. A. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 314, n. 1, 77-82, 1990.

ROGER, S. D. Biosimilars: how similar or dissimilar are they? **Nephrology**. v. 11, n. 4, 341-346, 2006.

ROMERO, T. Agência Fapesp. **Brasil quer dominar produção de biofármacos por meio de engenharia genética**. Disponível em : < <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=brasil-quer-dominar-producao-de-biofarmacos-por-meio-de-engenharia-genetica&id=3220> >. Acesso em: 12 de abril de 2012.

ROTONDORO et al. Purification and Characterization of Two Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Glycoforms. **Molecular Biotechnology**, v. 11, 1999.

SALERNO, M. S.; DAHER, T. **Política industrial, tecnológica e de comércio exterior Do governo federal (PITCE):Balanço e perspectivas**. Brasil, 23 de setembro de 2006.

SALMON, K.; HUNG, S. P.; MEKJIAN, K.; BALDI, P.; HATFIELD, G. W.; GUNSALUS, R. P. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 32, 29837-29855, 2003.

SATAGINNUS, U. Economía y productos biotecnológicos. **Revista Española de Economía de La Salud**. Espanha, v. 5, n. 6, 343-347, 2006.

SCHELLEKENS, H. Biosimilar therapeutics – What do you need consider?. **Nefrology Dialyses Transplantation**. v, 3, n. 1, 27-36, 2009.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, n. 3, 442-453, 2004.

SENGUPTA, P et al. Optimized conditions for high-level expression and purification of recombinant human interleukin-2 in *E. coli*. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v. 45, n.2, 91-97, 2008.

SHIMAMURA, M. et al. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. **Blood**. v. 69, n. 1, 353-355, 1987.

SMITH, C.; Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis. **Cancer Control**. v.10, n.1, 9-16, 2003.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 115, n.2, 113-128, 2005

SOUZA, L.M.; BOONE, T.C.; GABRILOVE, J.; LAI, P. H.; ZSEBO, K. M.; MURDOCK, D. C. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. **Science**. v. 232, n. 4746, 61-65, 1986.

SOUZA, L. Production of pluripotent granulocyte colony-stimulating factor. **AMGEN**. US 4,810,643, 1989.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. v. 41, n. x, 207-234, 2005.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**. v. 189, n. 1, 113-130, 1986

TOUW, I. P.; VAN DE GEIJN, G. J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development leukemia and related blood cell disorders. **Frontiers in Bioscience**. v. 12, 800-815, 2007.

VANZ, A.L.S et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. **Microbial Cell Factories**. v. 7, n. 13, 1-12, 2008.

VARKI, R et al. A glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in a novel protein production system (AVI-014) in healthy subjects: a first-in human, single dose, controlled study. **BMC Clinical Pharmacology**. v. 9, n. 2, p. 1-8, 2009.

VILLAVERDE, A; CARRIO, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**. v. 25, n. 17, p. 1385-1395, 2003.

WALSH, G. Biopharmaceutical Benchmarks. **Nature Biotech**. v. 21, n. 8, p. 865-870, 2003.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 15, n. 2, 135-138, 2002.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**. v. 15, n.17, 773-780, 2010.

WANG, S. Patent search on biologics as potential biosimilar candidates. **World Patent Information**. v. 33, n. 1, 67-71, 2011.

WARD, A. C.; TOUW, I.; YOSHIMIRA, A. The JAK-STAT pathway in normal and perturbed hematopoiesis. **Blood**. v. 95, n. 1, 19-29, 2000.

WEISSMAN, L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**. v. 100, n. 1, 157-168, 2000.

WELTE, K.; GABRILOVE, J.; BRONCHUD, M. H.; PLATZER, E.; MORSTYN, G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. **Blood**. v. 88, n. 6, 1907-1929, 1996.

WILLIAMS, J. G. STAT signalling in cell proliferation and in development. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 10, n. 5, 503-507, 2000.

XIE, H. W et al. Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. **MABs**. v. 2, n. 4, 379-394, 2010.

YAMASAKI, M et al., Purification and Characterization of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rhG-CSF) Derivates: kW-2228 and Other Derivates. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 8, 1998.

ZHANG, T et al. Modeling of protein refolding from inclusion bodies. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v. 41, n. 12, 1044-1052, 2009.

ZHU, J.; EMERSON, S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**. v. 21, n. 21, 3295-3313, 2002.

ZINK, T.; ROSS, A.; LUEERS, K.; CIESLAR, C.; RUDOLPH, R.; HOLAK, T. A. Structure and Dynamics of the Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Determined by NMR Spectroscopy. Loop Mobility in a Four-Helix-Bundle Protein. **Biochemistry**. v. 33, n. 28, 8453-8463, 1994.