



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ALTOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA HUMANA
EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS MEDIANTE
A UTILIZAÇÃO DE VETORES DICISTRÔNICOS**

CIBELE NUNES PERONI

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

Orientador:
Dr. Paolo Bartolini

**São Paulo
1999**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ALTOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA HUMANA
EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS MEDIANTE
A UTILIZAÇÃO DE VETORES DICISTRÔNICOS**

CIBELE NUNES PERONI

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador: Dr. PAULO BARTOLINI

**São Paulo
1999**



AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação e constante apoio;

Aos amigos da Supervisão de Radioensaios pela participação e estímulo na realização deste trabalho;

À Agência Internacional de Energia Atômica pela concessão de recursos financeiros e de bolsa de especialização no exterior;

À FAPESP e ao CNPq pela concessão de recursos financeiros;

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

ALTOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIREOTROFINA HUMANA EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DE VETORES DICISTRÔNICOS

Cibele Nunes Peroni

RESUMO

Altos níveis de expressão de glicoproteínas recombinantes em células de mamífero podem ser obtidos por isolamento de clones estáveis seguido de amplificação gênica de um marcador de seleção. A tireotrofina humana (hTSH), uma glicoproteína heterodimérica formada pelas subunidades α e β que não são ligadas covalentemente, foi expressa em células de ovário de hamster chinês (CHO) utilizando um sistema baseado em vetores de expressão dicistrônicos contendo um sítio interno de ligação ao ribossomo isolado do vírus da encefalomiocardite (EMC) e marcadores gênicos amplificáveis como diidrofolato redutase (DHFR) e adenosina deaminase (ADA). Os vetores de expressão obtidos para ambas subunidades (pEDdc- α e pEAdc- β hTSH) foram introduzidos em células CHO DHFR⁻ via estratégias de transfecção sequencial ou cotransfecção. Após as células terem sido cotransfectadas com os vetores de expressão e submetidas à amplificação gênica em meio de cultura contendo quantidades crescentes de metotrexato (MTX), foi possível o isolamento de clones que apresentaram um nível de secreção de até $5,7 \pm 1,0 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia, o mais alto já reportado para a expressão deste hormônio glicoproteico.

As condições de cultura celular e produção do hTSH num biorreator tipo "hollow-fiber" (*Cellmax Artificial Capillary Module*) foram estabelecidas para obter uma secreção adequada de hTSH e permitir uma primeira caracterização físico-química, imunológica e biológica desta proteína, em comparação com o produto de extração hipofisária e com a única preparação disponível de hTSH recombinante (Thyrogen®). A disponibilidade de grandes quantidades de hTSH recombinante é extremamente importante no diagnóstico e terapia do carcinoma tireoideano, mediante estimulação da captação de radioiodo por este tecido.

HIGH-LEVEL EXPRESSION OF HUMAN THYROTROPIN IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING DICISTRONIC EXPRESSION VECTORS

Cibele Nunes Peroni

ABSTRACT

High-level recombinant glycoprotein expression in mammalian cells can be obtained by isolation of stable clones followed by gene amplification of a selectable marker. Human thyrotropin (hTSH), a heterodimeric glycoprotein composed of non-covalently linked α - and β -subunits, was expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells using a system based on dicistronic expression vectors, containing an internal ribosome entry site (IRES) isolated from the encefalomyocarditis (EMC) virus and amplifiable markers genes such as dihydrofolate reductase (DHFR) and adenosine deaminase (ADA). The expression vectors obtained for both subunits (pEDdc- α and pEAdc- β hTSH) were introduced into DHFR⁻ CHO cells by sequential transfection or co-transfection strategies. After the cells had been cotransfected with the expression vectors and submitted to gene amplification in culture medium containing stepwise increments of methotrexate (MTX), it was possible to isolate clones that presented a secretion level up to $5.7 \pm 1.0 \mu\text{g hTSH}/10^6 \text{ cells/day}$, the highest ever reported for the expression of this glycoprotein hormone.

Cell culture and hTSH production in a hollow-fiber bioreactor (*Cellmax Artificial Capillary Module*) was set up in order to obtain a useful hTSH secretion and permit a preliminary physico-chemical, immunological and biological characterization of this protein, in comparison with pituitary extracted hTSH and with the only recombinant hTSH now available (Thyrogen[®]). The availability of large quantities of recombinant hTSH is extremely important in the diagnosis and therapy of thyroid carcinoma, via stimulation of thyroidal radioiodine uptake.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Considerações gerais sobre a tireotrofina.....	1
1.2. Obtenção e aplicação do hTSH.....	3
1.3. Expressão de glicoproteínas recombinantes.....	8
1.4. Utilização de vetores dicistrônicos.....	11
1.5. Objetivos do trabalho.....	13
 2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. MATERIAIS	
2.1.1. Equipamentos e acessórios principais.....	15
2.1.2. Nucleotídeos marcados.....	16
2.1.3. Oligonucleotídeos.....	16
2.1.4. Cepas de <i>E. coli</i>	16
2.1.5. Vetores plasmídicos.....	16
2.1.6. Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Molecular.....	17
2.1.7. Linhagens celulares.....	18
2.1.8. Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Celular.....	18
2.1.9. Preparações padrão, antissoros e outros reagentes para imunoensaios ou ensaio de bioatividade <i>in vivo</i>	19
2.1.10. Animais utilizados no bioensaio.....	20
2.1.11. Outros reagentes.....	21
 2.2. MÉTODOS	
2.2.1. Obtenção dos genes das subunidades α e β hTSH.....	22
2.2.2. Isolamento e purificação dos fragmentos de DNA.....	23

2.2.3. Amplificação e purificação dos plasmídeos.....	23
2.2.4. Sequenciamento de DNA.....	24
2.2.5. Transformação, seleção e amplificação das células eucariotas.....	24
2.2.5.1. Métodos de transfecção	
2.2.5.1.1. Transfecção transiente pelo método do DEAE-dextran.....	25
2.2.5.1.2. Transfecção estável pelo método dos lipossomas.....	26
2.2.5.1.3. Transfecção estável pelo método da eletroporação.....	27
2.2.5.1.4. Transfecção estável pelo método do fosfato de cálcio.....	27
2.2.5.2. Seleção e amplificação.....	27
2.2.6. Análise da expressão proteica.....	30
2.2.6.1. Radioimunoensaio (RIA) de α hTSH.....	30
2.2.6.2. Ensaio imunoradiométrico (IRMA) de hTSH.....	31
2.2.7. Produção em biorreator.....	32
2.2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC).....	33
2.2.9. Avaliação da atividade biológica <i>in vivo</i>	33

3.RESULTADOS

3.1. Obtenção dos vetores de expressão pEDdc- α e pEDdc- β hTSH

3.1.1. Isolamento do gene da subunidade α hTSH e sua clonagem no vetor pEDdc.....	34
3.1.2. Isolamento do gene da subunidade β hTSH e sua clonagem no vetor pEAdc.....	34

3.2. Transfecção de diferentes linhagens de células CHO com os vetores de expressão obtidos: pEDdc- α e pEDdc- β hTSH

3.2.1. Estratégia de transfecção sequencial	
3.2.1.1. Estabelecimento de uma linhagem CHO- α hTSH com secreção estável da subunidade α	38
3.2.1.2. Transfecção sequencial das células CHO DG-44 secretoras de α hTSH com os vetores pEAdc- β hTSH e pRSneo.....	44
3.2.2. Estratégia de cotransfecção	
3.2.2.1. Transfecção transiente.....	46

3.2.2.2. Transfecção para obtenção de linhagens estáveis.....	47
3.3. Padronização das condições de produção do hTSH em biorreator tipo “hollow-fiber”.....	53
3.4. Caracterização do hTSH recombinante obtido	
3.4.1. Análise em HPSEC associada a IRMA.....	56
3.4.2. Caracterização imunológica.....	58
3.4.3. Atividade biológica <i>in vivo</i>	60
 4. DISCUSSÃO.....	 63
 5. CONCLUSÕES.....	 72
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 74

1. INTRODUÇÃO

1.1.Considerações gerais sobre a tireotrofina

A tireotrofina humana ou hormônio estimulador da tireóide (hTSH) é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior, que apresenta uma função fisiológica fundamental na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, estimulando o crescimento da célula tireoideana e a síntese e secreção dos hormônios tireoideanos: triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4).

A secreção do hTSH é controlada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), um tripeptídeo hipotalâmico, pela somatostatina e pelos hormônios tireoideanos, através de um mecanismo de retro-regulação. Assim, quando há uma diminuição dos níveis de T_3 e T_4 na circulação, ocorre uma estimulação da secreção com consequente aumento da concentração sérica de hTSH, como acontece no hipotireoidismo primário. Por outro lado, uma elevação dos níveis dos hormônios tireoideanos acarreta uma supressão da secreção de hTSH, resultando em concentrações inferiores às dos indivíduos normais (0,6 - 4,6mUI/L de hTSH) nos casos de hipertireoidismo.

A ligação do hTSH a receptores específicos nas células epiteliais tireoideanas ativa a adenilato ciclase com consequente elevação dos níveis de AMP cíclico, que resulta na captação e organificação de iodo e na síntese e secreção de T_3 , T_4 e tireoglobulina (108).

Esta glicoproteína é formada por duas subunidades (α e β) unidas por ligação não covalente. As subunidades isoladas não apresentam atividades biológicas, sendo portanto a ação do hormônio dependente do arranjo correto entre as mesmas e da introdução das cadeias de carboidrato no heterodímero (23,33,111).

A subunidade α do hTSH é comum à de outros dois hormônios da hipófise anterior (folículo estimulante e luteinizante) e à da gonadotrofina coriônica humana, produzida na placenta, sendo que estes quatro hormônios formam uma família específica de glicoproteínas.

O cDNA da subunidade α é formado por 621pb, quando isolado e clonado (18). Um único gene, localizado no cromossomo 6, codifica esta subunidade, sendo que este gene apresenta 4 exons e 3 introns (exons I, II, III e IV de 94, 95, 185 e 78 pb; e introns I, II e III de 6,4; 1,7 e 0,4 kb, respectivamente), que traduzem um polipeptídeo de 92 aminoácidos no ser humano, com 10 cisteínas envolvidas em pontes-dissulfeto e peso molecular de 11kDa. A esta subunidade são adicionadas duas cadeias de oligossacarídeo de ligação-N, nas asparaginas 52 e 78, aumentando o seu peso molecular teórico para 13,8kDa (9). Em SDS-PAGE o peso molecular aparente resultou ser de 20,4kDa, devido a um comportamento anômalo desta subunidade (Dr. E.S.Cole, comunicação pessoal).

Numa mesma espécie, a sequência de aminoácidos da subunidade α é idêntica para os quatro hormônios glicoproteicos (5). Porém, a estrutura de carboidratos pode variar, devido às mudanças na conformação, induzidas pelas subunidades β específicas, ou em consequência da presença de diferentes enzimas envolvidas no processamento de carboidratos na hipófise ou placenta (119).

A subunidade β é única para cada um desses hormônios e confere especificidade biológica e imunológica. No entanto, há uma considerável homologia entre as sequências de aminoácidos destas subunidades β , especialmente na conservação das 12 cisteínas envolvidas em pontes-dissulfeto (87).

O gene da subunidade β do hTSH está localizado no cromossomo 1 (13), sendo formado pelo exon I de 37pb (não traduzido), exon II de 163pb (codifica o peptídeo sinalizador de 20 aminoácidos e os primeiros 34 aminoácidos desta subunidade) e exon III de 326pb (contem a região codificadora dos aminoácidos 35 a 118 e a sequência 3' não traduzida) separados por dois introns de 3,9 e 0,45 kb (29,35,120). Portanto, é codificada uma proteína de 118 aminoácidos, a qual é glicosilada apenas na asparagina 23, determinando assim um peso molecular teórico

para esta subunidade de 15,8kDa, que em SDS-PAGE resultou num peso molecular de 16,6kDa, sem portanto apresentar a anomalia já mencionada no caso da subunidade α (9). Porém, esta mesma proteína, quando isolada de hipófises, apresenta 112 aminoácidos, sem os 6 aminoácidos hidrofóbicos terminais. Uma possível explicação para esta discrepância é que estes últimos aminoácidos sejam eliminados por um processo fisiológico pós-traducional que ocorre na biossíntese do hTSH, envolvendo uma enzima proteolítica incomum, pois esta região não possui aminoácidos básicos que formam o sítio normal de clivagem de propeptídeos. Outra hipótese seria a ocorrência de uma clivagem proteolítica durante a purificação do hormônio. (106,119,121)

O hTSH, na sua forma heterodimérica, liga-se aos receptores das células epiteliais da tireóide tanto pela subunidade α como pela β . Na subunidade α foram identificadas duas regiões importantes para esta interação: Leu²⁶-Thr⁴⁶ e Ala⁸¹-Ser⁹² (75). Por outro lado, na subunidade β foram relatadas quatro destas: a região amino terminal (Phe¹-Glu¹⁵), a região entre Val⁷¹-Cys⁸⁵, a região entre Cys³¹-Cys⁵², que corresponde ao *loop* intercisteína e a porção carboxi-terminal (Cys¹⁰⁵-Tyr¹¹²), que é a mais relevante (76). Portanto, esta interação polivalente depende de vários sítios de ligação (27).

1.2. Obtenção e aplicação do hTSH

A extração de hTSH a partir de hipófises humanas apresenta sérias desvantagens, pois este hormônio está presente na hipófise em quantidades mínimas (<150 μ g) (108), juntamente com outros hormônios glicoproteicos (hLH e hFSH), cujas características físico-químicas extremamente similares dificultam o processo de purificação, conseqüentemente levando a metodologias trabalhosas e com rendimentos muito baixos (113). Além disso, existem graves dificuldades de ordem ético-social na

obtenção e utilização destas glândulas derivadas de autópsia, principalmente devido a casos de óbito ocorridos pela doença de Creutzfeldt-Jakob, uma encefalopatia fatal possivelmente transmitida por prion (39) após administração de preparações de hormônio de crescimento hipofisário, além do perigo de transmissão de vírus, como o vírus da AIDS e da hepatite, ou de outros agentes infecciosos e do potencial alergênico de eventuais contaminantes hipofisários.

Assim, o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante foi um fator fundamental para a produção de proteínas com potencial diagnóstico e terapêutico, como é o caso dos hormônios hipofisários (22,66), visto que:

- o produto é obtido em células hospedeiras geneticamente modificadas, onde não existem outros hormônios humanos de estrutura similar;
- o rendimento é maior em comparação com a extração hipofisária;
- a fonte é praticamente ilimitada, proporcionando uma continuidade e reprodutibilidade do produto obtido;
- as células eucariotas (preferivelmente de mamíferos) que são utilizadas na produção de hormônios glicoproteicos, por serem providas de mecanismos de glicosilação, não estão sujeitas a graves restrições de utilização e o perigo de contaminação é praticamente inexistente.

As estruturas dos oligossacarídeos presentes nas cadeias das glicoproteínas, isoladas de fontes naturais ou produzidas em sistemas heterólogos por técnicas de DNA recombinante, são heterogêneas, variando de acordo com a espécie, tecido de origem, condições fisio-patológicas *in vivo* (32,84,85) ou condições de crescimento das células *in vitro* (97). Esta microheterogeneidade implica no fato de que a maioria das glicoproteínas, incluindo o hTSH, são produzidas e secretadas não como uma estrutura molecular simples, mas como um conjunto de variantes de glicosilação denominadas isoformas. Segundo Szkudilinski e cols. (103), o hTSH recombinante produzido em células de ovário de hamster chinês (CHO) é composto de uma mistura de 5 isoformas de ponto isoelétrico variando entre 7,1-5,5, enquanto 6 isoformas de ponto isoelétrico variando entre 6,5-4,0 são encontradas no hTSH hipofisário. Além disso, as cadeias dos oligossacarídeos das isoformas do hTSH recombinante possuem predominantemente terminações em galactose-ácido siálico, enquanto as do hTSH

hipofisário podem terminar em N-acetil-galactosamina-sulfato ou galactose-ácido siálico. As formas mais básicas (menos sialiladas) do hTSH recombinante demonstram maior afinidade ao receptor e maior atividade *in vitro*, enquanto as formas mais ácidas, portanto mais sialiladas, mostram maior atividade *in vivo*. Os diferentes níveis de atividade biológica *in vitro* e *in vivo* do hTSH, devidos às diferentes terminações das cadeias oligossacarídicas, foram também observados por outros autores (109,110,112). De maneira geral, a glicosilação pode alterar a solubilidade, resistência à proteólise, resistência à inativação térmica, estruturas terciária e quaternária, atividade intrínseca, afinidade ao receptor, antigenicidade e meia-vida biológica da proteína em questão (65,112).

A importância dos carboidratos para a síntese e associação das subunidades, secreção, estabilidade e atividade biológica do hTSH já foi documentada na literatura (103). Porém, o exato significado dessas estruturas específicas na diversidade funcional das glicoproteínas ainda não é completamente compreendido. Sabe-se, por exemplo, que os oligossacarídeos, principalmente os presentes na subunidade α , são particularmente importantes na ação do TSH durante a transdução de sinal pós-receptor (110) e, mais recentemente, foi verificado que isoformas de hTSH ativam seletivamente os mecanismos intracelulares de transdução de sinal (98). Experimentos com utilização de mutação sítio-dirigida demonstraram também que a glicosilação da subunidade β hTSH é essencial para sua estabilidade e secreção (63).

Como já mencionado anteriormente, o hTSH recombinante produzido em células de mamíferos e especificamente em células de ovário de hamster chinês (CHO), apresenta uma composição de carboidratos diferente quando comparada a do hTSH extraído da hipófise. Porém, a estrutura molecular de glicoproteínas recombinantes secretadas diretamente por células CHO tem sido considerada por alguns autores como sendo aquela mais similar à estrutura da proteína humana nativa em circulação (45) ou isolada da urina (24), em comparação à proteína intra-hipofisária.

A presença de diferentes cadeias de oligossacarídeos é crítica nas aplicações clínicas, principalmente com relação à resposta antigênica que pode

secundariamente se direcionar contra a molécula nativa (81), além da variabilidade de eficácia terapêutica *in vivo* (80). A demonstração da ausência de imunogenicidade relativa à administração crônica de eritropoetina derivada de CHO (24) foi por exemplo um fator importante a favor da utilização dessas células.

As células CHO apresentam uma série de vantagens que as tornaram a linhagem de primeira escolha na síntese de glicoproteínas para aplicações terapêuticas humanas (24,46,99,125). Além das glicoproteínas secretadas apresentarem uma comprovada similaridade entre o produto natural humano e o biossintético (6,44,45,58,99,107,116), os níveis de expressão atingidos podem ser extremamente altos, frequentemente acima de 10 e até 110 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia (19,43,54,64,73,81,82,122). Essas células também possuem a vantagem de se adaptarem bem à ausência de soro e podem crescer tanto aderidas como em suspensão (20,50), o que facilita os processos de produção e purificação.

O hTSH possui amplas aplicações diagnósticas e terapêuticas. Quanto ao campo diagnóstico *in vitro*, o advento de imunoensaios de hTSH ultrasensíveis possibilitou o seu uso como um teste primário da função tireoideana (36,83,90), sendo sua determinação de fundamental importância no programa de "screening" do hipotireoidismo neonatal (93). A capacidade do hTSH aumentar *in vivo* a captação e organificação do iodo pelas células epiteliais tireoideanas tem sido utilizada no diagnóstico e tratamento do carcinoma tireoideano, administrando-se ^{131}I em pacientes com tecidos tireoideanos residuais ou metastáticos após a remoção cirúrgica da tireóide (72). Portanto, é necessário manter níveis elevados de TSH na circulação de pacientes tireoidectomizados para que as células residuais ou metastáticas do carcinoma tireoideano sejam capazes de captar ^{131}I , permitindo assim um diagnóstico por imagem cintilográfica, ou ainda, quando são administrados níveis suficientemente altos de radioisótopo, uma terapia via destruição do tecido (95).

O método padrão utilizado para manter níveis elevados de TSH na circulação é a interrupção da terapia com hormônios tireoideanos por 2 semanas (no caso da administração de T_3) ou por 4-6 semanas (levo- T_4), terapia esta empregada para

possibilitar a manutenção de um estado normal (eutireoideo) nos indivíduos tireoidectomizados. A principal desvantagem desta estratégia é a morbidade significativa decorrente do estado de hipotireoidismo causado por esta remoção (61).

A segunda estratégia mais utilizada é a administração de TSH exógeno, que também aumenta a captação de iodo, porém eliminando os efeitos indesejáveis do hipotireoidismo. Inicialmente, aproximadamente 50 anos atrás, o TSH bovino (bTSH) foi a fonte de TSH utilizada para esta finalidade clínica. Foram porém verificadas reações adversas de origem imunológica, incluindo alergias, desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e até mesmo casos de choque anafilático, fatos estes que desmotivaram a continuidade da administração deste produto (9,94). A utilização do hTSH obtido a partir de hipófises humanas foi iniciada a aproximadamente 25 anos atrás, sendo interrompida após os graves problemas de contaminação citados anteriormente.

Dessa maneira, o hTSH recombinante, um substituto seguro e efetivo, surge como um produto bastante promissor no campo diagnóstico e terapêutico do carcinoma tireoideano, embora ainda necessitando-se de uma melhor padronização dos protocolos para uso diagnóstico (61). A utilização deste produto recombinante foi recentemente liberada pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos, onde a incidência de carcinoma tireoideano é de 14000 pessoas por ano (60). No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Biologia e Medicina Nuclear, há uma estimativa de quatro em cada cem mil habitantes desenvolverem câncer na glândula tireóide, sendo que 98% dessa população pode ter indicação para tratamento com ^{131}I . Ressaltamos também a este respeito que estes pacientes necessitam de um acompanhamento diagnóstico periódico devido à lenta evolução da doença e que existe um único produto de hTSH recombinante disponível no mercado, o Thyrogen[®] produzido pela Genzyme Corporation (Cambridge, MA, EUA).

1.3. Expressão de glicoproteínas recombinantes

O nível de expressão de uma proteína heteróloga a partir de um ou mais genes introduzidos em células de mamífero depende de vários fatores, incluindo o número de cópias integradas do(s) gene(s), a eficiência de transcrição (processamento, transporte e estabilidade do RNA mensageiro) e eficiência de tradução (processamento, transporte e estabilidade da proteína). Além disso, cada gene possui um fator limitante específico de eficiência de expressão relacionado à sua própria sequência. (46)

Por outro lado, mesmo sendo conhecido que a grande maioria dos genes tem a capacidade de multiplicar suas cópias quando os organismos que os contêm são submetidos a pressões seletivas, em muitos casos não existe um método direto de seleção e amplificação para um determinado gene do qual se pretende obter um alto nível de expressão da proteína correspondente. Uma alternativa utilizada é cotransfectar as células de mamífero juntando ao gene de interesse um gene facilmente selecionável e amplificável para que ocorra a coamplificação do gene da proteína heteróloga de interesse.

Entre estes genes utilizados como marcadores de seleção e amplificação, o gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR) é um dos mais utilizados, sendo que esta enzima cataliza a conversão do ácido fólico a tetraidrofolato, o qual está envolvido na biossíntese das purinas e pirimidinas. Na presença de metotrexato (MTX), um análogo do ácido fólico que se liga e inibe a DHFR, as células sobreviventes possuem níveis elevados desta enzima em consequência de um processo de amplificação gênica. A maioria dos genes marcadores de seleção e amplificação baseiam-se em mecanismos de resistência a drogas citotóxicas (por exemplo, os genes da neomicina fosfotransferase e adenosina deaminase) ou de inibição de enzimas envolvidas em processos essenciais de biossíntese celular, como os genes da glutamina sintetase, asparagina sintetase, ornitina decarboxilase e da própria DHFR (50).

Assim, a expressão de glicoproteínas recombinantes têm sido realizada mediante uma enorme variedade de construções que utilizam vetores plasmídicos ou

virais, transfecções transientes ou estáveis, diferentes linhagens de células de mamíferos e diversos marcadores gênicos (46). Além disso, esta heterogeneidade de construções resultou numa grande variação dos rendimentos de expressão, os quais algumas vezes não foram, ou foram apenas aproximadamente, quantificados.

Entre as glicoproteínas hormonais recombinantes reportadas na literatura com obtenção de altos níveis de expressão, quando utilizados marcadores gênicos amplificáveis, encontra-se o hormônio luteotrófico bovino (bLH). Kaetzel e cols. (42,43) reportaram um nível de secreção da ordem de 20 μ g bLH/10⁶ células/dia em uma linhagem de células CHO deficientes no gene da diidrofolato redutase (DHFR⁻), utilizando-se dois vetores, sendo que um deles, com o gene da DHFR ligado ao gene da subunidade α , podia permitir a amplificação gênica induzida por metotrexato (MTX).

Por sua vez, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi obtida pela transfecção de células de macaco CV-1 com um único vetor contendo as duas subunidades (89) ou pela co-infecção das mesmas células com dois vetores, cada um codificando para uma subunidade (7), sendo este hormônio também expresso em células CHO selvagens mediante transfecção de um plasmídeo híbrido que codifica as duas subunidades, cada uma sob o controle de seu próprio promotor (70). Porém, nestes trabalhos os respectivos rendimentos de expressão não foram reportados.

O hTSH recombinante foi obtido através da co-transfecção de células CHO DHFR⁻ com dois plasmídeos, um dos quais contendo o gene da DHFR ligado ao gene da subunidade α (118) e foi também expresso transitoriamente em células de rim humano 293 ou rim de macaco COS, cotransfectando-se estas células com dois vetores idênticos, cada um contendo uma subunidade (121). Tireotrofina e foliculotrofina humanas (hFSH) foram também expressas em células CHO selvagens empregando um único tipo de vetor para codificar cada subunidade, similarmente àquela já utilizada para o hCG (52,70). O hFSH foi também expresso posteriormente como uma proteína quimérica, na qual a subunidade β foi fundida ao peptídeo C-terminal da subunidade β hCG visando aumentar a meia-vida circulatória deste hormônio (16). Este mesmo aumento de bioatividade *in vivo* foi verificado quando o mesmo peptídeo C-terminal do β hCG foi fundido à subunidade β hTSH (41). Todos os análogos de hTSH, incluindo a junção dos genes das subunidades α e β hTSH para

expressão de uma cadeia única com atividade biológica (17), foram construídos com a principal finalidade de estudar a relação estrutura-função, para possível desenvolvimento de agonistas ou antagonistas deste hormônio. Porém, o objetivo principal destes trabalhos não foi a obtenção de altos rendimentos proteicos. Por outro lado, Hussain e cols. (38) relataram a expressão de níveis da ordem de $100.000\mu\text{U hTSH/mL}$ que equivaleriam a aproximadamente $10\mu\text{g/mL}$ (considerando que $10\text{UI hTSH} = 1\text{mg}$), quando foi realizada uma coamplificação gênica induzida por MTX e utilizado um sistema de cultura celular em biorreator do tipo "hollow-fiber", em escala laboratorial. Além destes autores, a obtenção de altos níveis de expressão com finalidade de produção e utilização terapêutica foi apenas descrita por Cole e cols. (9), que também utilizaram um mecanismo de coamplificação gênica induzida por MTX, com rendimentos ao redor de $4,5\mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia em placas ou de $15\text{-}30\mu\text{g hTSH/mL}$ /dia em biorreator de 160L do tipo "microcarriers" para a produção do hTSH recombinante (Thyrogen®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA).

Outras glicoproteínas recombinantes também têm sido obtidas com altas taxas de expressão, quando utilizados marcadores gênicos amplificáveis. O interferon- γ (IFN- γ) foi produzido em células CHO, com composição e estrutura análogas àquela da preparação natural obtida a partir de células sanguíneas humanas, a um nível de secreção de $1,5\text{-}2,0 \times 10^6 \text{ U}/10^6$ células/dia (77). Se considerarmos uma atividade de $2 \times 10^8 \text{ U/mg}$ do produto purificado, podemos calcular uma taxa de secreção acima de $10\mu\text{g IFN-}\gamma/10^6$ células/dia. A amplificação gênica, mediada por um mutante da DHFR em dois vetores de expressão para os genes das cadeias leve (L) e pesada (H) de imunoglobulina, proporcionou um rendimento aproximado de $25\mu\text{g Ig}/10^6$ células/dia, quando foram transfectadas células de mieloma humano (12). Por outro lado, quando os genes das cadeias L e H foram ligados a dois diferentes marcadores gênicos, DHFR e ADA (adenosina deaminase), foi obtida uma amplificação independente em diferentes células CHO transfectadas que, após a fusão, produziram $60\mu\text{g Ig}/10^6$ células/48h (122), ou até $80\text{-}110\mu\text{g}/10^6$ células / dia para um outro anticorpo monoclonal obtido de maneira similar (19). Mais recentemente, Kim e cols. (54) relataram uma taxa de expressão de $20\mu\text{g Ig}/10^6$ células/dia, obtida mediante amplificação gênica induzida

por MTX, além da estabilidade obtida na ausência da pressão seletiva. Foi também construído um sistema de expressão contendo um elemento ativador de transcrição induzido por glicocorticóides, visando a síntese de t-PA (fator ativador do plasminogênio tecidual) ou de CSF-1 (fator estimulador da formação de colônias) juntamente com DHFR numa transcrição única dicistrônica, resultando na expressão de 1289U t-PA/mL ou de 15 μ g CSF-1/mL (40). O mesmo t-PA humano foi obtido com um nível de expressão de 20 μ g/10⁶ células/dia em linhagem de células de rato C127 e de 10 μ g/10⁶ células/dia em células CHO (81), sendo que, igualmente a todos os casos previamente descritos, foi novamente empregado um vetor com o gene da DHFR para a expressão de altos níveis de t-PA.

Em conclusão, a utilização de marcadores gênicos altamente amplificáveis parece um importante pré-requisito para a obtenção de linhagens de células eucariotas estáveis com alta capacidade de expressão e, no caso particular da formação de um heterodímero, a utilização de dois marcadores independentes parece ser recomendada.

1.4.Utilização de vetores dicistrônicos

A utilização de vetores dicistrônicos para expressão de genes heterólogos em células de mamíferos foi inicialmente descrita por Kaufman e cols. (48), onde a explicação do mecanismo pelo qual os ribossomos reconhecem sítios de iniciação de tradução no RNA mensageiro (RNAm) em eucariotos é baseada num modelo de varredura ("scanning model"). De acordo com este modelo, a subunidade 40S do ribossomo liga-se à extremidade 5' do RNAm e migra em direção à extremidade 3' até encontrar o primeiro códon de iniciação (AUG), o qual, quando presente num contexto apropriado, resulta no início da tradução. Além disso, em outros estudos citados foi

verificada a possibilidade de haver um reinício de tradução a partir de códons de iniciação internos em RNAs mensageiros policistrônicos.

Os vetores dicistrônicos descritos inicialmente por estes autores basearam-se numa construção na qual o marcador de amplificação (por exemplo, DHFR) encontrava-se na extremidade 3' da unidade de transcrição, a qual também possui o gene da proteína de interesse posicionado na extremidade 5'. Neste tipo de sistema, a eficiência de tradução do marcador de amplificação, vinculada ao reconhecimento de um códon de iniciação interno, estava reduzida de 30-400 vezes em relação a um vetor convencional contendo unicamente o gene do marcador. Por outro lado, foi também mencionado que as possibilidades de deleção do gene de interesse (no caso, um fator de formação de colônias de macrófagos e granulócitos, GM-CSF) poderiam ser reduzidas com a utilização de vetores dicistrônicos. Além disso, o processo de seleção e amplificação com metotrexato proporcionou a obtenção de clones contendo a unidade de transcrição GM-CSF – DHFR em altos níveis, com consequente expressão de aproximadamente 10 vezes mais proteína com relação à utilização de vetores convencionais, onde as unidades de transcrição do gene de interesse e do marcador encontram-se separadas.

A seguir, o mesmo grupo de Kaufman e cols. (47) desenvolveu uma nova geração de vetores dicistrônicos introduzindo entre o gene de interesse e o marcador de amplificação (DHFR ou ADA) uma sequência líder de DNA não traduzida isolada do vírus da encefalomiocardite (EMC), que funcionaria como um sítio interno de início da tradução ("internal ribosomal entry site" - IRES). Foi demonstrado que, graças a esta modificação, os vetores construídos foram ainda menos sujeitos a deleções ou rearranjos de DNA, sendo portanto úteis para uma obtenção mais rápida de clones com altos níveis de expressão estável de genes heterólogos em células eucariotas.

Outros autores (123) também utilizaram vetores dicistrônicos contendo a sequência EMC introduzida entre o gene da cadeia pesada de uma imunoglobulina e o gene da neomicina fosfotransferase (marcador de seleção), com obtenção de altos níveis de expressão ($\sim 28 \mu\text{g}/10^6$ células/dia).

Fouser e cols. (19), a partir da utilização de um vetor dicistrônico contendo os genes da cadeia leve de um anticorpo monoclonal e o da DHFR, obtiveram clones

capazes de secretar de 80-110 μ g do anticorpo monoclonal/10⁶ células/dia, um dos níveis de secreção mais altos já descritos na literatura.

Um outro tipo de vetor dicistrônico baseado em um mecanismo de "splicing" alternativo de RNA forneceu expressões das proteínas de interesse de 11-13 vezes superiores àquelas obtidas quando foram utilizados vetores convencionais (67).

Finalmente, Pu e cols. (88) realizaram um estudo comparativo utilizando construções com o gene da subunidade α do receptor solúvel de interleucina-4 (sIL-4R α) unido ao marcador de amplificação glutamina sintetase. Foram testados um vetor tradicional (expressão dos cDNAs de interesse e do marcador a partir de unidades diferentes de transcrição), um vetor dicistrônico baseado em "splicing" alternativo de RNA e uma construção dicistrônica contendo o sítio EMC já mencionado acima. A utilização deste último sistema resultou numa expressão de ~5 μ g de sIL-4R α /10⁶ células/dia, um rendimento bem superior ao obtido com os outros tipos de vetores empregados.

1.5. Objetivos do trabalho

De acordo com as considerações acima, a principal meta do presente trabalho é a obtenção de níveis elevados de hTSH recombinante em células CHO com a utilização de dois vetores dicistrônicos (pEDdc e pEAdc) que contêm os marcadores gênicos DHFR e ADA, altamente amplificáveis, sendo que cada um será ligado ao gene da subunidade α ou β . Como já mencionado, estes plasmídeos pertencem a uma nova geração de vetores onde um sítio interno de ligação ao ribossomo, isolado do vírus da encefalomiocardite (EMC), foi adicionado para promover uma tradução eficiente do marcador de amplificação no mRNA dicistrônico (47). Consequentemente, devem-se obter altas frequências de transformações e, num curto período de tempo, linhagens celulares estáveis que expressem altos níveis da proteína heteróloga de interesse. No momento de optar pela utilização destes vetores um dos nossos objetivos

foi a possível obtenção de níveis de secreção de hTSH mais elevados que os já descritos na literatura.

A utilização de vetores dicistrônicos baseia-se no fato de que estes sistemas de expressão têm se mostrado superiores quando comparados a vetores convencionais, tanto em níveis de expressão como em termos de eficiência de amplificação, além de apresentar uma produtividade estável da proteína de interesse, mesmo sem a presença do agente de seleção, como já citado anteriormente. Este último aspecto apresenta a vantagem de redução de custo de utilização do agente de seleção em escalas maiores de produção e eliminação da necessidade de remover este agente nos processos de purificação para aplicações terapêuticas.

Ressaltamos ainda que, até o presente momento, este sistema não foi empregado para a obtenção de uma glicoproteína hormonal heterodimérica. Além disso, o mesmo vetor pEDdc demonstrou ser bastante eficiente quando foi utilizado em nosso laboratório para a expressão de prolactina humana recombinante em células CHO, com obtenção de taxas de expressão de até $30\mu\text{g hPrI}/10^6$ células/dia.

Assim, a utilização desta via para a expressão do hTSH recombinante em escala laboratorial, visa principalmente a obtenção de um produto para aplicação no campo diagnóstico e terapêutico de carcinomas tireoideanos. Para esta finalidade será também utilizado um biorreator do tipo "hollow-fiber", que já está em funcionamento no laboratório. Considerando que além do tipo de célula hospedeira também as condições de seleção, cultura e biorreação podem influenciar a estrutura glicídica da proteína obtida (24), achamos interessante se propor como meta a avaliação das propriedades imunológicas e biológicas *in vivo* do produto obtido, em comparação ao hTSH de origem hipofisária e ao único produto recombinante disponível internacionalmente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Equipamentos e acessórios principais

- agitador rotatório de tubos ("rotator"), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region ImmunoAssay unit, Londres, Inglaterra;
- aparelho Accu-Check III para dosagem de glicose, BOERINGHER, Mannheim, Alemanha;
- aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, SHIMADZU, MD, EUA, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV e a um programa de computador *Class VP*;
- aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, MILLIPORE, Bedford, MA, EUA;
- biorreator tipo "hollow-fiber", modelo *Cellmax-Quad*, SPECTRUM, Laguna Hills, CA, EUA;
- centrífuga refrigerada automática, modelo *Super Speed RC-2B*, SORVALL, Newtown, Connecticut, EUA;
- coluna de exclusão molecular TSK G2000 SW (60cm x 7,5mm), tamanho de partículas 10 μ M e poros de 125Å, TOSHAAS, Montgomeryville, PA, EUA;
- contador gama tipo "poço", modelo *Cobra auto-gamma*, com troca automática de amostra, cuja eficiência aproximada para ¹²⁵I é de 80%, PACKARD INSTRUMENT COMPANY, Illinois, EUA;
- filmes de raios-X *Kodak X-OMAT* (KODAK, St. Louis, MO, EUA) para autoradiografias dos géis de sequenciamento;
- fluxo laminar classe II A/B3, modelo *1140*, FORMA SCIENTIFIC, Marietta, Ohio, EUA;
- eletroporador, modelo II, INVITROGEN, San Diego, CA, EUA;
- espectrofotômetro, modelo PMQ II, CARL ZEISS, Oberkochen, Alemanha;
- estufa de cultura de células, modelo 3159, FORMA SCIENTIFIC, Marietta, Ohio, EUA;

- material plástico estéril para cultura celular, CORNING COSTAR CORP., Cambridge, MA, EUA, e NALGENE COMPANY, Rochester, NY, EUA;
- membranas de filtração de 0,22µm, MILLIPORE, Bedford, MA, EUA;
- microscópio invertido, modelo ID 03, CARL ZEISS, Oberkochen, Alemanha;
- pré-coluna SW (7,5cm x 7,5mm), TOSOHAAS, Montgomeryville, PA, EUA;
- termocicladores para realização da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction): *Techne Cyclogene* (TECHNE, Duxford, Cambridge, Reino Unido), o qual foi gentilmente emprestado pela Dra. Edna Teruko Kimura (Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo), e *Gene Amp PCR System 2400* (PERKIN-ELMER, Norwalk, Connecticut, EUA);
- tubos de poliestireno para imunoensaio (7,5 x 1,2cm), EMTEL, São Paulo.

2.1.2. Nucleotídeos marcados

- o nucleotídeo $\gamma^{32}\text{P}$ dATP utilizado para marcação de DNA em procedimentos de hibridização e o $\alpha^{35}\text{S}$ dATP utilizado nas reações de sequenciamento foram adquiridos da AMERSHAM INTERNATIONAL, Aylesbury, Buckinghamshire, Inglaterra.

2.1.3. Oligonucleotídeos

- os oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de hibridização, PCR e sequenciamento foram sintetizados pela GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.

2.1.4. Cepas de *E.coli*

- DH5 α : supE 44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1;
- HB2151: K12 ara Δ lac-pro thi F'(proAB lacI^qZ Δ M15);
- RRI (pRK248clts): supE44 hsdS20($r_B^-m_B^-$) ara14 oriA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1.

2.1.5. Vetores plasmídicos

- plasmídeos pEDdc e pEAdc, gentilmente fornecidos pelo Dr. C. R. Wood (GENETICS INSTITUTE, Cambridge, MA, EUA), que possuem os marcadores gênicos DHFR (diidrofolato redutase) e ADA (adenosina deaminase) respectivamente. Todos os

elementos constitutivos destes plasmídeos, além de seu desempenho na expressão de proteínas, foram descritos por Kaufman e cols. (47). Uma sequência líder não traduzida isolada do vírus da encelalomiocardite (EMC), que funciona como sítio interno de ligação ao ribossomo, foi adicionada para promover uma tradução eficiente do marcador amplificável (no caso, DHFR ou ADA) no mRNA dicistrônico. Uma outra vantagem da utilização destes vetores é que o mecanismo de tradução do heterodímero deve ser estimulado, pois os mesmos possuem o gene de adenovírus VAI RNA que codifica uma RNA polimerase do tipo III, capaz de ativar o fator 2 de iniciação da síntese proteica em células eucariotas (121);

- plasmídeo pMOSBLUE (*pMOSBlue T-vector Kit*) da AMERSHAM INTERNATIONAL (Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), que foi utilizado na clonagem do gene da subunidade β hTSH seguindo o protocolo do fabricante. É um plasmídeo desenvolvido especialmente para possibilitar a inserção de produtos de amplificação por PCR que, devido a uma atividade não específica das polimerases, contêm um nucleotídeo de adenosina (A) nas extremidades 3' do DNA dupla fita. Estes produtos podem então ser inseridos num sítio de um vetor cujas extremidades possuem um nucleotídeo de timidina (T), como é o caso deste sistema comercial;

- plasmídeo pBluescript KS⁻ da STRATAGENE (La Jolla, CA, EUA), que foi utilizado no processo de obtenção do vetor de expressão da subunidade β hTSH (pEAdc- β hTSH);

- plasmídeo pRSVneo da CLONTECH (Palo Alto, CA, EUA), que possui o gene da enzima neomicina fosfotransferase, e foi utilizado por propiciar uma seleção inicial das células transformadas mediante a utilização de geneticina (G418).

2.1.6. Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Molecular

- agarose, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;

- ampicilina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;

- ágar-ágar purificado para bacteriologia, MERCK, São Paulo;

- bacto-triptona, DIFCO, São Paulo;

- clorofórmio p.a., MERCK, São Paulo;

- enzimas de restrição e de modificação da GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA), da PHARMACIA (Uppsala, Suécia) ou da NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly, MA, EUA);

- extrato de levedura para microbiologia, DIFCO, São Paulo;
- fenol p.a., MERCK, São Paulo;
- membrana de troca iônica, DEAE-celulose (NA-45, Schleicher & Schuell, EUA);
- sistema de purificação de DNA em gel de agarose *SephaglasTM Band Prep*, PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- sistema de marcação de DNA com $\gamma^{32}\text{P}$ dATP *Random Primers DNA*, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- sistema *Wizard Minipreps DNA* da PROMEGA (Madison, WI, EUA) para extração de DNA em pequena escala e *Qiagen Plasmid Maxi Kit* da QIAGEN (Hilden, Alemanha) para extração em larga escala;
- sistema *SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing Kit* utilizado nas reações de sequenciamento de DNA, AMERSHAM LIFE SCIENCE INC. (Arlington Heights, IL, EUA).

2.1.7. Linhagens celulares

- células CHO (linhagem celular de ovário de hamster chinês) selvagens (CHO-K1), ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA;
- células CHO mutantes DXB-11 (114) ou DG-44 (115) foram gentilmente fornecidas pelo Dr. L. Chasin (Columbia University, NY, EUA) e são deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR) que está presente no vetor pEDdc, proporcionando assim um mecanismo de seleção e amplificação gênica das células transformadas;
- células COS-7 (linhagem celular de rim de macaco verde africano, transformada com SV 40 defectivo na origem de replicação) foram cedidas pela Dra. B. Miloux (Sanofi Biorecherche, Labège, França).

2.1.8. Reagentes principais utilizados em procedimentos de Cultura Celular

- anfotericina B, *Fungizone[®]*, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- bicarbonato de sódio, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- cloreto de cálcio, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- cloroquina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;

- DEAE-dextran, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- deoxicoformicina (dCF), fornecida pelo National Cancer Institute, Drug Synthesis and Chemistry Branch, Division of Cancer Treatment (Bethesda, MD, EUA);
- dimetilssulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo;
- fitas Haemo-Glukotest, BOERINGHER, Mannheim, Alemanha;
- geneticina (G418), *Geneticin*[®], GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- gentamicina, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- glicose p.a., MERCK, São Paulo;
- HEPES, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- lipofectamina, *Lipofectamine*[™], GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- penicilina-estreptomicina, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- meio CHO-S-SFM II, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos (α MEM), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- meio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- meio *Opti-MEM*[®], GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- metotrexato (MTX), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- soro fetal bovino (SFB), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- soro fetal bovino dialisado (SFBd), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- tripsina, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- *Trypan Blue* 0,4% (corante vital), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.

2.1.9. Preparações padrão, antissoros e outros reagentes para imunoenaios ou ensaio de bioatividade *in vivo*

- anticorpo monoclonal (mAB) anti-hTSH (lote TSH 05840001) utilizado para radiodação (anticorpo de detecção), adquirido da SERONO DIAGNOSTIC, Woking, Surrey, Reino Unido;
- anticorpo policlonal anti-hTSH acoplado a celulose (anticorpo de captura; fase sólida lote 073), adquirido do NETRIA, North East Thames Region ImmunoAssay unit, Londres, Inglaterra;

- controles de qualidade para imunoensaio baseados em sangue humano (Dade Tri-level), BAXTER DIAGNOSTIC, Deerfield, IL, EUA;
- heparina sódica, *Liquemine*[®], ROCHE, Rio de Janeiro;
- 2º padrão internacional de hTSH hipofisário (2nd IRP) para imunoensaio (WHO 80/558), com atividade específica de 4,93 UI/mg, gentilmente cedido pelo NIBSC, National Institute for Biological Standards and Controls, Londres, Inglaterra;
- padrão secundário de hTSH hipofisário (RP-1), com atividade específica de 1,5 UI/mg, gentilmente cedido pelo NIDDK, National Hormone and Pituitary Program, Rockville, MD, EUA;
- preparação de referência obtida a partir do hTSH recombinante da Genzyme (*Thyrogen*TM, lote M-17073) fornecido pela MEDIX BIOTECH INC. (Foster City, CA, EUA), e calibrado por Ribela e cols. (90), com atividade específica de 7,7 UI/mg determinada por ensaio imunoradiométrico (IRMA);
- preparação da subunidade α hTSH (AFP-3290-B #2) e antissoro anti- α hTSH #1, gentilmente cedidos pelo NIDDK, National Hormone and Pituitary Program, Rockville, MD, EUA;
- preparação de hTSH hipofisário altamente purificada (NIDDK-hTSH-I 8, AFP-3959A) utilizada no ensaio de bioatividade *in vivo*, gentilmente cedido pelo NIDDK, National Hormone and Pituitary Program, Rockville, MD, EUA;
- sal de sódio de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T₃), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro, IPEN-CNEN/SP, São Paulo;
- sistema de radioimunoensaio para dosagem de tiroxina total (T₄ total), *RIA Coat-A-Count*[®] Total T₄, DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION (DPC, Los Angeles, CA, EUA);
- soro de coelho normal, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

2.1.10. Animais utilizados no bioensaio

- camundongos machos da linhagem isogênica Balb-c, com peso variando entre 22-30g, gentilmente doados pelo Instituto Butantã ou pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.1.11. Outros reagentes

- ácido etilenodiaminotetraacético (sal dissódico) (EDTA), CARLO ERBA, São Paulo;
- albumina de soro bovino (BSA), *RIA grade* (fração V), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- azida sódica, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- azul dextran 2000, PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- cloramina-T p.a., MERCK, São Paulo;
- cloreto de sódio p.a., MERCK, São Paulo;
- fosfato de sódio monobásico p.a., MERCK, São Paulo;
- fosfato de sódio bibásico p.a., MERCK, São Paulo;
- iodeto de potássio p.a., MERCK, São Paulo;
- metabissulfito de sódio r.p., CARLO ERBA, São Paulo;
- Na¹²⁵I comercial, livre de carreadores e oxidantes, fornecido pela NORDION EUROPE S.A. (Fleurus, Bélgica), com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL);
- resinas cromatográficas G-100 e G-150, PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- Tween-20, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Obtenção dos genes das subunidades α e β hTSH

Os genes das subunidades α e β hTSH foram obtidos a partir da mesma genoteca de cDNA hipofisário, da qual foram selecionados os cDNAs de hGH e hPrL (2). O DNA complementar (cDNA) ao RNA mensageiro foi preparado pelo método de Okayama (78), utilizando-se o sistema e protocolo de síntese de cDNA da AMERSHAM, a partir de RNA poli-A⁺ purificado de material hipofisário humano. A genoteca de cDNA foi construída (1) utilizando-se um sistema da AMERSHAM para clonagem de cDNA em fago λ gt10, de acordo com o método de Hohn (37).

O gene da subunidade α hTSH foi isolado pela técnica de hidridização a partir da seleção de clones de fago λ gt10 (4). A sonda radioativa utilizada foi um oligonucleotídeo de sequência: 5' AGT ATC CGC CCT GAA CAC AT 3' (20 mero), o qual foi marcado com γ ³²P dATP.

Para o isolamento do gene da subunidade β hTSH pela técnica de hidridização foi primeiramente utilizada como sonda um oligonucleotídeo de sequência: 5' CTC ACC AAT GCA AAG TAA G 3' (19 mero), ou o cDNA de β TSH de rato (gentilmente cedido pelo Dr. Antonio Carlos Bianco, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo), ambos marcados com γ ³²P dATP.

O isolamento do gene da subunidade β hTSH pela técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR)(21) foi realizado num volume final de reação de 50 μ L, onde foram utilizados: 70 ng de cDNA hipofisário humano, uma concentração final de 0,2-0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, de 200 μ M de cada dNTP e de 1,5 mM de MgCl₂, e 1/10 do volume do tampão específico para a enzima Taq polimerase. A mistura de reação foi aquecida a 94°C por 3 min., foram adicionadas 1,5 U da enzima Taq polimerase e realizados 35 ciclos de amplificação, cada um dos quais formado pelas

etapas de denaturação (1 min. a 94°C), anelamento dos oligonucleotídeos (1 min. a 48°C) e extensão dos fragmentos (1 min. a 72°C). Os oligonucleotídeos utilizados possuem as seguintes sequências:

- oligonucleotídeo A: 5' CTC ACC AAT GCA AAG TAA G 3' (19 mero)
- oligonucleotídeo B: 5' TCA GGC ACG CAC ATT TAA 3' (18 mero)

2.2.2. Isolamento e purificação dos fragmentos de DNA

Após digestão do DNA com enzimas de restrição específicas, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose, cuja concentração foi modificada de acordo com o tamanho de DNA de interesse (68).

A purificação dos fragmentos de DNA foi realizada mediante transferência para uma membrana de troca iônica, DEAE-celulose, seguindo as instruções do fabricante ou pelo sistema *Sephaglas™ Band Prep*.

2.2.3. Amplificação e purificação dos plasmídeos

As bactérias *E. coli* cepas HB2151, DH5α ou RR1 foram transformadas com os plasmídeos de interesse pelo método do cloreto de cálcio (68) ou por eletroporação (condições: 1500 V, 25mA e 25 W). A amplificação das bactérias transformadas foi realizada em meio LB (extrato de levedura 0,5%, bacto-triptona 1% e NaCl 1%) com ampicilina (100μg/mL), a 30°C para a cepa RR1 e 37°C para as demais, sob agitação até absorvância de saturação, $A_{600nm} = 2-4$ unidades óticas (u. o.).

As preparações de plasmídeos em pequena escala foram realizadas pelo método de lise alcalina como descrito (68) ou utilizando-se o sistema comercial *Wizard*

Minipreps DNA. Para as extrações em larga escala foi também utilizado o método de lise alcalina ou o sistema que emprega colunas de afinidade *Qiagen Plasmid Maxi Kit*.

2.2.4. Sequenciamento de DNA

A sequência de nucleotídeos dos genes das subunidades α e β hTSH foi determinada, após clonagem nos respectivos vetores de expressão, denaturando-se o DNA (4 μ g do vetor pEDdc- α ou pEAdc- β hTSH) com uma solução contendo 2 μ L de NaOH 2 M - EDTA 2mM e precipitando-se com 75 μ L de etanol na presença de 2 μ L de acetato de sódio 3M pH 6,8. A seguir, foi utilizado o sistema *SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing Kit*, realizando-se uma marcação de DNA com α^{35} S dATP e terminação do alongamento da cadeia de DNA pela adição de dideoxynucleotídeos (96).

Nas reações de sequenciamento das duas subunidades foram empregados os seguintes oligonucleotídeos complementares às sequências dos vetores:

- oligonucleotídeo A: 5' CAA TGA CAT CCA CTT TGC CTT TC 3' (23 mero)
- oligonucleotídeo B: 5' ACA TAT AGA CAA ACG CAC ACC GGC CT 3' (26 mero)

A seguir, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 6% na presença de 42% de uréia. Os géis foram secos e autoradiografados em filmes de raios-X Kodak-OMAT.

2.2.5. Transformação, seleção e amplificação das células eucariotas

As células CHO (linhagens celulares de ovário de hamster chinês) foram cultivadas aderidas a placas de cultura celular a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, em meio de cultura α MEM (meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos) suplementado com 10% de SBF (soro fetal bovino), penicilina (50 UI/mL), estreptomicina (50 μ g/mL), gentamicina (20 μ g/mL). Para a subcultura as células foram

diluídas 1:10 duas vezes por semana, utilizando-se 0,1g/L de tripsina em fosfato salina/EDTA 0,2% para destacar as células.

As células COS-7 (linhagem celular de rim de macaco verde africano, transformada com SV 40 defectivo na origem de replicação) foram utilizadas nos experimentos de transfecção transiente. Estas células crescem em condições similares às das CHO, em meio de cultura D-MEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco). A subcultura (1:10) também foi realizada duas vezes por semana, utilizando-se 0,5g/L de tripsina em fosfato salina/EDTA 0,2% para destacar as células.

As transfecções estáveis realizadas com as linhagens celulares CHO seguiram as duas estratégias fundamentais descritas na literatura para expressão de proteínas heterodiméricas em sistemas heterólogos:

- transfecção sequencial: as células foram transfectadas primeiramente com um dos vetores e foram submetidas à seleção e amplificação gênica até obtenção de uma linhagem estavelmente secretora. A seguir, as células transformadas foram novamente transfectadas com o outro vetor podendo ou não haver uma segunda etapa de amplificação;
- cotransfecção: as células foram transfectadas simultaneamente com os dois vetores e a amplificação realizada com base em um ou nos dois marcadores gênicos.

2.2.5.1. Métodos de transfecção

2.2.5.1.1. Transfecção transiente pelo método do DEAE-dextran

A transfecção transiente pelo método do DEAE-dextran (101) foi realizada com as células CHO DXB-11 (DHDR) e COS-7, as quais foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (3×10^5 células/poço) no dia anterior à transfecção. Em cada poço foram utilizados: 0,9 mL de meio de cultura sem soro, 6 µg de DNA

correspondentes ao(s) vetor(es) de interesse, 0,1 mL de DEAE-dextran 10mg/mL e 1 μ L de cloroquina 100 μ M.

O meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas uma vez com tampão fosfato salina (PBS). Adicionou-se 1 mL da mistura DEAE-dextran/DNA por poço e incubou-se por 3 h (CHO) ou 4-5 h (COS) a 37°C na estufa a 5% CO₂. A seguir, adicionou-se 1 mL de dimetilssulfóxido (DMSO) 10% em PBS gelado sobre as células e incubou-se por 1 min a temperatura ambiente. Aspirou-se, lavou-se duas vezes com PBS e incubou-se por 3 dias em meio de cultura + 2% SFB. Em seguida, os meios de cada poço foram coletados para determinação da expressão proteica.

2.2.5.1.2. Transfecção estável pelo método dos lipossomas

As células CHO selvagens e DG-44 (DHDR⁻) foram transfectadas pelo método dos lipossomas (34) utilizando-se o reagente *Lipofectamine*TM. Misturaram-se 10 μ L da solução de lipossomas (2mg/mL) em 90 μ L de meio de cultura *Opti-MEM*[®] com 5-15 μ g de DNA correspondente ao(s) vetor(es) de interesse também diluídos num volume final de 100 μ L de *Opti-MEM*[®]. Esta mistura (lipossomas + DNA) foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. A seguir, o volume foi completado para 2mL com *Opti-MEM*[®] e adicionou-se sobre as células parcialmente confluentes (50-80% de confluência) e aderidas a uma placa de 6cm (3-5 x 10⁵ células/placa), de maneira a cobri-las completamente, sendo que as mesmas foram previamente lavadas com *Opti-MEM*[®]. Após incubação por 5 ou 16h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, o meio foi substituído pelo meio α MEM + 20% SFB e as células foram novamente incubadas por 24h antes do início da seleção.

2.2.5.1.3. Transfecção estável pelo método da eletroporação

A transfecção das células CHO DG44 pelo método da eletroporação foi realizada seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante do eletroporador (*Invitrogen*, San Diego, CA, EUA). Foram utilizadas $3-4 \times 10^6$ células ressuspendidas em 250 μ L de meio de cultura sem soro e 20-30 μ g de DNA de interesse. Esta mistura foi colocada na cubeta apropriada e a eletroporação realizada nas seguintes condições: 330 V, 25 mA, 25 W e 1000 μ F. A seguir, as células foram semeadas em placas de 10cm contendo meio α MEM + 10% SFB por 2-3 dias antes do início da seleção.

2.2.5.1.4. Transfecção estável pelo método do fosfato de cálcio

As células CHO DXB-11 foram semeadas em placas de cultura de 10cm (10^6 células/placa) no dia anterior à transfecção pelo método do fosfato de cálcio (25). Em cada placa foram utilizados: 2mL de tampão HEBS pH 7,05, 20-24 μ g do DNA de interesse e 100 μ L de CaCl_2 2,5M.

A reação foi realizada num tubo cônico de 15mL e a solução de CaCl_2 foi adicionada gota a gota sob borbulhamento constante de ar. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min para que houvesse a formação dos microprecipitados de fosfato de cálcio/DNA, os quais foram então distribuídos sobre as células. Após incubação por 5-6 h a 37°C na estufa de CO_2 , o meio foi aspirado e as células cresceram durante 2 dias em meio α MEM + 2% SFB antes do início da seleção.

2.2.5.2. Seleção e amplificação

A seleção dos transformantes DHFR⁺ foi realizada em meio seletivo α MEM, em ausência de nucleosídeos e suplementação com 10% de soro fetal bovino dialisado

(SFBd). As colônias positivas foram isoladas após 10-15 dias de incubação de 5×10^4 células/placa de 10 cm em meio seletivo utilizando-se cilindros de clonagem e as células foram propagadas em placas de 6 poços até atingir a confluência. As células foram transferidas respectivamente para placas de 6 e 10cm de diâmetro visando a obtenção de um número suficiente para amplificação (5×10^5 células/placa).

As células foram expostas a doses crescentes de metotrexato (MTX) ou de deoxicoformicina (dCF) para amplificação dos genes da DHFR e ADA respectivamente, baseando-se em protocolos da literatura (49,50,51,122). As concentrações desses reagentes foram determinadas experimentalmente de acordo com os níveis de proteína expressos e com a viabilidade celular.

Nas diferentes etapas de seleção e amplificação, realizou-se uma cinética de expressão de acordo com protocolo descrito (74), para que fosse possível avaliar de forma mais precisa a eficiência de expressão da subunidade α ou do hTSH em $\mu\text{g}/10^6$ células/dia. Amostras de células foram diluídas até uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL e 1 mL desta suspensão foi semeado em duplicata em placas de 24 poços. Após 24h, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas por 24h adicionais, sendo em seguida o meio coletado para dosagem proteica e as células novamente contadas para a realização do cálculo de eficiência de expressão.

Assim, em relação a cada etapa de amplificação, foram realizados dois imunoenaios: um no final do período de incubação com a concentração mais baixa (A) de MTX ou dCF utilizada após adaptação das células (aproximadamente 10 dias) e outro com a mesma cultura de células que foi mantida paralelamente por mais 10 dias com a concentração mais alta (B), como encontra-se ilustrado na Fig. 1.

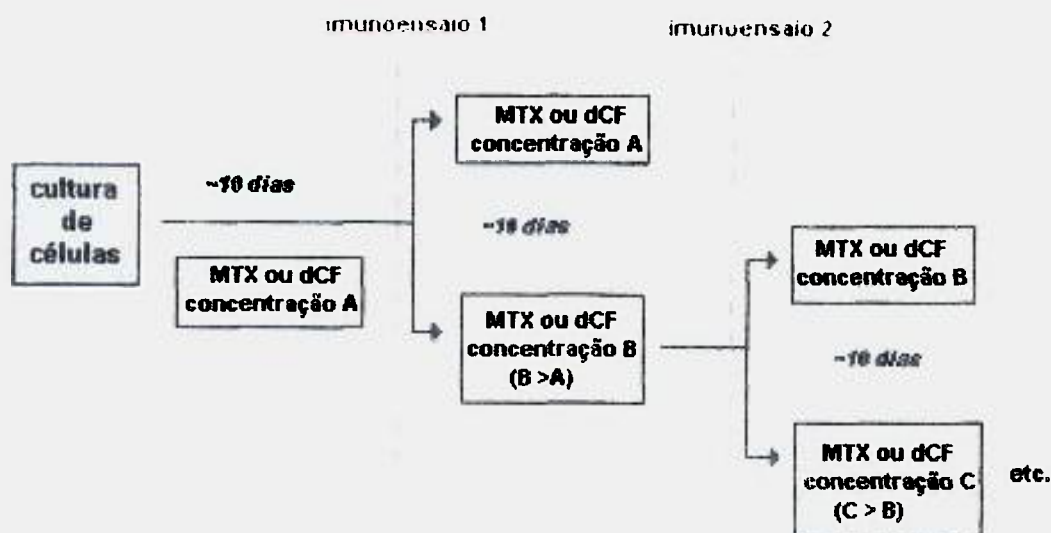


Fig. 1: Esquema das etapas de amplificação exemplificando os dois imunoensaios realizados para cada concentração de MTX ou dCF. A fase de adaptação das células a uma dose maior do reagente de amplificação foi de aproximadamente 10 dias. O primeiro ensaio foi realizado no final da etapa de amplificação com concentração mais baixa (A) do reagente e o segundo com a mesma cultura de células mantida paralelamente até o final da etapa de amplificação subsequente juntamente com uma cultura que foi exposta a uma concentração maior (B, onde $B > A$) do reagente.

2.2.6. Análise da expressão proteica

Durante a seleção e a amplificação das células CHO transformadas, os níveis de expressão da subunidade α hTSH e do hTSH heterodimérico foram acompanhados a cada etapa por meio de imunoenaios.

2.2.6.1. Radioimunoensaio (RIA) de α hTSH

A determinação dos níveis de expressão da subunidade α hTSH foi realizada por radioimunoensaio (RIA) específico padronizado em nosso laboratório, baseado na literatura (59) e na utilização de uma preparação da subunidade α hTSH, que foi utilizada para radioiodação e como padrão, e de um anticorpo anti- α hTSH.

A marcação da subunidade α hTSH com ^{125}I foi realizada pela técnica da cloramina-T modificada (3), empregando-se 29,6 a 37,0 MBq (0,8-1,0 mCi) de radioisótopo, 5 μg da proteína dissolvidos em 10 μL de tampão fosfato de sódio 0,01M pH7,4 + 0,15M NaCl (PBS), 10 μL de tampão fosfato de sódio 0,3M pH7,4 e 0,8 μg de cloramina-T em 12 μL de tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,4 (TF). A reação foi realizada a temperatura ambiente por 5 min, e então adicionou-se 1 μg de metabissulfito de sódio em 5 μL do mesmo TF. A seguir, foram adicionados 200 μg de iodeto de potássio e 4mg de azul dextran em 200 μL de TF contendo 0,1% de BSA. A purificação do traçador (^{125}I - α hTSH) foi efetuada em coluna cromatográfica de filtração em gel Sephadex G-100 (2,5 x 50cm, fluxo = 12mL/h), sendo a eluição realizada em tampão TF contendo 0,1% de BSA e 0,1% de azida sódica. Foram coletadas frações de 2mL e o traçador foi estocado a -20°C .

A determinação por RIA foi realizada em duplicata, adicionando-se em cada tubo de ensaio: 200 μL de preparação padrão (concentrações variando de 0,195-250ng de α hTSH/mL) ou de amostra ambas em meio de cultura α MEM + 10% SFBd, 50 μL de ^{125}I - α hTSH (~ 25000cpm) em tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,4 + 0,1% BSA + 0,1% azida sódica + 0,5% Tween-20 e 50 μL de anticorpo anti- α hTSH (diluição final

1/120000) no mesmo tampão fosfato. A reação foi incubada a 4°C durante 16h ("overnight") e a separação da fração ligada ao anticorpo foi realizada pela adição de um segundo anticorpo em fase líquida com incubação adicional de 2h a temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 30 min a 4°C, sendo previamente adicionados 2mL de H₂O por tubo.

A contagem da radiação foi efetuada em contador gama, calculando-se a $%B/B_0$, onde B é a radioatividade de cada amostra ligada ao anticorpo e B₀ é a correspondente à ligação máxima obtida sem a presença do antígeno frio.

Em todos os ensaios foram utilizados controles internos de qualidade, em níveis de concentração baixo, médio e intermediário.

2.2.6.2. Ensaio (IRMA) imunoradiométrico de hTSH

A determinação dos níveis de expressão do hTSH heterodimérico foi realizada por ensaio imunoradiométrico (IRMA) desenvolvido em nosso laboratório (83).

O ensaio foi realizado em duplicata com adição simultânea de todos os reagentes: 100μL de preparação padrão (concentrações variando de 0,15-100mUI hTSH/L) ou de amostra ambas em meio de cultura αMEM + 10% SFBd, 50μL de ¹²⁵I-mAB anti-hTSH (~ 60000cpm) em tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,4 + 1,0% BSA + 0,1% azida sódica + 0,5% Tween-20, 50μL de anticorpo policlonal anti-hTSH acoplado à celulose (1,25mg/tubo) e 300μL do mesmo tampão fosfato de sódio. A reação foi incubada por 16h ("overnight") a temperatura ambiente num agitador rotatório de tubos ("rotator"). A seguir, foram adicionados 2mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 0,05M pH7,4 + 0,1% azida sódica + 0,5% Tween-20) e a separação foi realizada por centrifugação a 1000 x g por 10 min a 4°C, sendo a etapa de lavagem repetida uma vez com a adição de 2mL de tampão de lavagem.

Em todos os ensaios foram utilizadas paralelamente preparações comerciais de controle de qualidade, em níveis de concentração baixo, intermediário e alto.

2.2.7. Produção em biorreator

Foi utilizado um biorreator escala piloto do tipo “hollow fiber”, um sistema que se baseia na cultura de células em cartuchos com capilares artificiais por onde é bombeado continuamente o meio de cultura apropriado (meio intracapilar). As células secretoras são cultivadas no espaço extracapilar, de onde se extrai periodicamente o meio contendo a proteína de interesse. (56,57)

Os meios intracapilares utilizados foram α MEM e CHO-S-SFM II, sendo este último um meio de cultura especialmente formulado para uso em biorreatores, com baixa quantidade de proteínas e sem soro, propiciando uma eficiente nutrição às células com vantagens no processo de purificação. Estes meios foram suplementados com MTX (100 nM), penicilina (50 UI/mL), estreptomicina (50 μ g/mL), gentamicina (40 μ g/mL) e anfotericina B (0,25 μ g/mL), além de glicose (4 mg/mL) no caso do α MEM. Os frascos de 1 L de meio foram trocados em média a cada 10 dias, considerando-se que a concentração de glicose presente não deve atingir um valor inferior a 50% da inicial. O consumo de glicose pelas células foi verificado com o aparelho Accu-Chek III e fitas Haemo-Glukotest.

O meio extracapilar utilizado foi α MEM acrescido de 10% SFBd, MTX (1 μ M) e dos antibióticos citados acima, sendo que os 7 mL aproximados deste meio foram trocados a cada intervalo de 1-3 dias para a determinação da expressão de hTSH em μ g/mL/dia. Foi ainda verificada a taxa de viabilidade celular através do número de células mortas (coradas com corante vital) em relação ao total de células liberadas neste meio, sendo que esta viabilidade deve ser mantida acima de 80%.

2.2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC)

As análises por HPSEC isocrática foram realizadas em aparelho cromatográfico equipado com detector UV, no comprimento de onda 220nm, utilizando-se coluna TSK G2000 SW de 60cm x 7,5mm conectada a uma pré-coluna TSK SW de 7,5cm x 7,5mm.

A fase móvel utilizada foi NaCl 0,15M, fosfato de sódio 0,02M, pH7,0, num fluxo de 1,0mL/min (9). As preparações injetadas foram previamente centrifugadas e os volumes de injeção variaram entre 5-300 μ L.

Foram coletadas frações de 535 μ L (18 gotas) ao longo de todo perfil cromatográfico, nas quais foi determinado o conteúdo de hTSH por IRMA.

2.2.9. Avaliação da atividade biológica *in vivo*

A atividade biológica *in vivo* do hTSH recombinante secretado pelas células CHO foi determinada por um bioensaio que não utiliza administração de radioisótopo no animal (14), sendo este uma modificação do ensaio clássico de McKenzie (71).

As amostras (desconhecido e padrão) foram injetadas intraperitonealmente em camundongos machos da linhagem isogênica Balb-c com 22-30g de peso, que tiveram o TSH endógeno suprimido pela administração oral de triiodotironina (T_3), numa concentração final de 3 μ g/mL, pH7-7,5, *ad libitum* por 4-5 dias. As diferentes doses das preparações de hTSH foram injetadas num volume de 200 μ L, após diluição em meio de cultura α MEM + 10% SFBd.

Amostras de sangue foram coletadas 6h após a administração do hTSH exógeno via plexo retro-orbital com anticoagulante heparina sódica, sendo que o respectivo nível de tiroxina total (T_4 total) liberada no plasma foi determinado por RIA.

3. RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO pEDdc- α E pEAdc- β hTSH

3.1.1. Isolamento do gene da subunidade α hTSH e sua clonagem no vetor pEDdc

A seleção da genoteca de cDNA hipofisário mediante técnicas clássicas de hibridização resultou em 4 clones positivos, quando foi utilizado um oligonucleotídeo (20 mero) complementar à sequência do gene da subunidade α , marcado com $\gamma^{32}\text{P}$ dATP. O DNA extraído destes clones foi digerido com a enzima EcoRI e o fragmento de 621pb obtido (cDNA da subunidade α de hTSH) foi inserido no vetor pEDdc para obtenção do vetor de expressão da subunidade α hTSH (pEDdc- α hTSH), como encontra-se esquematizado na Fig. 2.

A seguir, o gene desta subunidade foi sequenciado, sendo que em dois clones foi demonstrada a sequência correta por comparação à da subunidade α derivada da gonadotrofina coriônica humana (18).

3.1.2. Isolamento do gene da subunidade β hTSH e sua clonagem no vetor pEAdc

Inicialmente foi utilizada a mesma técnica de hibridização, empregando-se um oligonucleotídeo complementar à sequência do gene da subunidade β hTSH ou o cDNA de β TSH de rato marcados com $\gamma^{32}\text{P}$ dATP. Porém, após várias tentativas sem sucesso,

decidiu-se utilizar a técnica de PCR, devido a sua alta sensibilidade quando comparada a metodologias clássicas.

Pelo fato de haver sido isolado pela técnica de PCR, o fragmento de cDNA correspondente ao gene da subunidade β hTSH, de 460pb, apresentou o nucleotídeo deoxiadenosina 5'-monofosfato (A) nas extremidades, não sendo possível assim sua clonagem direta no vetor de expressão pEAdc.

Portanto, foi utilizado o sistema pMOSBlue, um plasmídeo especialmente formulado para clonagem de fragmentos de DNA oriundos de PCR (ver Materiais e Métodos), sendo que o gene da subunidade β hTSH foi inserido no sítio de clivagem da enzima Eco RV deste vetor, onde encontra-se a extremidade que termina num nucleotídeo de timidina (T), complementar à A.

A seguir, o plasmídeo obtido (pMOSBlue- β hTSH) foi digerido com as enzimas Hind III e Kpn I para confirmar a presença do inserto. Porém, mediante análise de restrição enzimática do DNA extraído das colônias positivas, foi verificado que o gene da β hTSH encontrava-se na orientação invertida. Foi assim necessária uma subclonagem do inserto nos sítios Hind III e Kpn I (enzimas que resultam em fragmentos de DNA com extremidades coesivas) do plasmídeo pBluescript. Após isolamento de um clone positivo, o inserto foi retirado mediante digestão com Sma I (extremidades não coesivas) e Eco RI (extremidades coesivas) para ser inserido no vetor pEAdc, obtendo-se assim o vetor de expressão da subunidade β (pEAdc- β hTSH), como encontra-se ilustrado na Fig. 3.

O sequenciamento do gene da subunidade β demonstrou que a sequência obtida corresponde à publicada anteriormente (120).

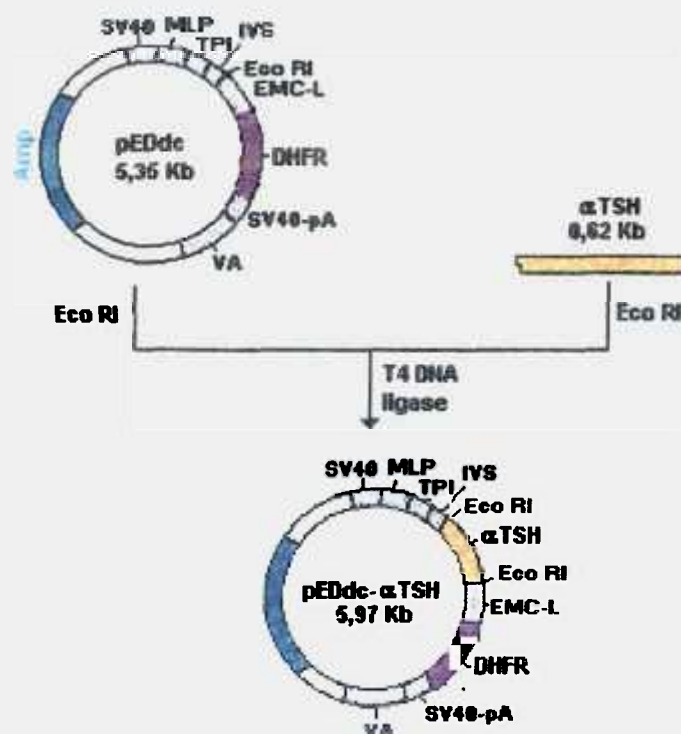


Fig. 2: Esquema de obtenção do vetor pEDdc-αhTSH. O vetor pEDdc é derivado do PUC 18, sendo seus principais componentes: SV40, fragmento que contém a origem de replicação e o elemento ativador de transcrição ("enhancer element") do "simian virus 40"; MLP e TPL, promotor e sequência líder derivados de adenovírus; IVS, intron híbrido derivado de sequência líder de adenovírus e de um gene da imunoglobulina; EMC-L, região 5' líder não traduzida do vírus da encefalomiocardite; DHFR, região que codifica a enzima diidrofolato redutase murina; SV40-pA, região de poliadenilação do SV40; VA, gene VAI RNA de adenovírus que codifica a RNA polimerase III, potencializando a tradução do mRNA; Amp, gene de resistência à ampicilina, utilizado para propagação em *E. coli*.

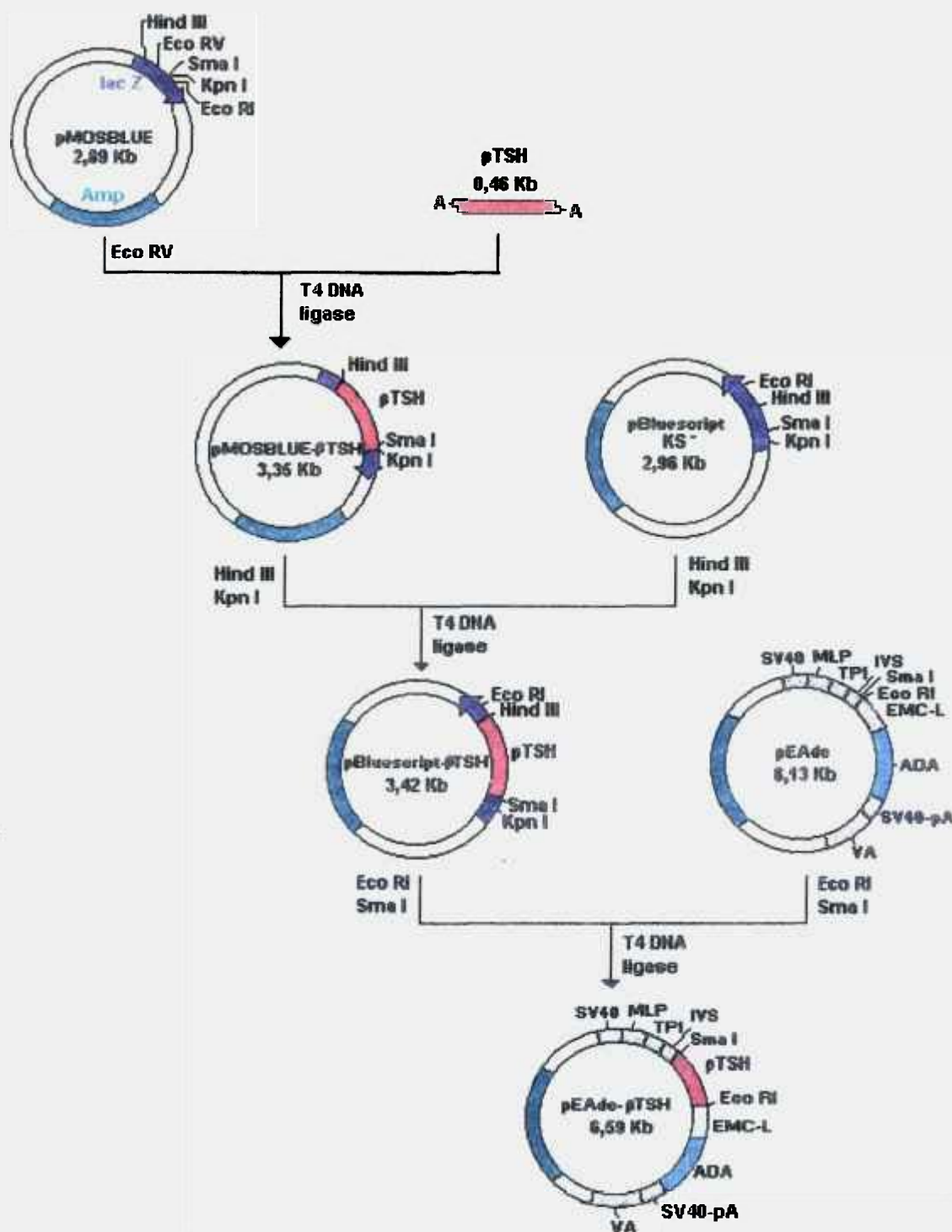


Fig. 3: Esquema de obtenção do vetor pEAdc-βhTSH. O vetor pEAdc possui os mesmos elementos descritos anteriormente para o pEDdc, exceto pela inserção do gene da enzima adenosina deaminase murina (ADA) na região correspondente ao gene da DHFR. Os plasmídeos pMOSBlue e pBluescript possuem um fragmento do gene lac Z, permitindo assim uma seleção imediata das colônias positivas (brancas) em relação às negativas (azuis), em placas contendo X-gal/IPTG.

3.2. TRANSFEÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS CHO COM OS VETORES DE EXPRESSÃO OBTIDOS: pEDdc- α E pEAdc- β hTSH

3.2.1. Estratégia de transfecção sequencial

3.2.1.1. Estabelecimento de uma linhagem CHO- α hTSH com secreção estável da subunidade α

Foi realizada inicialmente uma cotransfecção de células CHO selvagens utilizando os vetores pEDdc- α hTSH e pRSneo (marcador de seleção) pelo método dos lipossomas. Isto deveria servir para a determinação da eficiência de transfecção e para definir um protocolo de seleção com geneticina (G418) e de amplificação com metotrexato (MTX).

Foram utilizados 5 μ g de pEDdc- α hTSH + 0,5 μ g de pRSneo / placa de 6cm de diâmetro e três placas para cada tempo de transfecção testado (5 e 16h). Após 48h do início da transfecção, foi iniciada a seleção em meio mínimo essencial sem a presença de nucleosídeos (α MEM), suplementado com 10% soro fetal bovino dialisado (SFBd), 1mg/mL G418 e 30nM MTX. O número de colônias derivadas de células transformadas e as eficiências de transfecção obtidas encontram-se na Tabela I.

Tabela I: Número de células transformadas e eficiências de transfecção obtidas após transfecção de células CHO selvagens com os vetores pEDdc- α hTSH + pRSneo.

tempo de transfecção (h)	células transformadas (n=3 ensaios)	eficiência de transfecção* (nº de células transformadas/ nº de células transfectadas)
5	45 $\pm$ 10	0,6 x 10 ⁻⁴
16	88 $\pm$ 28	1,2 x 10 ⁻⁴

* considerando um número inicial de 7,5 x 10⁵ células transfectadas

Portanto, foi verificado que o tempo de transfecção de 16h proporcionou uma eficiência de transfecção duas vezes maior.

Durante esta etapa do trabalho foi padronizado um RIA específico para a determinação dos níveis de expressão da subunidade α hTSH, sendo que o perfil de uma curva dose-resposta típica encontra-se na Fig. 4.

Com este esquema de ensaio, apresentando ligações específicas (B_0) da ordem de 40% e inespecíficas (NSB) < 1%, foi possível a realização das determinações necessárias para o acompanhamento da secreção da subunidade α hTSH.

A seguir, as células foram colocadas em meio de cultura para amplificação, ou seja, na presença de quantidades crescentes de MTX: 60, 80 e 120nM. Deve-se ressaltar que nesta etapa do trabalho, foi utilizada a amplificação gênica no “pool” de células, sendo que os clones seriam isolados apenas posteriormente, quando fosse atingido um nível máximo e constante de expressão. Em experimentos posteriores, foi adotada a estratégia de isolamento de clones logo após a seleção, numa tentativa de diminuir as chances de perda de um clone com alto potencial de secreção (50).

Os primeiros níveis de α hTSH, determinados pelo RIA específico para dosagem desta subunidade, revelaram um discreto aumento de expressão de um nível indetectável até 8-12ng α hTSH/mL. Como as células não apresentaram uma viabilidade adequada em 120nM MTX, foi realizado o isolamento de 20 clones,

partindo-se das células submetidas a 80nM MTX, e determinados os respectivos níveis de expressão de α hTSH (Fig. 5).

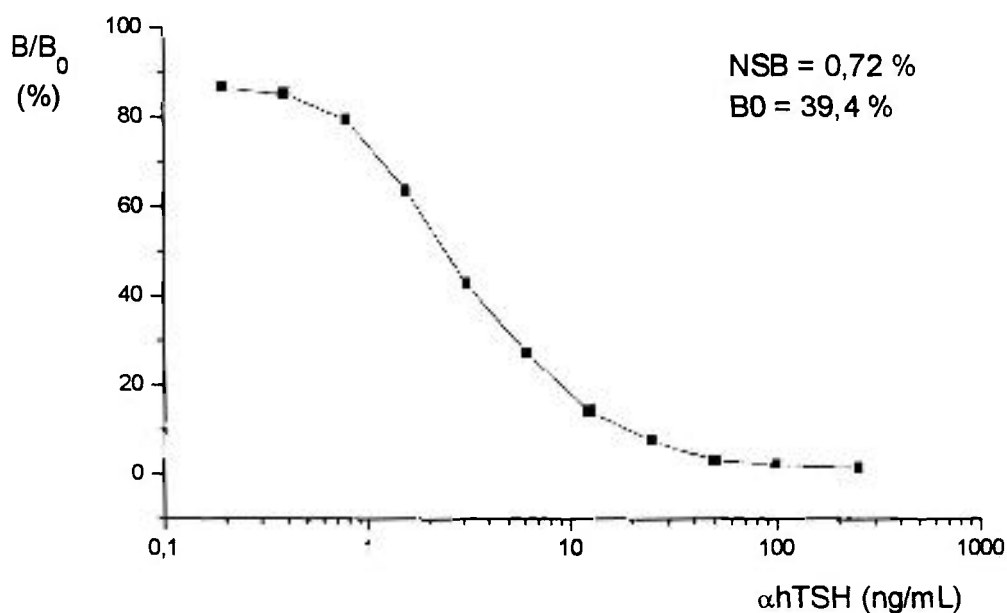


Fig. 4: Curva dose-resposta de RIA para a determinação dos níveis de expressão da subunidade α hTSH. Em destaque, encontram-se valores típicos de NSB e de B_0 obtidos. Foram utilizados reagentes do NIDDK: a preparação da subunidade α hTSH utilizada para radioiodação e como padrão e o anticorpo anti- α hTSH.

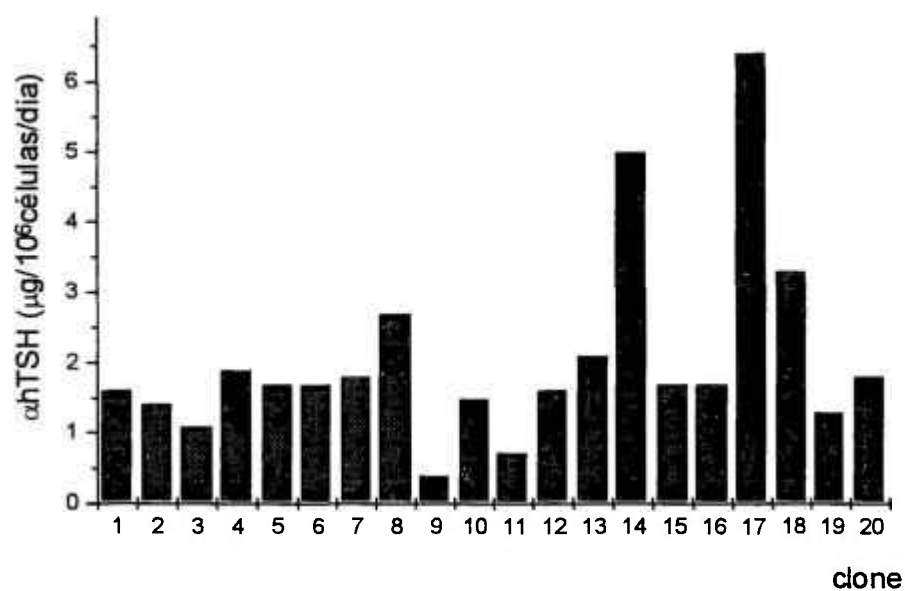


Fig. 5: Níveis de expressão de α hTSH (μ g/ 10^6 células/dia) determinados por RIA nos meios de cultura de 20 clones isolados de células CHO selvagens, transfectadas com os vetores pEDdc- α hTSH + pRSneo e submetidas à amplificação gênica com MTX.

Podemos observar que foi obtido um clone com uma taxa de expressão relativamente alta, maior que $6\mu\text{g } \alpha\text{hTSH}/10^6\text{células}/\text{dia}$. Não houve porém incremento do nível de expressão quando o mesmo foi exposto a doses maiores de MTX. Nesta etapa foi portanto estabelecido um protocolo geral de seleção e amplificação para obtenção de células CHO produtoras de αhTSH .

No experimento seguinte, além de células selvagens, foram também utilizadas células CHO DG-44 (DHFR⁻) e as transfecções foram realizadas com $15\mu\text{g}$ de pEDdc- αhTSH adicionando-se $1,5\mu\text{g}$ de pRSneo no caso das CHO selvagens, pelo mesmo método dos lipossomas e utilizando um tempo de transfecção de 16h.

A eficiência de transfecção após 4 dias de incubação em meios seletivos resultou num fator 5 vezes maior para as células CHO selvagens, como pode ser observado na Tabela II.

Tabela II: Número de células transformadas e eficiências de transfecção obtidas após transfecção de células CHO selvagens e DG-44 com os vetores pEDdc- αhTSH + pRSneo.

linhagem de CHO	células transformadas (n=3)	eficiência de transfecção* (n° de células transformadas/ n° de células transfectadas)
selvagem	214 ± 132	$5,6 \times 10^{-4}$
DG-44	44 ± 23	$1,1 \times 10^{-4}$

* considerando um número inicial de $4,0 \times 10^5$ células selvagens e de $3,8 \times 10^5$ células DG-44

A seguir, as duas linhagens celulares transfectadas foram submetidas a doses de 20, 40, 80 e 160nM MTX. Os níveis de expressão de αhTSH obtidos, antes do isolamento dos clones, encontram-se na Tabela III.

Tabela III: Níveis de expressão de α hTSH obtidos em meio de cultura de células CHO selvagens e DG-44 após transfecção com os vetores pEDdc- α hTSH + pRSneo e amplificação gênica com doses crescentes de MTX.

Dose de MTX (nM)	CHO selvagens (μ g α hTSH/ 10^6 células/dia)	CHO DG-44 (μ g α hTSH/ 10^6 células/dia)
0	0	0,090
20	0	0,140
40	0,004	0,050
80	0,006	0,039

Como os níveis de expressão de α hTSH não apresentaram aumentos significativos, foram isolados clones das células CHO selvagens submetidas a 80nM MTX e das DG-44 submetidas a 20nM MTX. Enquanto que para as CHO selvagens foram novamente obtidos clones com níveis de expressão ao redor de 5 μ g α hTSH/ 10^6 células/dia, confirmando os resultados obtidos no primeiro experimento, os clones isolados das células DG-44 apresentaram apenas níveis próximos de 0 μ g α hTSH/ 10^6 células/dia.

Em conclusão, pode-se dizer que provavelmente enquanto nas células CHO selvagens ocorreu uma integração estável do gene heterólogo (α hTSH) no DNA genômico da célula hospedeira, nas DG-44 parece ter havido uma eliminação deste gene.

Na etapa subsequente, foi alterada a técnica de transfecção e as células DG-44 foram transformadas com 30 μ g do vetor pEDdc- α hTSH por eletroporação. Esta técnica foi escolhida por existirem relatos na literatura de obtenção de altos níveis de expressão de anticorpos (60 μ g/ 10^6 células/48h ou 28 μ g/ 10^6 células/dia), quando foram realizadas transfecções por eletroporação (122,123).

Após seleção dos transformantes em meio α MEM + 10% SFBd na ausência de nucleosídeos, a amplificação gênica foi realizada submetendo-se as células a doses de 50, 100 e 200 nM MTX, sendo escolhida a de 100 nM para isolamento dos clones

por ter apresentado uma expressão de α hTSH de até 30 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia, em meio de cultura onde ainda não tinham sido isolados os clones, concomitantemente a uma multiplicação celular adequada.

A seguir foram isolados 65 clones e dois deles apresentaram níveis de expressão da ordem de 200 μg α hTSH/ 10^6 células/dia. Um desses clones foi então utilizado para a transfecção com os vetores pEAdc- β hTSH e pRSneo. Este último marcador de seleção foi utilizado por ainda não ter sido padronizada a seleção e amplificação mediante utilização do marcador ADA.

3.2.1.2. Transfecção sequencial das células CHO DG-44 secretoras de α hTSH com os vetores pEAdc- β hTSH e pRSneo

As células CHO DG-44 capazes de secretar α hTSH de forma estável foram transfectadas com 20 μg do vetor pEAdc- β hTSH + 2 μg de pRSneo pelo método do fosfato de cálcio. A seguir, a seleção das células transformadas foi realizada em meio α MEM suplementado com 10% SFBd +0,6 mg/mL G418. Foram isolados 24 clones positivos e determinados os respectivos níveis de expressão de hTSH (Fig. 6).

Como os níveis de expressão obtidos não ultrapassaram 100ng hTSH/ 10^6 células/dia, a estratégia de transfecção sequencial demonstrou ser um método muito trabalhoso e, pelo menos em nossas mãos, pouco eficiente para obtenção de altos níveis de secreção de proteínas heterodiméricas recombinantes. Provavelmente ainda seriam necessárias etapas adicionais de amplificação gênica induzida pela adenosina deaminase (ADA), que encontra-se no vetor de expressão da subunidade β hTSH, metodologia esta que não pudemos desenvolver da melhor maneira por falta de alguns reagentes apropriados.

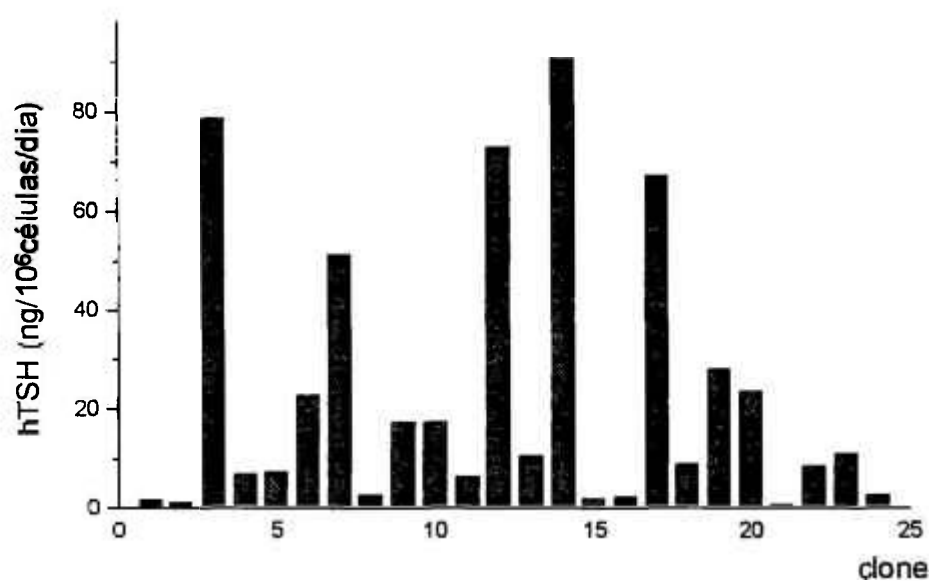


Fig. 6: Níveis de expressão de hTSH (ng/10⁶ células/dia) determinados por IRMA nos meios de cultura de 24 clones isolados após transfecção sequencial das células CHO DG44 com os vetores pEDdc- α hTSH e pEAdc- β hTSH + pRSneo.

3.2.2. Estratégia de cotransfecção

3.2.2.1. Transfecção transiente

Foram realizados experimentos de transfecção transiente utilizando os vetores pEDdc- α e pEAdc- β hTSH em células COS e CHO DXB-11 (DHFR⁻) numa proporção de 1:1 (3 μ g de DNA de cada vetor), pelo método do DEAE-dextran. Na Tabela IV, as determinações dos níveis de expressão de hTSH indicam que houve a formação do heterodímero, confirmada pela ausência de reação cruzada do IRMA utilizado, quando realizada a dosagem deste hormônio no meio proveniente das células CHO transformadas apenas com o vetor da subunidade α ou β hTSH. Como já é conhecido, as células COS apresentam em geral níveis maiores de expressão que as CHO em experimentos de transfecção transiente.

TABELA IV: Níveis de expressão de hTSH obtidos em meios de cultura de células submetidas à transfecção transiente com os vetores pEDdc- α e pEAdc- β hTSH.

Condição	hTSH (mUI/L)*	hTSH (ng/10 ⁶ células/dia)**
cotransf. α + β em COS	3567,0	1190,0
cotransf. α + β em CHO	32,0	10,0
transf. α em CHO	0,12	0,04
transf. β em CHO.	0,10	0,03
CHO não transf.	0,05	0,02

*cada valor representa a média de n=3 ensaios

** para a conversão foi assumido que 10 UI hTSH = 1 mg

Portanto, a transfecção transiente é uma metodologia bastante prática e rotineiramente utilizada por permitir uma rápida avaliação da ocorrência de heterodimerização, no caso específico deste tipo de proteína, sendo também muito

empregada quando se necessita de uma comparação entre vários tipos de vetores ou em estudos imediatos de estrutura-função.

3.2.2.2. Transfecção para obtenção de linhagens estáveis

A cotransfecção dos vetores pEDdc- α e pEAdc- β hTSH em células CHO DXB-11 para obtenção de linhagens estavelmente secretoras foi realizada pelo método do fosfato de cálcio.

As células foram transfectadas com diferentes proporções dos vetores de expressão, uma prática comumente empregada em protocolos descritos na literatura, onde foram obtidos altos níveis de expressão de proteínas heterodiméricas, como o hormônio luteotrófico bovino (42) e o próprio hTSH (9). Nestas estratégias geralmente utiliza-se uma proporção menor do vetor que possui o gene da DHFR, o sistema de amplificação gênica mais conhecido e empregado, sendo necessário aumentar a probabilidade de entrada do vetor que não possui marcador de seleção e amplificação juntamente com o vetor que o possui.

Um primeiro experimento foi realizado com uma proporção de 1:9 (2 μ g pEDdc- α : 18 μ g pEAdc- β hTSH). Após a transfecção, as células foram submetidas à seleção em meio sem a presença de nucleosídeos (α MEM + 10% SFBd), sendo isolados 29 clones, dos quais foram escolhidos 5 para a amplificação gênica.

A amplificação do gene da DHFR precisou ser reiniciada com doses bastante baixas de MTX (5nM), visto que não foi verificada uma viabilidade adequada dos clones selecionados quando os mesmos foram diretamente submetidos a 20 nM MTX. Como pode ser verificado na Tabela V, os níveis de hTSH obtidos com 5nM MTX ainda apresentavam-se bastante baixos, necessitando-se de incrementos maiores de MTX.

Assim, os clones já submetidos a 5 nM MTX foram transferidos para meio de cultura com 20 nM MTX, mas novamente não apresentaram viabilidade celular adequada.

TABELA V: Níveis de expressão de hTSH obtidos em meio de cultura de células cotransfectadas com os vetores pEDdc- α + pEAdc- β hTSH (1:9) e submetidas a 0 e 5 nM MTX.

Clone	0 nM MTX (ng hTSH/10 ⁶ células/dia)	5 nM MTX (ng hTSH/10 ⁶ células/dia)
1	31	25
2	12	21
3	26	33
4	3	8
5	7	4

Uma outra tentativa foi submeter o clone 3 à amplificação gênica induzida pelo gene da ADA, expondo-o a doses crescentes de dCF (30, 50, 75 e 100nM). Porém, como podemos observar na Tabela VI, os níveis máximos de expressão atingidos foram somente de 215ng hTSH/10⁶ células/dia.

TABELA VI: Níveis de expressão de hTSH obtidos em meio de cultura do clone 3 isolado de células cotransfectadas com os vetores pEDdc- α + pEAdc- β hTSH (1:9) e submetidas a doses crescentes de dCF.

Dose de dCF (nM)	hTSH (ng/10 ⁶ células/dia)
0	30
30	16
50	12
75	215
100	56

Assim, decidiu-se pela realização de uma nova transfecção utilizando-se uma outra proporção dos vetores. Neste segundo experimento foi utilizada uma proporção de 1:5 dos vetores (4 μ g pEDdc- α : 20 μ g pEAdc- β hTSH), segundo protocolo descrito na

literatura quando foi obtida uma expressão do hormônio luteotrófico bovino (bLH) de 20 $\mu\text{g}/10^6$ células/dia (42).

Após isolamento de 48 clones positivos, logo após a seleção em meio αMEM + 10% SFBd e determinação preliminar do nível de expressão de cada clone, foram escolhidos 4 deles para prosseguir com a amplificação induzida por MTX. Foram utilizadas as seguintes doses de MTX: 0; 0,03; 0,06; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 μM MTX, e os respectivos incrementos dos níveis de hTSH obtidos após cada etapa da amplificação gênica encontram-se na Tabela VII, sendo que a partir da dose de 0,5 μM MTX prosseguiu-se com apenas dois clones. Como descrito em Materiais e Métodos, a dosagem de cada clone foi redeterminada em cada etapa de amplificação, pois entre cada uma delas houve um intervalo de tempo de aproximadamente 10 dias para que as células apresentassem uma adaptação à nova concentração de MTX. Por isso, em relação a cada concentração de MTX foram realizados 2 ensaios, o primeiro no final da própria etapa de amplificação e outro com o meio obtido das mesmas células mantidas paralelamente em cultura até o fim da etapa de amplificação subsequente.

Os níveis de hTSH foram calculados em $\mu\text{g}/10^6$ células/dia e $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{dia}$ para que se possa avaliar a taxa de expressão relacionada à capacidade secretora do clone e a concentração obtida no meio de cultura, respectivamente. De fato, enquanto o primeiro parâmetro é interessante por permitir a avaliação da capacidade de produção do clone obtido, o segundo está mais relacionado a problemas práticos de caracterização e purificação. Na Fig. 7 encontram-se representados os níveis médios obtidos para cada clone em μg hTSH/mL/dia nas diferentes concentrações de MTX utilizadas.

Pelo fato de que em várias dosagens realizadas com o clone 1 submetido a 1 μM MTX foram obtidos em média níveis de expressão de $5,7 \pm 1,0 \mu\text{g}$ hTSH/ 10^6 células/dia ou $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g}$ hTSH/mL/dia ($n=5$), mesmo após propagação do mesmo na ausência de MTX por 2 semanas, este foi o clone selecionado para ser utilizado nos primeiros estudos de padronização da produção de hTSH em um biorreator, escala piloto. Este clone apresentou uma eficiência de expressão similar à do clone obtido pelo grupo da Genzyme (9), cuja capacidade de secreção em placas foi de $4,5 \pm 1,7 \mu\text{g}$

hTSH/ 10^6 células/dia quando realizada uma amplificação gênica com concentrações de MTX superiores a 5,0 μ M.

TABELA VII: Níveis de expressão de hTSH em μ g/ 10^6 células/dia e μ g/mL/dia obtidos em meio de cultura de clones isolados de células CHO DXB-11 cotransfectadas com os vetores pEDdc- α + pEAdc- β hTSH (1:5) e submetidas à amplificação gênica induzida por MTX.

Clone	0 μ M MTX		0,03 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	0,032	0,004	0,045	0,004
2	0,033	0,003	0,052	0,009
3	0,027	0,002	0,055	0,010
4	0,034	0,004	0,053	0,017

Clone	0,03 μ M MTX		0,06 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	1,31	0,58	0,98	0,39
2	1,64	0,60	1,13	0,62
3	0,64	0,24	1,02	0,61
4	0,44	0,12	0,75	0,29

Clone	0,06 μ M MTX		0,1 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	1,20	0,35	1,12	0,37
2	0,75	0,18	0,89	0,33
3	0,74	0,20	0,73	0,26
4	0,76	0,26	0,73	0,22

Tabela VII (cont.)

Clone	0,1 μ M MTX		0,2 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	2,13	0,51	2,88	0,81
2	2,72	0,62	1,85	0,54
3	2,91	0,83	2,76	0,63
4	2,67	0,83	2,37	0,50

Clone	0,2 μ M MTX		0,5 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	2,67	0,90	2,43	0,68
2	2,16	0,72	4,50	0,90
3	1,82	0,51	2,18	0,48
4	2,11	0,73	2,11	0,65

Clone	0,5 μ M MTX		1,0 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	2,40	0,91	5,38	1,70
2	3,40	1,12	2,57	0,93

Clone	1,0 μ M MTX		2,0 μ M MTX	
	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)	(μ g hTSH/ 10^6 células/dia)	(μ g hTSH/ mL/dia)
1	4,64	1,23	4,45	1,12
2	5,60	1,35	3,22	0,79

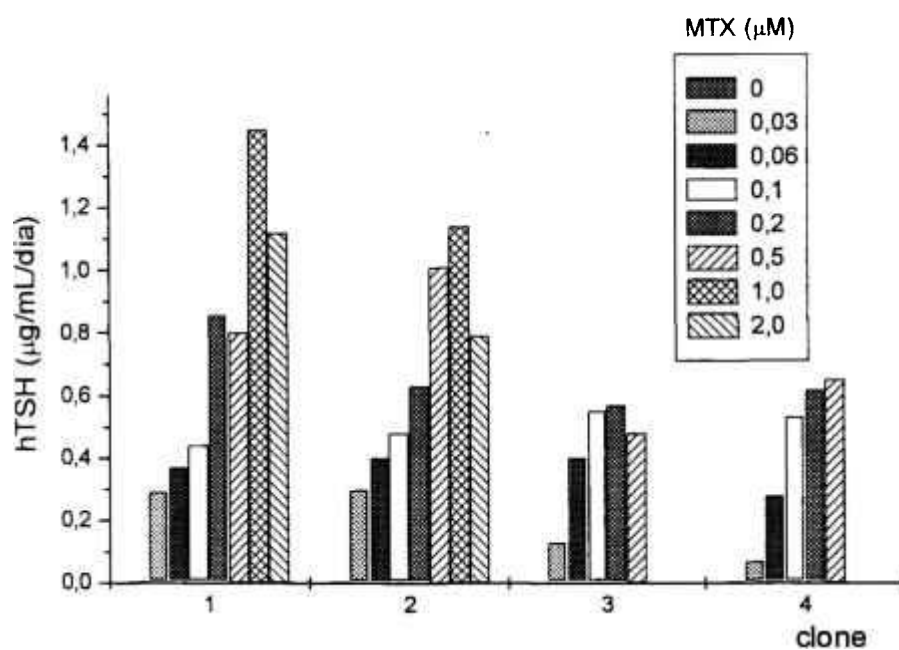


Fig. 7: Níveis médios de hTSH em $\mu\text{g/mL/dia}$ obtidos em meio de cultura de clones isolados de células CHO DXB-11 cotransfectadas com os vetores pEDdc- α + pEAdc- β hTSH (1:5) e submetidas à amplificação gênica induzida por MTX.

3.3. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO hTSH EM BIORREATOR TIPO “HOLLOW-FIBER”

Inicialmente no espaço extracapilar do cartucho do biorreator foram adicionadas 14×10^6 células do clone 1 em 7mL de meio α MEM acrescido de 10% SFBd, 1 μ M MTX e antibióticos, enquanto como meio intracapilar utilizou-se α MEM acrescido de antibióticos, como descrito em Materiais e Métodos.

Durante o primeiro mês foram realizadas 10 coletas de meio extracapilar e determinados os níveis de hTSH expressos em μ g/mL/dia (Fig. 8). A baixa expressão verificada neste período corresponde a uma multiplicação celular não adequada dentro do cartucho, onde podia-se observar a existência de grandes espaços vazios e de apenas pequenos aglomerados celulares, sendo que numa situação adequada de multiplicação celular é esperado que a maior parte do cartucho torne-se esbranquiçada devido ao grande número de células presentes.

Portanto, o meio α MEM provavelmente não possibilitou um desenvolvimento adequado das células, fato confirmado por também não estar havendo consumo de glicose.

Em seguida, o meio intracapilar foi modificado para CHO-S-SFM II, meio este especialmente formulado para uso em biorreator, conjuntamente com a adição de mais 7×10^6 células no mesmo meio extracapilar anteriormente utilizado (α MEM acrescido de 10% SFBd, 1 μ M MTX e antibióticos). Depois de 1 semana foram observados aglomerados celulares maiores e alto consumo de glicose, como pode ser observado na Tabela VIII. Concomitantemente houve incremento significativo do nível de hTSH a partir da coleta 11 até a 15, alcançando uma viabilidade celular da ordem de 85%. Porém, o meio CHO-S-SFM II foi utilizado somente por 8 dias (a partir do dia 33), devido à sua baixa disponibilidade.

TABELA VIII: Determinação das taxas de consumo de glicose e da viabilidade celular realizada nas amostras de meio extracapilar coletadas do biorreator.

Tempo de reação (dias)	Coleta de meio extracapilar (número)	concentração final de glicose no meio (g/L)	consumo de glicose (%)*	viabilidade celular (%)
7-39	3-13	4,0-6,0	0	n.d.**
40	14	2,1	47,5	n.d.
41	15	1,6	60,0	85,7
43	16	3,3	17,5	60,0
45	17	2,3	42,5	15,0-20,0
47	18	2,6	35,0	10,0-15,0

* considerando uma concentração inicial de 4g glicose/L de meio de cultura

**n.d. = não determinado

No dia 41, o meio intracapilar foi trocado para α MEM, por este se tratar de um meio de mais fácil disponibilidade, e após 24 horas foi obtida a expressão máxima de hTSH (acima de 20 μ g/mL/dia), correspondente à coleta 16, no momento em que havia uma viabilidade celular da ordem de 60%. Nesta coleta, determinou-se a presença de uma concentração alta de glicose no meio (3,3g/L), pois o meio intracapilar havia sido recentemente trocado para α MEM após a coleta 15, na qual foi determinada uma concentração abaixo da recomendada para troca (50% da inicial). Porém, nas duas coletas seguintes (17 e 18) foi observada uma drástica diminuição dos níveis de hTSH, com simultânea queda de viabilidade celular para 10-20%.

Assim, estes resultados preliminares obtidos com a utilização do biorreator indicam que é necessária a utilização do meio CHO-S-SFM II para manter uma viabilidade celular adequada simultaneamente a uma alta taxa de expressão de hTSH durante um período mais longo.

Além disso, apesar das dificuldades iniciais, deve-se ressaltar que foram obtidas concentrações de hTSH da ordem de 20 μ g/mL/dia, valores comparáveis aos declarados pela Genzyme para sua produção em larga escala (15-30 μ g/mL/dia)

utilizando um biorreator de 160L, tipo "microcarrier". É interessante observar também que aproximadamente a mesma produtividade foi obtida por um colega nosso durante o seu trabalho no NIH (Bethesda, MD, EUA) com o mesmo biorreator tipo "hollow-fiber", utilizando um dos melhores clones produtores de hTSH, da própria Genzyme.

Foi também graças à esta primeira produção em biorreator, que permitiu uma concentração útil de hTSH, que foi possível realizar a maior parte dos testes de caracterização do hTSH recombinante obtido, os quais encontram-se descritos a seguir.

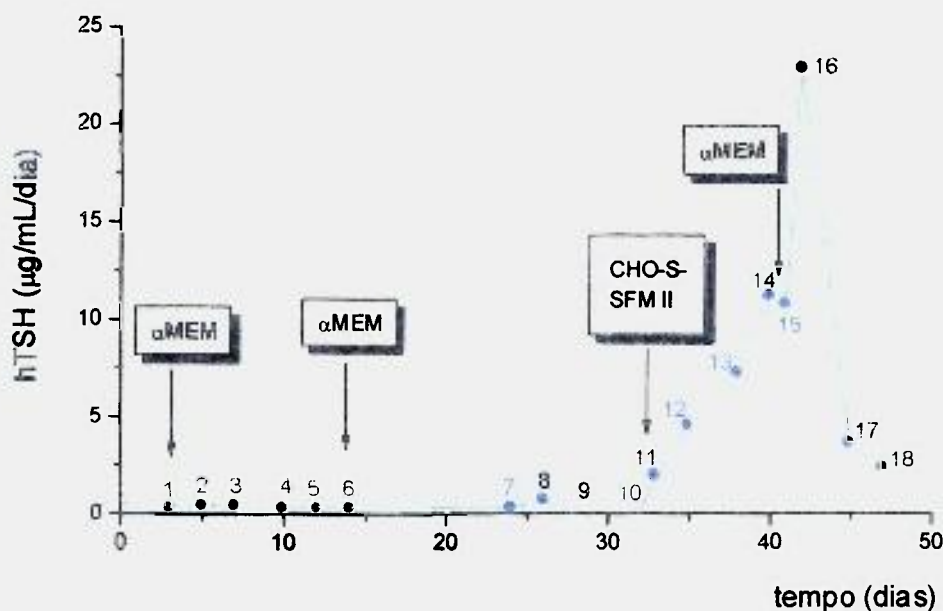


Fig. 8: Níveis de expressão de hTSH obtidos no meio extracapilar coletado do biorreator durante seu tempo de funcionamento. As coletas deste meio encontram-se indicadas por números progressivos. As trocas de meios intracapilares encontram-se indicadas por setas.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DO hTSH RECOMBINANTE OBTIDO

3.4.1. Análise em HPSEC associada a IRMA

Foi realizada uma análise qualitativa e de identidade do hTSH produzido no biorreator utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC) combinada a uma determinação imunológica por ensaio imunoradiométrico (IRMA).

Na HPSEC foi utilizado o meio de cultura extracapilar diretamente obtido do biorreator (α MEM + 10% SFBd) referente à coleta 16, descrita anteriormente, sendo que foram injetados na coluna 300 μ L desta solução correspondentes a aproximadamente 6 μ g de hTSH, valor estimado por IRMA. Foram coletadas frações de 535 μ L durante a análise cromatográfica do meio de cultura e da preparação da Genzyme (injeção de 10 μ g), para serem avaliadas no IRMA (Fig. 9).

O tempo de retenção obtido na HPSEC para a preparação da Genzyme (t_R =18,55min) foi fidêntico ao obtido para o hTSH produzido no biorreator (t_R =18,52min).

Portanto, a HPSEC associada ao IRMA é um método analítico bastante prático e eficiente para a avaliação do hTSH, por permitir uma análise no próprio meio de cultura, antes de qualquer etapa de purificação. A potencialidade desta metodologia já havia sido demonstrada recentemente, em nosso laboratório, na análise do hormônio de crescimento humano recombinante em fluídos periplásmicos bacterianos (11).

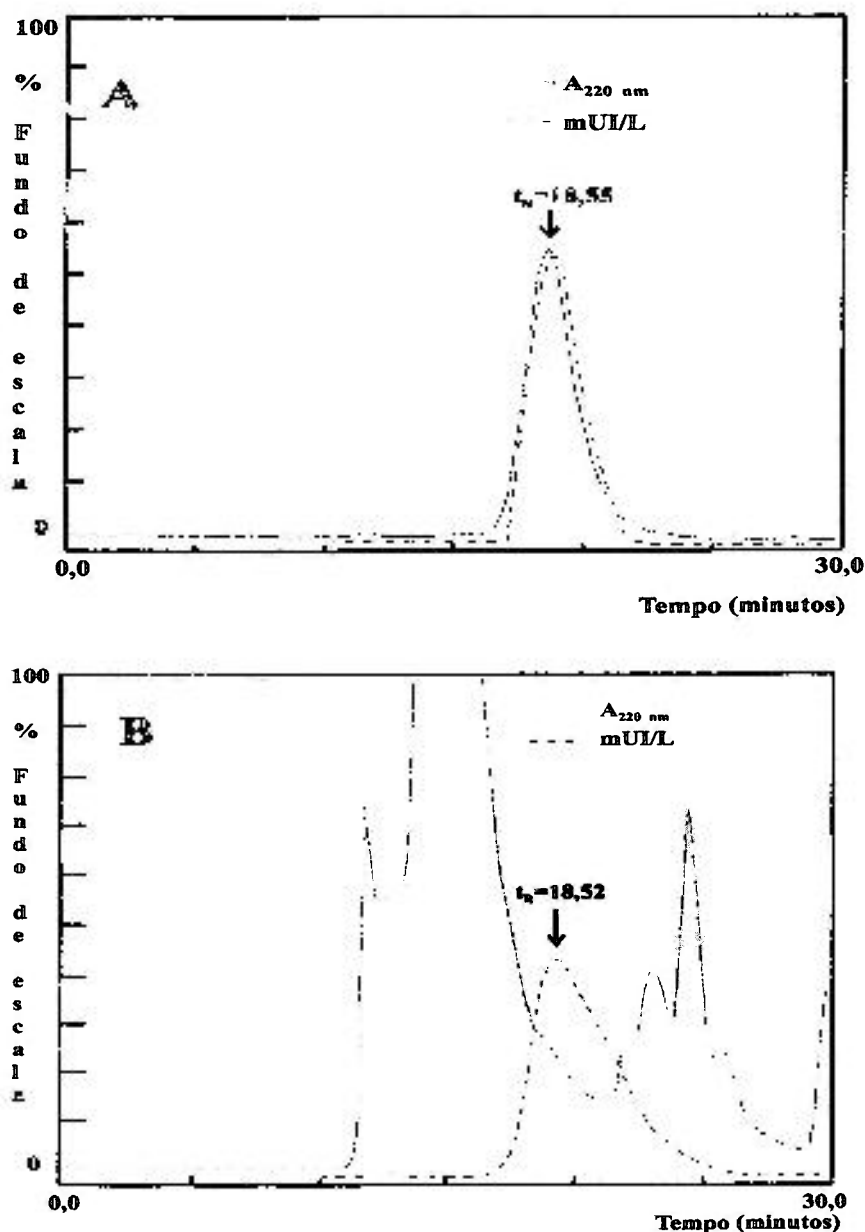


Fig. 9: Cromatogramas obtidos por HPSEC isocrática em coluna G2000 SW (60cm x 7,5mm, tamanho de partícula 125 Å), conectada a uma pré-coluna de 7,5cm x 7,5mm. A fase móvel utilizada foi NaCl 0,15M, fosfato de sódio 0,02M, pH 7,0, com um fluxo de 1,0mL/min. $A_{220\text{ nm}}$, absorvância monitorada a 220nm, (—); hTSH determinado por IRMA, expresso em mIU/L (- - - -); t_R , tempo de retenção, (min).
 (A) 10 μg de hTSH recombinante (Thyrogen®, Genzyme);
 (B) 300 μL de meio de cultura extracapilar obtido do biorreator (αMEM + 10%SFBd) correspondente à coleta 16 indicada na Fig. 8.

3.4.2. Caracterização imunológica

Foi avaliado o comportamento do hTSH obtido no biorreator, antes e após análise em HPSEC, quando utilizado como padrão no IRMA em comparação a diferentes preparações de hTSH de origem hipofisária (padrão primário da WHO e secundário do NIDDK) e de hTSH recombinante da Genzyme, sendo que esta última preparação já tinha sido calibrada anteriormente em nosso laboratório por Ribela e cols. (90).

Como pode ser observado na Fig. 10, as curvas obtidas com os meios de cultura contendo hTSH, mesmo com aquele que não foi purificado em HPSEC, apresentam paralelismo em relação aos padrões utilizados, confirmando a identidade do produto. Portanto, este tipo de purificação cromatográfica já pode ser potencialmente considerada como um método simples e eficiente para o preparo de reagentes para imunoensaio.

As curvas obtidas com o meio de cultura coletado do biorreator, antes e após purificação em HPSEC, foram representadas em μL , visto que o produto não havia sido ainda purificado e, portanto, sem atividade específica definida. Isto também explica o porque das mesmas curvas não serem sobreponíveis às das preparações de referência. Com respeito a estas últimas, a não sobreposição das mesmas pode ser explicada pelo fato de apresentarem potências diferentes: hTSH WHO (4,93 UI/mg), NIDDK (1,5 UI/mg) e Genzyme (7,7 UI/mg). De fato, quando foram calculadas as potências relativas do padrão do NIDDK em relação ao da WHO ($0,26 \pm 0,06$; $n=6$) e da preparação da Genzyme, sempre em relação ao mesmo padrão ($1,43 \pm 0,16$; $n=6$) foram encontrados valores similares às atividades específicas nominais: 1,3 e 7,1 UI/mg, respectivamente. Assim, aplicando-se estes valores de potência relativa para o cálculo em ng das preparações do NIDDK e da Genzyme, as curvas resultaram praticamente sobreponíveis.

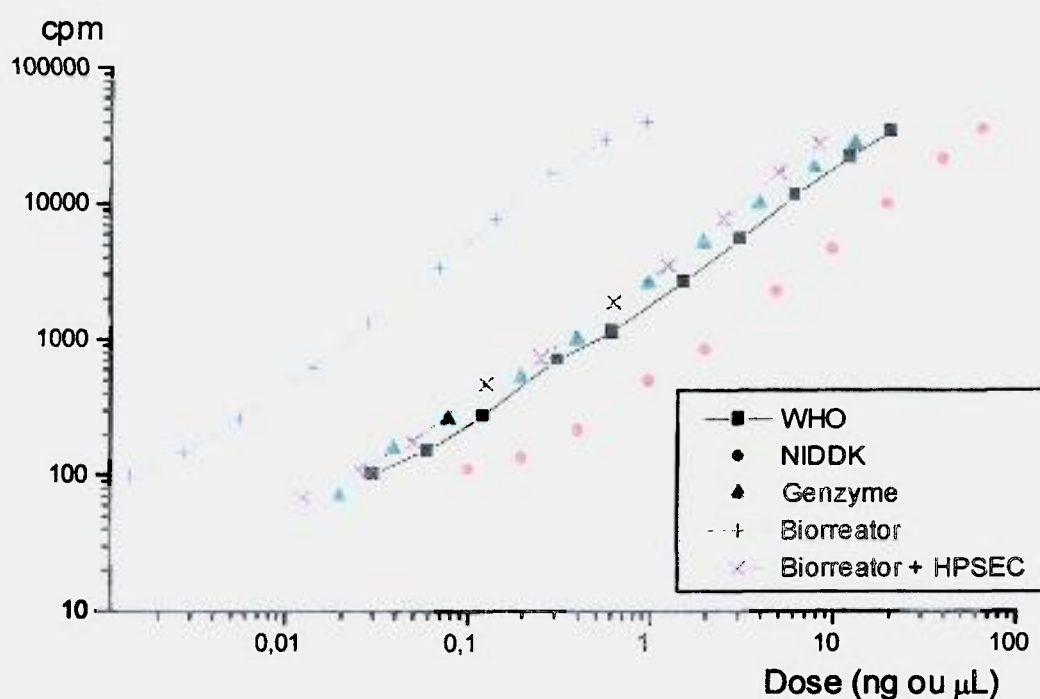


Fig. 10: Curvas dose-resposta obtidas por IRMA com diferentes preparações de hTSH utilizadas como padrão: **WHO**, segunda preparação do padrão primário internacional de hTSH hipofisário (WHO 80/558, 4,93 UI/mg); **NIDDK**, padrão secundário de hTSH hipofisário (NIDDK-hTSH RP1, 1,5 UI/mg); **Genzyme**, preparação de referência obtida a partir do hTSH recombinante da Genzyme (Thyrogen, 7,7 UI/mg); **Biorreator**, meio de cultura contendo hTSH recombinante coletado diretamente do biorreator; **Biorreator + HPSEC**, idem ao anterior após purificação em HPSEC. As curvas das duas preparações de hTSH obtidas a partir do biorreator encontram-se representadas em μL enquanto que as dos padrões hipofisários e do hTSH recombinante em ng.

3.4.3. Atividade biológica *in vivo*

A bioatividade *in vivo* do hTSH recombinante produzido no biorreator foi avaliada em camundongos, após supressão do TSH endógeno pela administração de triiodotironina (T_3), utilizando um bioensaio que não necessita de administração de radioisótopo nos animais (14).

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar para padronização da técnica em nosso laboratório, utilizando o hTSH obtido do biorreator em meio de cultura (α MEM +10% SFBd) e quantificado por IRMA, em comparação ao hTSH recombinante da Genzyme.

Os níveis de liberação de tiroxina (T_4), determinados por RIA, em resposta às diferentes doses das preparações de hTSH injetadas, encontram-se na Fig. 11, onde pode ser observada uma resposta similar em termos de bioatividade para as duas preparações recombinantes. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que ambas foram obtidas a partir de células CHO, possuindo portanto um tipo de glicosilação e um grau de sialilação muito próximos.

No experimento seguinte, foi também utilizada uma preparação de origem hipofisária (NIDDK-hTSH-I 8), além de uma dose maior das três preparações avaliadas, como pode ser observado na Fig. 12.

As duas preparações de hTSH recombinante apresentaram novamente uma resposta aproximadamente equivalente, enquanto que o hTSH hipofisário aparentemente apresentou uma bioatividade menor.

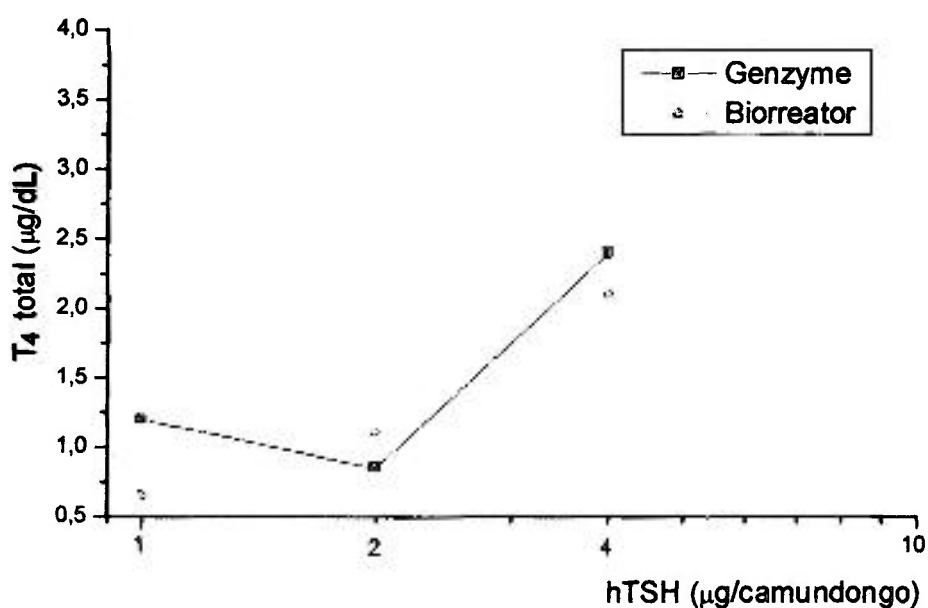


Fig. 11: Curvas dose-resposta relativas à atividade biológica do hTSH *in vivo*. A bioatividade foi determinada em camundongos, após supressão do TSH endógeno pela administração de T₃, durante 4-5 dias, como descrito em Materiais e Métodos. Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 200µL de diferentes doses das preparações de hTSH recombinante: a fornecida pela Genzyme (**Genzyme**) e a produzida no biorreator do IPEN, em meio de cultura (**Biorreator**). Os níveis de T₄ total foram determinados por RIA no plasma coletado 6h após a administração de hTSH.

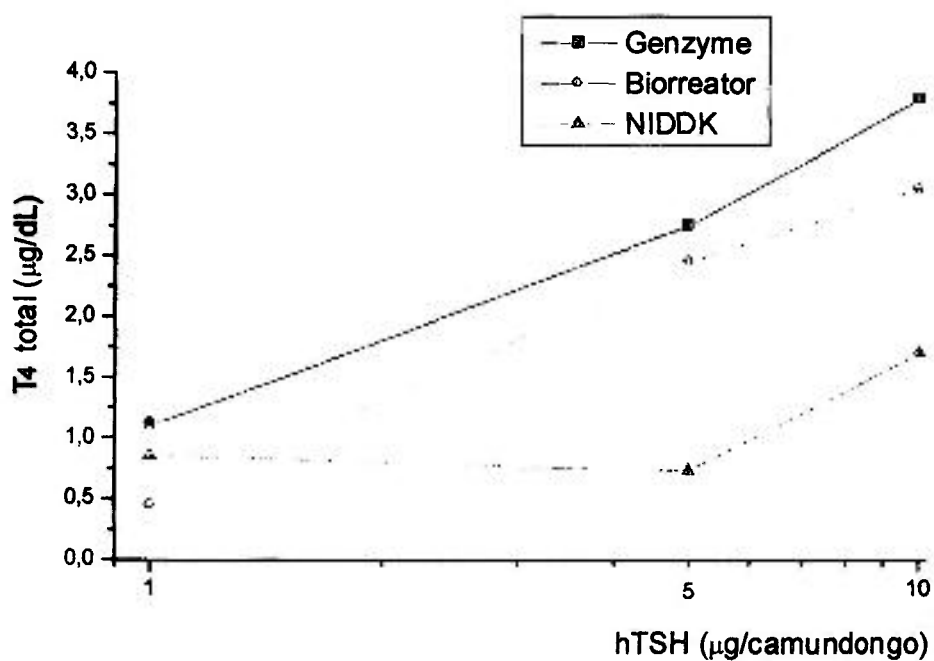


Fig. 12: Curvas dose-resposta relativas à determinação da atividade biológica do hTSH *in vivo*. A bioatividade foi determinada como descrito na Fig. 11. Foram utilizadas as duas preparações de hTSH recombinante já mencionadas e uma de origem hipofisária obtida do NIDDK (NIDDK-hTSH-I 8).

4. DISCUSSÃO

A expressão de altos níveis de hTSH recombinante, a partir de uma linhagem de células CHO estavelmente transfectadas com os genes das subunidades α e β desta glicoproteína, foi realizada a partir da utilização de dois vetores dicistrônicos contendo marcadores gênicos amplificáveis independentes, pEDdc (marcador DHFR) e pEAdc (marcador ADA), com os quais foram obtidos os respectivos sistemas de expressão para as duas subunidades: pEDdc- α e pEAdc- β hTSH.

A escolha pela utilização deste tipo de vetor dicistrônico baseou-se principalmente na necessidade de associar os genes das subunidades a um ou dois marcadores gênicos selecionáveis e amplificáveis, para facilitar inicialmente o processo de seleção das células transformadas e subsequentemente tornar possível a realização da coamplificação dos genes de interesse com consequente obtenção de altos níveis de expressão da proteína heteróloga (50). Kaufman e cols (48) já haviam mencionado as vantagens de utilização de uma unidade de transcrição dicistrônica contendo o gene da proteína de interesse associado ao gene do marcador de seleção/amplificação, visto que foi observado um aumento de expressão de aproximadamente 10 vezes em relação a um sistema convencional, onde cada gene encontra-se numa unidade de transcrição com seu próprio promotor. Com o posterior desenvolvimento de uma nova geração de vetores contendo uma sequência líder não traduzida do vírus da encefalomiocardite (EMC), possivelmente responsável por uma ligação ribossômica interna que possibilitaria uma tradução independente do marcador gênico, foi verificada uma consequente diminuição dos níveis de rearranjo ou deleção da proteína de interesse (47). A utilização subsequente de construções dicistrônicas contendo o fragmento EMC possibilitou a obtenção de altos rendimentos proteicos que se mantiveram estáveis mesmo na ausência dos respectivos agentes de seleção/amplificação (88,123).

A disponibilidade dos vetores pEDdc e pEAdc que possuem a sequência EMC e marcadores gênicos bastante utilizados, especialmente o da DHFR, foi aliada à vantagem de terem sido desenvolvidas células CHO deficientes no gene desta enzima (DHFR⁻) por Urlaub e cols. (114,115) possibilitando assim uma seleção imediata das células transformadas em meio de cultura sem a presença de nucleosídeos, acrescido de soro fetal bovino dialisado. No presente trabalho, o gene da subunidade α foi portanto clonado no vetor pEDdc, permitindo assim uma amplificação gênica mediante exposição a doses crescentes de metotrexato (MTX). Esta amplificação foi responsável pela obtenção de altos níveis de expressão da subunidade α , visto que foram isolados clones que apresentaram níveis de secreção da ordem de $200\mu\text{g } \alpha\text{hTSH}/10^6$ células/dia, valores que estão entre os mais altos já descritos na literatura.

Um excesso de subunidade α foi várias vezes relatado como sendo um importante pré-requisito para a obtenção de secreções eficientes das glicoproteínas hormonais pertencentes a esta família. Corless e cols. (10) verificaram que uma secreção eficiente do hormônio luteinizante humano (hLH) em células C-127 foi somente obtida quando a subunidade βhLH foi expressa na presença de excesso da subunidade α . Por outro lado, outros autores (43) observaram que, após transfecção de células CHO com vetores contendo os genes das subunidades α e β do LH bovino, ocorria inicialmente uma amplificação induzida por MTX somente do gene da α provavelmente por estar associado ao da DHFR. A formação do heterodímero também atingia uma concentração máxima em consequência da presença de um excesso de α , indicando que a taxa de combinação das subunidades dependia fundamentalmente das suas concentrações e afinidades recíprocas dentro do aparato secretório celular. No caso do hTSH, Matzuk e cols. (69) observaram que apenas 5% da sua subunidade β , transfectada em células CHO, foi secretada no meio, similarmente a 10% para a subunidade βhLH nas mesmas células, sendo que ocorreu uma rápida e eficiente heterodimerização na presença da subunidade α (69). No caso do hFSH, quando somente o gene da subunidade β foi transfectado em células CHO, houve também uma secreção lenta de menos de 20% desta subunidade. A cotransfecção com a subunidade α possibilitou o aproveitamento de 90% da subunidade βhFSH (53). Mais

recentemente, van de Wiel e cols. (117) utilizaram um sistema de expressão de FSH bovino em células de inseto (baculovírus) e sugeriram que a subunidade α atuaria como uma espécie de “*molecular chaperone*” para o aumento da estabilidade e secreção da subunidade β .

Além do isolamento do gene da subunidade α e obtenção do vetor de expressão pEDdc- α hTSH terem sido concluídos mais rapidamente, devido às considerações realizadas acima, foi inicialmente utilizada a transfecção do vetor desta subunidade em células CHO seguindo uma estratégia de transfecção sequencial, uma das alternativas existentes para introdução de genes heterólogos em células eucariotas visando a expressão de altos níveis de proteínas heterodiméricas recombinantes. Esta metodologia, que permite uma amplificação independente devida à presença de dois marcadores gênicos, já havia sido empregada com sucesso na obtenção de outras proteínas heterodiméricas. Assim, a amplificação gênica independente de dois clones isolados de células CHO contendo os genes da cadeia leve e pesada de uma imunoglobulina associados aos marcadores DHFR e ADA respectivamente, após fusão celular dos mesmos, resultou na obtenção de uma taxa de secreção de $60\mu\text{g Ig}/10^6$ células/48h (122). Já a utilização da própria estratégia de transfecção sequencial em células CHO, primeiramente transformadas com o gene da cadeia leve de um anticorpo monoclonal que foi amplificado por estar associado ao marcador DHFR e posteriormente selecionadas e amplificadas pela integração do gene da cadeia pesada associado ao marcador ADA, foi responsável por um rendimento de expressão de 80-110 $\mu\text{g mAB}/10^6$ células/dia, um dos valores mais altos relatados pela literatura, como já mencionado anteriormente (19).

Portanto, a primeira etapa do presente trabalho foi a obtenção de uma linhagem de células CHO com secreção estável da subunidade α hTSH. Inicialmente foram utilizadas células CHO selvagens para padronização de um protocolo de transfecção por lipossomas, uma das metodologias de uso corrente devido à sua praticidade e altas frequências de transformação (54).

As eficiências de transfecção (nº de células transformadas / nº de células transfectadas), após seleção das células CHO selvagens transformadas com os vetores pEDdc- α hTSH e pRSneo, foram comparáveis às relatadas na literatura para outras glicoproteínas (47,48), sendo que dessa maneira foi possível a determinação do melhor tempo de transfecção e a definição de um protocolo inicial de isolamento de clones, de seleção com geneticina (G418) e de amplificação com MTX, além da padronização de um radioimunoensaio específico para dosagem da subunidade α . A partir de células CHO selvagens foi portanto isolado um clone com taxa de secreção relativamente alta, maior que 6 μ g α hTSH /10⁶ células/dia, sendo que o objetivo subsequente foi a utilização de células CHO DHFR⁻. Mediante a utilização destas células deveria ser possível obter uma amplificação gênica mais eficiente com consequente incremento dos rendimentos proteicos (50).

Com relação à utilização de mutantes de CHO, foram primeiramente utilizadas células DHFR⁻ da linhagem DG-44 (115), pois estas seriam mais eficientes no processo de amplificação por apresentarem uma dupla deleção no gene da DHFR, sendo portanto a probabilidade de reversão da mutação praticamente inexistente em comparação às da linhagem DXB-11 que sofreram apenas uma mutação no gene desta enzima (114). Após isolamento dos clones das células CHO DG-44 transfectadas com o vetor pEDdc- α hTSH, foi verificado porém que os níveis de secreção desta subunidade foram quase que indetectáveis e não houve amplificação mediante exposição a doses crescentes de MTX. Esta ausência de amplificação gênica pode ter sido decorrente de uma localização apenas episomal com possível eliminação posterior do gene da subunidade α hTSH (50).

Com a mudança da técnica de transfecção para eletroporação, foram isolados clones derivados de CHO DG-44 que atingiram os altos níveis de expressão já mencionados (~ 200 μ g α hTSH /10⁶ células/dia). A eletroporação também é um método bastante utilizado, sendo que foi empregada na obtenção de altas taxas de secreção de outras proteínas heterólogas, como imunoglobulinas (122,123). Deve-se ressaltar porém que somente a alteração da técnica de transfecção não justificaria uma expressão proteica em níveis tão elevados, visto que a técnica dos lipossomas também

pode proporcionar uma integração estável do gene heterólogo no genoma do hospedeiro possibilitando assim uma amplificação gênica adequada (50).

Posteriormente, um dos clones que apresentaram secreção de α hTSH de forma estável foi sequencialmente transfectado com o vetor de expressão da subunidade β hTSH (pEAdc- β hTSH). Entretanto, os níveis de secreção do heterodímero não ultrapassaram 100ng hTSH/ 10^6 células/dia, antes da realização de uma segunda etapa de amplificação que seria induzida pelo gene da adenosina deaminase (ADA) presente neste vetor. Esta segunda amplificação deveria ter proporcionado um aumento considerável dos níveis de expressão (19), mas ainda não forneceu resultados interessantes provavelmente por falta de reagentes apropriados.

Com relação à estratégia de transfecção sequencial, podemos portanto concluir que mesmo tendo sido obtida uma alta expressão da subunidade α , não foi possível por enquanto uma secreção em níveis úteis da molécula heterodimérica.

O estudo da estratégia de cotransfecção dos vetores pEDdc- α hTSH e pEAdc- β hTSH foi realizado concomitantemente, sendo que já na transfecção transiente foi possível verificar a formação do heterodímero. A transfecção transiente é um método rápido e prático, bastante utilizado (19,46,47,48,73) para verificar a funcionalidade de um sistema de expressão ou comparar diferentes vetores, antes do estabelecimento de uma linhagem celular que apresente secreção estável da proteína heteróloga.

Os experimentos de cotransfecção para obtenção de linhagens celulares estavelmente secretoras foram realizados em células CHO DXB-11 pelo método do fosfato de cálcio, pois havia indicações (Dra. B. Miloux, comunicação pessoal) de que a utilização desta linhagem celular juntamente com este método de transfecção resultava em elevadas taxas de transformação com possibilidade de isolamento de clones que apresentam altos rendimentos da proteína heteróloga (73). Deve-se levar em consideração no entanto que cada laboratório encontra o seu próprio sistema ideal de transfecção ou mesmo amplificação gênica (46). Nestes experimentos de cotransfecção foram utilizadas diferentes proporções dos vetores de expressão, de acordo com uma estratégia também empregada por outros pesquisadores (9,42) para

obtenção de altos níveis de expressão de proteínas heterodiméricas. Dessa maneira foi isolado um clone que apresentou uma expressão de $5,7 \pm 1,0 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia após a amplificação gênica induzida por doses crescentes de MTX, um valor comparável ou até mesmo superior ao declarado por Cole e cols. (9), que também utilizaram um sistema de amplificação do gene da DHFR e obtiveram uma expressão de $4,5 \pm 1,7 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia, para o único clone utilizado até o momento na produção de hTSH recombinante (Thyrogen[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA).

A utilização subsequente do nosso clone num biorreator tipo "hollow-fiber" proporcionou um incremento de concentração de hTSH de aproximadamente 14 vezes, uma vez que a secreção, que em placas era da ordem de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g hTSH}/\text{mL}/\text{dia}$ (correspondente a $5,7 \pm 1,0 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia, mencionado acima), atingiu valores acima de $20 \mu\text{g hTSH}/\text{mL}/\text{dia}$ no biorreator. Este aumento de produtividade está de acordo com dados da literatura, na qual, mediante a utilização deste tipo de biorreator, foram relatadas secreções 3-13 vezes maiores do que as observadas com cultura celular em monocamadas (55,56,57). Além das vantagens de diminuição de custo e espaço de produção, o aumento de eficiência pode ser resultante de uma melhora no suprimento de nutrientes e na remoção de metabólitos tóxicos como lactato e amônia (62) e de uma possível melhora de aproveitamento de fatores específicos de estimulação celular decorrente de uma interação célula-célula mais intensa (56,86).

Durante este primeiro experimento de padronização das condições de produção em biorreator, os dados obtidos indicaram que somente a utilização do meio CHO-S-SFM II possibilitaria uma nutrição celular adequada, sendo que este meio foi também responsável por um grande aumento do número de células aderidas às paredes dos capilares do cartucho do biorreator. Este meio disponível comercialmente, cuja formulação não é revelada pelo fabricante, já havia proporcionado a obtenção de altas taxas de secreção de outras glicoproteínas, como eritropoetina (124), um receptor de endotoxina (100) e interferon- γ (30,31), além de possuir baixa quantidade de proteína e não utilizar soro. Isto resulta em vantagens no processo de purificação com

maior facilidade na eliminação de contaminantes, fator importante principalmente quando se trata de um produto injetável, da mesma maneira que o hormônio de crescimento recombinante produzido em nosso laboratório (79).

A associação da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC) a uma determinação imunológica por ensaio imunoradiométrico (IRMA) permitiu uma análise em termos de identidade, atividade e eficiência de expressão e secreção no próprio meio de cultura, coletado diretamente do biorreator, antes de qualquer etapa de purificação. Uma utilização semelhante de cromatografia por exclusão molecular em colunas do tipo "Sephadex" e determinação imunológica por RIA ou IRMA já havia sido descrita por outros autores na identificação do hTSH recombinante heterodimérico e de suas subunidades (121) e num estudo comparativo entre o hTSH recombinante e o hipofisário (38). A técnica de HPSEC havia sido também utilizada na identificação do pico de atividade do fator estimulador de formação de colônias de macrófago (M-CSF), quando a análise direta do meio de cultura de um clone isolado de células CHO possibilitou a identificação de duas formas desta proteína de pesos moleculares diferentes (105). Mais recentemente, em nosso laboratório, o emprego da HPSEC associada a um RIA também permitiu a identificação de dímeros e outras formas de alto peso molecular em preparações de hormônio de crescimento humano obtidas diretamente de fluídos de choques osmóticos bacterianos (11).

Uma caracterização imunológica preliminar do hTSH presente no meio de cultura coletado do biorreator, antes e após purificação em HPSEC, permitiu uma avaliação deste hormônio quando utilizado como padrão no IRMA em comparação com diferentes preparações de origem hipofisária e recombinante. A obtenção de curvas paralelas, quando utilizada a preparação de hTSH recombinante e as diferentes preparações de referência, forneceu indicações de que o produto obtido possui as características imunológicas necessárias para ser utilizado no preparo de reagentes para uso diagnóstico *in vitro*, tais como a própria preparação de referência (90, 118), traçadores (91) e, eventualmente, anticorpos.

O comportamento imunológico semelhante encontrado na análise das duas preparações recombinantes obtidas de células CHO, indica uma possível identidade em termos de glicosilação. O tipo de estrutura glicídica pode de fato influenciar as propriedades imunológicas dos hormônios glicoproteicos, podendo esta ainda estar relacionada às diferentes condições de produção em biorreator (103). Já Kashiway e cols. (45) haviam relatado que duas preparações de hTSH recombinante obtidas nas mesmas células e utilizadas como padrões em quatro diferentes sistemas de imunoensaio comerciais, apresentaram curvas com perfis similares às obtidas com uma preparação de referência de origem hipofisária. Estas diferentes preparações não foram porém utilizadas na determinação do mesmo hormônio glicoproteico circulante. Este fato que deve ser portanto levado em consideração quando se utiliza um hormônio glicoproteico recombinante como preparação de referência, devido à heterogeneidade de epítomos de reconhecimento por anticorpos, podendo haver comprometimento da validade analítica do ensaio (8,15). Entretanto, após uma avaliação e validação adequada, o hTSH recombinante certamente poderá ser utilizado como preparação de referência, sendo um reagente que pode ser obtido em alta pureza e com maior continuidade e homogeneidade, além de não apresentar reações cruzadas com outros hormônios como ocorre com preparações derivadas de hipófises humanas (92).

A escolha de um ensaio biológico *in vivo* baseou-se principalmente nas potenciais vantagens deste sistema em relação aos ensaios *in vitro*, uma vez que por utilizar o animal intacto ao invés de apenas células ou receptores isolados, é capaz de fornecer uma resposta global que, além da capacidade de ligação ao receptor, depende também do fluxo sanguíneo intratireoideano e da taxa de eliminação relacionada ao grau de glicosilação (103). Foi utilizado portanto o bioensaio padronizado por East-Palmer (14), que é bastante utilizado (26,28,41,102,104) por ser mais prático, rápido e não utilizar administração de radioisótopo no animal, como acontecia no ensaio clássico de McKenzie (71).

Os resultados de determinação de atividade biológica *in vivo* do hTSH recombinante obtido demonstraram que esta preparação possui uma resposta biológica equivalente à da preparação recombinante produzida pela Genzyme. Este

comportamento similar pode estar relacionado ao fato de que as duas preparações foram obtidas a partir de células CHO, possuindo portanto uma glicosilação e um grau de sialilação muito próximos, enquanto o hTSH hipofisário parece possuir uma bioatividade menor. Vários pesquisadores de fato observaram que as preparações de hTSH recombinante obtidas de células CHO permanecem por um tempo maior em circulação, por possuírem em geral um grau de sialilação maior que as obtidas de hipófises humanas, apresentando portanto uma atividade *in vivo* mais acentuada (14,41,103,104,109). Takeuchi e cols. (107) já haviam relatado que o grau de sialilação afeta as propriedades biológicas e físico-químicas de uma glicoproteína, pois os resíduos de ácido siálico da eritropoetina demonstraram ser importantes não somente por permitir que a mesma escape do sistema de eliminação hepática das asialoglicoproteínas, mas também contribuem para a estabilização conformacional, visto que a asialoeritropoetina é mais sensível à denaturação por calor e digestão por tripsina. Foi ainda observado que a expressão de hTSH em baculovírus, um sistema que não é capaz de sintetizar oligossacarídeos complexos terminados em ácido siálico, resultou num produto com uma resposta biológica menor *in vivo*, sendo portanto novamente evidenciado que uma das principais funções da adição dessas terminações em ácido siálico seria proteger as glicoproteínas de uma rápida eliminação pelos asialoreceptores existentes no fígado (28).

Estas considerações portanto confirmam o alto interesse clínico do produto obtido em células CHO, como já demonstrado pelos dados experimentais relatados para a utilização do hTSH recombinante seja em campo diagnóstico que terapêutico (61,72,95).

5. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A partir do isolamento dos genes das subunidades α e β hTSH foram construídos vetores de expressão dicistrônicos originais (pEDdc- α e pEAdc- β hTSH, respectivamente), os quais foram utilizados nas duas estratégias principais existentes para obtenção de altos níveis de expressão de glicoproteínas heterodiméricas recombinantes: transfecção sequencial e cotransfecção. Os níveis de expressão proteica obtidos indicaram que a cotransfecção apresentou-se como o método mais prático, rápido e eficiente para o isolamento de clones estavelmente secretores. Ainda se faz necessária uma melhor investigação sobre o mecanismo de amplificação gênica relativa à utilização do marcador ADA (adenosina deaminase);
- A utilização de diferentes proporções dos vetores de expressão nos experimentos de cotransfecção possibilitou o isolamento de um clone que apresentou uma expressão de $5,7 \pm 1,0 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia ($n=5$), um valor superior ao obtido pela Genzyme ($4,5 \pm 1,7 \mu\text{g hTSH}/10^6$ células/dia), a única firma que produz hTSH recombinante em quantidades comerciais até o momento. Com este clone foram iniciados os estudos para produção em escala piloto num biorreator do tipo "hollow-fiber", sendo que os resultados preliminares indicaram que as concentrações de hTSH obtidas (acima de $20 \mu\text{g hTSH}/\text{mL}/\text{dia}$) foram comparáveis ao valor declarado pela Genzyme para sua produção em larga escala ($15\text{-}30 \mu\text{g hTSH}/\text{mL}/\text{dia}$);
- Paralelamente foram obtidos clones capazes de apresentar níveis de secreção proteica (subunidade α) superiores àqueles relatados em geral na literatura;

- Os primeiros dados obtidos com o biorreator indicaram que será necessária a utilização do meio CHO-S-SFM II, o qual deverá ser disponível em grandes quantidades visando uma produção laboratorial e o início de um processo de purificação em escala piloto;
- Os estudos preliminares de caracterização físico-química, imunológica e biológica, realizados mediante utilização de HPSEC, IRMA e ensaio biológico *in vivo*, forneceram indicações de que o hTSH recombinante obtido possui as características necessárias para ser utilizado no campo diagnóstico e terapêutico para o acompanhamento e tratamento de carcinomas tireoideanos, além de outras possíveis aplicações, como no hipotireoidismo secundário. Esta preparação pode ser também considerada como potencialmente adequada para a obtenção de reagentes de uso diagnóstico *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BARTOLINI, P.; DIAS L.M.F.; MURATA, Y. Produção de hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, v. 45, p. 241-243, 1990.
2. BARTOLINI, P.; MORGANTI, L.E.; MURATA, Y.; RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; BELLINI, M.H.; SOARES, C.R.J. Utilization of DNA recombinant techniques for the preparation of radioimmunoassay reagents for pituitary hormones. In: IAEA Staff (Eds.). *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, IAEA, Vienna, 1992, p.p. 197-204.
3. BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P.; CAMILO, M.A. Improvement of reproductibility and quality control of human growth hormone radioiodination. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, v. 43, p. 93-100, 1988.
4. BENTON, W.D.; DAVIS, R.W. Screening λ -gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, v. 196, p. 180-182, 1977.
5. BOOTHBY, M.; RUDDON, R.W.; ANDERSON, C.; McWILLIAMS, D.; BOIME, I. A single gonadotropin α -subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 5121-5127, 1981.
6. CERPA-POLJAK, A.; BISHOP, L.A.; HORT, Y.J.; CHIN, C.K.H.; DeKROON R.; MAHLER, S. M.; SMITH, G.M.; STUART, M.C. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology*, v. 132, p. 351-355, 1993.
7. CHAKRABARTI, S.; SRINIVASAN, J.; LALL, L.; RAO, L.V.; TALWAR, G.P. Expression of biologically active human chorionic gonadotropin and its subunits by recombinant vaccinia virus. *Gene*, v. 77, p. 87-93, 1989.
8. CHAPPEL, S. Biological to immunological ratios: reevaluation of a concept (Editorial). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 70, p. 1494-1495, 1990.

* De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), Referências bibliográficas: NBR-6023, Rio de Janeiro, 1989.

9. COLE, E.S.; LEE, K.; LAUZIÈRE, K.; KELTON, C.; CHAPPEL, S.; WEINTRAUB, B.; FERRARA, D.; PETERSON, P.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; RICHARDS, S.; DICKRELL, L.; KLEEMAN, J.M.; McPHERSON, J.M.; PRATT, B.M. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. **Bio/Technology**, v. 11, p. 1014-1024, 1993.
10. CORLESS, C.L.; MATZUK, M.M.; BAMABHADHAN, J.V.; DRICHEVSKY, A.; BOIME, I. Gonadotropin beta subunits determine the role of assembly and the oligosaccharide processing of hormone dimer in transfected cells. **J. Cell Biol.**, v. 104, p. 1173-1181, 1987.
11. DALMORA, S.; OLIVEIRA, J.E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr. A**, v. 782, p. 199-210, 1997.
12. DORAI, H.; MOORE, G.P. The effect of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification on the expression of transfected immunoglobulin genes. **J. Immunol.**, v. 139, p. 4232-4241, 1987.
13. DRACOPOLI, N.C.; RETTIG, W.J.; WHITFIELD, G.K.; DARLINGTON, G.J.; SPENGLER, B.A.; BIEDLER, J.L.; OLD, L.J.; KOURIDES, I.A. Assignment of the gene for the β subunit of thyroid stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1822-1826, 1986.
14. EAST-PALMER, J.; SZKUDLINSKI, M.W.; LEE, J.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B. A novel, nonradioactive *in vivo* bioassay of thyrotropin (TSH). **Thyroid**, v. 5, p. 55-59, 1995.
15. EKINS, R. Future development in radioimmunoassay with particular reference to the needs of developing countries. In: IAEA Staff (Eds.). **Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine**, IAEA, Vienna, 1992, p.p. 3-51.
16. FARES, F.A.; SUGANUMA, N.; NISHIMORI, K.; LAPOLT, P.S.; HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin β subunit to the follitropin β subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4304-4308, 1992.
17. FARES, F.A.; YAMABE, S.; BEN-MENACHEM, D.; PIXLEY, M.; HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Conversion of thyrotropin heterodimer to a biologically active single-chain. **Endocrinology**, v. 139, p. 2459-2464, 1998.

18. FIDDES, J.C.; GOODMAN, H.M. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the α -subunit of human chorionic gonadotropin. **Nature**, v. 281, p. 351-356, 1979.
19. FOUSER, L.A.; SWANBERG, S.L.; LIN, B.; BENEDICT, M.; KELLEHER, K.; CUMMING, D.A.; RIEDEL, G.E. High level expression of a chimeric anti-ganglioside GD-2 antibody: genomic kappa sequences improve expression in COS and CHO cells. **Biotechnology**, v. 10, p. 1121-1127, 1992.
20. FRIEDMAN, J.S.; COFER, C.L.; ANDERSON, C.L.; KUSHNER, J.A.; GRAY, P.P.; CHAPMAN, G.E.; STUART, M.A.; LAZARUS, L.; SHINE, J.; KUSHNER, P.J. High expression in mammalian cells without amplification. **Bio/Technology**, v. 7, p. 359-362, 1989.
21. FROHMAN, M.A.; DUSH, M.K.; MARTIN, G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 8998-9002, 1988.
22. GESUNDHEIT, N.; ALEXANDER, J.K. Endocrine therapy with recombinant hormones and growth factors. In: WEINTRAUB, B.D. (Ed) **Molecular endocrinology**. New York: Raven Press, 1995, p.p. 491-507.
23. GESUNDHEIT, N.; WEINTRAUB, B.D. Mechanisms and regulation of TSH glycosylation. In: DHINDSA, D.S.; BAHL, O.P. (Eds) **Molecular and cellular aspects of reproduction**. New York: Plenum, 1986, p.p. 87-105.
24. GOOCHE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSON, D.C.; BAHR, J.B. The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. In: SIKDAR, T.P.; BIER, S.K. (Eds) **Frontiers in Bioprocessing**. Washington: American Chemical Society, v. II, 1992. p.p. 199-240.
25. GRAHAM, F.L.; VAN DER EB, A.G. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. **Virology**, v. 54, p. 536-539, 1973.
26. GROOSMANN, M.; SZKUDLINSKI, M.W.; TROPEA, J.E.; BISHOP, L.A.; THOTAKURA, N.R.; SCHOFIELD, P.R.; WEINTRAUB, B.D. Expression of human thyrotropin in cell lines with different glycosylation patterns combined with mutagenesis of specific glycosylation sites: characterization of a novel role for the oligosaccharides in the *in vitro* and *in vivo* bioactivity. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 29378-29385, 1995.
27. GROOSMANN, M.; WEINTRAUB, B.D.; SZKUDLINSKI, M.W. Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 476-501, 1997.

28. GROOSMANN, M.; WONG, R.; TEH, N.G.; TROPEA, J.E.; EAST-PALMER, J.; WEINTRAUB, B.D.; SZKUDLINSKI, M.W. Expression of biologically active human thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: effect of insect cell glycosylation on hTSH activity *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology**, v. 138, p. 92-100, 1997.
29. GUIDON Jr, P.T.; WHITFIELD, G.K.; PORTI, D.; KOURIDES, I. A. The human thyrotropin β -subunit gene differs in 5' structure from murine TSH- β genes. **DNA**, v. 7, p.691-699, 1988.
30. GU, X.; HARMON, B.J.; WANG, D.I.C. Site- and specific sialylation of recombinant human interferon- γ in Chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 55, p. 390-398, 1997.
31. GU, X.; XIE, L.; HARMON, B.J.; WANG, D.I.C. Influence of primatone RL supplementation on sialylation of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cell culture using serum-free media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, p. 353-360, 1997.
32. GYVES, P.W.; GESUNDHEIT, N.; THOTAKURA, N.R.; STANNARD, B.S.; DeCHERNEY, G.S.; WEINTRAUB, B.D. Changes in the sialylation and sulfation of secreted thyrotropin in congenital hypothyroidism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 3792-3796, 1990.
33. HARTREE, A.S.; RENWICK, A.G.C. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. **Biochem. J.**, v. 287, p. 665-679, 1992.
34. HAWLEY-NELSON, P.; CICCARONE, V.; GEBEYEHU, G.; JESSEE, J.; Lipofectamine[®] reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. **Focus**, v. 15, p. 73-79, 1993.
35. HAYASHIZAKI, Y.; MIYAI, K.; KATO, K.; MATSUBARA, K. Molecular cloning of the human thyrotropin- β subunit gene. **FEBS**, v. 188, p. 394-400, 1985.
36. HAY, I.D.; BAYER, M.F.; KAPLAN, M.M.; KLEE, G.G.; LARSEN, P.R.; SPENCER, C.A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. **Clin. Chem.**, v. 37, p. 2002-2008, 1991.
37. HOHN, B. *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. **Methods Enzymol.**, v. 68, p. 299-308, 1979.

38. HUSSAIN, A.; ZIMMERMAN, C.A.; BOOSE, J.A.; FROEHLICH, J.; RICHARDSON, A.; HOROWITZ, R.S.; COLLINS, M.T.; LASH, R.W. Large scale synthesis of recombinant human thyrotropin using methotrexate amplification: chromatographic, immunological and biological characterization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 81, p. 1184-1188, 1996.
39. IRONSIDE, J.W. Prion diseases in man. *J. Pathol.*, v. 186, p. 227-234, 1998.
40. ISRAEL, D.I.; KAUFMAN, R.J. Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucocorticoid receptor. *Nucl. Acid. Res.*, v. 17, p. 4589-4604, 1989.
41. JOSHI, L.; MURATA, Y.; WONDISFORD, F.E.; SZKUDLINSKI, M.W.; DESAI, R.; WEINTRAUB, B.D. Recombinant thyrotropin containing a β -subunit chimera with the human chorionic gonadotropin- β carboxy-terminus is biologically active, with a prolonged plasma half-life: role of carbohydrate in bioactivity and metabolic clearance. *Endocrinology*, v. 136, p. 3839-3848, 1995.
42. KAETZEL, D.M.; BROWNE, J.K.; WONDISFORD, F.E.; NETT, T.M.; THOMASON, A.R.; NILSON, J.H. Expression of biologically active bovine luteinizing hormone in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 7280-7283, 1985.
43. KAETZEL, D.M.; NILSON, J.H. Methotrexate-induced amplification of the bovine lutropin genes in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 6344-6351, 1988.
44. KAGAWA, Y.; TAKASAKI, S.; UTSUMI, J.; HOSOI, K.; SHIMIZU, H.; KOCHIBE, N.; KOBATA, A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon- β 1 and recombinant human interferon- β 1 produced by three different mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 17508-17515, 1988.
45. KASHIWAI, T.; ICHIHARA, K.; ENDO, Y.; TAMAKI, H.; AMINO, N.; MIYAI, K. Immunological and biological characteristics of recombinant human thyrotropin. *J. Immunol. Methods.*, v. 143, p. 25-30, 1991.
46. KAUFMAN, R.J. Amplification and expression of transfected genes in mammalian cell. In: HELLEMS, R.E. (Ed) **Gene amplification in mammalian cells**. New York: Marcel Dekker, 1992, p.p. 315-343.
47. KAUFMAN, R.J.; DAVIES, M.V.; WASLEY, L.C.; MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucl. Acid. Res.*, v. 19, p. 4485-4490, 1991.

48. KAUFMAN, R.J.; MURTHA, P.; DAVIES, M.V. Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells **EMBO J.**, v. 6, p. 187-193, 1987.
49. KAUFMAN, R.J.; MURTHA, P.; INGOLIA, D.E.; YEUNG, C.Y.; KELLEMS, R.E. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 3136-3140, 1986.
50. KAUFMAN, R.J. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. **Meth. Enzymol.**, v. 185, p. 537-566, 1990.
51. KAUFMAN, R.J.; WASLEY, L.C.; SPILIOTES, A.J.; GOSSELS, S.D.; LATT, S.A.; LARSEN, G.R.; KAY, R.M. Coamplification and coexpression of human tyssue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 1750-1759, 1985.
52. KEENE, J.L.; MATZUK, M.M.; BOIME, I. Expression of recombinant human choriogonadotropin in Chinese hamster ovary glycosylation mutants. **Mol. Endocrinol.**, v. 3, p. 2011-2017, 1989.
53. KEENE, J.L.; MATZUK, M.M.; OTANI, T.; FAUSER, B.C.J.M.; GALWAY, A.B.; HSUEH, A.J.W.; BOIME, I. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 4769-4775, 1989.
54. KIM, S.J.; KIM, N.S.; RYU, C.J.; HONG, H.J.; LEE, G.M. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 58, p. 73-84, 1997.
55. KNAZEK, R.A.; KOHLER, P.O.; GULLINO, P.M. Hormone production by cells grown *in vitro* on artificial capillaries. **Exptl. Cell Res.**, v. 84, p. 251-254, 1974.
56. KNAZEK, R.A.; WU, Y.; AEBERSOLD, P.M.; ROSENBERG, S.A. Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors. **J. Immunol. Methods**, v. 127, p. 29-37, 1990.
57. KNIGHT, P. Hollow fiber bioreactors for mammalian cell culture. **Bio/Technology**, v. 7, p. 459-461, 1989.
58. KONIG, R.; ASHWELL, G.; HANOVER, J.A. Overexpression and biosynthesis of CD4 in Chinese hamster ovary cells: coamplification using the multiple drug resistance gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 9188-9192, 1989.

59. KOURIDES, I.A.; WEINTRAUB, B.D.; LEVKO, M.A.; MALOOF, F. Alpha and beta subunits of human thyrotropin: purification and development of specific radioimmunoassays. **Endocrinology**, v. 94, p. 1411-1421, 1974.
60. LADENSON, P.W.; BRAVERMAN, L.E.; MAZZAFERRI, E.L.; BRUGER-DAVIS, F.; COOPER, D.S.; GARBER, J.R.; WONDISFORD, F.E.; DAVIES, T.F.; DeGROOT, L.J.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; WEINTRAUB B.D. Comparison of administration of recombinant human thyrotropin with withdrawal of thyroid hormone for radioactive iodine scanning in patients with thyroid carcinoma. **N. Engl J. Med.**, v. 25; p. 888-896, 1997.
61. LADENSON, P.W. Strategies for thyrotropin use to monitor patients with treated thyroid carcinoma. **Thyroid**, v. 9, p. 429-433, 1999.
62. LAO, M.; TOTH, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnol. Prog.**, v. 13, p. 688-691, 1997.
63. LASH, R.W.; DESAI, R.K.; ZIMMERMAN, C.A.; FLACK, M.R.; YOSHIDA, T.; WONDISFORD, F.E.; WEINTRAUB, B.D. Mutations of the human thyrotropin- β subunit glycosylation site reduce thyrotropin synthesis independent of changes in glycosylation status. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 15, p. 255-263, 1992.
64. LIN, J.; WANG, M.; ANDREWS, W.H.; WYDRO, R.; MORSER, J. Expression efficiency of the human thrombomodulin-encoding gene in various vector and host systems. **Gene**, v. 147, p. 287-292, 1994.
65. LIU, D.T. Glycosylation pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations, and the US Orphan Drug Act. **Trends Biotechnol.**, v. 10, p. 114-120, 1992.
66. LOUMAYE, E.; MARTINEAU, I.; PIAZZI, A.; O'Dea, L.; INCE, S.; HOWLES, C.; DECOSTERD, G.; LOON, K.V.; GALAZKA, A. Clinical assessment of human gonadotrophins produced by recombinant DNA technology. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 95-107, 1996.
67. LUCAS, B.K.; GIERE, L.M.; DeMARCO, R.A.; SHEN, A.; CHISOLM, V.; CROWLEY, C.W. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. **Nucl. Acids Res.**, v. 24, p. 1774-1779, 1996.
68. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.

69. MATZUK, M.M.; KORNMEIER, C.M.; WHITFIELD, G.K.; KOURIDES, I.A.; BOIME, I. The glycoprotein α -subunit is critical for secretion and stability of the human thyrotropin β -subunit. ***Mol. Endocrinol.***, v. 2, p. 95-100, 1988.
70. MATZUK, M.M.; KRIEGER, M.; CORLESS, C.L.; BOIME, I. Effects of preventing O-glycosylation on the secretion of human chorionic gonadotropin in Chinese hamster ovary cells. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v. 84, p. 6354-6358, 1987.
71. McKENZIE, J.M. The bioassay of thyrotropin in serum. ***Endocrinology***, v. 63, p. 372-382, 1958.
72. MEYER, C.A.; BRAVERMAN, L.E.; EBNER, S.A.; VERONIKIS, I.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; DERASKA, D.J.; DAVIES, T.F.; VALENTINE, M.; DEGROOT, L.J.; CURRAN, P.; McELLIN, K.; REYNOLDS, J.; ROBBINS, J.; WEINTRAUB, B.D. Diagnostic use of recombinant human thyrotropin in patients with thyroid carcinoma (Phase I/II study). ***J. Clin. Endocrinol. Metab.***, v. 78, p. 188-196, 1994.
73. MILOUX, B.; LUPKER, J.H. Rapid isolation of highly recombinant Chinese Hamster Ovary cell lines. ***Gene***, v. 149, p. 341-344, 1994.
74. MONACO, L.; TAGLIABUE, R.; GIOVANAZZI, S.; BRAGONZI, A.; SORIA, M.R. Expression of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in CHO dhfr⁻ cells: new insights into the *in vitro* amplification expression system. ***Gene***, v. 45, p. 145-150, 1996.
75. MORRIS, J.C.; JIANG, N.S.; CHARLESWORTH, M.C.; McCORMICK, D.J.; RYAN, R.J. The effects of synthetic, α -subunit peptides on thyrotropin interaction with its receptor. ***Endocrinology***, v. 123, p. 456-462, 1988.
76. MORRIS, J.C.; McCORMICK, D.J.; RYAN, R.J. Inhibition of thyrotropin binding to receptor by synthetic human thyrotropin β peptides. ***J. Biol. Chem.***, v. 265, p. 1881-1884, 1990.
77. MORY, Y.; BEN-BARAK, J.; SEGEV, D.; COHEN, B.; NOVICK, D.; FISCHER, D.G.; RUBINSTEIN, M.; KARGMAN, S.; ZILBERSTEIN, A.; VIGNERON, M.; REVEL, M. Efficient constitutive production of human IFN- γ in Chinese hamster ovary cells. ***DNA***, v. 5, p. 181-193, 1986.
78. OKAYAMA, H.; BERG, P. High efficiency cloning of full-length DNA. ***Mol. Cell Biol.***, v. 2, p. 161-170, 1982.

79. OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; PERONI, C.N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M.H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. **J. Chromatogr. A**, v. 852, p. 441-450, 1999.
80. PAREKH, R.B.; PATEL, T.P. Comparing the glycosylation patterns of recombinant glycoproteins. **Trends Biochem. Technol.**, v. 10, p. 276-280, 1992.
81. PAREKH, R.B.; RAYMOND, A.; DWEK, R.A.; RUDD, P.M.; THOMAS, J.R.; RADEMACKER, T.W.; WARREN, T.; WUN, T.C.; HEBERT, B.; REITZ, B.; PALMIER, M.; RAMABHADRAN, T.; TIEMIER, D.C. N-glycosylation and *in vitro* enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells and a murine cell line. **Biochemistry**, v. 28, p. 7670-7679, 1989.
82. PATEL, H.; BRAMALL, J.; WATERS, H.; DeBEER, M.C.; WOO, P. Expression of recombinant human serum amyloid A in mammalian cells and demonstration of the region necessary for high-density lipoprotein binding and amyloid fibril formation by site-directed mutagenesis. **Biochem. J.**, v. 318, p. 1041-1049, 1996.
83. PERONI, C.N.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Sensitive human thyrotropin immunoradiometric assay set up by the identification and minimization of nonspecific bindings. **J. Immunoassay**, v. 18, p. 247-265, 1997.
84. PERSANI, L.; BORGATO, S.; ROMOLI, R.; ASTERIA, C.; PIZZOCARO, A.; BECK-PECCOZ, P. Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2486-2492, 1998.
85. PERSANI, L.; TONACCHERA, M.; BECK-PECCOZ, P.; VITTI, P.; MAMMOLI, C.; CHIOVATO, L.; ELISEI, R.; FAGLIA, G.; LUDGATE, M.; VASSART, G.; PINCHERA, A. Measurement of cAMP accumulation in Chinese hamster ovary cells transfected with the recombinant human TSH receptor (CHO-R): a new bioassay for human thyrotropin. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 16, p. 511-519, 1993.
86. PETERS, A.; HEUER, H.; SCHOMBURG, L.; de GREEF, W.J.; VISSER, T.J.; BAUER, K. Thyrotropin-releasing hormone gene expression by anterior pituitary cells in long-term cultures is influenced by the culture conditions and cell-to-cell interactions. **Endocrinology**, v. 138, p. 2807-2811, 1997.
87. PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 466-495, 1981.

88. PU, H.; CASHION, L.M.; KRETSCHMER, P.J.; LIU, Z. Rapid establishment of high-producing cell lines using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. **Mol. Biotechnol.**, v. 10, p. 17-25, 1998.
89. REDDY, V.B.; BECK, A.K.; GARRAMONE, A.J.; VELLUCCI, V.; LUSTBADER, J.; BERNSTINE, E.G. Expression of human choriogonadotropin in monkey cells using a single simian virus 40 vector. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3644-3648, 1985.
90. RIBELA, M.T.C.P.; BIANCO, A.C.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 249-256, 1996.
91. RIBELA, M.T.C.P.; CAMARGO, I.M.C.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. Single step purification of recombinant human growth hormone (hGH) directly from bacterial osmotic fluids, for the purpose of ^{125}I -hGH preparation. **Submitted to publication.**
92. RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J. Immunol. Methods**, v. 159, p. 269-274, 1993.
93. RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; MORGANTI, L.E.; ARAÚJO, E.A.; SOARES, C.R.J.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P. In-house reagent preparation for the setting up of a magnetic immunoradiometric assay (IRMA) for hTSH. In: IAEA Staff (Eds.). **Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine**, IAEA, Vienna, p.p. 225-233, 1992.
94. ROBBINS, J. Pharmacology of bovine and human thyrotropin: an historical perspective. **Thyroid**, v. 9, p. 451-453, 1999.
95. RUDAVSKY, A.Z.; FREEMAN, L.M. Treatment of scan-negative, thyroglobulin-positive metastatic thyroid cancer using radioiodine ^{131}I and recombinant human thyroid stimulating hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 11-14, 1997.
96. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSTON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
97. SANTELL, L.; RYLL, T.; ETCHEVERRY, T.; SANTORIS, M.; DUTINA, G.; WANG, A.; GUNSON, J.; WARNER, T.G. Aberrant metabolic sialylation of recombinant proteins expressed in Chinese hamster ovary cells in high productivity cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, p. 132-137, 1999.

98. SCHAAF, L.; LEIPRECHT, A.; SAJI, M.; HÜBNER, U.; USADEL, K.H.; KOHN, L.D. Glycosylation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 132, p. 185-194, 1997.
99. SCHRÖDER, M.; FRIEDL, P. Overexpression of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 53, p. 547-559, 1997.
100. SCHÜTT, C; FÜRL, B.; STELTER, F.; JACK, R.S.; WITT, S. CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 99-102, 1997.
101. SOMPAYRAC, L.M.; DANNA, K.J. Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7575-7578, 1981.
102. SZKUDLINSKI, M.W.; TEH, N.G.; GROSSMANN, M.; TROPEA, J.E.; WEINTRAUB, B.D. Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues. **Nature Biotechnol.**, v. 14, p. 1257-1263, 1996.
103. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTHAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B.D. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese hamster ovary cells: The role of sialylation and sulfation in TSH bioactivity. **Endocrinology**, v. 133, p. 1490-1503, 1993.
104. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTHAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. Subunit-specific functions of N-linked oligosaccharides in human thyrotropin: Role of terminal residues of α - and β -subunit oligosaccharides in metabolic clearance and bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 9062-9066, 1995.
105. TAKAHASHI, M.; NISHIDA, T.; TAKANO, M.; YAMANISHI, K.; SHIMOKURA, M.; OHMOTO, Y.; AIHARA, K.; ICHIKAWA, H.; NAKAI, S.; HIRAI, Y.; ADACHI, M. Purification and characterization of recombinant human macrophage colony-stimulating factor expressed in Chinese hamster ovary cells. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 57, p. 915-921, 1993.
106. TAKATA, K.I.; WATANABE, S.; HIRONO, M.; TAMAKO, M.; TERAOKA, H.; HAYASHIZAKI, Y. The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH β subunit. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 165, p. 1035-1042, 1989.

107. TAKEUCHI, M.; TAKASAKI, S.; MIYAZAKI, H.; KATO, T.; HOSHI, S.; KOCHIBE, N.; KOBATA, A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 3657-3663, 1988.
108. THORNER, M.O.; VANCE, M.L.; LAWS, E.R.; HORVATH, E.; KOVACS, K. The anterior pituitary. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. (Eds) *Williams Textbook of Endocrinology*. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1998, p.p. 249-340.
109. THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; BATES, L.G.; COLE, E.S.; PRATT, B.M.; WEINTRAUB, B.D. Biological activity and metabolic clearance of a recombinant human thyrotropin produced in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, v. 128, p. 341-348, 1991.
110. THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of thyrotropin α - and β subunits in hormone action. *Endocrinology*, v. 131, p. 82-88, 1992.
111. THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D.; BAHL, O.P. The role of carbohydrate in human chorionadotropin (hCG) action. Effects of N-linked carbohydrate chains from hCG and other glycoproteins on hormonal activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 70, p. 263-272, 1990.
112. THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. N-glycans of thyrotropin and gonadotropins: their physiological relevance. *Glyconews*, v. 2, p. 1-4, 1993.
113. TORJENSEN, P.A.; SAND, T.; NORMAN, N.; TRYGSTAD, O.; FOSS, I. Isolation of LH, FSH and TSH from human pituitaries after the removal of hGH. *Acta Endocrinol.*, v. 77, p. 485-497, 1974.
114. URLAUB, G.; CHASIN, L.A. Isolation of Chinese hamster ovary cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, p. 4216-4220, 1980.
115. URLAUB, G.; KÄS, E.; CAROTHERS, A.M.; CHASIN, L.A. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*, v. 33, p. 405-412, 1983.
116. USHIDA, Y.; NATSUKA, S.; SHIMOKAWA, Y.; TAKATSU, Z.; SHIMAMURA, S.; HASE, S. Structures of the sugar chains of recombinant macrophage colony-stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells. *J. Biochem.*, v. 122, p. 148-156, 1997.

117. van de WIEL, D.F.M.; van RIJN, P.A.; MELOEN, R.H.; MOORMANN, R.J.M.
High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 83-98, 1998.
118. WATANABE, S.; HAYASHIZAKI, Y.; ENDO, Y.; HIRONO, M.; TAKIMOTO, N.; TAMAKI, M.; TERAOKA, H.; MIYAI, K.; MATSUBARA, K. Production of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 149, p. 1149-1155, 1987.
119. WONDISFORD, F.E.; MAGNER, J.A.; WEINTRAUB, B.D. Thyrotropin. In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (Eds). **The thyroid a fundamental and clinical text**. 6. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1991. p.p. 257-276.
120. WONDISFORD, F.E.; RADOVICK, S.; MOATES, J.M.; USALA, S.J.; WEINTRAUB, B.D. Isolation and characterization of the human thyrotropin β -subunit gene. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 12538-12542, 1988.
121. WONDISFORD, F.E.; USALA, S.J.; DeCHERNEY, G.S.; CASTREN, M.; RADOVICK, S.; GYVES, P.W.; TREMPER, J.P.; KERFOOT, B.P.; NIKODEM, V.M.; CARTER, B.J.; WEINTRAUB, B.D. Cloning of the human thyrotropin β -subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. **Mol. Endocrinol.**, v. 2, p. 32-39, 1988.
122. WOOD, C.R.; DORNER, A.J.; MORRIS, G.E.; ALDERMAN, E.M.; WILSON, D.; O'HARA, R.M.; KAUFMAN, R.J. High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3011-3016, 1990.
123. WOOD, C.R.; MORRIS, G.E.; ALDERMAN, E.M.; FOUSER, L.; KAUFMAN, R.J. An internal ribosome binding site can be used to select for homologous recombinants at an immunoglobulin heavy-chain locus. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 8006-8010, 1991.
124. YOON, S.K.; AHN, Y.; KWON, I.; HAN, K.; SONG, J.Y. Influence of reducing agents on the secretion rate of recombinant erythropoietin from CHO cells. **Biotechnol. Letters**, v. 20, p. 101-104, 1998.
125. ZENG, S.; DINTER, A.; EISENKRÄTZER, D.; BISELLI, M.; WANDREY, C.; BERGER, E.G. Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged β 1,6N-acetylglucosaminyltransferase in CHO cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, p. 653-658, 1997.