

EDITORIAL



PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO POR TÉCNICAS DE DNA-RECOMBINANTE

Paolo Bartolini, Ligia Morganti F. Dias e Yoko Murata

RHCFAP/2400

BARTOLINI, P. e col. — Produção de hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 49(6): 241-243, 1990.

DESCRIPTORES: Hormônio de crescimento humano. DNA-Recombinante, Engenharia genética. Bactérias transformadas.

O hormônio de crescimento humano (hGH) teve sua presença na hipófise anterior postulada há quase setenta anos por Evans e Long⁴ e sua primeira extração hipofisária foi realizada em 1956¹⁴. Ele tem sido utilizado nas últimas três décadas e, até ao redor de 1980, foi possível obtê-lo somente através de extração de hipófises de cadáveres, desde que este hormônio é espécie-específico. Estas glândulas humanas são obviamente disponíveis em quantidades limitadas e de difícil obtenção por razões ético-jurídicas e morais. Basta lembrar que as leis brasileiras são altamente restritivas no sentido da obtenção destes órgãos. Além disto, estas glândulas podem apresentar contaminações de altíssimo risco para a vida do paciente. Isto devido à possibilidade, já relatada em quatro casos, da transmissão de um vírus lento causador da doença de Creutzfeld-Jacob².

Em 1979 pesquisadores da famosa sociedade californiana de biotecnologia "Genentech" publicaram o relato da síntese e expressão do gene do hGH em bactérias (*E. coli*)⁷. Tratava-se na realidade de metionil-hGH, ou seja, do produto natural acrescentado de uma metionina inicial, codificada pelo "starting codon"-ATG. Este, co-

mo é sabido, representa o sinal para a iniciação da síntese protéica. Esta síntese do hGH foi realizada numa parte por via química (aminoácidos 1-23) e noutra por via enzimática (aminoácidos 24-191). O produto assim obtido foi denominado "Protropin" e teve sua comercialização autorizada pela autoridade norte-americana competente (Food & Drug Administration — FDA) somente em 1985. Isto ocorreu após cinco anos de testes clínicos e toxicológicos, mas já em 1986 proporcionou à Genentech uma arrecadação de aproximadamente quarenta milhões de dólares.

Em 1984 o grupo japonês dirigido por Morio Ikehara¹² realizou pela primeira vez a síntese química completa do gene que codifica o hGH. Isto resultou da síntese do gene mais comprido realizada até então: 584 pares de bases. Lembremos que a síntese dos 78 fragmentos necessários (de 7-26 bases cada) para a construção da sequência inteira, foi realizada de maneira completamente manual, desde que na época ainda não eram disponíveis os sintetizadores auto-

máticos de oligonucleotídeos. Neste caso o produto obtido também foi metionil-hGH, cuja expressão e estocagem ocorrem no citoplasma bacteriano.

Também em 1984, Gray e col.⁹, novamente da Genentech, demonstraram que as bactérias, após 10⁹ anos de evolução, ainda reconhecem a sequência sinalizadora do hGH. A sequência de 26 aminoácidos informa os mecanismos celulares pelos quais a proteína em questão deve ser secretada. Isto acontece após clivagem do mesmo sinal peptídico mediante endopeptidases específicas. Nas células hipofisárias somatotróficas este processo é realizado na membrana do retículo endoplasmático, enquanto que nas bactérias ocorre na membrana interna, com consequente secreção do hGH maduro no espaço periplásmico. Com base nestes dados a Genentech⁸ e a firma francesa "Sanofi"⁵ realizaram a síntese e a secreção periplásmica do hGH utilizando a própria sequência sinalizadora humana, enquanto que o laboratório "Lilly" de Indianapolis-EUA realizou procedimento análogo utilizando porém uma sequência sinalizadora bacteriana (ompA). Chegou-se assim à obtenção da molécula sintética de hGH-Recombinante idêntica a do hormônio hipofisário (hGH autêntico).

Divisão de Medicina, Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEN/São Paulo.

co) com secreção e estocagem no periplasma: um ambiente mais adequado para a formação da correta estrutura e conformação molecular⁸. Hormônio de crescimento humano autêntico também foi obtido pela firma dinamarquesa "Nordisk-Gentofte" mediante adição de uma extensão aminoterminal, posteriormente removida mediante exopeptidase³.

A última geração de bactérias transformadas por engenharia para fins de produção de hGH, é aquela que realiza a excreção direta para o meio de cultura. O grupo italiano "Enichem" explorou as diferentes características de membrana do "*Bacillus subtilis*", utilizando a seqüência sinalizadora da subtilisina, uma protease extracelular produzida por esta bactéria (Grandi G., comunicação pessoal). Kato e col.¹³ obtiveram essa excreção introduzindo o gene sintético de hGH num vetor de expressão que, além de conter o sinal seqüencial da penicilinase que dirige a proteína madura através da membrana interna, contém também outro gene (kil) que permeabiliza a parede externa da bactéria. Hsiung e col.¹¹ chegaram ao mesmo resultado, sempre com *E. coli*, utilizando dois vetores: o primeiro regulando a expressão do hGH e o segundo da proteína liberadora de bacteriocina (BRP), um fator que permeabiliza a membrana interna e externa da bactéria e permite a excreção de proteínas citoplasmáticas para o meio de cultura.

É bom lembrar que o hormônio de crescimento humano não foi

clonado e expressado somente em bactérias, mas também em células eucariotas, como aquelas de "*Saccharomyces cerevisiae*"¹⁷, e de mamíferos. Estas últimas permitem a obtenção, em meio de cultura mais caro e complexo, de grandes quantidades (até mais de 200 mg/litro) desta proteína. Lupker e col.¹⁵ do grupo Sanofi utilizaram para essa finalidade uma linhagem de células renais (Vero) de macaco enquanto que a firma "Serono" de Genebra-Suíça (comunicação pessoal) e Friedman e col.⁶ utilizaram células de ovário de hamster chinês (CHO).

Existe enfim, numa perspectiva diferente e extremamente interessante, o trabalho de Morgan e col. do MIT-Harvard¹⁶ descrevendo a introdução do gene de hGH-Recombinante em queratinócitos humanos. Estas células transformadas, capazes de secretar hGH, foram enxertadas no tecido subcutâneo de camundongos atímicos. Apesar das grandes dificuldades ainda existentes, é óbvia a importância desse resultado no sentido de se chegar a uma administração de hGH "in vivo", mediante enxertos adequados e sem a necessidade de extrações e purificações.

No Brasil, a Divisão de Medicina do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN-CNEN/São Paulo, utilizando técnicas de DNA-Recombinante, realizou a construção de um vetor de expressão original que permite a secreção periplásmica de hormô-

nio de crescimento humano autêntico, numa cepa de bactérias transformadas. O trabalho foi realizado de forma completa e independente a partir de mRNA de extração hipofisária e através da síntese de cDNA, da clonagem e "screening" de uma genoteca de cDNA hipofisária, até a construção de dois diferentes vetores de expressão. Foram obtidos rendimentos de até 5 µg de hGH por mililitro, por unidade de densidade óptica (A₆₀₀). O produto extraído e purificado resultou perfeitamente idêntico ao hormônio de origem hipofisária, o que foi comprovado através de testes físico-químicos, radioimunológicos e biológicos. O ensaio biológico em ratos hipofisectomizados, realizado mediante técnicas padronizadas em nosso laboratório¹, apresentou uma potência comparável àquela do padrão internacional da Organização Mundial da Saúde, cuja atividade biológica é de 2,6 UI/mg.

Estão agora sendo ultimados os testes pré-clínicos, necessários para poder passar à fase de estudos clínicos, implementando ao mesmo tempo a produção até alcançar uma escala de nível semi-industrial e, posteriormente, de nível industrial. Isto deverá permitir, por um preço acessível, o atendimento de grande parte da população brasileira que apresenta deficiência total ou parcial deste hormônio, visando também várias e diferentes aplicações que, como mostra a recente literatura médica, podem apresentar grande interesse terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTOLINI, P. & MURAMOTO, E. — Bioassay of hGH: standardization of more economical assay designs. *Horm. Metab. Res.*, 16: 614, 1984.
2. BROWN, P.; GAJDUSEK, D. C.; GIBBS, JR, C. J. & ASHER, D. M. — Potential epidemic of Creutzfeld-Jacob disease from human growth hormone therapy. *New Engl. J. Med.*, 313: 729, 1985.
3. DALBØGE, H.; DAHL, H. M.; PEDERSEN, J.; HANSEN, J. W. & CHRISTENSEN, T. — A novel enzymatic method for production of authentic hGH from an *Escherichia coli* produced hGH precursor. *Biotechnology*, 5: 161, 1984.
4. EVANS, H. M. & LONG, J. A. — The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally, upon growth, maturity and oestrus cycles of the rat. *Anat. Record.*, 21: 62, 1921.
5. FERRARA, P. — hGH: production by genetic engineering of a hormone identical to the natural 22 K hormone. In: Therapeutic agents produced by genetic engineering. "Quo va-

- dis?" Symposium, Sanofi Group, May 29-30, 1985, Toulouse-Labège, France, pp. 147-155.
6. FRIEDMAN, J. S.; COFER, C. L.; ANDERSON, C. L.; KUSHNER, J. A.; GRAY, P. P.; CHAPMAN, G. E.; STUART, M. C.; LAZARUS, L.; SHINE, J. & KUSHNER, P. J. — High expression of hGH in mammalian cells without amplification. *Biotechnology*, 7: 359, 1989.
 7. GOEDEL, D. V.; HEYNEKER, H. L.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R.; ITAKURA, K.; YANSURA, D. G.; ROSS, M. J.; MIOZZARI, G.; CREA, R. & SEEBURG, P. H. — Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, 281: 544, 1979.
 8. GRAY, G. L.; BALDRIDGE, J. S.; Mc KEOWN, K. S.; HEYNEKER, H. L. & CHANG, C. N. — Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene*, 39: 247, 1985.
 9. GRAY, G. L.; Kc KEOWN, K. A.; JONES, A. J. S.; SEEBURG, P. H. & HEYNEKER, H. L. — *Pseudomonas aeruginosa* secretes and correctly processes human growth hormone. *Biotechnology*, 2: 161, 1984.
 10. HSIUNG, H. M.; MAYNE, N. G. & BECKER, G. W. — High level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 4: 991, 1986.
 11. HSIUNG, H. M.; CANTRELL, A.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; VEROS, A. J. & BECKER, G. W. — Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone in the culture medium. *Biotechnology*, 7: 267, 1989.
 12. IKEHARA, M.; OHTSUKA, E.; TOKUNAGA, T.; TANIYAMA, Y.; IWAI, S.; KITANO, K.; MIYAMOTO, S.; OHGI, T.; SAKURAGAWA, Y.; FUJIYAMA, K.; IKARI, T.; KOBAYASHI, M.; MIYAKE, T.; SHIBAHARA, S.; ONO, A.; SAKURAI, A.; OISHI, T.; CHISAKA, O. & MATSUBARA, K. — Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5956, 1984.
 13. KATO, C.; KOBAYASHI, T.; KUDO, T.; FURUSATO, T.; MURUKAMI, Y.; TANAKA, T.; BABA, H.; OISHI, T.; OHTSUKA, E.; IKEHARA, M.; YANAGIDA, T.; KATO, Y.; MORIYAMA, S. & HORIKOSHI, K. — Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene*, 54: 197, 1987.
 14. LI, C. H. & PAPKOFF, H. — Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. *Science*, 124: 1293, 1956.
 15. LUPKER, J. H.; ROSKAM, W. G.; MILOUX, B.; LIAUZUN, P.; YANIV, M. & JOUANNAU, J. — Abundant excretion of human growth hormone by recombinant-plasmid-transformed monkey kidney cells. *Gene*, 24: 281, 1983.
 16. MORGAN, J. R.; BARRANDON, Y.; GREEN, H. & MULLIGAN, R. C. — Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science*, 237: 1476, 1987.
 17. TOKUNAGA, T.; IWAI, S.; GOMI, H.; KODAMA, K.; OHTSUKA, E.; IKEHARA, M.; CHISAKA, O. & MATSUBARA, K. — Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. *Gene*, 39: 117, 1985.

Recebido para publicação em 2/9/90.