



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
TIREOTROFINA RECOMBINANTE HUMANA (rec-hTSH) EM
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO)**

FERNANDA DE MENDONÇA

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

**Orientadora:
Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto
Ribela**

**São Paulo
2003**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
TIREOTROFINA RECOMBINANTE HUMANA (rec-hTSH) EM
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO).

Fernanda de Mendonça



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

Orientadora:

Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela

São Paulo

2003

Dedico este trabalho

Às minhas avós Zenaide dos Santos Pereira (*in memoriam*) e Anacirema Gomes Mendonça, pelo carinho de todos os dias.

Aos meus pais Cantidiano José de Mendonça Neto e Vânia Aparecida Pereira de Mendonça, pelo amor, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao meu irmão Fabrício de Mendonça, pelo constante apoio e incentivo.

Ao meu noivo Vagner dos Santos Macedo, pela compreensão e carinho.

Aos meus tios Rui Correa e Vera Lúcia Pereira Correa e primos Alexandre Correa e Rangel Correa, pelo apoio de todos os momentos.

"Sem dúvida nenhuma, meu primeiro contato com o mundo real da prática de minha profissão foi o desencadeador de meu mais profundo e significativo ideal de vida. Percebi que só no amor, na entrega pura e verdadeira, um ser humano poderia realizar algo em benefício de seu semelhante. Que o trabalho enquanto trabalho, por mais técnico e perfeito que fosse, nada resolveria sem a doação contínua e permanente."

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação, carinho, incentivo e paciência na realização deste trabalho.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação e oportunidade.

À Dra. Nanci do Nascimento pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo João Ezequiel de Oliveira, pela colaboração, amizade, apoio e paciência em todos os momentos.

Aos amigos Carlos Roberto Jorge Soares, Cibele Nunes Peroni e José Maria de Sousa, pela colaboração e apoio.

Aos amigos Sueli, Junqueira, Rosângela, Bernadete e Edna, pela amizade e colaboração.

Aos amigos Patrick, Adriana, Janaína, Miriam, Eric, Cláudia, Daniella, Neide, Evellyn, Lucélia, Paula Beatriz, Cristiane, Fernanda e Renan, pela amizade nos momentos de alegria e de tristeza.

A todos os funcionários do Centro de Biologia Molecular que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

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

À FAPESP, pela concessão de recursos financeiros.

À pós-graduação do IPEN pela oportunidade de realizar este trabalho.

"A pesquisa se faz com os amigos, não se faz sozinho..."

Patrick Jack Spencer

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TIREOTROFINA HUMANA RECOMBINANTE (rec-hTSH) EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO).

Fernanda de Mendonça

RESUMO

Tireotrofina humana recombinante autêntica (rec-hTSH), um hormônio glicoprotéico heterodimérico, contendo 2 subunidades não covalentemente ligadas alfa (α) e beta (β), secretada por células de ovário de hamster chinês (CHO) geneticamente modificadas, foi obtida em nosso laboratório no IPEN-CNEN/SP. Este hormônio, obtido pela primeira vez em nosso país por a um processo original, é extremamente importante para, entre outras aplicações, diagnóstico e tratamento de câncer de tireóide e para o tratamento do hipertireoidismo.

A produção laboratorial do rec-hTSH foi realizada em biorreator Hollow Fiber e também em frascos de cultura de, sendo a concentração da proteína de interesse obtida no biorreator de aproximadamente 20 $\mu\text{g/mL}$ com soro fetal bovino dialisado (dFBS) ou cerca de 7 $\mu\text{g/mL}$, na ausência de dFBS e de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ em frascos de cultura com e sem dFBS. O conteúdo de proteínas totais do meio, nestes dois sistemas, foi cerca de 15 vezes maior no biorreator, sendo a atividade específica três vezes menor.

Várias estratégias de purificação foram desenvolvidas com base nas análises em HPLC de exclusão molecular e de fase reversa, realizadas no meio condicionado de CHO. Quando foi utilizado um procedimento de purificação envolvendo três etapas cromatográficas (troca catiônica, afinidade e exclusão molecular), foi obtido um rendimento total de aproximadamente 20% e uma pureza de 95%. Uma maior recuperação (34%) e pureza (98%) foi obtida utilizando uma estratégia envolvendo cromatografias de afinidade, hidrofobicidade e exclusão molecular. Um procedimento de purificação envolvendo duas etapas cromatográficas, afinidade e exclusão molecular ou hidrofobicidade e exclusão molecular apresentou uma recuperação de 55% e 37% respectivamente e originou produtos com pureza de 90%.

A identidade e pureza do rec-hTSH obtido em nosso laboratório foram avaliadas por métodos físico-químicos (HPLC de exclusão molecular, de fase reversa, SDS-PAGE, sequenciamento de aminoácidos N-terminal e espectrometria de massa Maldi-Tof) e métodos imunológicos (ensaio imunoradiométrico, e Western blotting). As análises físico-químicas e imunológicas foram sempre realizadas comparando-se o nosso produto com as duas preparações de referência disponíveis, hTSH hipofisário (hTSH-NIDDK) e recombinante (Thyrogen®). A atividade biológica foi confirmada por um bioensaio *in vivo*, sendo a potência do rec-hTSH IPEN de 3,1 IU/mg, usando o Thyrogen como referência.

EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN THYROTROPIN (rec-hTSH) FROM CHINESE HAMSTER OVARY CELLS (CHO).

Fernanda de Mendonça

ABSTRACT

Authentic recombinant human thyrotropin (rec-hTSH), an heterodimeric glycoprotein hormone containing two non-covalently linked subunits alpha(α) and beta (β), secreted by genetically modified chinese hamster ovary (CHO) cells, was obtained in our laboratory at IPEN-CNEN/SP. This hormone, synthesized for the first time in our country by an original process, is extremaly important for thyroid cancer diagnosis and therapy and also for hyperthyroidism treatment, among others applications.

The laboratory production of rec-hTSH was carried out in a hollow fiber bioreactor and also in culture flasks. The concentration of the protein of interest in the hollow fiber bioreactor was practically 20 μ g/mL with dialysed fetal bovine serum (dFBS) and practically 7 μ g/mL without dFBS and 4,5 μ g/mL in culture flasks, with or without dFBS. The total protein content of the medium was practically 15 times higher in the bioreactor, with 3 times lower specific activity.

Several purification strategies were designed with basis on size exclusion and reversed phase HPLC analysis, carried out on hTSH-secreting CHO cells conditioned medium. When a three-step purification procedure (cation-exchange, dye affinity and size exclusion chromatography) was utilized, an overall yield of ~20% was attained and a 95% pure rec-hTSH was obtained. Higher recovery (34%) and purity (98%) were obtained utilizing a strategy involving dye affinity, hydrophobicity and size exclusion chromatography. Two-step purification procedures, involving dye affinity or hydrophobicity and size exclusion chromatography, presented recoveries of 55% and 37% respectively, originating products practically 90% purity.

Identity and purity of rec-hTSH were evaluated through physico-chemical methods (size exclusion HPLC, reversed phase HPLC, SDS-PAGE, N-terminal aminoacid sequencing and MalDi-Tof mass spectrometry) and immunological methods (immunoradiometric assay and Western blotting). The physico-chemical and immunological assays were carried out by comparing our product with the only two reference preparations available, native (hTSH-NIDDK) and recombinant (Thyrogen[®]) hTSH. Biological activity was confirmed by an "in vivo" bioassay, the potency of rec-hTSH IPEN being 3.1 IU/mg, when Thyrogen was used as a reference.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 MATERIAIS	19
2.1.1 Células produtoras de hTSH	19
2.1.2 Animais utilizados nos experimentos	19
2.1.3 Equipamentos e acessórios principais	19
2.1.4 Principais reagentes utilizados	21
2.2 MÉTODOS	24
2.2.1 Expressão de rec-hTSH por linhagem estável de CHO transformada ..	24
2.2.1.1 Produção em biorreator	24
2.2.1.2 Produção em frascos de cultura	24
2.2.2 Concentração do meio contendo hTSH	25
2.2.2.1 Resina Sephadex G 25	25
2.2.2.2 Precipitação com solução saturada de sulfato de amônio	26
2.2.2.3 Liofilização	26
2.2.2.4 Ultrafiltração tangencial	26
2.2.3 Purificação	27
2.2.3.1 Cromatografia de troca iônica (catiônica)	27
2.2.3.2 Cromatografia de afinidade	27
2.2.3.3 Cromatografia de exclusão molecular	27
2.2.3.4 Cromatografia de interação hidrofóbica	28
2.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	28
2.2.5 Ensaio imunoradiométrico (IRMA) do rec-hTSH	29
2.2.6 Determinação de proteína total	29
2.2.7 Marcação do rec-hTSH	29
2.2.8 SDS-PAGE	30
2.2.9 Western Blotting (WB)	31

2.2.10 Ensaio biológico	31
2.2.11 Meia vida circulatória do rec-hTSH em camundongos	32
2.2.12 Seqüenciamento da porção N-terminal	32
2.2.13 Espectrometria de massa MALDI-TOF	32
3 RESULTADOS	33
3.1 Estudo de diferentes meios obtidos de cultura para o cultivo de células CHO produtoras de rec-hTSH	33
3.2 Sistemas de produção de rec-hTSH	34
3.2.1 Produção de rec-hTSH em biorreator	34
3.2.2 Produção de rec-hTSH em frascos de cultura	34
3.3 Caracterização do rec-hTSH no meio de cultura, antes da purificação ..	37
3.4 Concentração do meio contendo hTSH	45
3.5 Purificação	51
3.5.1 Estratégia 1: Catiônica - Afinidade - Exclusão Molecular	51
3.5.2 Estratégia 2: Afinidade / Hidrofóbica - Exclusão Molecular	64
3.5.3 Estratégia 3:	86
3.6 Estudo da liofilização	86
3.7 Caracterização do rec-hTSH-IPEN purificado	90
3.7.1 Avaliação da atividade imunológica	90
3.7.2 Avaliação da potência biológica	92
3.7.3 Seqüenciamento da porção N-terminal	94
3.7.4 Determinação da massa molecular (MM) do hTSH	96
3.7.4.1 Espectrometria de massa MALDI - TOF	96
3.7.4.2 HPLC	96
3.7.5 Avaliação da meia vida circulatória do hTSH em camundongos	100
4 DISCUSSÃO	106
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1- INTRODUÇÃO

A proteína recombinante objeto do presente estudo é a tireotrofina humana (hTSH). Este hormônio é produzido na glândula hipofisária anterior, sua síntese e secreção sendo estimuladas pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e inibidas pelos hormônios tireoideanos, triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), num clássico mecanismo de feedback negativo. O papel fisiológico do TSH inclui o estímulo de funções tireoideanas tais como a captação e organificação do iodo, a produção e a liberação de iodotironinas pela tireóide e a promoção do crescimento desta glândula. Este hormônio também atua protegendo da apoptose as células tireoideanas e ocupa um papel crítico na ontogenia (76).

O TSH tem alto interesse clínico, seja em aplicações no campo diagnóstico que terapêutico. Tem sido amplamente utilizado principalmente no diagnóstico e tratamento de câncer de tireóide (6, 10, 24, 30, 36, 38, 48, 61, 68). O procedimento padrão para estes casos é a tireoidectomia seguida de terapia adjuvante ablativa com radioiodo (^{131}I). A terapia com radioiodo deve ser realizada sob a influência estimuladora do TSH dada a propriedade do hTSH aumentar a captação *in vivo* e organificação do iodo pelas células epiteliais tireoideanas. 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 do radioisótopo, uma terapia via destruição do tecido. Para manter níveis elevados de TSH na circulação de indivíduos tireoidectomizados é comumente usado suspender a terapia com hormônios tireoideanos, empregada para manutenção desses indivíduos em estado fisiológico normal. Isto leva o indivíduo a hipotireoidismo e a seus efeitos indesejáveis na qualidade de vida. Outra estratégia utilizada é a administração de hTSH exógeno. Vários estudos (30, 38, 61) mostram que a administração exógena de TSH é um meio seguro e eficiente para estimular a captação pela tireóide bem como os níveis séricos de tireoglobulina, sem as desvantagens de um estado de morbidez significativa decorrente do hipotireoidismo. No campo diagnóstico *in vitro*, o advento de imunoenaios ultra-sensíveis possibilitou o uso destes em testes

primários da função tireoideana, sendo a determinação de TSH de fundamental importância na rotina de análises clínicas ligadas à físiopatologia da tireóide e no programa de triagem do hipotireoidismo neonatal (31, 56, 64). Estas e outras importantes aplicações do rec-hTSH são apresentadas na Tabela 1 (76, 20).

Tabela 1- Aplicações do rec-hTSH

-
- Avaliação clínica da função tireoideana
 - Diagnóstico de hipotireoidismo
 - Diagnóstico diferencial de hipotireoidismo primário e secundário
 - Diagnóstico da diminuição da reserva tireoideana
 - Seguimento de câncer de tireóide (uso indicado e aprovado pelo FDA)
 - Estímulo para teste de tireoglobulina e mapeamento de corpo inteiro
 - Tratamento de câncer da tireóide
 - Estímulo para ablação com radioiodo
 - Avaliação da estrutura-função da tireóide
 - Função do receptor do TSH
 - Estudo das proteínas da tireóide e iodotironinas
 - Mapeamento da tireóide
 - Melhoramento da qualidade do mapeamento da tireóide e de sua interpretação
 - Tratamento com radioiodo
 - Tratamento de tireotoxicoses e de bócio
 - Preparação de reagentes de imunoensaios (padrões e traçadores)
 - Testes laboratoriais de bioatividade de TSH
-

O TSH é uma glicoproteína com estrutura dimérica contendo duas subunidades (α e β), não covalentemente ligadas, com respectivamente 92 e 118 aminoácidos. A subunidade α é comum a outros hormônios hipofisários glicoprotéicos como o hormônio luteotrófico (LH), foliculotrofina (FSH) e gonadotrofina coriônica (CG) e a subunidade β é específica do hormônio. As cadeias de carboidratos no TSH constituem 15-25% de sua massa (75). Ambas as subunidades são glicosiladas, com duas cadeias de oligossacarídeos de ligação-N na subunidade α , na asparagina 52 e 78, e apenas uma na subunidade β , na asparagina 23 (Figura 1) (76).

α

```

1  A P D V Q D C P E C T L Q E N P F F S Q P G A P I L Q C M G      30
                                     ↓
                                     52
31  C C F S R A Y P T P L R S K K T M L V Q K N V T S E S T C C      60
                                     ↓
                                     78
61  V A K S Y N R V T V M G G F K V E N H T A C H C S T C Y Y H K S  92

```

β

```

                                     ↓
                                     23
1  F C I P T E Y T M H I E R R E C A Y C L T I N T T I C A G Y      30

31  C M T R D I N G K L F L P K Y A L S Q D V C T Y R D F I Y R      60

61  T V E U P G C P L H V A P Y F S Y P V A L S C K C G K C N T      90

91  D Y S D C I H E A I K T N Y C T K P Q K S Y L V G F S V      118

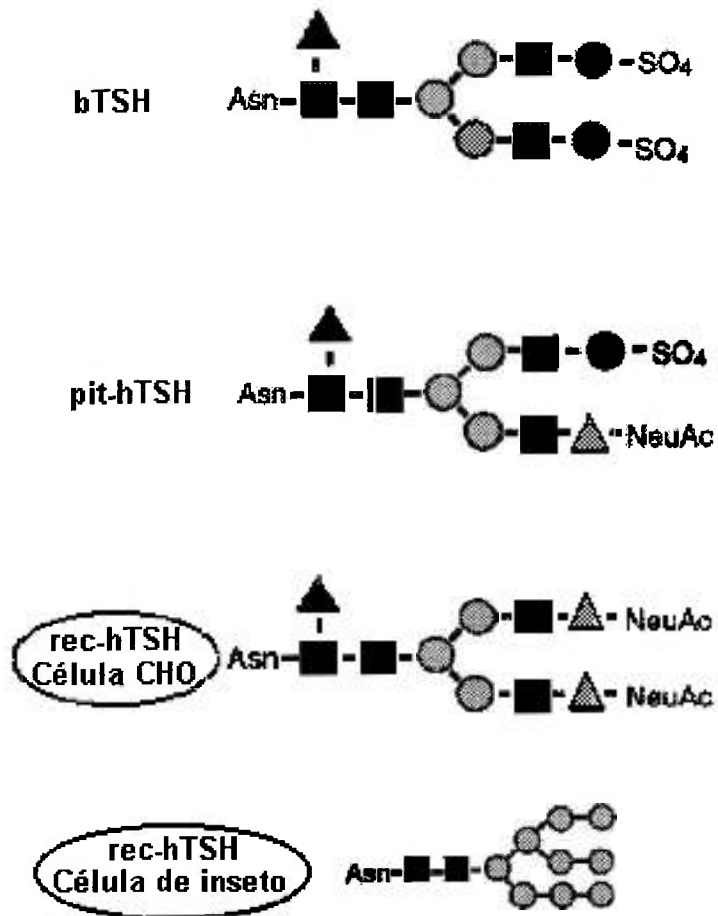
```

Figura 1 Estrutura primária das subunidades α e β do hTSH. As setas indicam a presença de cadeias de carboidratos.

É bem documentado na literatura que as cadeias de carboidratos na proteína podem afetar a sua solubilidade, susceptibilidade a proteases, sua antigenicidade, o "folding" estrutural, a depuração *in vivo* e especialmente a sua bioatividade (58, 70, 79). A contribuição de cada uma das subunidades na ação do hormônio, entretanto, não é perfeitamente conhecida. Os oligossacarídeos da subunidade α são particularmente importantes na ação do TSH durante a transdução de sinal pós-receptor (79), enquanto a glicosilação da subunidade β é essencial para sua estabilidade e secreção (77).

As cadeias de carboidratos do TSH tem estrutura complexa, ocorrendo notáveis diferenças nos resíduos terminais, dependendo da espécie e do hospedeiro em que é realizada a síntese (11, 29, 75). A Figura 2 mostra esquematicamente as terminações das cadeias de carboidratos no TSH de várias origens. Os carboidratos do TSH bovino (bTSH) terminam em sulfato de N-acetilgalactosamina, aqueles do TSH humano hipofisário (pit-hTSH) em sulfato de N-acetilgalactosamina e galactose-ácido siálico, enquanto que os carboidratos do TSH humano recombinante (rec-hTSH) produzido em células de ovário de hamster chinês (CHO) terminam em galactose-ácido siálico e do rec-hTSH produzido em células de insetos em manose. Estudos realizados por Canone e colaboradores (11) mostraram ser o conteúdo de açúcar nas preparações recombinantes de hTSH maior do que naquele do hormônio hipofisário, (respectivamente 21 e 14%) com uma maior quantidade de ácido siálico e ausência de N-acetilgalactosamina.

A depuração metabólica, a potência biológica *in vivo* bem como a bioatividade *in vitro* são altamente dependentes do tipo específico de resíduo terminal presente nas estruturas dos oligossacarídeos, sendo o conteúdo de ácido siálico essencial para determinar a permanência do hormônio na circulação. Foi demonstrado (29, 73, 74) que preparações com baixo teor de ácido siálico tem meia vida no soro mais curta, permanecendo um tempo menor na circulação, quando comparadas àquelas mais acídicas (mais ricas em ácido siálico). O hTSH hipofisário, contendo predominantemente oligossacarídeos sulfatados, mostrou uma depuração mais rápida que o rec-hTSH (74). Também foi demonstrado que a atividade biológica *in vitro* é inversamente proporcional ao grau de sialilação (11, 29).



Manose (●), N-acetilglicosamina (■), N-acetilgalactosamina (●),
 fucose (▲), galactose (▲) e ácido siálico (NeuAc).

Figura 2: Esquema apresentando as diferentes estruturas de carboidratos em TSH de diversas origens.

Preparações de rec-hTSH exibiram atividade biológica *in vitro* 5 vezes menor comparadas à do hormônio hipofisário (11). Para a atividade biológica *in vivo* foram demonstradas também diferenças em função do conteúdo de ácido siálico da preparação, maior atividade biológica tendo sido encontrada em preparações com maior teor de ácido siálico (29, 73). Sendo que para a atividade *in vivo* dos hormônios glicoprotéicos é determinante a velocidade de depuração metabólica, o rec-hTSH mostrou uma atividade biológica *in vivo* maior do que aquela do rec-hTSH hipofisário (74).

Vários métodos foram desenvolvidos para medir a atividade biológica *in vivo* (18,46, 47, 69, 73, 75) e *in vitro* (69, 73) do hTSH. Os bioensaios *in vivo* fornecem uma medida adequada da bioatividade bem como da farmacocinética ou farmacodinâmica do hormônio, porém são em geral demorados, utilizam um grande número de animais e apresentam um alto grau de variabilidade inerente aos organismos vivos. O método *in vivo* mais antigo desenvolvido para o hTSH e amplamente utilizado é o bioensaio em camundongos, baseado na captação do ^{131}I pela tireóide, seguida da medida do aumento subsequente da radioatividade na circulação (soma do iodo ligado aos hormônios tireoideanos e do iodo livre), sob o estímulo de TSH (47). Esse ensaio requer um pré tratamento dos animais com uma dieta com baixo teor de iodo e subseqüentes injeções de tiroxina e iodo radioativo. Além disso a utilização neste ensaio de material radioativo, cuja manipulação e descarte geram problemas adicionais, tem sido apontada como uma desvantagem desta técnica. Um bioensaio *in vivo*, desenvolvido mais recentemente, que não administra radioatividade, foi relatado na literatura (18, 46), no qual T_4 induzido pelo TSH é medido, mediante imunoensaio, após supressão do TSH endógeno pela administração de T_3 . Bioensaios *in vitro* baseados em células são em geral uma alternativa mais rápida aos bioensaios feitos com animais. Vários ensaios baseados em células tem sido desenvolvidos para medir a atividade de TSH (11, 75). A elevação dos níveis de cAMP nas células de tireóide de rato (FRTL-5) e em células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com receptor de TSH, após tratamento com TSH, tem sido medida por radioimunoensaio (RIA). A incorporação de timidina triciada por células FRTL-5, induzida pelo TSH, tem sido também usada

para quantificar a atividade do hormônio. Foram também descritos na literatura ensaios baseados em membranas, mais rápidos do que os métodos baseados em animais ou em células e que podem apresentar uma menor variabilidade (69). A habilidade do TSH para estimular a produção de cAMP no homogeneizado de membranas de tireóide bovina e humana tem sido também usada para quantificar a atividade de TSH. Tanto os ensaios baseados em células quanto aqueles baseados em membranas podem fornecer uma medida da atividade *in vitro* do hTSH, entretanto nenhum dos dois fornece informação com relação à potência do hormônio em seres humanos. Bioensaios *in vitro* devem ser complementados com métodos físico-químicos, como por exemplo o conteúdo de ácido siálico, para assegurar o controle adequado de fatores que podem potencialmente afetar a função biológica.

Em recente publicação (76) foram apresentadas também diferenças no ponto isoelétrico (pI) em função do conteúdo do ácido siálico na preparação. Várias glicofomas de rec-hTSH puderam ser detectadas em uma faixa de ponto isoelétrico de 6,2 a 8,8 (Tabela 2), nenhuma delas sendo sobreposta àquelas do hTSH hipofisário. Já uma preparação sem ácido siálico mostrou-se homogênea com um ponto isoelétrico de 8,8.

A diferente estrutura glicídica pode também influenciar as propriedades imunológicas dos hormônios glicoprotéicos, podendo estar relacionada com o tipo de célula hospedeira e com as diferentes condições de cultivo e produção em biorreator (25, 26, 27, 35, 73, 85).

Devido à complexa estrutura das glicoproteínas, a síntese de hTSH só pode ser obtida em sistemas de células eucariotas. Entre estes, leveduras, plantas e insetos são incapazes de realizar glicosilação complexa como a dos mamíferos.

Tabela 2: Pontos isoelétricos (pIs) de diferentes preparações baseadas em estudos de focalização isoelétrica.

hTSH hipofisário	8,3 8,1 7,8 7,6 7,1 6,8
rec-hTSH (1 Neu Ac/glicano)	8,5 8,4 8,2 8,0 7,7 7,3 7,0 6,7 6,5 6,2
rec-hTSH (0,4 Neu Ac/glicano)	8,8 8,5 8,4 8,2
Asialo rec-hTSH	8,8

As leveduras (*pichia pastoris* ou *saccharomices*), por exemplo, realizam apenas glicosilação manosilada enquanto as plantas não possuem enzimas para processar a glicosilação-N das cadeias de oligossacarídeos terminando em galactose (Gal) e/ou resíduos de ácido siálico (NeuAc). No caso de células de insetos, estas não contêm resíduos de carboidrato N-acetilglicosamina (GlcNAc), Gal ou NeuAc. As células hospedeiras ideais para a síntese e secreção do hTSH são derivadas da linhagem de ovário de hamster chinês (CHO), cujo mecanismo de glicosilação é surpreendentemente semelhante àquele das células tireotróficas humanas (27). Essas são as células mais usadas na produção de proteínas recombinantes utilizadas em terapia humana (66).

A expressão de glicoproteínas recombinantes tem sido realizada mediante construções que utilizam vetores plasmídicos ou virais, transfecções transientes ou estáveis e diversos marcadores gênicos de seleção e amplificação. O hTSH recombinante foi obtido através da co-transfecção de células CHO DHFR^r com dois plasmídeos, um dos quais contendo o gene da DHFR^r ligado ao gene da subunidade α (83). Foi também expresso transitoriamente em células de rim humano ou rim de macaco pela co-transfecção destas células com dois vetores idênticos, cada um contendo uma subunidade (84). Nestes trabalhos, o rendimento em hormônio obtido foi muito baixo, sendo o objetivo principal deles estudar a relação estrutura-função. Níveis maiores de expressão de hTSH utilizando um mecanismo de co-amplificação gênica induzida por metotrexato (MTX) e utilizando um sistema de cultura de células

em biorreator, foram conseguidos por Hussain e colaboradores (32) e Cole e colaboradores (14). Em nosso laboratório (Centro de Biologia Molecular do IPEN), a síntese de hTSH recombinante (rec-hTSH) foi obtida utilizando dois vetores dicistrônicos (pEDdc e pEAdc) que contém os marcadores gênicos de seleção e amplificação deidrofolato redutase (DHFR) e adenosina deaminase (ADA), cada um ligado ao gene da subunidade α ou β (57). Foi apresentado neste trabalho que após as células CHO(DHFR^r) terem sido co-transfectadas com estes vetores de expressão e submetidas à amplificação gênica em meio de cultura contendo quantidades crescentes de MTX, foi possível isolar clones com nível de secreção em placas (cultura celular em monocamadas) de até $7,2 \pm 1,3 \mu\text{g hTSH} \cdot 10^{-6} \text{ células} \cdot \text{dia}^{-1}$, o mais alto já relatado para a expressão deste hormônio (57). Um segundo tratamento, envolvendo a utilização da deoxicoformicina, direcionado para amplificar o marcador gênico ADA, forneceu um clone com secreção de hTSH 2-3 vezes maior que na estratégia anterior, chegando a uma secreção de $17,8 \pm 7,6 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ células} \cdot \text{dia}^{-1}$. O clone utilizado no desenvolvimento do presente trabalho foi aquele que resultou da estratégia de amplificação incompleta (só com MTX). Cabe aqui ressaltar que poucos laboratórios realizaram até o presente a síntese de hTSH em células CHO. Apenas um, Genzyme, Cambridge, MA, USA obteve, mediante utilização de vetores convencionais, uma expressão semelhante à por nós obtida: $4,5 \mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ células} \cdot \text{dia}^{-1}$ (14).

No processo de produção de uma proteína recombinante, a purificação representa uma das etapas mais complexas e de maior custo (17, 34, 41, 66, 82). Sua eficiência e consistência são de crucial importância para a qualidade do produto final. Estratégias de purificação efetivas e econômicas devem ser programadas de tal forma que a estrutura e a função da proteína recombinante (atividade imunológica e biológica) não se alterem e que seja obtido um alto rendimento e grau de pureza.

A cromatografia é o método utilizado para a purificação de hormônios hipofisários em geral e do rec-hTSH em particular, especialmente por suas características de alta seletividade e rapidez. A escolha das etapas cromatográficas (tipo, seqüência e número de etapas) a ser seguida é determinada pelo uso que se pretende fazer com o produto final. Por exemplo, enquanto De Oliveira e

colaboradores (16) descreveram um esquema de purificação em seis etapas para a purificação do rec-hGH, obtido no espaço periplásmico de *E. coli*, para uso terapêutico, Ribela e colaboradores. (65) reportaram uma única etapa de purificação para obter o mesmo hormônio para uso como reagente (traçador e padrão) em radioimunoensaios. A primeira estratégia utilizou métodos cromatográficos convencionais baseados em troca iônica, exclusão molecular e hidrofobicidade para a obtenção de um produto altamente purificado, de acordo com as recomendações das agências regulatórias referentes a produtos para uso terapêutico. A última estratégia utilizou uma cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) para a obtenção de uma preparação que, apesar de não ser tão pura como a anterior, ainda assim mostrou-se adequada para o uso pretendido como reagente químico.

A capacidade de resolução de cada uma das etapas cromatográficas depende principalmente da escolha da resina de separação. Sua pureza, estabilidade físico-química, reprodutibilidade interlotes, alta tolerância à limpeza estridente e esterilização, resistência mecânica que permita altos fluxos, tamanho e distribuição dos poros e especificidade dos grupos funcionais, são fatores determinantes para a seleção da fase estacionária para uma determinada purificação. Aspectos importantes do desempenho de um grande número de adsorventes, acoplados a uma grande variedade de matrizes poliméricas, em cromatografias preparativas, foram revisados por Boschetti, Leonard e Andersson (8, 40 e 1). O procedimento de limpeza das resinas cromatográficas é uma etapa importante em um protocolo de purificação de hormônios hipofisários recombinantes, principalmente quando esses hormônios se destinam ao uso terapêutico. Por exemplo, o uso de condições alcalinas para limpeza e regeneração das resinas cromatográficas é eficiente para a degradação das endotoxinas, bem como para a remoção de vírus e DNA. Também o uso de detergentes deve ser considerado, pois estes removem, com eficiência, vírus presentes em produtos recombinantes obtidos de cultura de células de mamíferos (34).

O modo de eluição do produto a ser purificado também é um fator importante no desenvolvimento de um protocolo de purificação. Preparações derivadas de DNA

recombinante contém impurezas tais como endotoxinas, nos produtos expressos em bactérias, ou DNA potencialmente oncogênico, nas preparações expressas em células de mamíferos transformadas. Uma cromatografia de troca aniônica pode ser eficiente para reter esses contaminantes, que possuem carga negativa, enquanto uma cromatografia de troca catiônica, pode ser útil para a eluição deles. No primeiro caso, estes contaminantes são adsorvidos à resina ("bind-elute mode"), enquanto no segundo caso eles eluem na fração não adsorvida ("flow-through mode"). É claro que a escolha da resina de troca iônica dependerá principalmente do ponto isoelétrico (pI) do produto de interesse e de sua estabilidade no pH a ser utilizado na purificação.

Também muito úteis na seleção dos métodos de separação para a purificação de uma proteína de interesse, são os bancos de dados em geral utilizados na tecnologia de DNA recombinante, contendo informações sobre as proteínas do meio de cultura e das células hospedeiras. Por exemplo o banco de dados desenvolvido por Andrews e colaboradores apresenta algumas propriedades físico-químicas das principais proteínas da *E. coli*, *S. cerevisiae* e células CHO (tamanho, hidrofobicidade relativa e ponto isoelétrico), enquanto o banco de dados desenvolvido por Lienqueo e colaboradores fornece as concentrações das principais proteínas contaminantes de produtos expressos em *E. coli*, assim como suas cargas em diferentes valores de pH (2, 42). Esses bancos de dados mostraram-se valiosos na seleção do tipo, seqüência e número mínimo de etapas cromatográficas, levando a produção de rec-hGH com um grau de pureza adequado (42, 43, 82). Seu uso também levou à identificação de diferenças marcantes na hidrofobicidade entre o hGH e as principais proteínas contaminantes das células hospedeiras. Este diferencial foi utilizado por Dalmora e colaboradores para separar o hGH diretamente das proteínas periplásmicas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e por De Oliveira e colaboradores para a remoção de proteínas contaminantes de *E. coli* por cromatografia de interação hidrofóbica (15, 16).

A primeira etapa de uma estratégia de purificação, utilizada para hormônios hipofisários recombinantes como o hTSH, é a clarificação (separação entre sólidos e componentes solúveis), freqüentemente realizada por microfiltração e centrifugação

do meio de cultura ou do homogeneizado celular. Um dos principais problemas no início de um processo de purificação é a concentração da proteína de interesse que pode ser muito baixa, principalmente quando a produção é extracelular. Uma etapa de concentração, como ultrafiltração ou precipitação, é portanto em geral necessária quando o produto em questão estiver muito diluído. A utilização de uma etapa de adsorção freqüentemente cromatografia de troca iônica) como primeira etapa de purificação, pode também ser empregada para a concentração do produto, oferecendo a vantagem de uma purificação parcial, além de uma concentração. Estas etapas, entretanto, consomem muito tempo podendo demorar várias horas. Conseqüentemente, subprodutos tais como proteases, podem afetar a proteína de interesse levando-a à degradação. Estes problemas podem ser minimizados utilizando a cromatografia de leito expandido (EBA), que consiste em uma técnica que permite a recuperação direta da proteína de interesse a partir do extrato cru e combina a separação de partículas, a concentração e uma purificação parcial do produto, em uma única etapa. A cromatografia de leito expandido é uma técnica de leito fluidizado na qual o líquido é bombeado de baixo para cima através das esferas de um adsorvente que não é comprimido pelo êmbolo superior. Desta forma, o leito pode se expandir e espaços aparecem entre as esferas do adsorvente de forma que quando a amostra é aplicada, o material particulado pode passar livremente por esses espaços vazios enquanto a proteína de interesse se liga à matriz. A expansão do leito é controlada pelo tamanho e densidade das esferas do adsorvente, pelo fluxo e pela viscosidade da fase móvel. Os princípios e aplicações deste tipo de cromatografia, assim como as vantagens e problemas encontrados no seu uso para a extração direta de proteínas do extrato cru, sem clarificação, foram recentemente descritas (3, 12).

Em seguida às etapas de clarificação e concentração, é freqüentemente utilizada uma combinação de etapas cromatográficas convencionais, para a purificação dos hormônios hipofisários recombinantes. Estas etapas incluem cromatografia de exclusão molecular, de troca iônica, de afinidade e de interação hidrofóbica. As cromatografias de exclusão molecular e de troca iônica são as técnicas utilizadas com maior freqüência nos esquemas de purificação dos

hormônios hipofisários recombinantes. Praticamente todos eles incluem pelo menos uma dessas etapas.

A separação por exclusão molecular baseia-se na permeabilidade da matriz e depende do tamanho relativo ou do volume hidrodinâmico da proteína em relação ao tamanho médio do poro do material da fase estacionária (4). No caso dos hormônios hipofisários recombinantes, esta técnica tem sido em geral aplicada como uma etapa de polimento ou para remoção de sal (5, 13, 22, 21, 39, 53, 55, 81) e menos freqüentemente para o fracionamento de proteínas (16).

A cromatografia de troca iônica é baseada na ligação de moléculas carregadas do soluto a agrupamentos com cargas opostas, ligados de forma covalente à uma matriz cromatográfica (7). A maioria dos protocolos de purificação de hormônios hipofisários recombinantes incluem mais de uma etapa de cromatografia de troca iônica, baseada seja no modo em que a proteína de interesse é adsorvida na resina ou no modo em que ela elui sem se ligar à resina. Esses dois modos foram utilizados, por exemplo, por Cole e colaboradores (13) para a purificação do rec-hTSH.

A cromatografia de afinidade, um método baseado no reconhecimento molecular altamente específico, tem sido também empregado com sucesso na purificação de hormônios hipofisários recombinantes. Seus mecanismos fundamentais, implicações e limitações foram analisados por Narayanan (52). Esta técnica de separação utiliza um ligante específico, acoplado de forma covalente a uma matriz insolúvel, que ligar-se-á a uma certa proteína. Estes ligantes podem ser classificados em dois grandes grupos: 1- biológico e 2- sintético ou pseudo-específico. Enquanto o primeiro grupo consiste de anticorpos, proteína A (*S. aureus*), nucleotídeos, heparina, lectinas como a concanavalina A, etc, o segundo grupo contém corantes, metais e peptídeos sintéticos. Os ligantes biológicos apresentam uma especificidade inerente natural por uma dada molécula, já a afinidade dos ligantes sintéticos é particularmente direcionada para uma determinada proteína variando e otimizando as condições de ligação e eluição. No que se refere a ligantes naturais específicos para determinados grupos, uma lectina imobilizada, como a concanavalina A, foi utilizada na purificação e caracterização de hormônios

glicoprotéicos recombinantes, com base em sua especificidade para resíduos α -D-manosila ou glicosila (29, 84). Um outro ligante biológico, um anticorpo monoclonal anti-hGH, foi utilizado na purificação do rec-hGH produzido em *E. coli* (28, 33). Ligantes sintéticos, como os corantes, podem mimetizar ligantes naturais e ligar algumas moléculas protéicas de forma extremamente específica nos seus sítios ativos, resultando em uma adsorção forte e específica por meio de interações não covalentes. A interação entre o corante e a proteína baseia-se em uma complexa combinação de interação eletrostática, hidrofóbica, de transferência de carga, de pontes de hidrogênio, todas possíveis de acordo com a natureza estrutural do corante. O Cibacron Blue 3G-A, um corante reativo baseado em triazinil, foi utilizado com sucesso na purificação do hTSH (14, 73, 78). Íons metálicos, utilizados como ligantes na cromatografia afinidade por metal imobilizado (IMAC), foram usados com sucesso na purificação de hGH recombinante (44, 45) e hPRL recombinante (81). Na IMAC a adsorção das proteínas é baseada na coordenação entre íons metálicos imobilizados em uma matriz e grupos doadores de elétrons na superfície da proteína. A adsorção depende da acessibilidade de certos resíduos de aminoácidos, em particular a histidina. Cisteínas livres, que poderiam também contribuir para a ligação da proteína aos íons metálicos quelados, são raramente encontradas disponíveis na forma reduzida. Todavia, as cadeias laterais do triptofano, fenilalanina e de tirosina podem contribuir para a ligação, se estiverem nas proximidades de resíduos de histidina acessíveis ao solvente (23). A IMAC mostrou ser uma ferramenta de grande valia para purificar proteínas recombinantes com resíduos N-terminal de histidina. Mukhija e colaboradores (51), Morganti e colaboradores (50), Shin e colaboradores (71) e Strokovskaya e colaboradores (72) por exemplo, desenvolveram purificações de uma ou duas etapas baseadas em metal, com resíduos de histidina, para hGH ou hPRL expressos em *E. coli* e células de insetos.

A cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se na hidrofobicidade das proteínas, promovendo sua separação com base nas interações que ocorrem entre ligantes hidrofóbicos imobilizados e regiões não polares na superfície das proteínas. Estas interações envolvem forças de Van der Waals e o grau de hidrofobicidade de uma proteína é determinado pela somatória das propriedades hidrofóbicas dos

aminoácidos expostos ou não (19, 59) . A interação hidrofóbica foi utilizada em vários esquemas de purificação de hGH. Lefort e colaboradores utilizaram a Octyl-Sepharose e a Phenyl Sepharose como primeira etapa cromatográfica, levando a um enriquecimento do hormônio de 17 e 8 vezes respectivamente (39). De Oliveira e colaboradores obtiveram um alto grau de redução de proteínas contaminantes de *E. coli* (enriquecimento de 676 vezes) utilizando a Phenyl Sepharose como última etapa (16).

Com relação à purificação do rec-hTSH, somente um processo biotecnológico completo foi descrito para a produção deste hormônio glicoprotéico, para uso clínico (73). Ele foi desenvolvido pela companhia farmacêutica Genzyme Corporation que comercializa este produto com o nome de Thyrogen[®]. Este processo é constituído de quatro etapas cromatográficas e várias etapas de concentração. A seqüência das cromatografias adotadas neste trabalho foi: troca catiônica, afinidade, troca aniônica e exclusão molecular. As duas primeiras etapas cromatográficas (ambas com resinas empacotadas em colunas de acrílico ou aço inoxidável com fluxo radial) foram realizadas no modo "bind eluted" enquanto a terceira foi realizada no modo "flow through". Anteriormente a esse enfoque sobre a purificação do rec-hTSH relatada por Cole, Thotakura e colaboradores (78) analisaram a composição de carboidratos, a atividade biológica *in vitro* e a taxa de depuração *in vivo* do rec-hTSH obtido de uma das várias linhagens celulares de CHO investigadas em colaboração por dois grupos de pesquisa. Neste trabalho foi desenvolvida uma estratégia de purificação mais simples, baseada em cromatografia de afinidade por corante, troca aniônica (Q-Sepharose Fast Flow) e troca catiônica (S-Sepharose Fast Flow). O produto, neste caso, não era para injeção em seres humanos, sendo portanto esta estratégia útil para a finalidade desejada. Subseqüentemente este mesmo grupo descreveu um esquema de purificação do rec-hTSH levemente diferente, baseado em troca catiônica (S-Sepharose Fast Flow), afinidade pelo corante (Blue Sepharose Fast Flow) e uma cromatografia optativa de troca aniônica, como terceira etapa (73). Também foi descrito na literatura por Wondisford e colaboradores (84) e por Grossmann e colaboradores (29) um esquema de purificação de uma única etapa. Estes autores visavam simplesmente a caracterização inicial do produto por eles

desenvolvido, rec-hTSH em células embrionárias de rim humano e em células de inseto. Ambos os grupos aplicaram a cromatografia de afinidade por lectina (concaivalina A Sepharose) para estudar a glicosilação do hormônio.

A caracterização do produto purificado é feita em geral por uma bateria de testes físico-químicos e biológicos. A caracterização do rec-hTSH apresentada na literatura se fez, em geral, de acordo com o esquema da Figura 3 (75).

A avaliação da pureza de preparações recombinantes de hTSH purificadas foi em geral realizada por SDS-PAGE e Western blot (14, 73) e por cromatografia de fase reversa e exclusão molecular (14, 54).

A estrutura de aminoácidos do rec-hTSH é idêntica àquela do hTSH hipofisário (20). Entretanto sua glicosilação é diferente, como anteriormente comentado, uma vez que é produzida em uma linhagem celular não humana. O conteúdo de ácido siálico declarado na literatura para preparações de hTSH recombinantes obtidas em CHO, variou de 1,9 a 2,7 resíduos por cadeia de oligossacarídeo, enquanto o do hTSH hipofisário variou de 0,3 a 0,5 resíduos por cadeia (73, 78).

A potência biológica declarada para a preparação recombinante Thyrogen é de 4 IU/mg (30). Estimativas semelhantes da biopotência de uma preparação de rec-hTSH, doada à Organização Mundial da Saúde (WHO) pela Genzyme, foram reportadas na literatura variando de 1,85 a 6,4 IU/mg, usando uma variedade de métodos de bioensaio in vitro e um padrão biológico hipofisário (84/703) (60). Foram estimadas também para esta mesma preparação atividades variando de 5,51 a 7,63 IU/mg, por imunoenaios (radioimunoensaio e ensaio imunofluorimétrico), utilizando o 2º Padrão de Referência Internacional (80/558) de hTSH como padrão (60). Estes resultados foram oriundos de um Estudo de Colaboração Internacional coordenado pela WHO do qual participaram 33 laboratórios de 11 países, incluindo o nosso laboratório. Ribela e colaboradores (64) obtiveram valores semelhantes para a imuno-potência da preparação Thyrogen, por ensaio imunoradiométrico (IRMA), de $7,7 \pm 0,33$, utilizando o 2º Padrão de Referência Internacional (80/558) de hTSH como padrão e de $7,8 \pm 0,69$ utilizando um padrão secundário (2ª Preparação de Referência Brasileira).

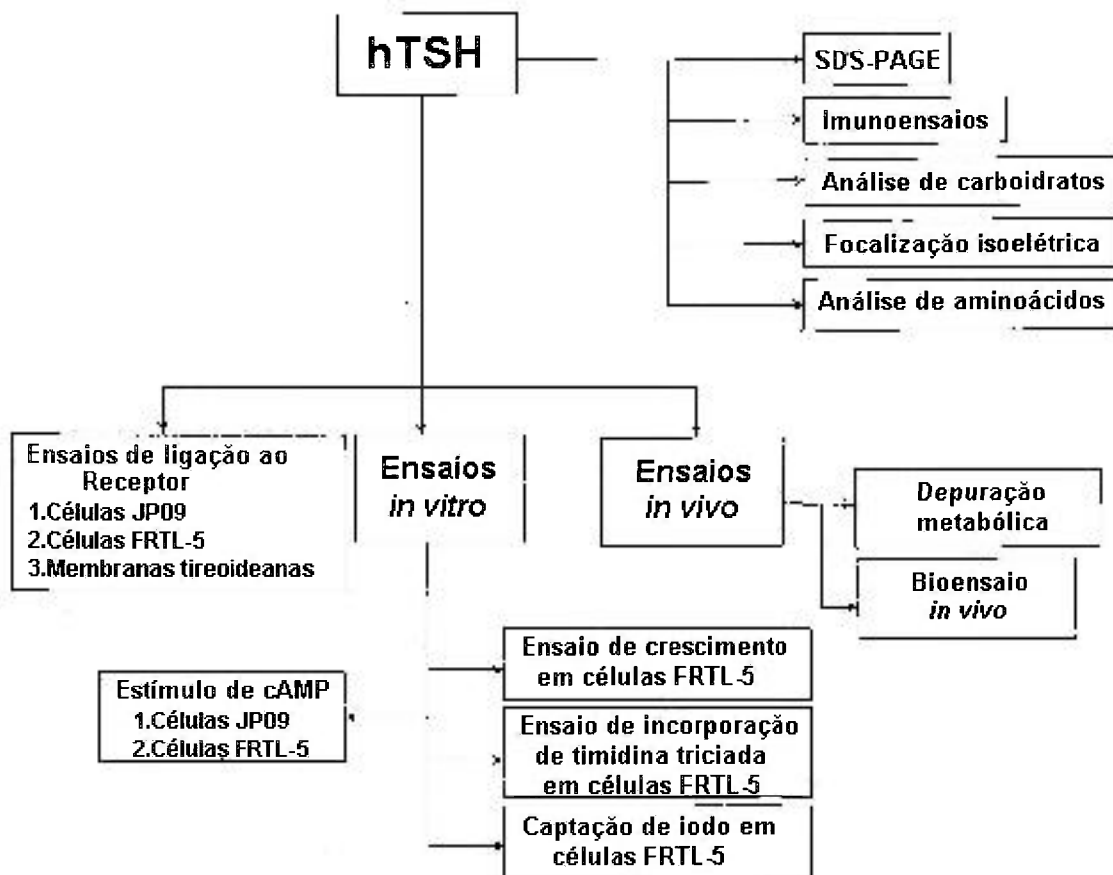


Figura 3 Esquema de caracterização de rec-hTSH.

Com relação ao peso molecular do rec-hTSH, Cole e colaboradores (14) declararam um valor teórico de 29660 Da para o heterodímero, 13820 Da para a subunidade α e 15840 Da para a subunidade β . Estes valores foram derivados da seqüência de aminoácidos, adicionando a contribuição devida aos carboidratos. Estes mesmos autores referem-se a um valor de 36000 Da para o peso molecular do rec-hTSH quando este foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC) e os valores de 20490 Da e 16630 Da respectivamente para as subunidades α e β , quando determinados via SDS-PAGE. Uma comparação entre os pesos moleculares do rec-hTSH e pit-hTSH, realizada por cromatografia de exclusão molecular (coluna de Sephadex G-75) por Hussain e colaboradores (32), indicou que o rec-hTSH tem um peso molecular aparentemente maior que o hormônio hipofisário.

Esta diferença foi atribuída aos diversos tamanhos das subunidades β , ao grau de glicosilação ou a ambos. Embora a seqüência do cDNA da subunidade β seja de 118 aminoácidos, 6 aminoácidos carboxílica terminal não estão presentes na subunidade β do pit -hTSH provavelmente devido a uma clivagem enzimática. Por outro lado, a subunidade do rec-hTSH não parece ser submetida ao processamento carboxílica terminal. Essa diferença de tamanho pode resultar em mudanças no peso molecular aparente dessas duas preparações de hTSH. Com relação aos carboidratos, preparações de rec-hTSH contêm 37% mais carboidrato do que a forma hipofisária (73, 78), podendo também justificar esta diferença.

1.1- OBJETIVO

Face ao exposto acima, considerando a larga utilização terapêutica desta glicoproteína e que apenas uma firma no mundo a disponibiliza, o objetivo do presente trabalho é a produção laboratorial de rec-hTSH, sua purificação e caracterização físico-química, imunológica e biológica confirmando identidade, pureza e potência do produto obtido, em comparação com padrões de referência internacional, recombinante (Thyrogen) e hipofisário (NIDDK).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- MATERIAIS

2.1.1- Células produtoras de hTSH

- Células de ovário de hamster chinês (CHO), deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase (DHFR), (linhagem mutante DXB-11) co-transfectadas com vetores dicistrônicos (pEDdc- α e pEAdc- β -TSH) e submetidas à amplificação gênica com metotrexato (MTX) (57).

2.1.2- Animais utilizados nos experimentos

- Camundongos machos da linhagem isogênica *Balb-C* e da linhagem *Swiss*, com peso de aproximadamente 25g oriundos do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório do IPEN/CNEN - SP.

2.1.3- Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Agitador rotatório de tubos (“rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region Immunoassay Unit, Londres, Inglaterra.
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162, Marconi, São Paulo, Brasil.
- Aparelho Accu-Check III para dosagem de glicose, Boeringher, Mannheim, Alemanha.
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu, MD, EUA
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler, Zurich, Suíça.
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler, Zurich, Suíça.
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler, Zurich, Suíça.

- Biorreator tipo "Hollow-Fiber", modelo Cellmax-Quad, Spectrum, Laguna Hills, Ca, EUA.
- Bomba peristáltica modelo P-1, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Centrífuga, modelo LS-3 plus, Celm, São Paulo, Brasil.
- Centrífuga refrigerada automática modelo Super Speed RC – 2B, Sorvall, Newtown, Connecticut, EUA.
- Coletor de frações, modelo Frac-200, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Coluna para HPLC de exclusão molecular TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), tamanho das partículas 10 μm e poros de 125 Å, acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm DI), Tosohaas, Montgomeryville, PA, EUA.
- Coluna para HPLC de fase reversa C₄ Vydac, 214 TP 54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), tamanho das partículas 5 μm , diâmetro dos poros de 300 Å acoplada à pré-coluna 214 FSK 54 (5 μm , 1,0 cm X 4,6 mm D.I.), Separations Group, Hesperia, CA, EUA.
- Colunas cromatográficas: XK 16 mm x 20 cm, XK 16 mm x 6 cm, XK 26 mm x 40 cm e XK 26 mm x 100 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Contador gama tipo "poço", com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ¹²⁵I de 80%, Packard Instrument Company, Illinois, EUA.
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil.
- Estufa de cultura celular, modelo 3159, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA.
- Filtro 3 MM VW, Scientific Products, Ca, EUA.
- Fluxo Laminar classe II A/B 3, modelo 1140, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA.
- Freezer –20 °C, modelo 0651, Prosdócimo, São Paulo, Brasil.
- Freezer –40 °C, modelo AB 240, Metalfrio, São Paulo, Brasil.
- Freezer –80 °C, modelo 8425, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA.
- Leitor de placas para microtitulação modelo MR400, Dynatech, Bethesda, EUA.

- Liofilizador, modelo Dura Stop – TDS – 3 DURA DRY, FTS Systems, Stone Ridge, EUA.
- Material plástico estéril para cultura celular, Corning Costar Corp., Cambridge, MA, EUA e Nalgene Company, Rochester, NY, EUA.
- Medidor digital de pH, modelo 420 A, Orion, Boston, EUA.
- Membranas para filtração de 0,22 μm , Millipore, Bedford, MA, EUA.
- Membrana para filtração PELLICON, 10 kDa com 50 cm^2 de área, Millipore Pellicon Biomax, Bedford, EUA.
- Membrana de nitrocelulose (22 μm), Hybond – C modelo RPN 303 C, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha.
- Placas para microtitulação com fundo em “U”, Dynatech, Chantilly, EUA.
- Refrigerador duplex, modelo 320 clear, Brastemp, São Paulo, Brasil.
- Refrigerador com porta de vidro modelo VE 730, Metafrio, São Paulo, Brasil.
- Sistema de eletroforese vertical Hoefer Mini VE, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Sistema de purificação de água Millipore Milli-Q plus, Bedford, EUA.
- Sistema de ultrafiltração TFF System, Millipore Labscale, Bedford, EUA.
- Tubos de poliestireno para imunoenaios (7,5x1,2 cm), EMTEL, São Paulo.

2.1.4- Principais reagentes utilizados

- Acetonitrila grau HPLC, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA.
- Ácido Acético, Labsynth, São Paulo, Brasil.
- Ácido clorídrico, Merck, São Paulo.
- Acrilamida, Merck, São Paulo, Brasil.
- Albumina de Soro bovino (BSA) RIA Grade (fração V), Sigma, St. Louis, EUA.
- Anticorpo anti-hTSH, Mab TC 14, NIBSC, National Institute for Biological Standards and Control, Hertforshire, Reino Unido.
- Anticorpo Monoclonal (mAB) (lote TSH 05840001) utilizado para radioiodação (anticorpo de detecção), adquirido da Serono Diagnostic, Woking, Surrey, Reino Unido.

- Anticorpo policlonal anti-hTSH acoplado a celulose (anticorpo de captura, fase sólida), adquirido da Skybio Limited, Wyboston, Bedford, EUA.
- Azida Sódica, Sigma, St. Louis, EUA.
- Azul Dextrana 2000, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Bisacrilamida, Merck, São Paulo, Brasil.
- Cloramina T p. a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Cloreto de Sódio p.a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Controles de qualidade para imunoenaios baseados em sangue humano (Dade TRI – level), Baxter Diagnostic, Deerfield, EUA.
- Coomassie Brilliant Blue G 250, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Fosfato de sódio monobásico p.a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Fosfato de sódio dibásico p.a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Glicerol, Merck, São Paulo, Brasil.
- Glicina, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA.
- Iodeto de Potássio p.a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Na¹²⁵I comercial livre de carregadores e oxidantes com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL), fornecido pela Nordion Europe S.A..
- Leite liofilizado Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil.
- Meio de cultura celular CD CHO sem nucleosídeos, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- Meio de cultura celular CHO-S-SFM II com nucleosídeo (hipoxantina e timidina), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- Meio de cultura celular CHO-S-SFM II sem nucleosídeo, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- Metabissulfito de Sódio, Carlo Erba, São Paulo, Brasil.
- Metanol, Merck, São Paulo, Brasil.
- Metotrexato (MTX), Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Penicilina – Estreptomicina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- Persulfato de Amônio , Merck, São Paulo, Brasil.

- Preparação de hTSH recombinante da Genzyme (Thyrogen[®], fornecido pela Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil).
- Preparação de referência hTSH hipofisário altamente purificado (NIDDK-hTSHSIAFP-B-2), gentilmente doado pelo NIDDK, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, EUA.
- Proteína A, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Resinas cromatográficas: Sephadex G - 25, Sephadex G - 100, SP Sepharose Fast Flow (SPFF), Blue Sepharose Dye Affinity Fast Flow, Sephacryl S-100 High Resolution, Phenyl Sepharose CL4 - B, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Sal de sódio de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T₃), Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Sistema de dosagem de proteína total, *Micro BCA*, Pierce, Rockford, EUA.
- Sistema de radioimunoensaio para dosagem de tiroxina total (T₄), *RIA Coat-A-Count[®] Total T₄*, Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, CA, EUA.
- Soro fetal bovino dialisado (SFBd), Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- Sulfato de amônio p. a., Merck, São Paulo, Brasil.
- Sulfato de gentamicina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- TEMED (N, N, N', N'tetrametietilenodiamina), Sigma, St. Louis, EUA.
- Tripsina, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.
- TRIS, Sigma, St. Louis, EUA.
- Tween 20, Sigma, St. Louis, EUA.

2.2- MÉTODOS

2.2.1- Expressão de rec-hTSH por linhagem estável de CHO transformada

Os estudos para obtenção de hTSH em escala laboratorial foram realizados em dois sistemas: biorreator tipo “hollow-fiber” e frascos de cultura.

2.2.1.1- 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 CHO transfectadas são semeadas no espaço extracapilar, de onde se extrai periodicamente o meio contendo a proteína de interesse. O meio intracapilar utilizado foi CHO-S-SFM II suplementado com penicilina/estreptomicina (50 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e 100 nM de metotrexato (MTX). O meio extracapilar utilizado foi o mesmo citado anteriormente com ou sem 10% de soro fetal bovino dialisado (dFBS).

Durante 5 dias as células foram deixadas em meio CHO-S-SFM II com 10% de dFBS para aderirem aos capilares. Após este período, o meio foi substituído para remover as células que se soltaram. O meio de perfusão foi periodicamente substituído quando a concentração de glicose era inferior a 2 mg/mL. Após cerca de 20 dias o meio extracapilar foi substituído por meio sem soro e então foram coletadas amostras e armazenadas a -80 °C. Todo o processo foi realizado a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

2.2.1.2- Produção em frascos de cultura

As células CHO transfectadas são cultivadas em frascos de 75 cm² com uma quantidade de aproximadamente 10⁶ células em 10 mL de meio de cultura a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio utilizado para o cultivo é o CHO-S-SFM II com nucleosídeo (hipoxantina e timidina), suplementado com penicilina/estreptomicina (50 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL)

e metotrexato MTX (100 nM) . Durante 5 dias as células são mantidas nesse meio com 10% de soro fetal bovino dialisado (dFBS) até atingirem 80% de confluência. Após a confluência, as células são tripsinizadas, colhidas e divididas em frascos de 162 cm², com aproximadamente 10⁶ células em 20 mL de meio de cultura. O cultivo permanece nas mesmas condições descritas acima até atingirem a confluência citada. Após este período o meio é substituído por meio sem soro. O meio de cultura (sem soro) de diferentes frascos é coletado diariamente e centrifugado a 797 x g por 5 minutos, sendo as células removidas e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C. Vários meios de cultura foram testados: • Meio CD que é um meio quimicamente definido, que não contém nucleosídeos, proteínas de origem animal, de plantas ou de origem sintética; • Meio CHO-S-SFM II, com e sem nucleosídeos, que é um meio completo, sem soro, e de baixo teor protéico (< 100 µg/mL). Nos estudos com esses diferentes meios de cultura, as células CHO transfectadas foram cultivadas em placas com 100 mm de diâmetro e em placas de 24 poços.

2.2.2- Concentração do meio contendo hTSH

2.2.2.1- Resina Sephadex G 25

Ao meio de cultura (30 mL) contendo hTSH, adicionaram-se 6 g da resina Sephadex G 25 que foram mantidos sob agitação constante, por 1 hora à 4 °C. A amostra então foi submetida a uma centrifugação de 5858 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e novamente submetido a uma centrifugação nas mesmas condições já mencionadas. O sobrenadante referente à segunda centrifugação foi analisado por IRMA.

2.2.2.2- Precipitação com solução saturada de sulfato de amônio

Soluções saturadas de sulfato de amônio nas concentrações 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e 80%, foram adicionadas a 50mL de meio de cultura contendo hTSH, sob agitação constante, à 4 °C. Após o final da adição do sulfato de amônio, a amostra permaneceu sob agitação por 1 hora, à 4 °C. A amostra foi então submetida a uma centrifugação 5858 x g por 30 minutos, à 4 °C. O pellet foi recuperado e ressuspenso em 2,5 mL de Na₂HPO₄ 0,3mM pH 7,0. O sobrenadante e o pellet foram analisados por IRMA.

2.2.2.3- Liofilização

O meio de cultura contendo hTSH (1 L) foi dialisado contra água (6 trocas de 4 L) e liofilizado. Após a liofilização o produto foi reconstituído em 40 mL de água.

2.2.2.4- Ultrafiltração tangencial

Utilizou-se um sistema de ultrafiltração tangencial TFF SYSTEM e filtro PELLICON, 50 cm², região de corte de 10 kDa. As amostras de diferentes lotes de meio de cultura contendo hTSH, foram submetidas a uma filtração tangencial com fluxo de 200 mL/h e pressão de 4 bar. Após obtida a concentração desejada, a amostra foi dialisada em tampão Na₂HPO₄ 0,3mM pH 7,0. A amostra concentrada e dialisada e a amostra do permeado foram ambas analisadas por IRMA e HPSEC.

2.2.3- Purificação

Neste estudo foram empregadas várias estratégias de purificação envolvendo as seguintes cromatografias:

2.2.3.1- Cromatografia de troca iônica (catiônica)

Foi utilizada a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF), resina de troca catiônica, em uma coluna de 26 mm de diâmetro X 10cm de altura, previamente equilibrada em acetato de sódio 0,02 M e NaCl 0,05 M, pH 5,0. O hTSH foi eluído com gradiente linear de NaCl, de 0,05 M a 0,25 M, com um fluxo de 200 mL/h, as frações coletadas sendo de 5 mL. A amostra para entrar nesta coluna teve seu pH acertado para 5,0.

2.2.3.2- Cromatografia de afinidade

Foi utilizada a resina de afinidade por corante, Blue Sepharose Fast Flow, em uma coluna de 16 mm de diâmetro X 6cm de altura, previamente equilibrada em Na_2HPO_4 0,02 M, pH 7,0. Foi realizada uma lavagem com pelo menos $2 V_T$ desse mesmo tampão seguida de lavagens com 0,6 M NaCl e 1,5 M NaCl adicionados a este tampão. O fluxo de trabalho foi de 100 mL/h, e as frações coletadas foram de 5 mL.

2.2.3.3- Cromatografia de exclusão molecular

Foi utilizada uma resina de exclusão molecular, Sephacryl S-100 High Resolution, em uma coluna de 26mm de diâmetro X 90cm de altura previamente equilibrada com Na_2HPO_4 0,02 M, pH 7,0 e NaCl 0,15 M. A eluição do hTSH foi feita com o mesmo tampão de equilíbrio, o fluxo de trabalho foi de 60 mL/h e foram colhidas frações de 5 mL.

2.2.3.4- Cromatografia de hidrofobicidade

Foi utilizada uma resina de hidrofobicidade, Phenyl Sepharose CL - 4B, em uma coluna de 16 mm de diâmetro X 10cm de altura previamente equilibrada com Na_2HPO_4 0,02 M, pH 7,0 1M NaCl. Foram feitas várias lavagens para eluição das proteínas contaminantes e do hTSH: Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0 contendo NaCl 1M; Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0 contendo NaCl 0,6 M; Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0; Na_2HPO_4 0,3 mM, pH 7,0; e Na_2HPO_4 0,3 mM, pH 7,0 contendo 40% etanol. Foram colhidas frações de 5 mL e o fluxo foi de 120 mL/h. A amostra para entrar nesta coluna foi acertada para 1M NaCl.

2.2.4- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A avaliação qualitativa e quantitativa do rec-hTSH, nas diferentes etapas do processo de purificação e no meio condicionado, foi realizada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) (15, 54, 62) . Em ambas a detecção foi feita mediante luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220nm.

No caso da HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática tendo sido utilizada como fase móvel o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 contendo cloreto de sódio 0,15 M, e sendo o fluxo de trabalho de 1,0 mL/min.

Na RP-HPLC a coluna foi mantida a 25 °C e foram usados na fase móvel dois tampões A e B (tampão A: fosfato de sódio 0,05 M pH7,0 e tampão B: 50% de A + 50% de acetonitrila). Um gradiente linear de 25 a 100% de tampão B foi estabelecido durante 40 minutos, com fluxo de trabalho de 0,5 mL/min.

Em ambas as metodologias a determinação do tempo de retenção se fez sempre comparativamente à preparação recombinante Thyrogen (Genzyme) bem como a quantificação se fez sempre comparativamente à preparação hipofisária de referência do NIDDK.

2.2.5- Ensaio imunoradiométrico (IRMA) do rec-hTSH

O ensaio foi realizado utilizando amostras em duplicata com adição simultânea de todos os reagentes:

100 μ L de preparação padrão (concentração variando de 1,5 – 100 mUI hTSH/L), 50 μ L de 125 I – mAB anti-hTSH (praticamente 60000 cpm), 300 μ L de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH7,4 contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween 20 e 50 μ L de fase sólida (anticorpo anti-hTSH acoplado a celulose). A reação foi mantida por 16 horas (“overnight”) a temperatura ambiente em um agitador rotatório de tubos (“rotator”). A seguir foram adicionados 2,0 mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 + 0,1% de azida sódica + 0,5% tween 20) e a separação foi realizada por centrifugação a 100 X g por 10 min a 4 °C, sendo esta etapa de lavagem repetida por duas vezes.

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

2.2.6- Determinação de proteína total

A concentração de proteína total foi estimada usando o método “Micro BCA”. Este consiste na detecção colorimétrica e quantificação de proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinconínico (BCA). Utilizou-se uma curva padrão de calibração que relaciona diferentes concentrações de BSA pura (0,5 - 200 μ g/mL) com a absorvância correspondente, no comprimento de onda de 540 nm.

2.2.7- Marcação do rec-hTSH

A marcação do rec-hTSH com 125 I foi realizada pela técnica suave da cloramina T (63) empregando-se 29,6 MBq (0,8 mCi) de radioisótopo e 5 μ g de hTSH dissolvidos em 10 μ L de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4. A reação de marcação foi realizada a temperatura ambiente empregando 0,8 μ g de cloramina T seguida da adição, após 5 minutos de 1 μ g de metabissulfito de sódio e de 200 μ g de iodeto de potássio. A purificação do traçador (125 I – hTSH) foi

efetuada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100, com dimensões 2,5 cm X 50 cm, em um fluxo de 12 mL/h, sendo a eluição realizada em tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 0,1% de BSA e 0,1% de azida sódica. Foram coletadas frações de 2,0 mL e o traçador foi armazenado a -20°C.

No caso da marcação do anticorpo anti-hTSH a técnica de marcação utilizada foi da cloramina T clássica (64). Empregaram-se nesta marcação 37 MBq (1mCi) de ^{125}I e 50 μg de anticorpo anti-hTSH dissolvidos em 10 μL de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4. A reação de marcação foi realizada a temperatura ambiente empregando 10 μg de cloramina T seguida da adição, após 30 segundos de 10 μg de metabissulfito de sódio e 200 μg de iodeto de potássio. A purificação do traçador (^{125}I mAb anti-hTSH) foi efetuada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-150 com dimensões de 1,2 x 100 cm, em um fluxo de 3 mL/h. A eluição foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,05M contendo 1% de BSA e 0,1% de azida sódica. Foram coletadas frações de 0,5 mL e o traçador foi armazenado a 4 °C.

2.2.8- SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições não redutoras. Durante a corrida eletroforética a intensidade da corrente foi de 20 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução de 40% metanol e 10% de ácido acético glacial, por pelo menos uma hora.

A coloração foi efetuada imergindo o gel fixado em uma solução com 0,25% de "Coomassie Brilliant Blue G 250", 45% de metanol e 8% de ácido acético e mantendo-o sob agitação por aproximadamente uma hora. A seguir foi descorado em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, sendo realizadas trocas sucessivas, até ser obtida a transparência desejada. O gel foi conservado em uma solução de 1% de glicerol em água.

2.2.9- Western Blotting (WB)

Para a realização do WB, seguiu-se basicamente a técnica de transferência semi-seca, utilizando o anticorpo anti-hTSH (Mab TC 14), diluído 1:100 (9).

Após a transferência, a membrana foi tratada por dez minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado, e incubada por dezoito horas a temperatura ambiente (Ta) com 50 mL de anticorpo diluído em PBS contendo 5% de leite em pó. Após a incubação com anticorpo, foram realizadas cinco lavagens com PBS 5% de leite. A seguir a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS 5% de leite contendo 200.000 cpm/mL de proteína A marcada com ^{125}I . Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS contendo 0,01% de Tween 20 por pelo menos seis vezes. Na seqüência, foi deixada a temperatura ambiente até secar, sendo posteriormente envolvida em uma folha transparente de PVC, estando assim pronta para a autoradiografia. A exposição autoradiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante um período de tempo que depende da intensidade da resposta desejada, da atividade específica da proteína A marcada com ^{125}I , da afinidade e título dos anticorpos e da riqueza em produto a ser analisado.

2.2.10- Ensaio biológico

Antes do ensaio foi administrada triiodotironina (T3) na água, durante 5 dias, a camundongos Balb C, para suprimir o TSH endógeno. Diferentes doses (1, 5, 10 e 20 μg) do rec-hTSH purificado em nosso laboratório, do Thyrogen e do pit-hTSH NIDDK foram injetadas intraperitonealmente (3 animais por dose) e amostras de sangue foram coletadas do seio orbital, 6 horas após a injeção. O nível de T4 liberado serviu como medida da bioatividade do TSH injetado e foi dosado por RIA (kit da DPC).

2.2.11- Meia vida circulatória do rec-hTSH em camundongos

A meia vida circulatória do rec-hTSH-IPEN e rec-hTSH-Thyrogen foi determinada a partir da curva de concentração plasmática de hTSH em camundongos aos quais foi administrado, pela veia da cauda, 1 μ g dessas preparações. Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss. As amostras de sangue foram coletadas via plexo retro-orbital após diferentes tempos, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, e 180 minutos, 3 animais para cada tempo. O sangue coletado foi centrifugado a 6000 X g por 10 minutos, o plasma foi removido e posteriormente o conteúdo de hTSH avaliado por IRMA.

A curva de concentração plasmática do rec-hTSH foi decomposta em duas equações exponenciais, uma correspondente à rápida queda inicial, seguida da fase de eliminação lenta. A meia vida da fase rápida e lenta são calculadas pela inclinação das retas correspondentes a cada uma dessas fases.

2.2.12- Seqüenciamento da porção N-terminal

Para determinar a seq:uência de aminoácidos da porção N-terminal o produto purificado foi submetido a 5 ciclos de degradação de Edman pelo laboratório Commonwealth Biotechnologies Inc. (Richmond, VA).

2.2.13- Espectrometria de massa MALDI-TOF

Amostras do rec-hTSH purificado, rec-hTSH Thyrogen e pit-hTSH NIDDK, foram submetidas a espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorbition Ionization-Time of Flight mass spectrometry) pelo laboratório Commonwealth Biotechnologies Inc. (Richmond, VA).

A espectrometria de massa foi realizada em um espectrômetro de massa Voyager DE utilizando o ácido sinapínico (AS) como matriz.

3- Resultados

3.1- Estudo de diferentes meios de cultura para o cultivo de células CHO produtoras de rec-hTSH

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos quando células CHO produtoras de rec-hTSH foram cultivadas em placas de 100 mm nos meios CD e no meio CHO-S-SFM II sem e com nucleosídeos e com adição de metotrexato (MTX). Observa-se que tanto a concentração de hTSH quanto a de proteína total é bem menor quando se utiliza o meio CD, o que acarreta uma atividade específica ($\mu\text{g hTSH}/\mu\text{g}$ proteína total) cerca de 50% menor com relação ao meio SFM com nucleosídeo + MTX. Quando se considera a produtividade por célula, determinada mediante teste de Mônaco e cols. (49), realizado em placas de 24 poços, obtém-se, conforme mostra a Tabela 4, uma produção de hTSH 50% menor no meio CD do que no meio SFM com nucleosídeos + MTX, enquanto essa produção é cerca de 20% menor com o meio SFM sem nucleosídeos e cerca de 5% menor quando é usado o meio SFM com nucleosídeos.

Com base nesses resultados resolvemos utilizar, em nossas produções de hTSH, o meio SFM com nucleosídeos + MTX.

TABELA 3: Níveis de hTSH e conteúdo protéico obtidos com diferentes meios de cultura, em placas de 100 mm.

Meio	hTSH ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Proteína total ^b ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Atividade específica ($\mu\text{g hTSH}/\mu\text{g}$ proteína) (%)
CD sem nucleosídeos	0,70	62,5	1,12
SFM sem nucleosídeos	2,04	123,8	1,65
SFM com nucleosídeos+MTX	2,74	121,2	2,26
SFM com nucleosídeos	2,40	115,8	2,07

^adeterminado por RP-HPLC

^bdeterminada por BCA

TABELA 4: Níveis de hTSH obtidos com diferentes meios de cultura, em placas de 24 poços, considerando o número de células presentes.

Meio	hTSH ($\mu\text{g/ml}$)	hTSH ($\mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{ célula} \cdot \text{dia}^{-1}$)
CD sem nucleosídeos	0,42	1,47
SFM sem nucleosídeos	1,0	2,30
SFM com nucleosídeos+MTX	1,6	2,90
SFM com nucleosídeos	1,2	2,80

3.2- Sistemas de produção de rec-hTSH

Dois sistemas de produção de rec-hTSH foram padronizados: biorreator e frascos de cultura.

3.2.1- Produção de rec-hTSH em biorreator

O ciclo de duas produções (A e B) de rec-hTSH em biorreator é apresentado na Figura 4 . Em ambas, o nível mais alto de hTSH foi praticamente $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, obtido nos primeiros 20 dias quando ainda dFBS está presente no meio.

Uma redução do nível de hTSH, da ordem de 3 vezes, ocorreu, entretanto, após a retirada do soro. Fato semelhante é relatado na literatura (73, 75) na utilização de um sistema análogo de hollow-fiber. O conteúdo protéico obtido nestes diferentes lotes de produção foi da ordem de $1,9 \text{ mg/mL}$.

3.2.2- Produção de rec-hTSH em frascos de cultura

Doze diferentes lotes de produção foram realizados em frascos de cultura de 162 cm^2 (Tabela 5). O nível de hTSH obtido nas diferentes produções foi bastante reprodutível. Nas doze produções realizadas a concentração média de hTSH foi de $4,5 \pm 0,78 \mu\text{g/ml}$ e o conteúdo protéico de $142,7 \pm 23,9 \mu\text{g/ml}$.

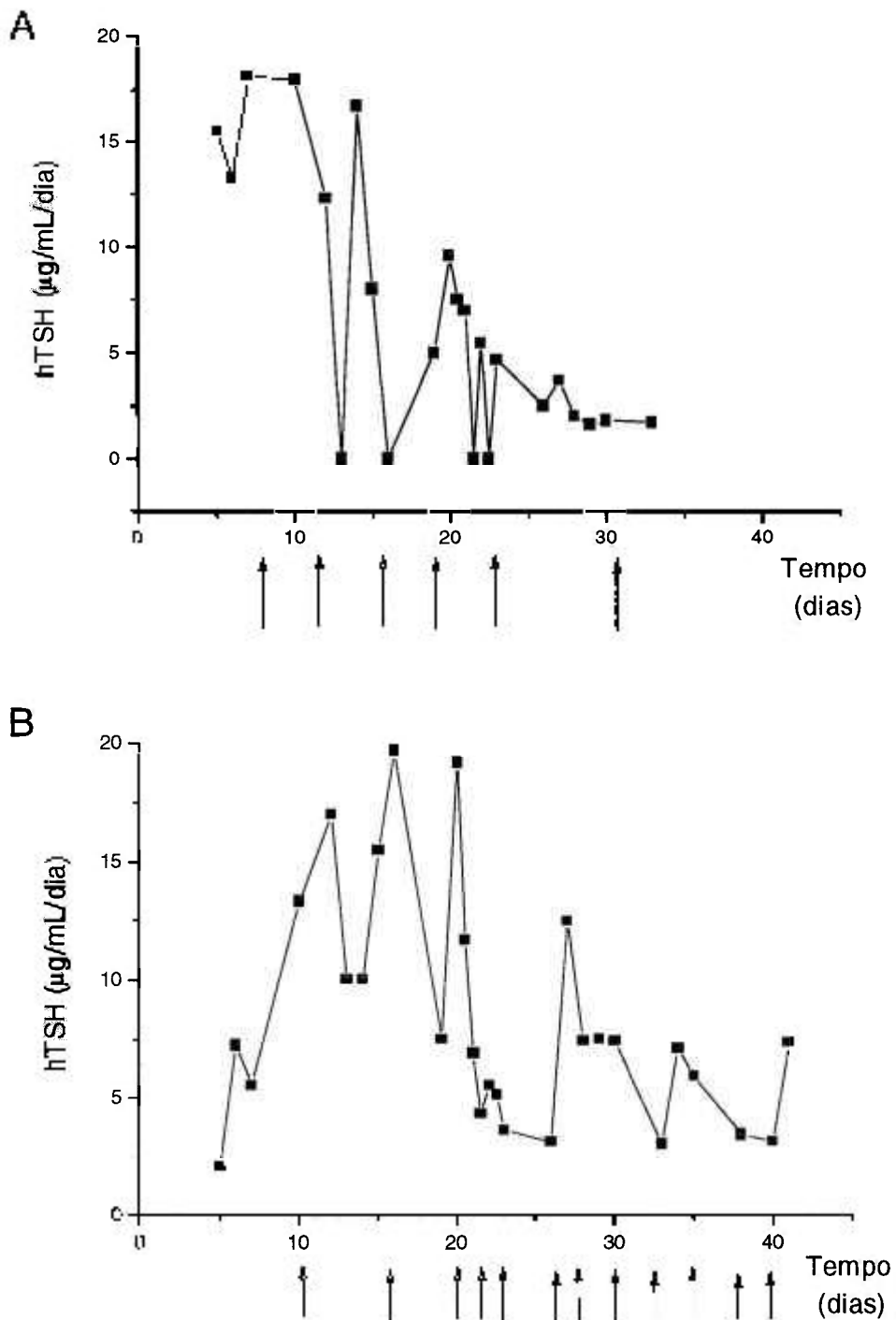


Figura 4 Exemplos de ciclos de produção do rec-hTSH em biorreator tipo hollow-fiber. O meio extracapilar utilizado foi CHO-S-SFM II com 10% dFBS até o dia 20. O meio intracapilar foi o mesmo CHO-S-SFM II sem dFBS. ■, coleta de meio extracapilar; ↑, troca de meio intracapilar

TABELA 5 Concentração de hTSH e de proteína total nos diferentes lotes de produção realizados em frascos de 162 cm².

Produção	hTSH ^a (µg/ml)	Proteína ^b (µg/ml)	Atividade específica (µg hTSH/µg proteína) (%)
P1	4,7	100,8	4,7
P2	5,3	142,8	3,7
P3	5,3	160,6	3,3
P4	4,6	170,6	2,7
P5	5,6	157,6	3,6
P6	3,7	136,0	2,7
P7	4,1	117,3	3,5
P8	3,2	129,8	2,5
P9	5,0	180,4	2,8
P10	4,0	158,6	2,5
P11	4,5	141,2	3,2
P12	3,4	116,5	2,9

^adeterminado por RP-HPLC

^bdeterminado por BCA

A atividade específica (conteúdo de hTSH sobre o conteúdo total de proteína x 100) média encontrada nos nossos lotes foi de $3,2 \pm 0,64$ %.

O andamento da produção de rec-hTSH, para quatro lotes (P4, P6, P7 e P12), que estendeu-se por tempos diferentes, respectivamente 10, 13, 17 e 23 dias é exemplificado na Figura 5.

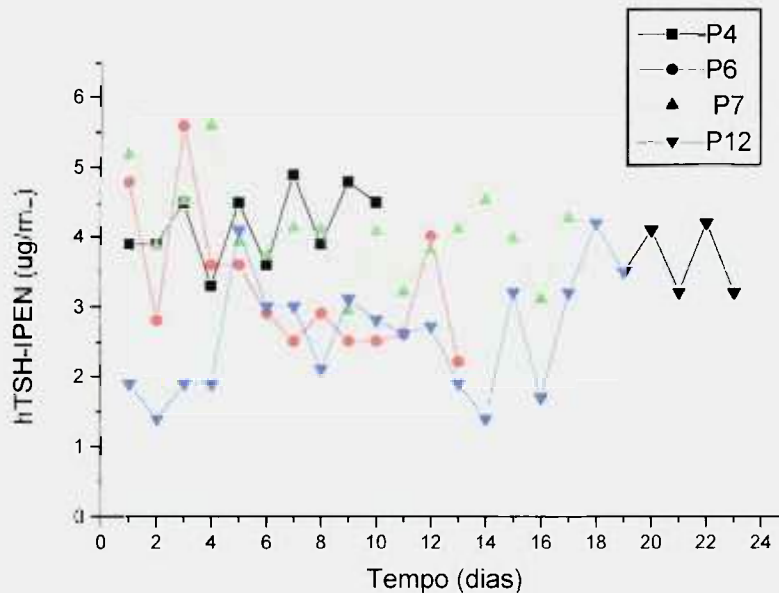


Figura 5 Variação da concentração de hTSH, relativa às produções 4, 6, 7 e 12, ao longo do cultivo.

3.3- Caracterização do rec-hTSH no meio de cultura, antes da purificação

Os meios contendo hTSH oriundos do cultivo em biorreator ou em frascos de cultura foram analisados qualitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de exclusão molecular (HPSEC) e de fase reversa (RP-HPLC). Em ambas as metodologias o hTSH foi identificado pelo seu tempo de retenção (t_R) em comparação ao tempo de retenção de uma preparação de referência ou por sua atividade imunológica medida por ensaio imunoradiométrico (IRMA). Neste trabalho foram utilizadas duas preparações de referência: a preparação recombinante Thyrogen da empresa Genzyme e a preparação hipofisária do "National Hormone and Pituitary Program" dos EUA (pit-hTSH). Os perfis obtidos para estas preparações em HPSEC e RP-HPLC são apresentados nas Figuras 6 e 7 respectivamente. Nestas figuras estão indicadas também as posições das subunidades α e β do pit-hTSH. Observa-se que a preparação hipofisária é mais impura que a preparação recombinante Thyrogen.

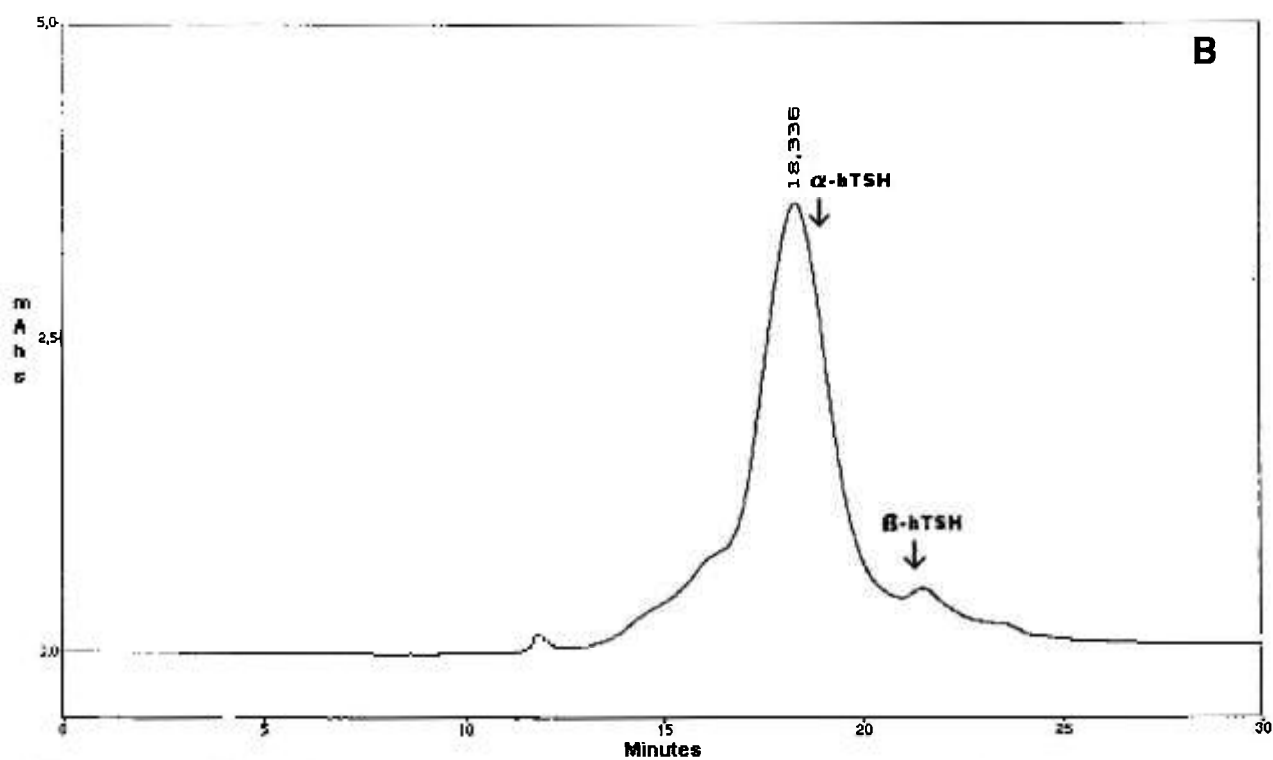
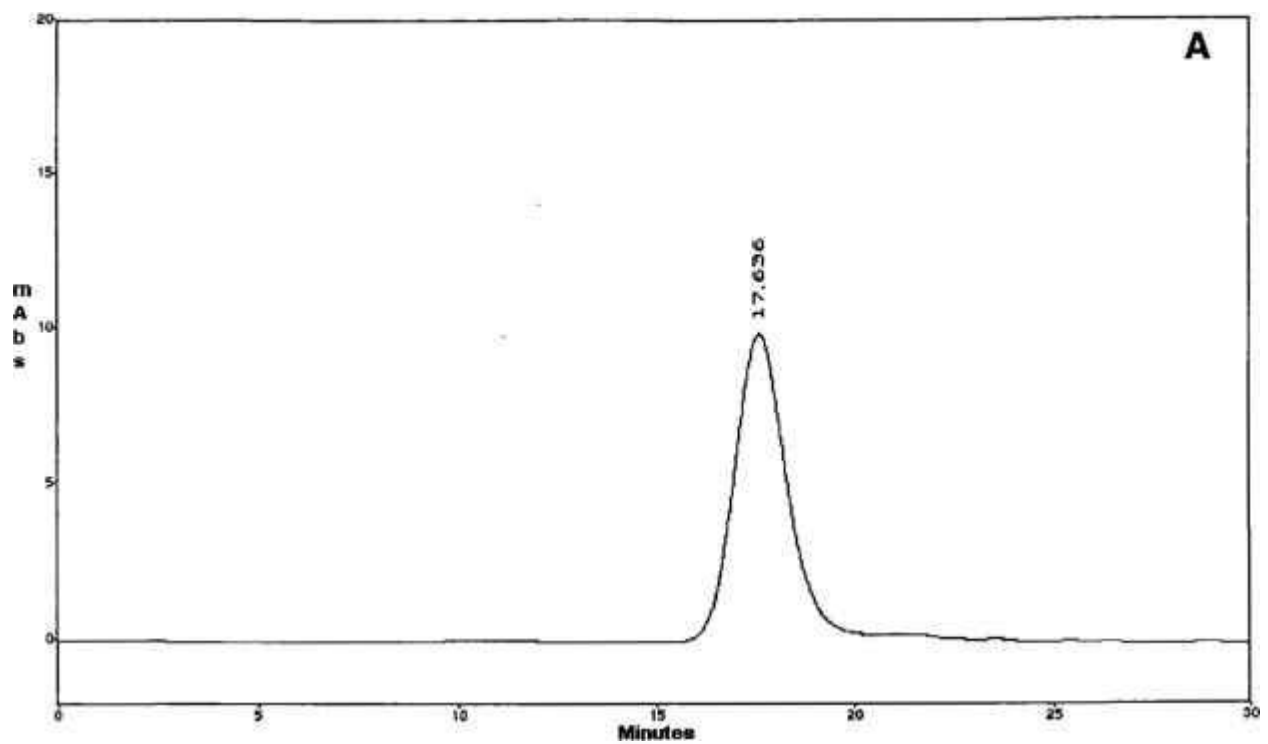


Figura 6 Perfil de eluição em HPSEC da preparação de referência Thyrogen (A) e da preparação hipofisária do NIDDK (B).

_____ A 220 nm

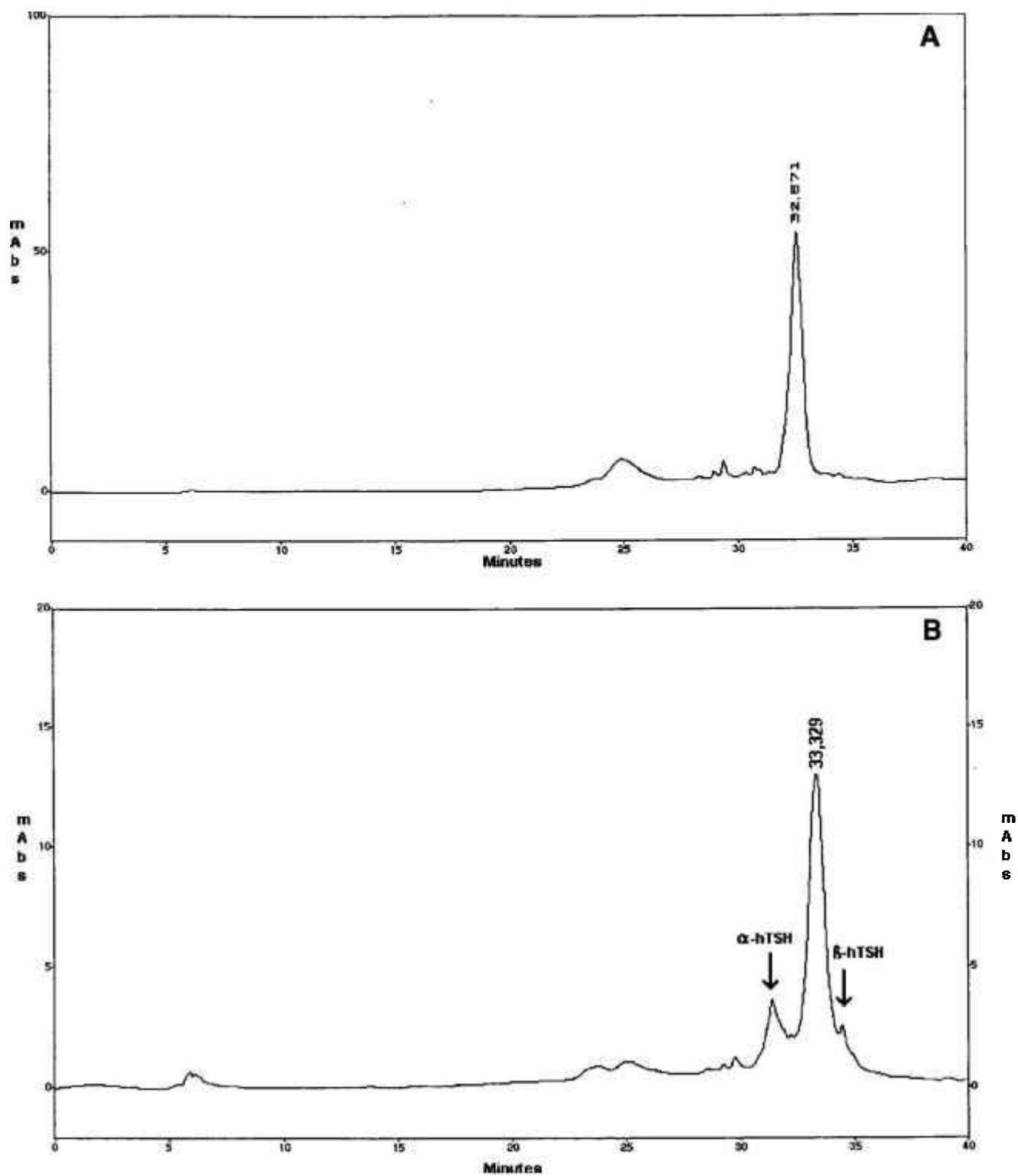


Figura 7 Perfil de eluição em RP-HPLC da preparação recombinante Thyrogen (A) e da preparação hipofisária do NIDDK (B).

_____ A 220 nm

A análise em HPSEC do meio condicionado contendo hTSH (Figura 8A) identificou dois principais contaminantes, um com t_R de 11,8 min e outro com t_R de 14,7 min. Observou-se nestes picos alguma atividade imunológica sugerindo a presença de formas relacionadas de hTSH de alto peso molecular (agregados ou dímeros, por exemplo). A análise em RP-HPLC (Figura 8B) mostrou que a maioria das proteínas contaminantes presentes no meio condicionado são menos hidrofóbicas que o hTSH, que elui com um tempo de retenção (t_R) de 32,8 min. Um grande pico com $t_R = 41,3$ min surge devido ao gradiente e a componentes do meio de cultura, enquanto o principal contaminante, um pico com $t_R = 30,4$ min, é composto pelo mesmo material que elui na HPSEC, no tempo de retenção de 14,68 min.

Uma metodologia de quantificação do hTSH presente no meio condicionado foi desenvolvida neste trabalho, por RP-HPLC. Esta metodologia foi validada considerando os seguintes parâmetros: exatidão, linearidade de resposta, precisão e sensibilidade.

Um teste de recuperação foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de hTSH recombinante puro a um meio condicionado controle, obtido realizando o mesmo processo de cultivo próprio das células produtoras com células CHO não transformadas. A quantificação foi realizada contra uma preparação de referência (hTSH-NIDDK), sendo a recuperação média de hTSH de $97,4 \pm 1,83$ %, com um coeficiente de variação (cv) de 1,9%, $n = 12$ (Tabela 6).

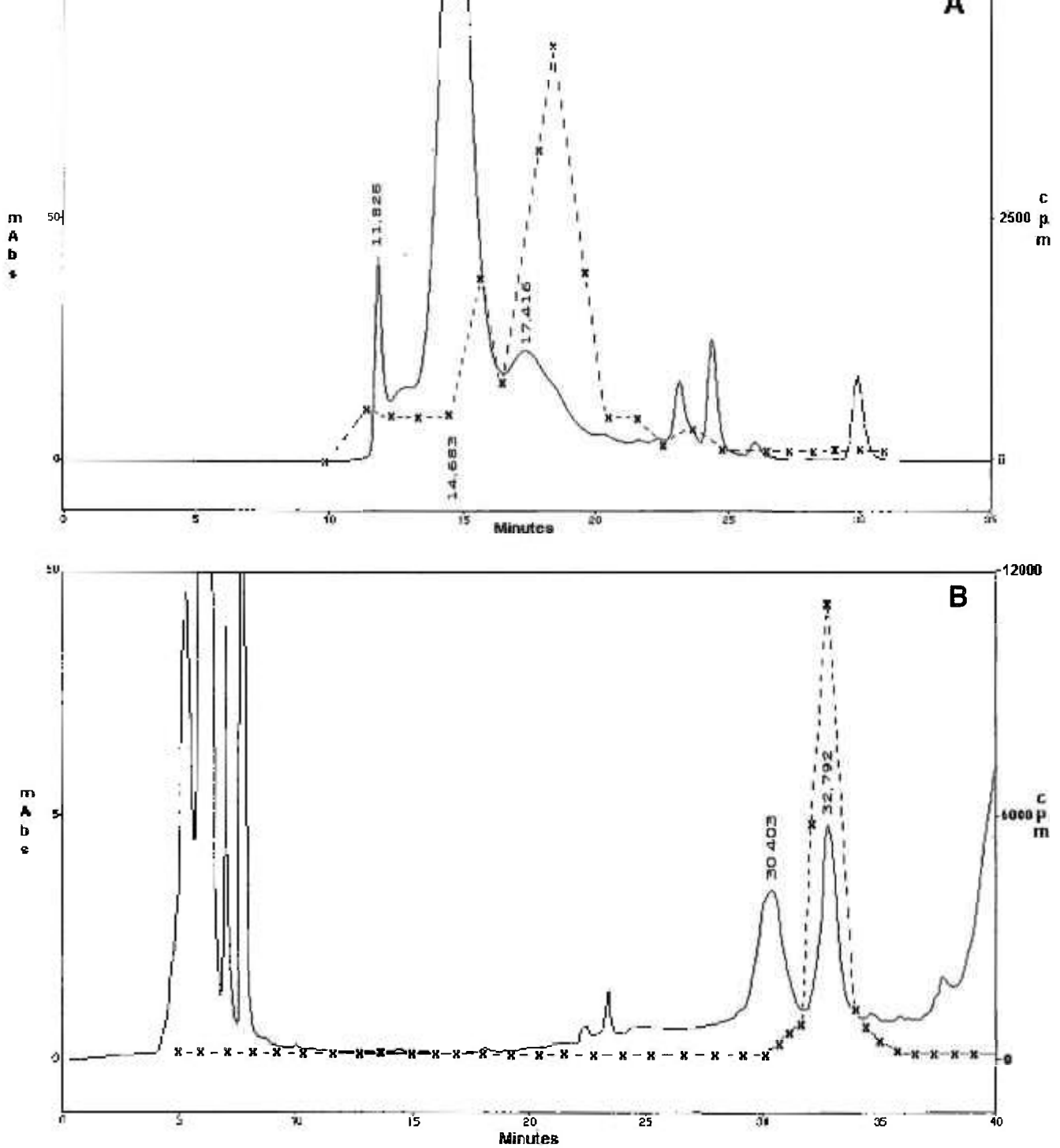


Figura 8 Perfil de eluição do meio condicionado de células CHO obtido em HPSEC (A) e RP-HPLC (B).

x-----x IRMA

_____ A 220 nm

Foi assim demonstrada a exatidão da determinação do hTSH no meio de cultura condicionado, sendo a correlação entre hTSH adicionado e recuperado altamente significativa ($r = 0,9999$; $p < 0,001$; $n = 6$) com um erro sistemático inferior a 2%.

$$Y_{\text{recuper}} = 0,9838 X_{\text{adicionado}} - 0,0279$$

TABELA 6 Teste de recuperação de quantidades conhecidas de hTSH recombinante adicionadas ao meio condicionado controle

hTSH adicionado (μg)	Area do pico (u.a.)	hTSH determinado (μg)	Recuperação (%)
20	879,0	19,60	98,0
10	448,7	9,96	99,6
5	215,9	4,81	96,2
2,5	105,9	2,36	94,4
1,25	55,1	1,23	98,4
0,625	27,3	0,61	97,6

A curva dose-resposta (hTSH adicionado X área do pico), no intervalo de 0,625 μg a 20 μg é apresentada na Figura 9. A equação da curva dose-resposta obtida foi: $Y_{\text{u.a.}} = 44,006 X_{\mu\text{g}} + 1,1248$ onde "u.a." são unidades arbitrárias de área.

O coeficiente de correlação altamente significativo ($r = 0,9999$; $p < 0,0001$ para $n = 15$) confirmou a linearidade de resposta obtida nesta metodologia de RP-HPLC.

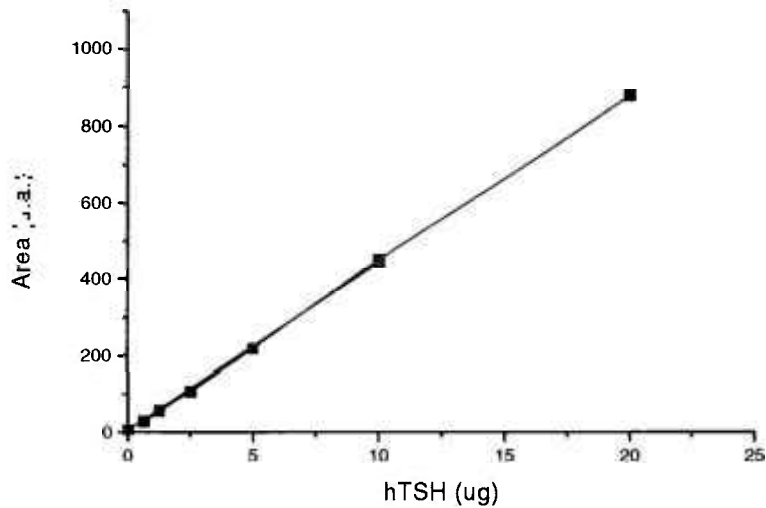


Figura 9 Curva dose-resposta para determinação de hTSH por RP-HPLC, relacionando área do pico com quantidades de hormônio.

A precisão intra e interdia do sistema de RP-HPLC foi avaliada, analisando nas mesmas condições e em triplicata, em um único dia e em três dias diferentes, três meios contendo hTSH. Estes foram preparados adicionando-se hTSH puro a um meio controle, obtendo concentrações que variaram de 3 µg/mL a 50 µg/mL (A, B,C). Os dados da Tabela 7 mostram coeficientes de variação (cv) intradia e inter-dia inferiores a 2,6 e 7,2% respectivamente. Determinações com níveis menores de precisão, (até cv = 12,6%), mas ainda úteis, foram também obtidas quando as mesmas amostras foram analisadas interdia usando a curva de calibração apresentada na Figura 9, sem correr uma preparação de referência cada dia.

TABELA 7 Determinação por RP-HPLC da precisão intra e interdia utilizando meios com diferentes níveis de hTSH.

Amostra	Intradia ^a (µg/mL)	Interdia	
		Padrão interno (µg/mL)	Curva dose-resposta
A	3,04 ± 2,52 ^b	3,17 ± 4,19 ^b	3,17 ± 5,52 ^b
B	6,15 ± 2,15	6,25 ± 7,17	5,35 ± 12,55
C	50,0 ± 1,06	49,8 ± 0,53	49,0 ± 3,42

^a Todos os dados referem-se a 3 determinações

^b cv, expresso em porcentagem (desvio padrão /média x 100)

O limite de detecção (sensibilidade) da metodologia de RP-HPLC foi calculada com base no desvio padrão da resposta relativa à menor dose usada (0,625 µg) e à dose zero (adição apenas do meio controle) usando o teste "t" (p= 0,05), conforme a formulação de Rodbard (67):

$$y_{min} = y_0 + ts_0 \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}}$$

$$s_p = \sqrt{\frac{s_0^2(n_0 - 1) + s_1^2(n_1 - 1)}{n_0 + n_1 - 2}}$$

onde:

y_{min} = resposta mínima detectável (área do pico)

y_0 = resposta da determinação da dose zero

n_0 = número de replicatas das determinações da dose zero

s_0 = desvio padrão da determinação da dose zero

n_1 = número de replicatas das determinações da menor dose usada

s_1 = desvio padrão da determinação da menor dose usada

t = valor do "t" de Student

A sensibilidade assim calculada foi de 0,205 µg (ou 1,02 µg/mL), com cv intra-ensaio de 5,6% (n = 6). A exatidão e precisão deste cálculo teórico da sensibilidade foram também confirmadas experimentalmente. Uma quantidade conhecida de 0,200 µg de hTSH, analisada nas mesmas condições de ensaio, forneceu um valor de $0,196 \pm 0,006$ µg (n = 3) (cv = 3%), quando determinada pela curva dose-resposta.

3.4- Concentração do meio contendo hTSH

Antes de iniciar a purificação em colunas cromatográficas foi necessária uma etapa de concentração, face ao grande volume de meio em geral resultante da cultura celular, em cada produção.

Foram testados quatro métodos:

- 1- Incubação com resina Sephadex G-25.
- 2- Precipitação com solução saturada de sulfato de amônio.
- 3- Liofilização.
- 4- Ultrafiltração.

Utilizando o 1º método conseguiu-se uma concentração da ordem de 6 vezes com relação ao volume inicial. A Tabela 8 mostra o conteúdo de hTSH e de proteína total antes e após a incubação com resina Sephadex G-25. Obteve-se com este método uma recuperação de hTSH de apenas 23% e de proteína total de 79%, não sendo portanto útil a concentração do meio de cultura por este método.

TABELA 8 Conteúdo de hTSH e proteína total antes e depois incubação com resina Sephadex G-25.

Sephadex G-25	hTSH ^a (µg)	Proteína total ^b (µg)
Antes	156,0	2448,0
Depois	36,3	1943,3

^a determinado por IRMA

^b determinado por BCA

Os resultados obtidos pelo 2º método (precipitação com sulfato de amônio) são apresentados nas Tabelas 9 e 10. A Tabela 9 apresenta a recuperação de hTSH no sobrenadante, em diferentes concentrações de sulfato de amônio, partindo de um conteúdo inicial de hTSH de 104 µg, onde observa-se que todo hTSH foi recuperado no sobrenadante. Nova análise foi feita com saturações de 50% a 80% sendo o

hTSH avaliado no sobrenadante e no precipitado, partindo de um conteúdo inicial de hTSH de 128 μg (Tabela 10).

TABELA 9 Recuperação de hTSH no sobrenadante em relação a diferentes saturações de sulfato de amônio

Saturação (%)	hTSH no sobrenadante ^a (μg)	Recuperação (%)
20	148,0	142,0
30	105,0	101,0
40	108,0	104,0

^a determinado por IRMA

TABELA 10 Recuperação de hTSH no sobrenadante e no precipitado em relação a diferentes saturações de sulfato de amônio

Saturação (%)	Recuperação no sobrenadante ^a (%)	Recuperação no precipitado (%)
50	50,0	22,0
60	41,0	29,0
70	21,0	27,0
80	0,5	19,0

^a determinado por IRMA

Considerando que a recuperação de hTSH no precipitado é muito baixa (máximo 29% com solução de sulfato de amônio com 60% de saturação), este método não se mostrou útil para a concentração do meio de cultura.

A concentração por liofilização, como se vê na Tabela 11, apresentou uma recuperação de hTSH de 94% e uma concentração de até 25 vezes. Qualitativamente não houve alteração do produto após liofilização (Figura 10). Portanto a concentração por liofilização pode ser uma alternativa a ser utilizada.

TABELA 11 Conteúdo de hTSH antes e depois da liofilização

Liofilização	hTSH (mg)
Antes	3,6
Depois	3,4

Por entender que a liofilização possa não ser a melhor opção econômica para um processo produtivo, foi estudado um outro sistema de concentração mais facilmente adaptado a escalas maiores de produção: concentração/ diálise do meio condicionado por ultrafiltração tangencial, utilizando um sistema TFF SYSTEM LABSCALE (MILLIPORE) e membrana PELLICON XL, 50 cm² com região de corte de 10 kDa.

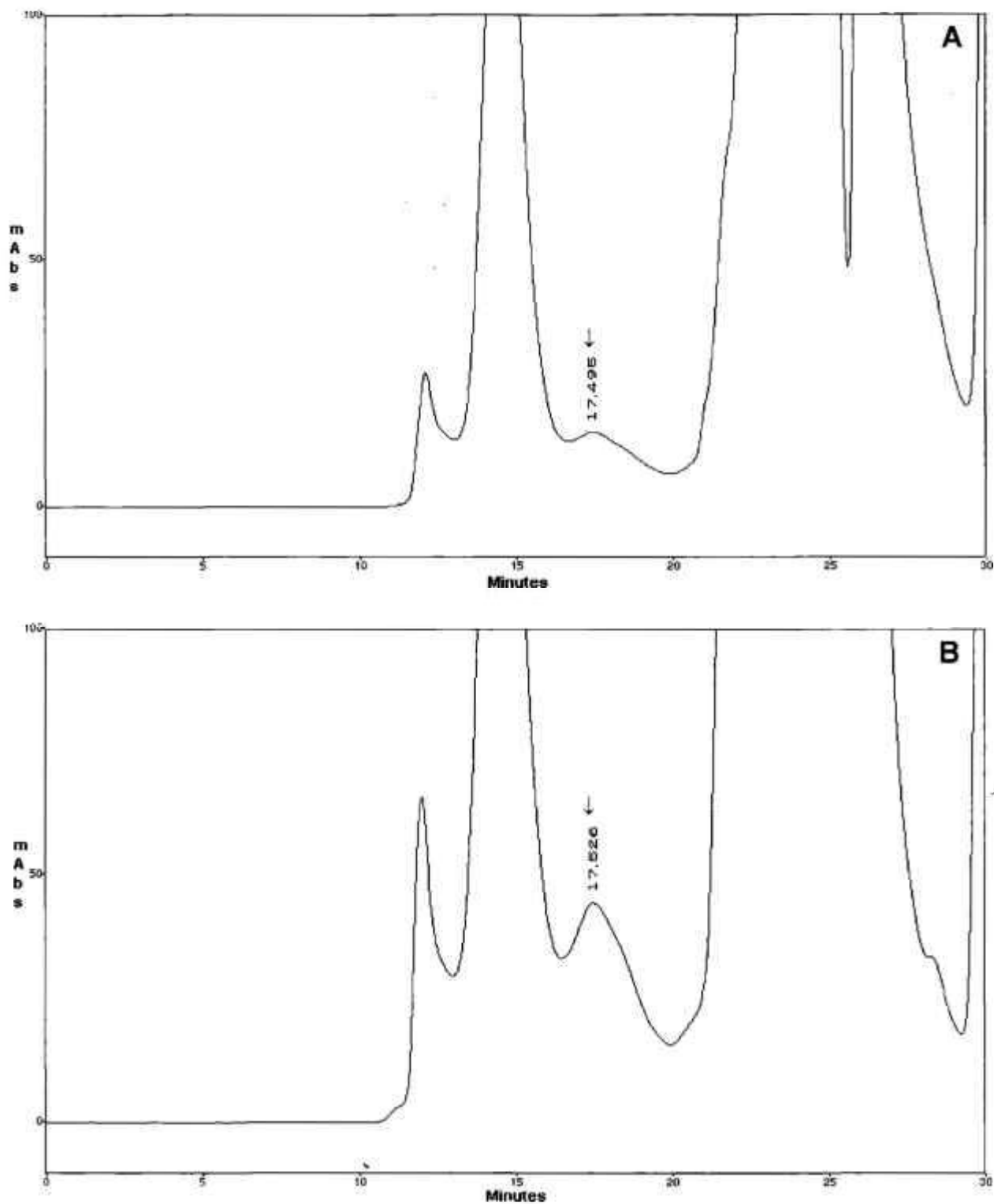


Figura 10 Cromatogramas do meio condicionado de CHO antes da liofilização (A) e depois da liofilização (B) obtidos em HPSEC. A diferente área dos picos é basicamente devida a diferentes concentrações das amostras.

_____ A 220 nm

A Tabela 12 mostra os dados obtidos para a concentração de diferentes lotes de meio contendo hTSH. O sistema utilizado permitiu uma concentração de 6–75 vezes, e a recuperação média de hTSH por esse processo foi de $82 \pm 12,4\%$, $cv = 15,1\%$ ($n = 6$).

Tabela 12 Concentração por ultrafiltração tangencial de diferentes lotes de meio contendo hTSH.

Lote	Fator de de concentração (... vezes)	Recuperação após concentração e diálise (%)
1	36	84
2	51	67
3	38	91
4	75	72
5	57	76
6	6	100

A análise qualitativa desse processo por HPSEC (Figura 11) mostra que não ocorreram mudanças significativas do rec-hTSH presente no meio condicionado após concentração e diálise desse material. Este foi então o método escolhido para concentrar os meios contendo o hTSH a ser purificado.

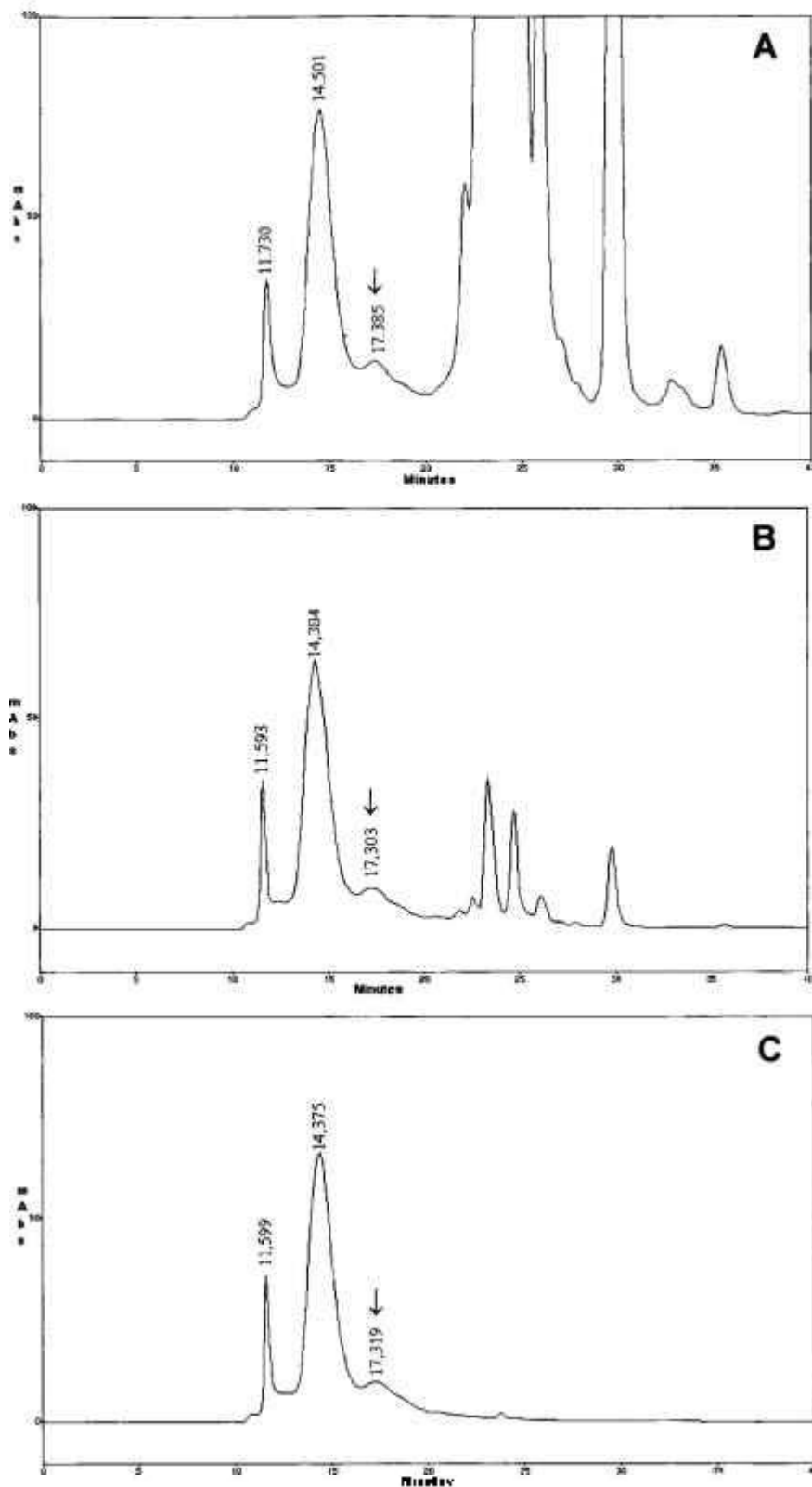


Figura 11 Cromatogramas obtidos em HPSEC para o meio condicionado antes da concentração por ultrafiltração (A), após concentração (B) e após diálise e concentração (C). Foram aplicadas alíquotas de $200\mu\text{L}$, $7\mu\text{L}$ e $4\mu\text{L}$ respectivamente em A, B e C.

_____ A 220 nm

3.5- Purificação

Várias estratégias foram utilizadas neste trabalho para purificação do rec-hTSH-IPEN pelas quais obtiveram-se produtos com grau de pureza que variaram de 90% a 99%.

3.5.1- Estratégia 1: Catiônica - Afinidade - Exclusão Molecular

A estratégia 1 consistiu em 3 etapas: uma cromatografia de troca iônica, tipo catiônica, seguida de uma cromatografia de afinidade ao corante (Dye Affinity) e por fim de uma cromatografia de exclusão molecular.

Na primeira etapa utilizou-se a resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF). A Figura 12 mostra o cromatograma resultante da purificação do meio condicionado em coluna de troca iônica. Observam-se nesta figura vários picos, sendo o pico correspondente ao hTSH identificado por IRMA. A região que mostrou maior atividade imunológica corresponde à concentração de NaCl no gradiente de 0,12 M a 0,16 M. Ao longo da corrida cromatográfica foi detectada também atividade imunológica (bem menor) em outras regiões, durante a lavagem com tampão de acondicionamento da coluna com concentração de NaCl de 0,07 M a 0,08 M e de 0,195 M a 0,205 M, o que mostra a heterogeneidade da preparação de hTSH, fato freqüentemente relatado na literatura.

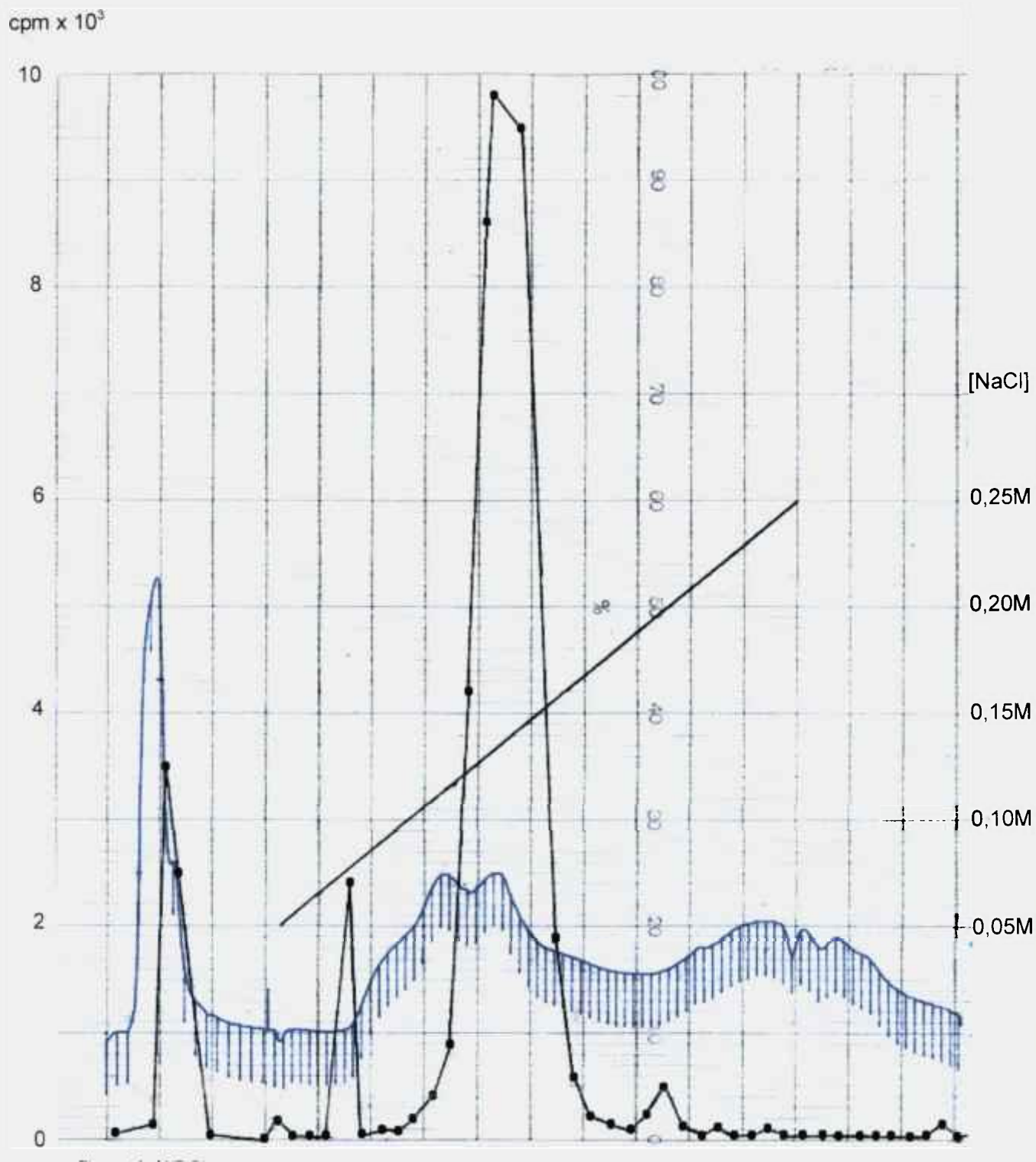


Figura 12 Perfil de eluição em SP Sepharose FF, resultante da purificação do meio condicionado concentrado e dialisado.

— A 280 nm

●—● hTSH IRMA (cpm)

As frações foram reunidas e o "pool" resultante analisado em HPSEC, tendo-se obtido o perfil da Figura 13, onde se vê a presença de vários picos. Entre esses, o de tempo de retenção $t_R = 17,4$ min é o que apresenta maior atividade imunológica. Os outros que apresentam também alguma atividade imunológica, embora pequena, podem ser hTSH alterado. Sendo que os picos à direita do hTSH aparecem também no tampão presente nesta amostra, calculamos um conteúdo de hTSH da ordem de 27% sobre a proteína total. A análise deste mesmo pool em RP-HPLC mostrou o perfil da Figura 14, sendo o pico correspondente ao hTSH o de $t_R = 35,9$ min. Observa-se ainda neste perfil a presença de grande quantidade de proteínas contaminantes com hidrofobicidade bem menor que a do hTSH que eluem com tempo de retenção entre 5 e 10 min.

Esse mesmo pool foi submetido a uma nova etapa de purificação usando uma resina de afinidade para corante (Blue Sepharose Fast Flow). A Figura 15 mostra o perfil obtido nessa etapa de purificação sendo o hTSH identificado por IRMA. As frações que apresentaram maior atividade imunológica e que correspondem à eluição com 0,6M NaCl, foram reunidas e analisadas em HPSEC (Figura 16), mostrando que cerca de 85% da proteína resultante desta etapa é hTSH. Os picos que aparecem à direita do hTSH, que elui no $t_R = 17,9$ min, foram também encontrados no tampão da amostra. O pool proveniente da cromatografia de afinidade analisado em RP-HPLC apresentou o perfil da Figura 17. Comparando esse perfil com aquele obtido na RP-HPLC para o pool proveniente da cromatografia de troca iônica do tipo catiônica (Figura 14) verificamos que a cromatografia de afinidade por corante eliminou praticamente todas as formas menos hidrofóbicas que o hTSH.

O produto resultante da cromatografia de afinidade por corante, foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular utilizando a resina Sephacryl S-100 High Resolution.

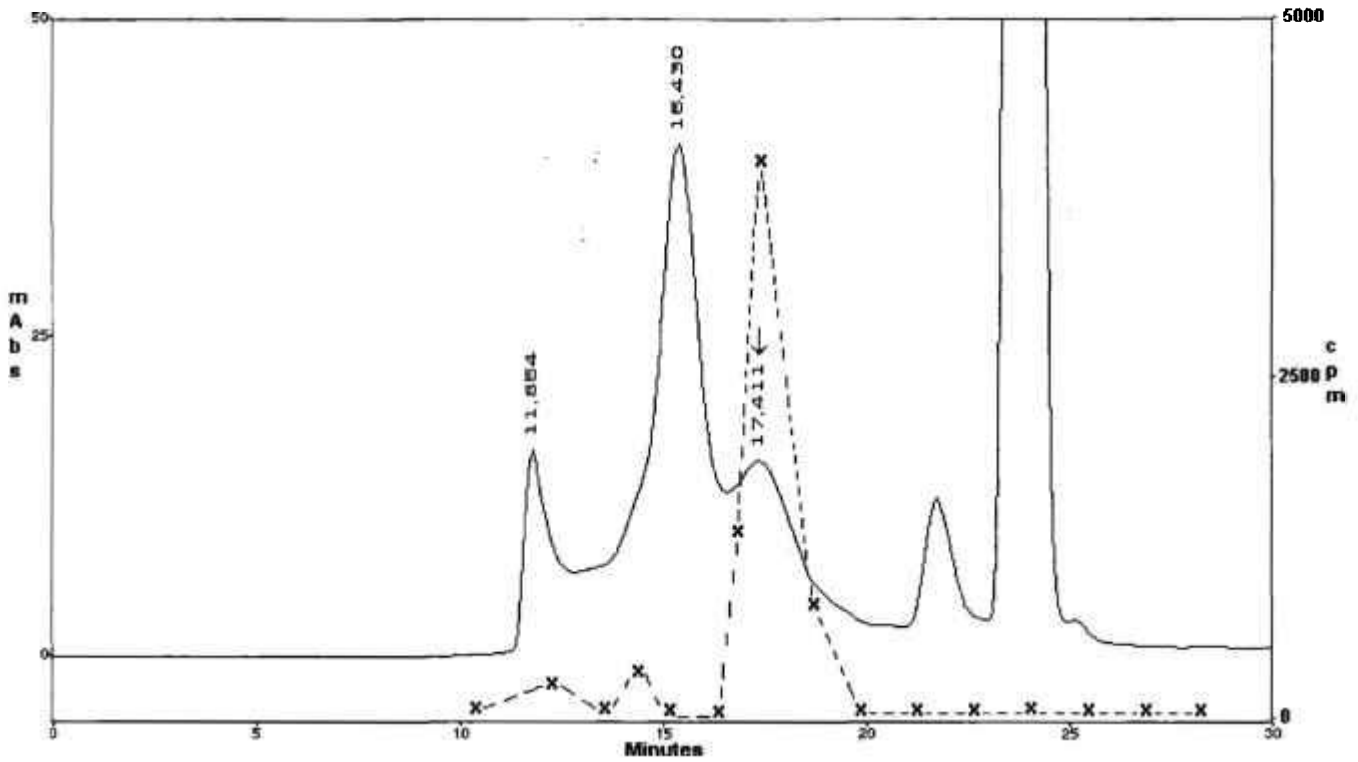


Figura 13 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação em SP-Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,2$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

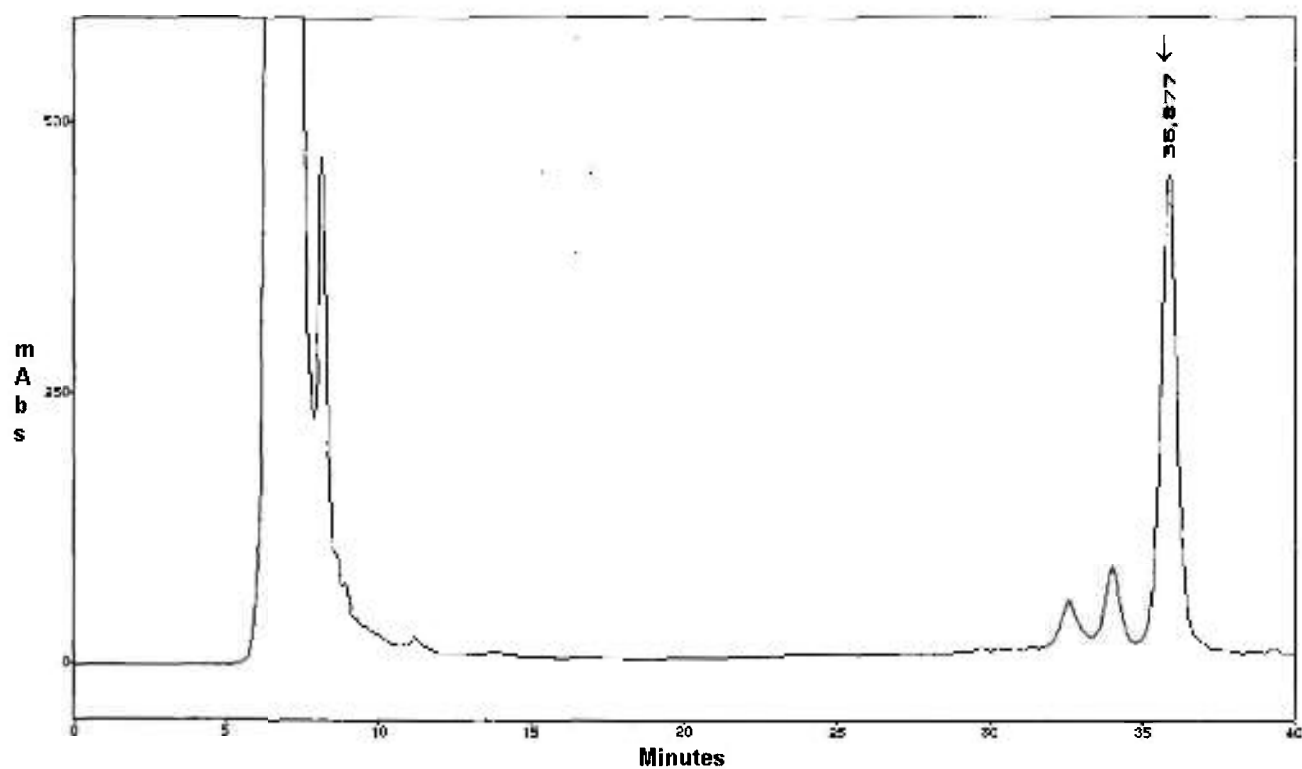


Figura 14 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação em SP-Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 35,82\text{min}$.

_____ A220 nm

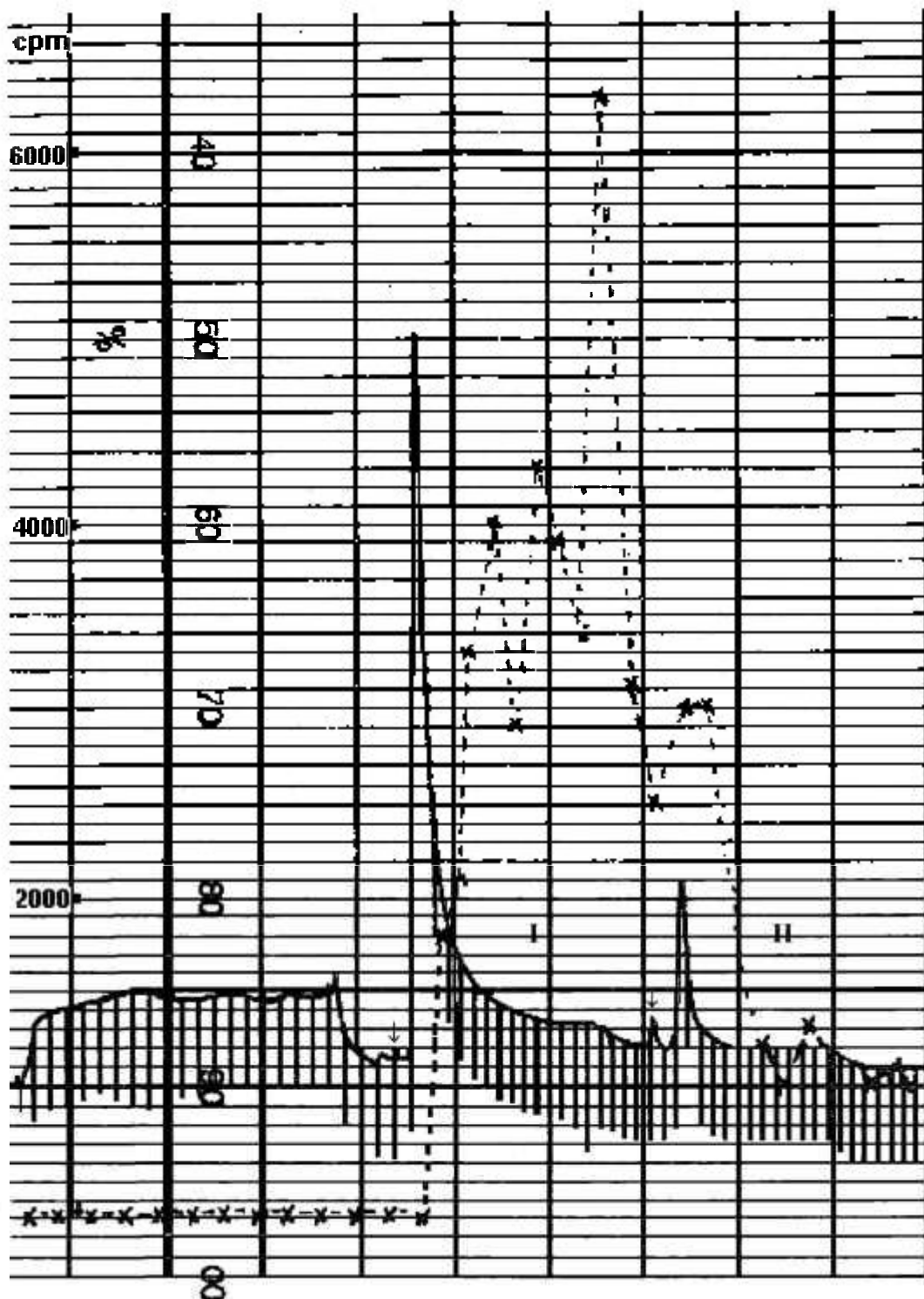


Figura 15 Cromatograma resultante da purificação do rec-hTSH em Blue Sepharose Fast Flow.

I Lavagem com 0,6 M de NaCl em tampão 0,02 M de Na_2HPO_4 pH 7,0.

II Lavagem com 1,5 M de NaCl em tampão 0,02 M de Na_2HPO_4 pH 7,0.

— A 280 nm

x-----x IRMA (cpm)

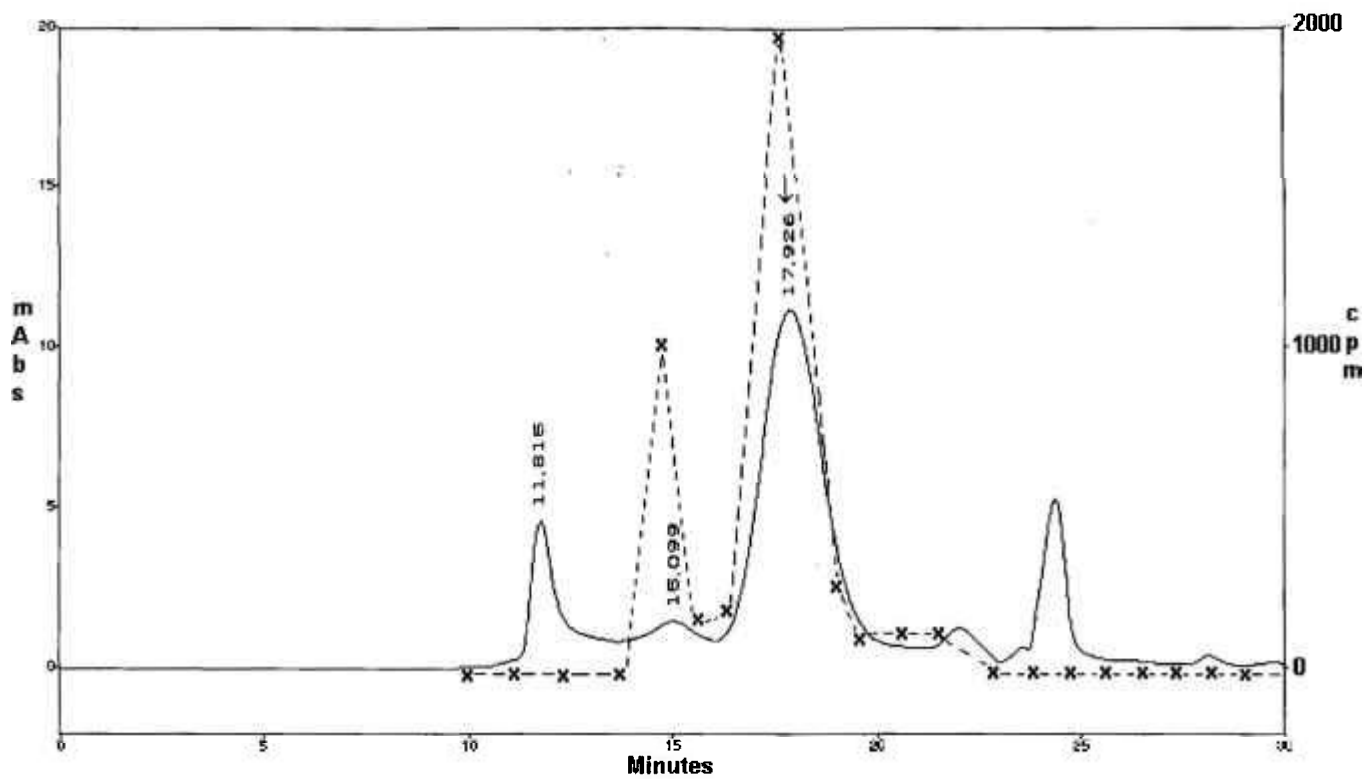


Figura 16 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação em Blue Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,53\text{min}$.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

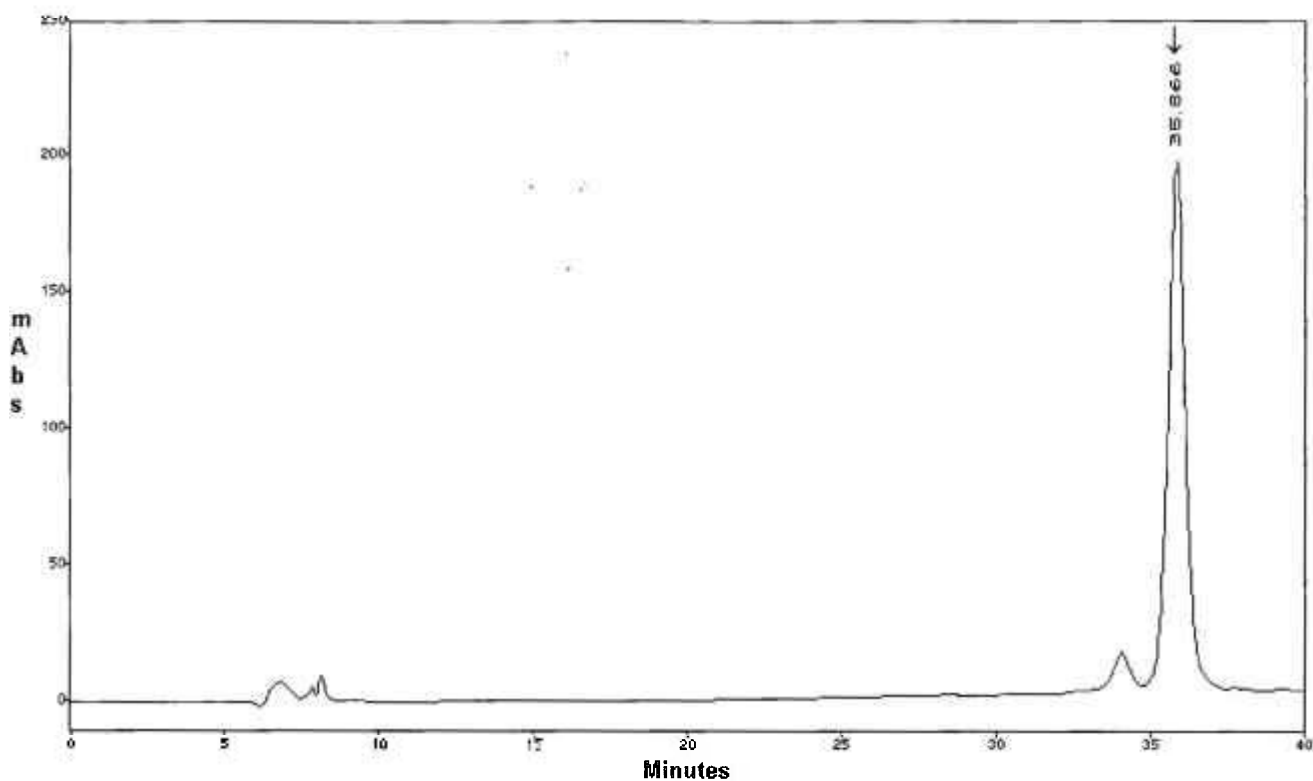


Figura 17 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação em Blue Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 35,82$ min.

_____ A220nm

A Figura 18 mostra o perfil obtido nesta cromatografia sendo a identificação do hTSH feita por IRMA. A análise, em HPSEC, do produto resultante dessa terceira etapa de purificação é apresentado na Figura 19 A. Os vários picos que aparecem neste perfil além daqueles correspondentes ao hTSH e a outras formas agregadas se devem ao tampão da amostra conforme mostra a Figura 19 B. O perfil obtido em RP-HPLC é apresentado na Figura 20. Observa-se neste caso um perfil idêntico àquele obtido para o pool proveniente da cromatografia de afinidade, como era previsível.

A análise de balanço de massa de uma purificação representativa baseado nesta estratégia é apresentada na Tabela 13. A recuperação individual média de cada etapa foi de 60%, sendo a recuperação final do processo de 22% com um fator de purificação de 40 vezes.

TABELA 13 Análise do balanço de massa relativo à purificação de rec-hTSH

Etapa	Recuperação de hTSH ^a (%)	Fração de Massa ^b	Fator de Purificação (...Vezes)
Meio condicionado	100*	0,030	----
Troca catiônica	58,3	0,097	3,2
Afinidade	35,3	0,353	11,6
Exclusão Molecular	21,8	1,20	40,0

^a calculada por HPSEC

^b conteúdo de hTSH determinado por HPSEC dividido pela massa total de proteína determinada por BCA.

* calculado por RP-HPLC

O produto obtido segundo a estratégia acima descrita, quando analisado em SDS-PAGE e Western Blotting, apresentou o comportamento apresentado na Figura 21. Observa-se nessa figura que o rec-hTSH IPEN apresenta um perfil e uma pureza similar àquela apresentada pelas outras duas preparações de referência de hTSH, uma hipofisária e outra recombinante, embora o seu peso

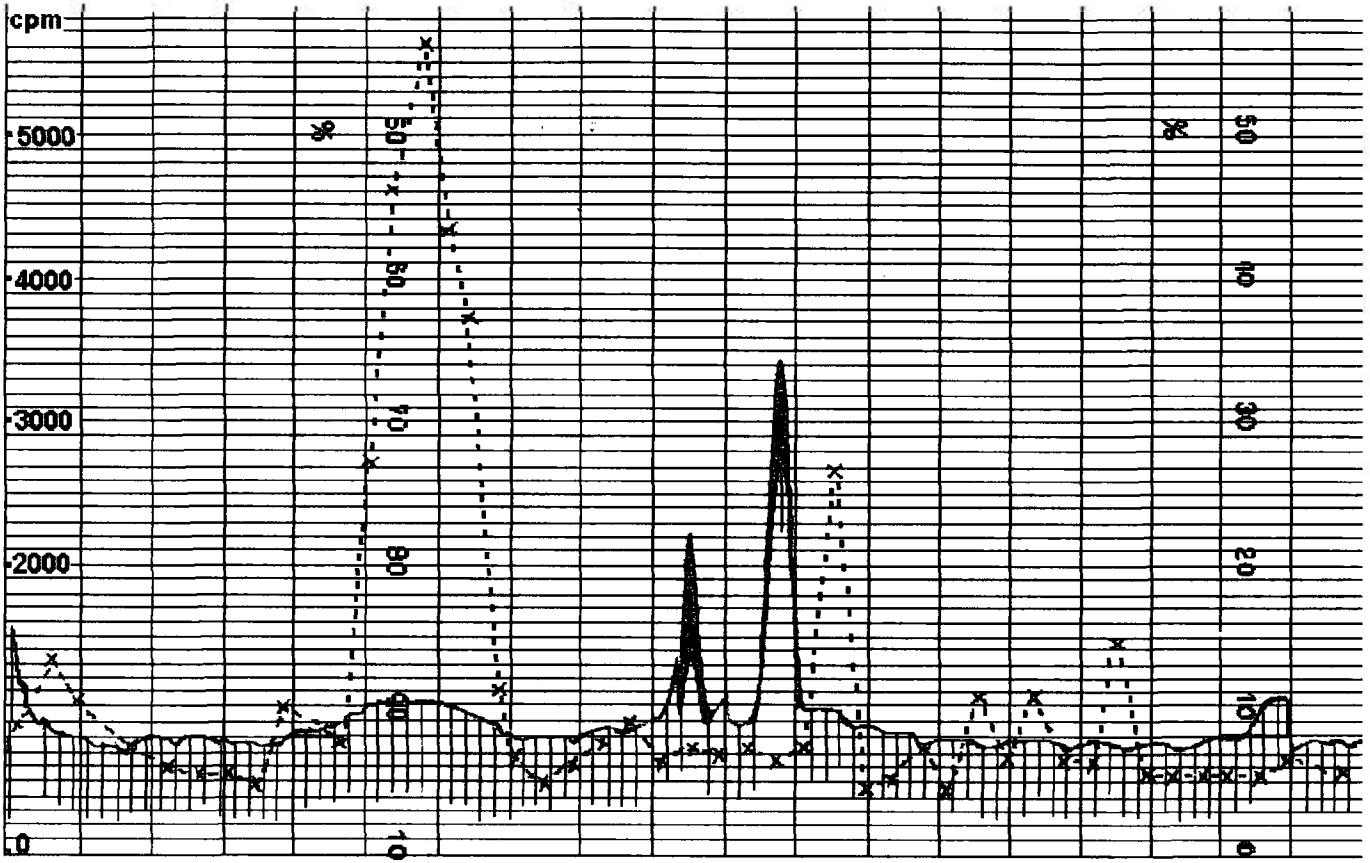


Figura 18 Cromatograma resultante da purificação do rec-hTSH em Sephacryl S-100 High Resolution.

x-----x IRMA (cpm)

_____ A 280 nm

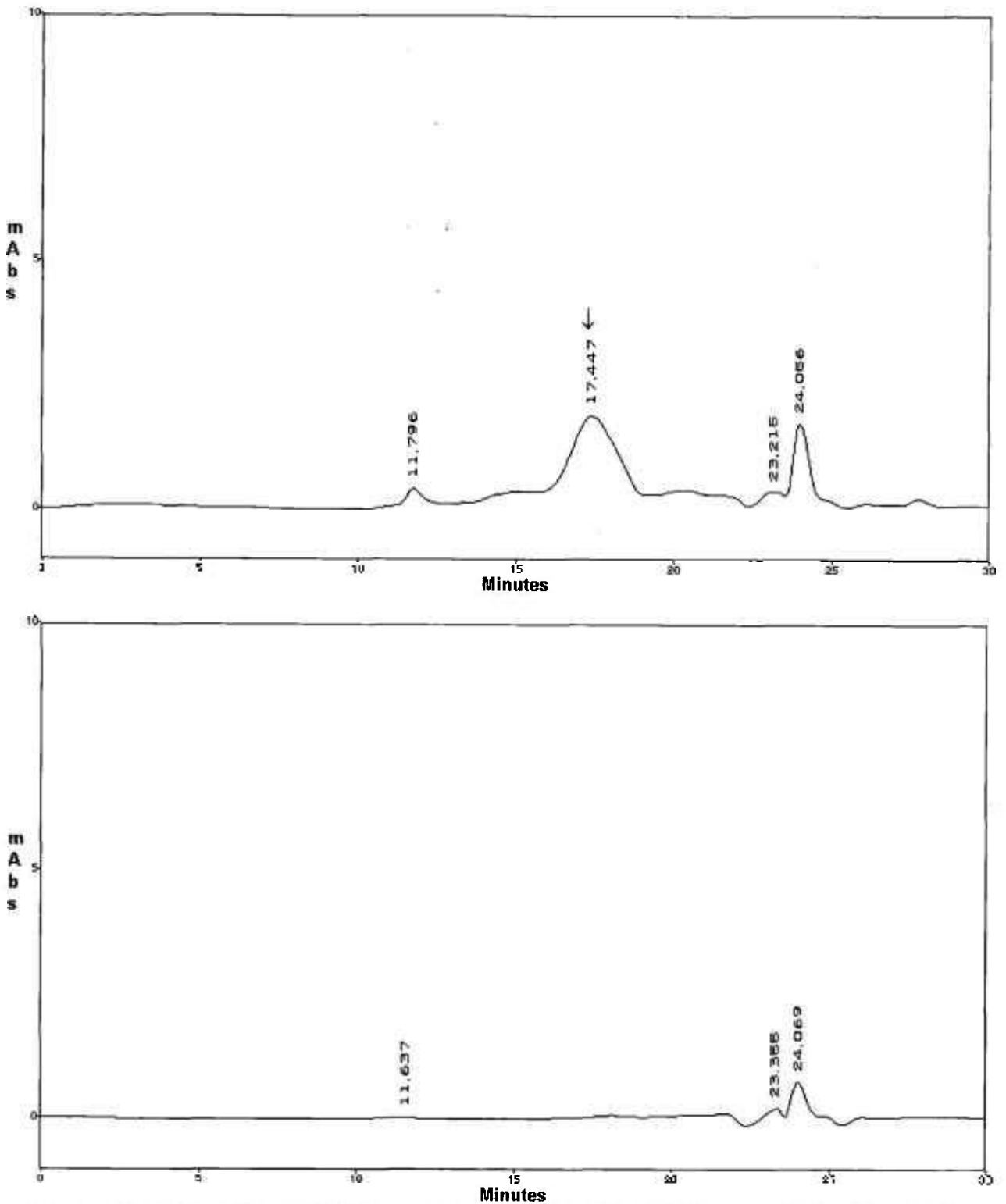


Figura 19 Análise em HPSEC do pool resultante após purificação em Sephacryl S-100 High Resolution (A) e do tampão da amostra (B). A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,2$ min.

_____ A 220 nm

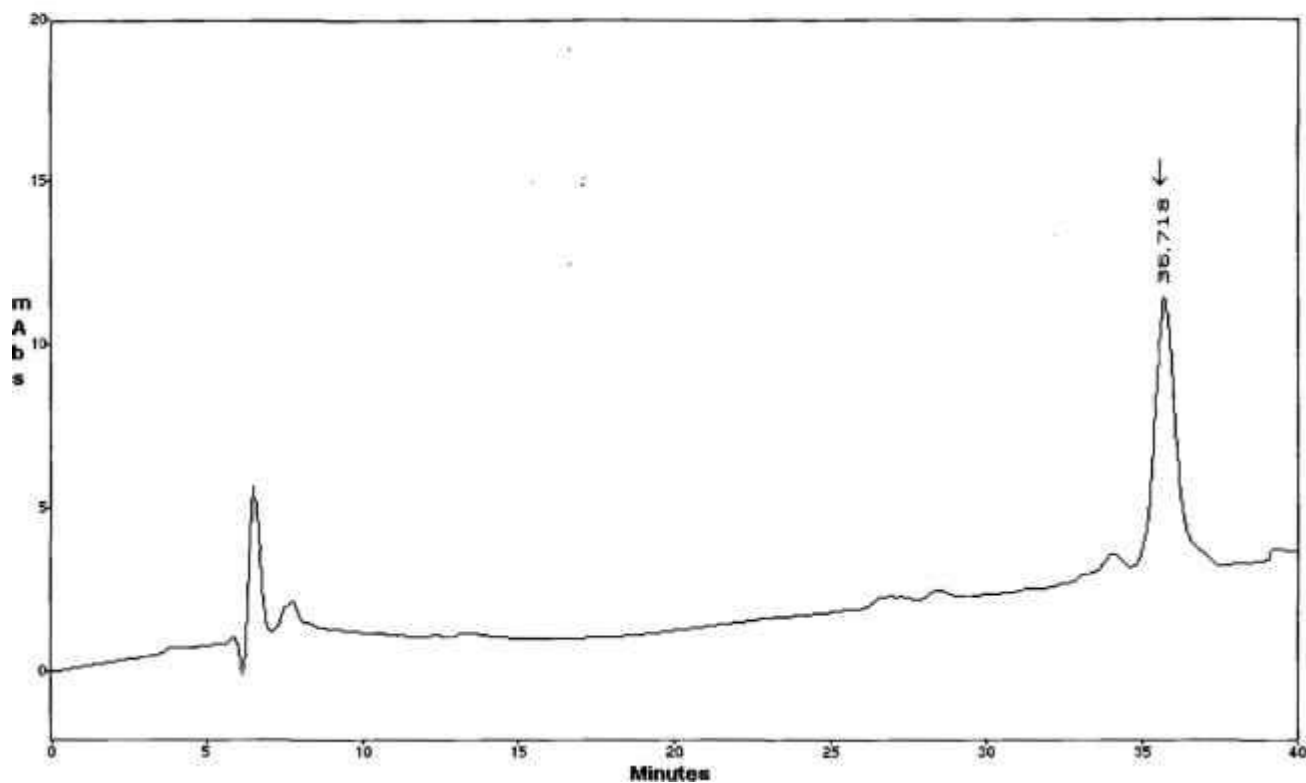


Figura 20 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação em Sephacryl S-100 High Resolution. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 35,8$ min.

_____ A 220 nm

molecular aparente (cerca de 28 kDa) seja menor daquele do Thyrogen e levemente maior daquele da preparação hipofisária. O Western Blotting confirmou a identidade do hTSH purificado e a ausência de quantidades significativas de formas alteradas.

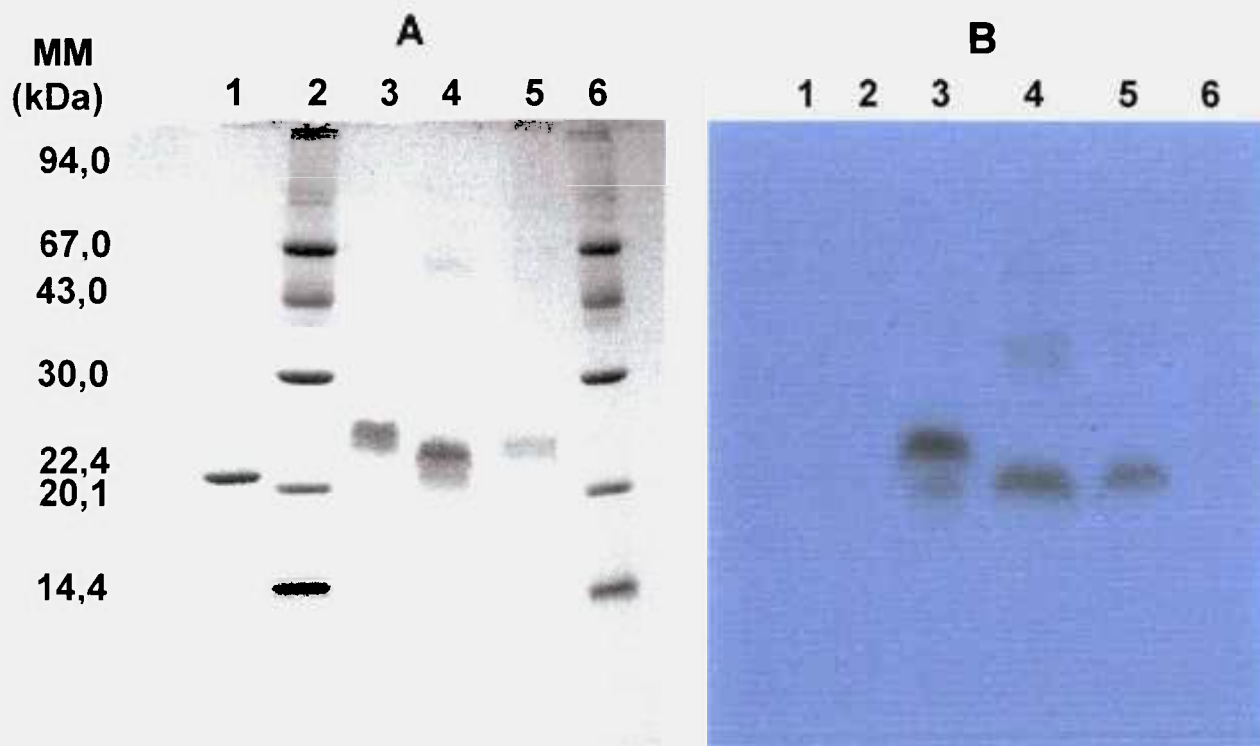


Figura 21 SDS-PAGE sem redução de diferentes preparações de hTSH após coloração com Comassie Brilliant Blue G (A) e após Western-Blotting (B).

- 1 - rec-hGH (WHO);
- 2 - marcadores de massa molecular;
- 3 - rec-hTSH-Thyrogen;
- 4 - pit-hTSH (NIDDK);
- 5 - rec-hTSH-IPEN;
- 6 - marcadores de massa molecular.

3.5.2- Estratégia 2: Afinidade / Hidrofóbica - Exclusão Molecular

A estratégia 2 consistiu em duas etapas. Como primeira etapa foi utilizada uma cromatografia de afinidade ao corante (Dye Affinity) ou uma cromatografia de interação hidrofóbica seguidas por uma cromatografia de exclusão molecular.

Na Figura 22 podemos observar o perfil obtido quando a cromatografia de afinidade é utilizada como primeira etapa, onde se vêem vários picos, sendo que a maior atividade imunológica é encontrada na eluição com NaCl 0,6M. As frações correspondentes a essa região foram reunidas em um pool e analisadas em HPSEC (Figura 23). Observa-se a eluição do hTSH em um $t_R = 18,5$ min e a diminuição significativa do contaminante que elui com tempo de retenção de praticamente 15 min. A análise em RP-HPLC desse mesmo pool mostrou o perfil da Figura 24, sendo o pico correspondente ao hTSH o de $t_R = 32,7$ min. Uma alta recuperação de hTSH foi conseguida nesta etapa (91%).

O cromatograma obtido quando a cromatografia de interação hidrofóbica foi realizada como primeira etapa é apresentado na Figura 25. Picos relativamente grandes de proteína foram eluidos, todos com atividade imunológica, em três das cinco etapas (I; IV; V) de lavagens. Nas duas outras condições de eluição (II; III), os picos de proteína não foram relevantes embora apresentem alguma atividade imunológica. A análise em HPSEC e em RP-HPLC do pico I (Figura 26 e Figura 27) mostrou que com 0,02 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl elui a maior parte do contaminante com t_R em torno de 15 min na HPSEC e em torno de 30 min na RP-HPLC. Uma parte do hTSH foi perdido nesta etapa de lavagem, como mostram as regiões entre 17-18 min e 32 min, respectivamente em HPSEC e RP-HPLC. A etapa de lavagem com 0,3 mM Na_2PO_4 (pico IV) (Figura 28 e Figura 29) eliminou uma fração significativa do contaminante que elui com t_R em torno de 11 min e também formas mais hidrofóbicas que o hTSH. O hTSH eluído com 40% etanol (pico V) analisado em HPSEC e RP-HPLC mostrou o perfil da Figuras 30 e 31 respectivamente. Um alto fator de purificação (25 vezes) foi obtido com a cromatografia de interação hidrofóbica, apesar de ainda estar presente uma quantidade considerável de contaminante com t_R em torno de 11 min. A recuperação desta etapa de purificação foi de 62%.

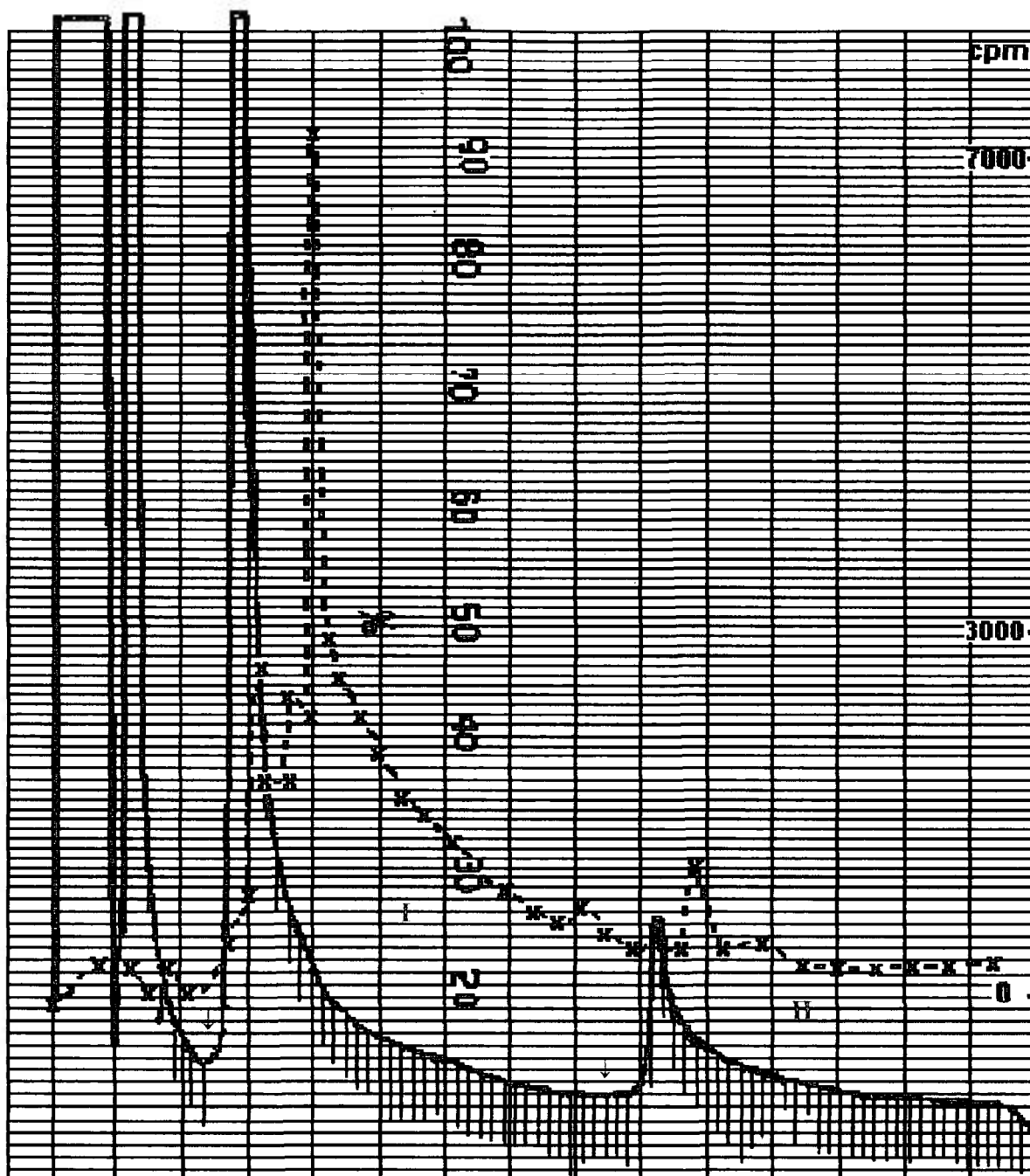


Figura 22 Cromatograma resultante da purificação do meio condicionado (concentrado e dialisado) em Blue Sepharose Fast Flow.

I - Lavagem com NaCl 0,6 M em tampão 0,02M de Na_2HPO_4 pH 7,0.

II - Lavagem com NaCl 1,5 M em tampão 0,02M de Na_2HPO_4 pH 7,0.

_____ A 280 nm

x-----x IRMA (cpm)

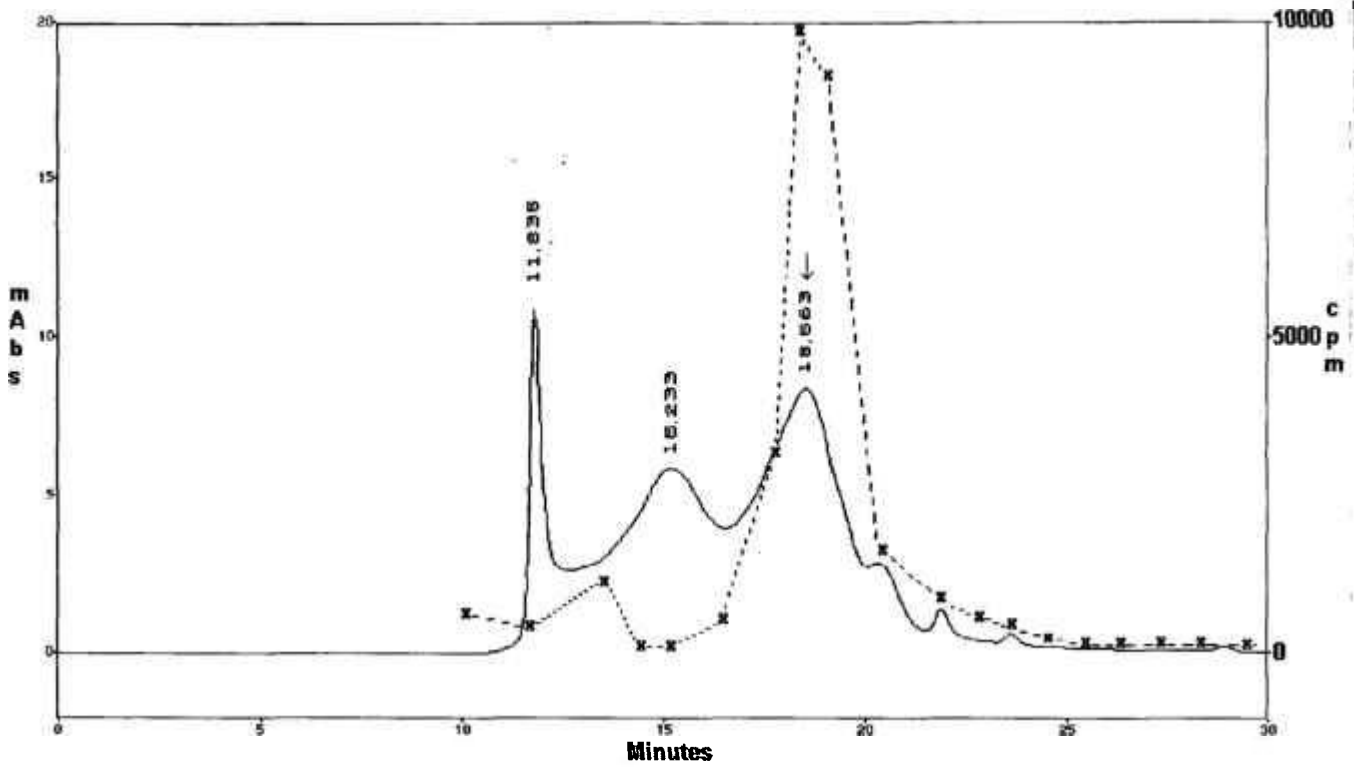


Figura 23 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação em Blue Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 18,5$ min.

————— A 220nm
 x-----x IRMA (cpm)

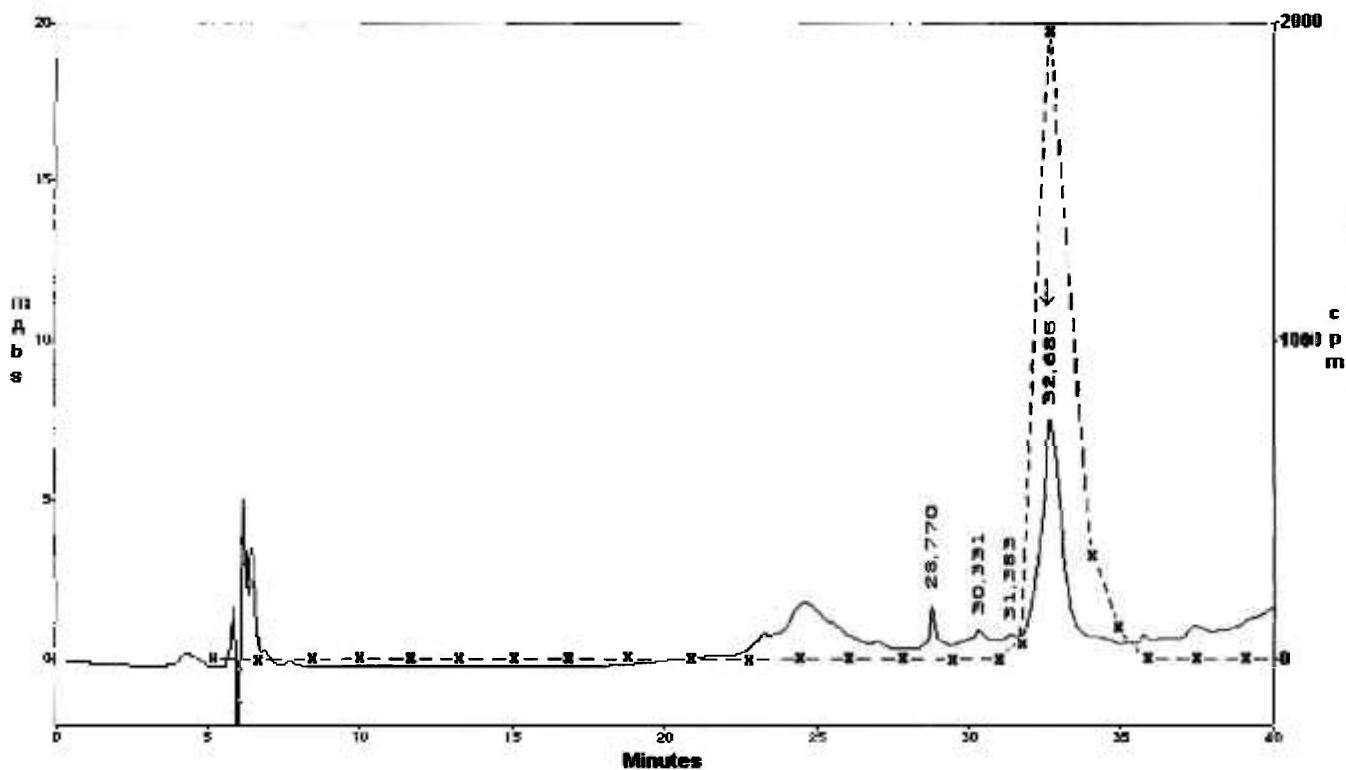


Figura 24 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação em Blue Sepharose Fast Flow. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,5$ min.

————— A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

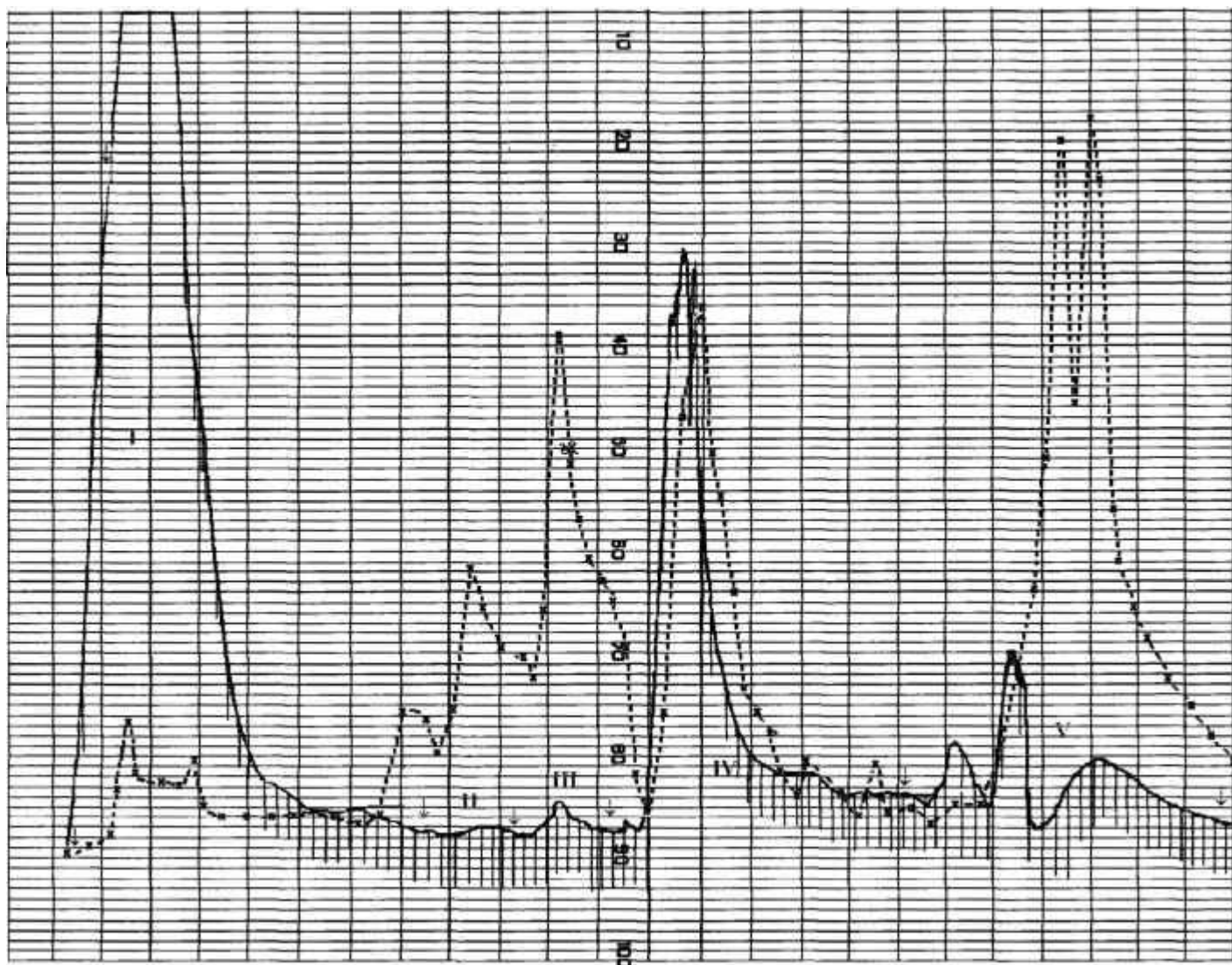


Figura 25 Cromatograma de eluição resultante da purificação do meio condicionado (concentrado e dialisado) em Phenyl Sepharose CL-4B.

- I - Lavagem com 1 M de NaCl em tampão 0,02 M de Na_2HPO_4 pH 7,0.
- II - Lavagem com 0,6 M de NaCl em tampão 0,02 M de Na_2HPO_4 pH 7,0.
- III - Lavagem com tampão 0,02 M de Na_2HPO_4 pH 7,0.
- IV - Lavagem com tampão 0,3 mM de Na_2HPO_4 pH 7,0.
- V - Lavagem com 40% de Etanol em tampão 0,3 mM de Na_2HPO_4 pH 7,0.

_____ A 280 nm

x-----x IRMA (cpm)

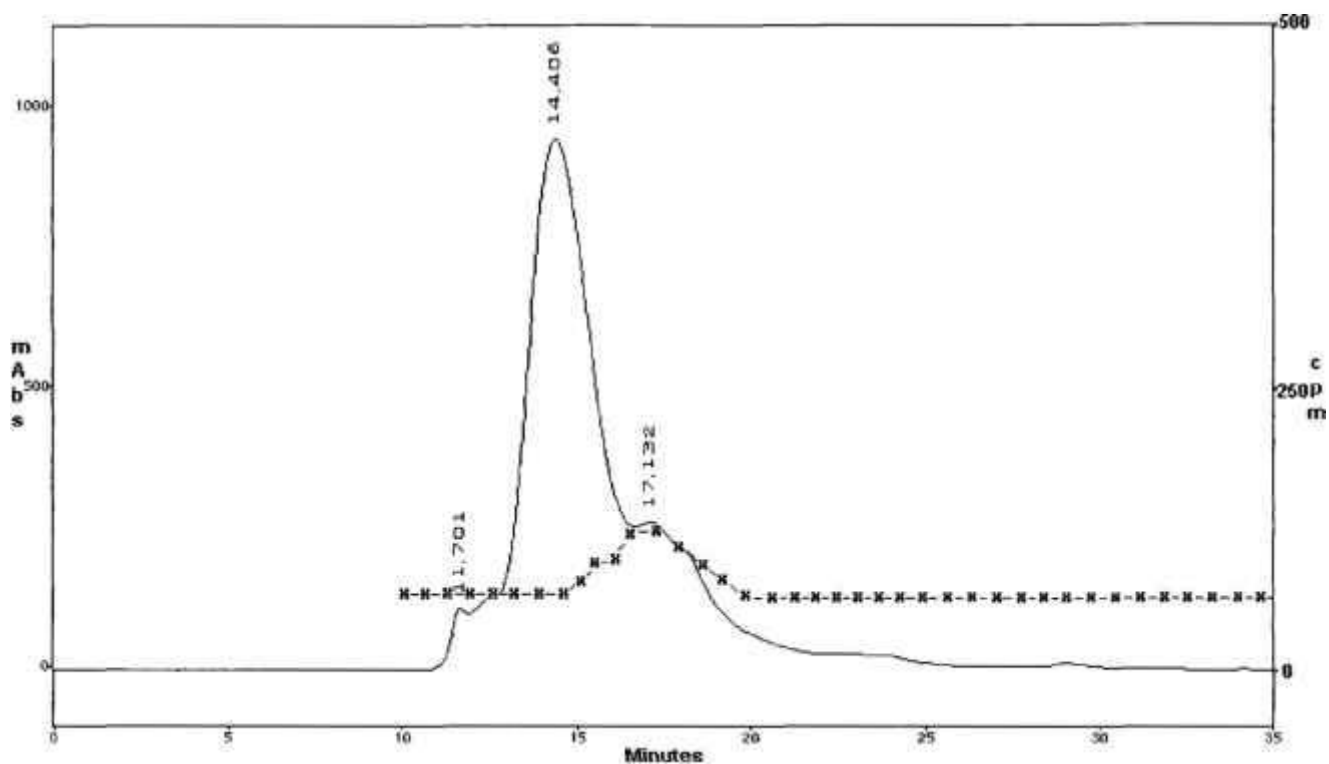


Figura 26 Análise em HPSEC do produto de lavagem com 1 M de NaCl em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,15$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

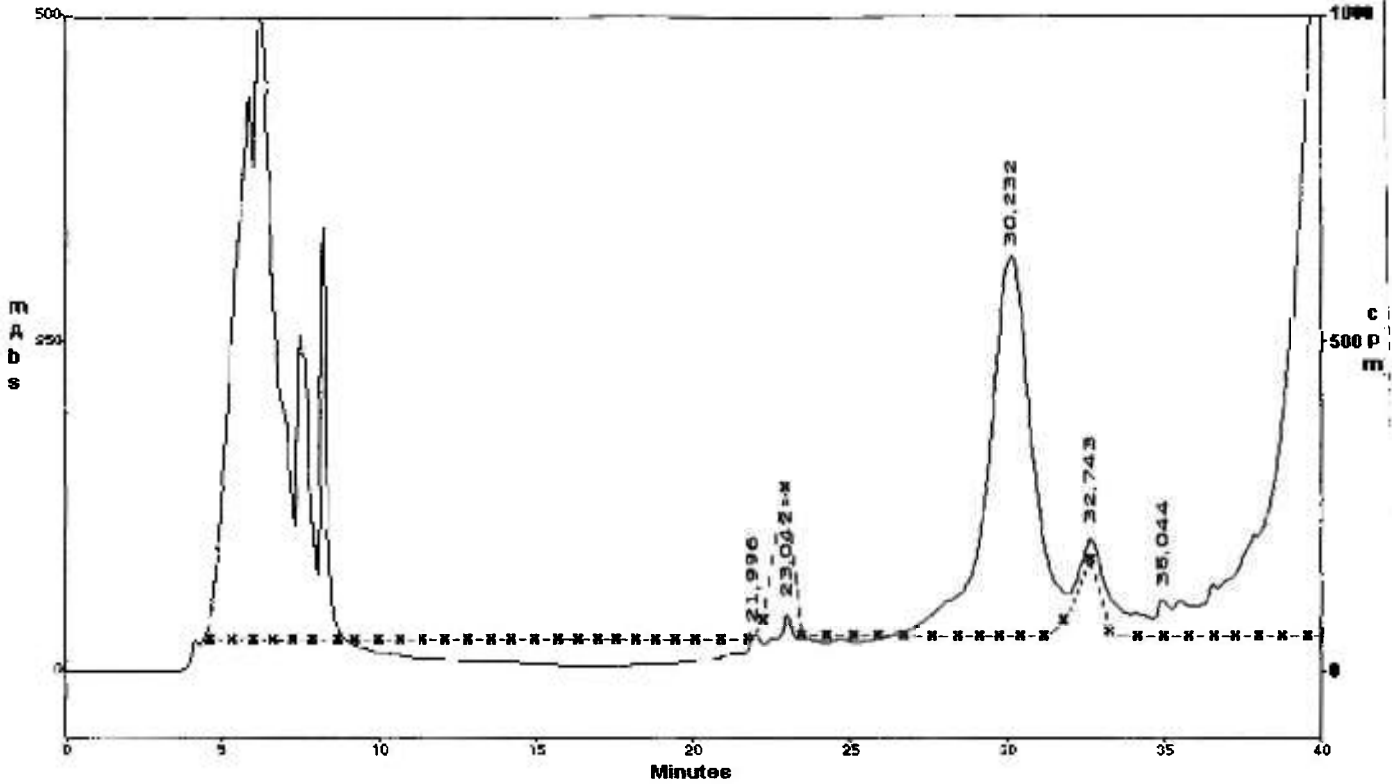


Figura 27 Análise em RP-HPLC do produto de lavagem com 1M NaCl em tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,0. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,81$ min.

————— A 220 nm
 x-----x IRMA (cpm)

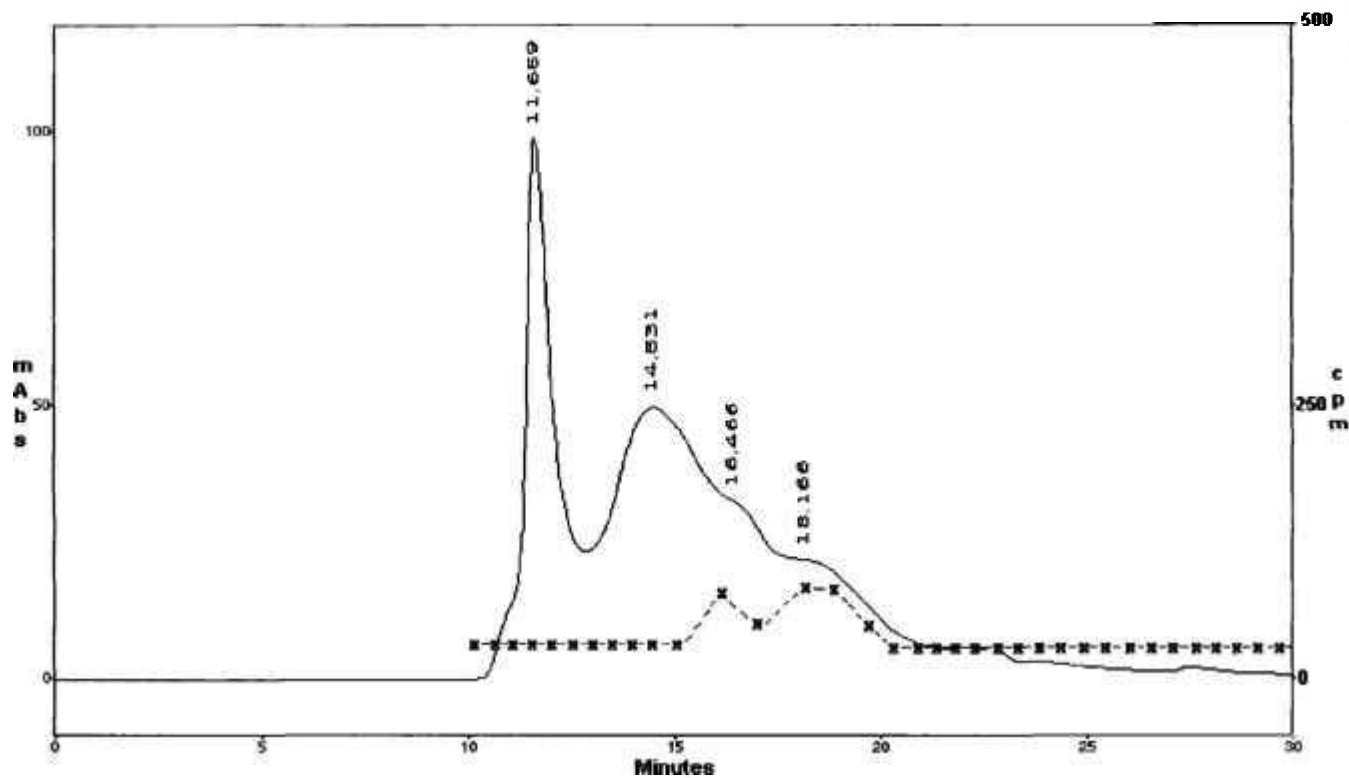


Figura 28 Análise em HPSEC do produto de lavagem com tampão fosfato de sódio 0,3 mM pH 7,0. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,15$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

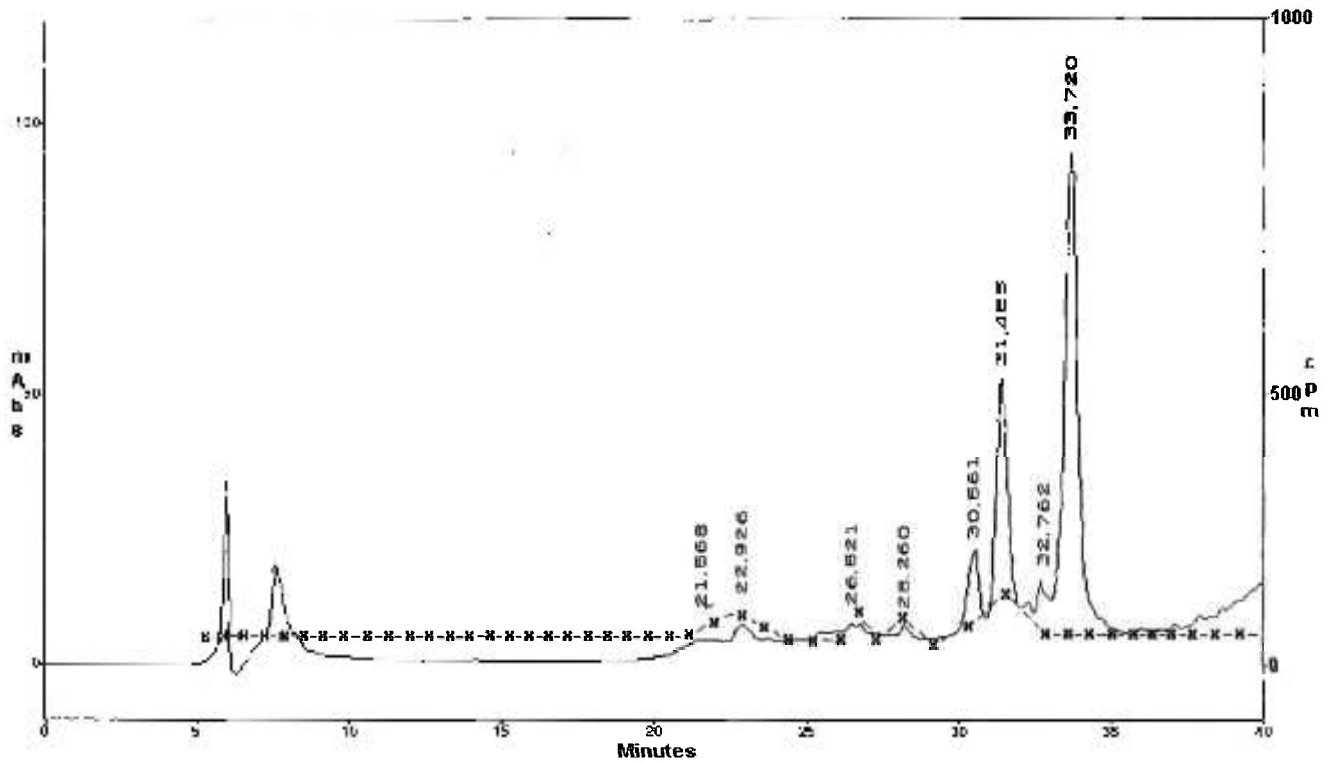


Figura 29 Análise em RP-HPLC do produto de lavagem com tampão fosfato 0,3 mM pH 7,0. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,81$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

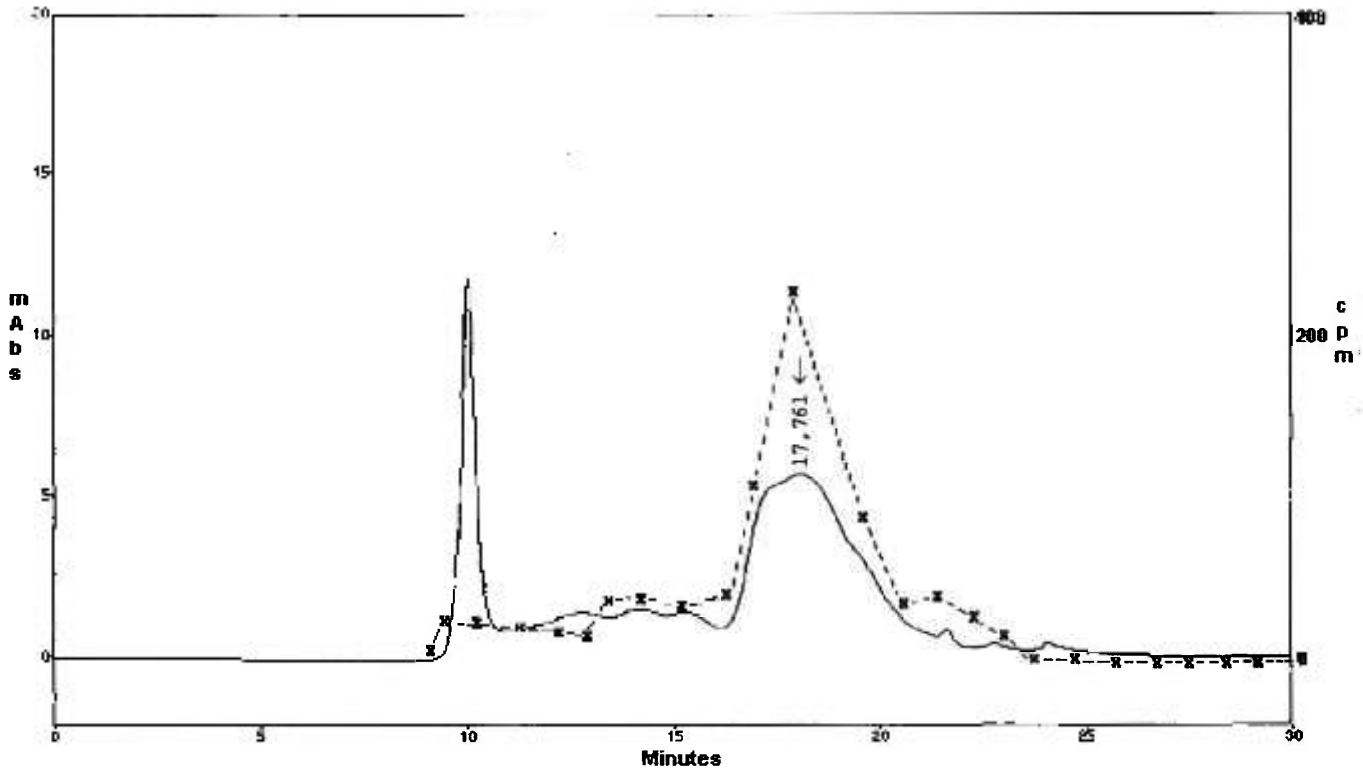


Figura 30 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação em Phenyl Sepharose[®] CL-4B. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 17,60$ min.

_____ A 220 nm
 x-----x IRMA (cpm)

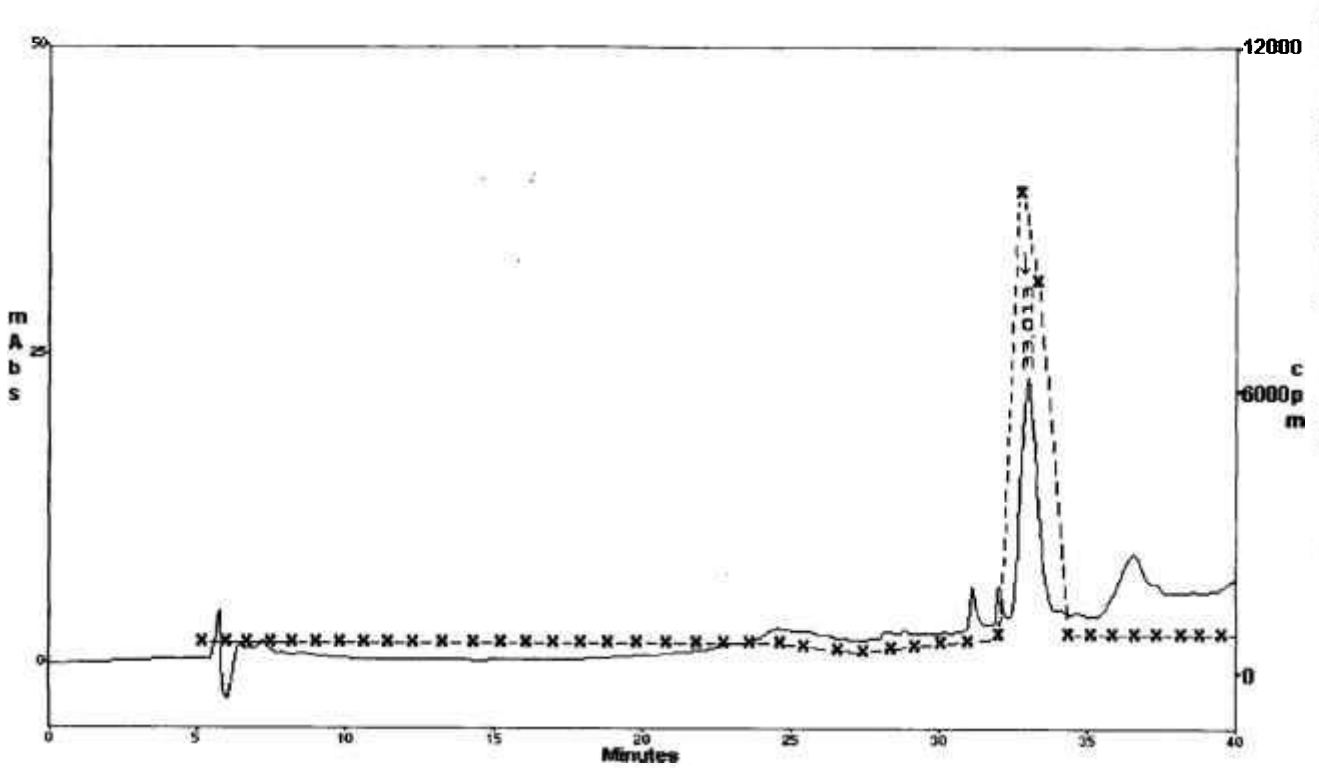


Figura 31 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação Phenyl Sepharose CL-4B. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,78$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

O pool resultante da cromatografia por afinidade ou da cromatografia hidrofóbica foi então submetido a uma cromatografia por exclusão molecular, utilizando uma resina Sephacryl S-100 High Resolution. A Figura 32 apresenta o perfil típico desta segunda etapa de purificação, onde aparecem três picos, o terceiro pico apresentando atividade imunológica. A análise em HPSEC do pool obtido nesta etapa de purificação nos mostra os perfis das Figuras 33 e 34, livre das proteínas contaminantes, respectivamente para as purificações utilizando cromatografia de afinidade e cromatografia de interação hidrofóbica como primeira etapa. Na Figura 35 a análise em HPSEC do tampão da cromatografia de exclusão molecular evidencia que os picos que aparecem a direita do pico correspondente ao hTSH se devem ao tampão da amostra. Podemos ainda observar nas Figuras 36 e 37 os perfis desses mesmos pools, quando analisados em RP-HPLC. O pico observado com tempo de retenção entre 5 e 10 min. deve-se também ao tampão da amostra (Figura 38). A recuperação do processo completo de purificação quando a estratégia realizada foi baseada em cromatografia de afinidade seguida da cromatografia de exclusão molecular foi de 55% e a pureza, calculada por BCA, foi de 91,4%. No caso da utilização da cromatografia de hidrofobicidade associada à de exclusão molecular, a recuperação foi de 37% e a pureza, calculada por BCA, foi de 90,2%. A Figura 39 mostra a análise em SDS-PAGE dos produtos purificados segundo estas estratégias. Aparentemente maior grau de pureza foi conseguido para o produto purificado por cromatografia hidrofóbica e cromatografia de exclusão molecular. Para obtenção de um produto com maior grau de pureza, o pool final da cromatografia de exclusão molecular foi purificado em HPSEC e analisado nesse mesmo tipo de coluna (Figura 40) apresentando uma pureza de 99,6%. A análise do mesmo pool em RP-HPLC é apresentada na Figura 41.

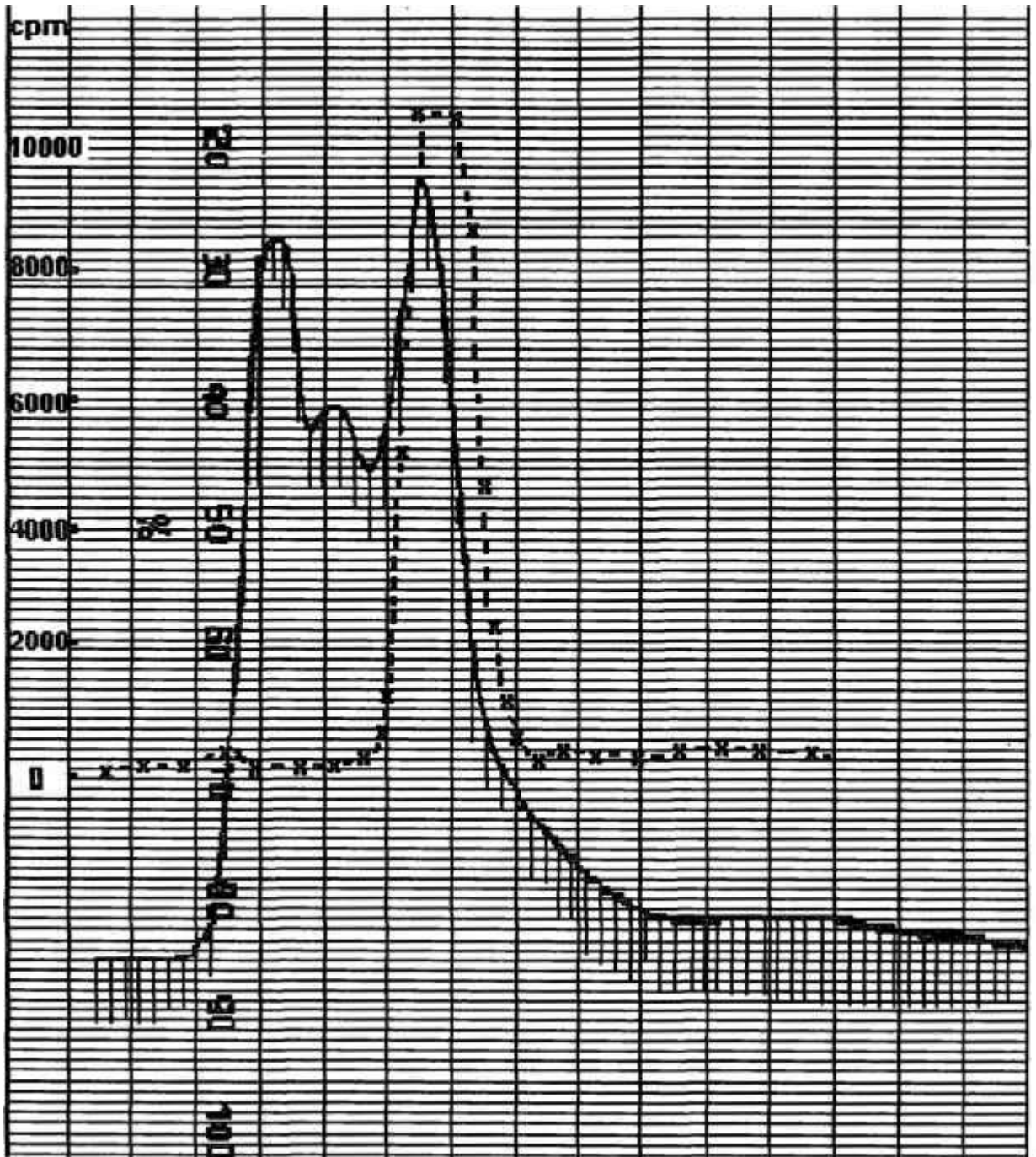


Figura 32 Cromatograma resultante da purificação do rec-hTSH em Sephacryl S-100 High Resolution.

_____ A 280 nm

x-----x IRMA (cpm)

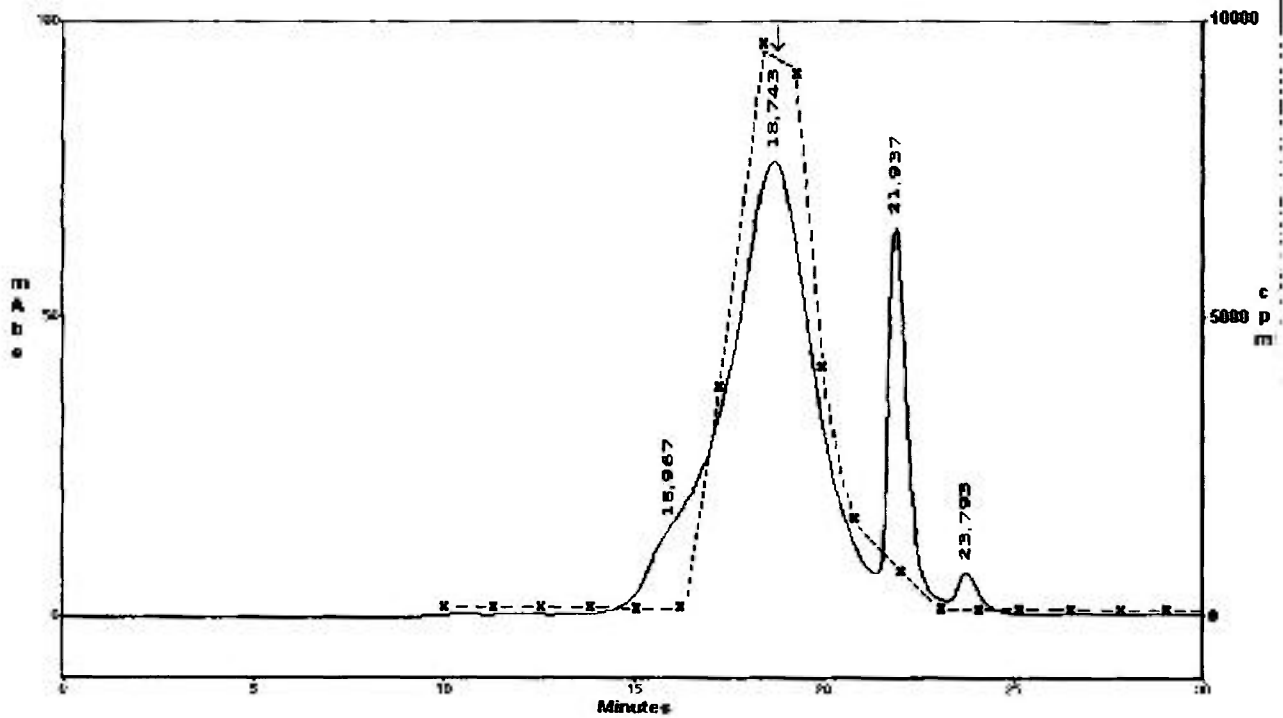


Figura 33 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação por afinidade e em Sephacryl S-100 High Resolution. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 18,57$ min.

————— A 220 nm
 x-----x IRMA (cpm)

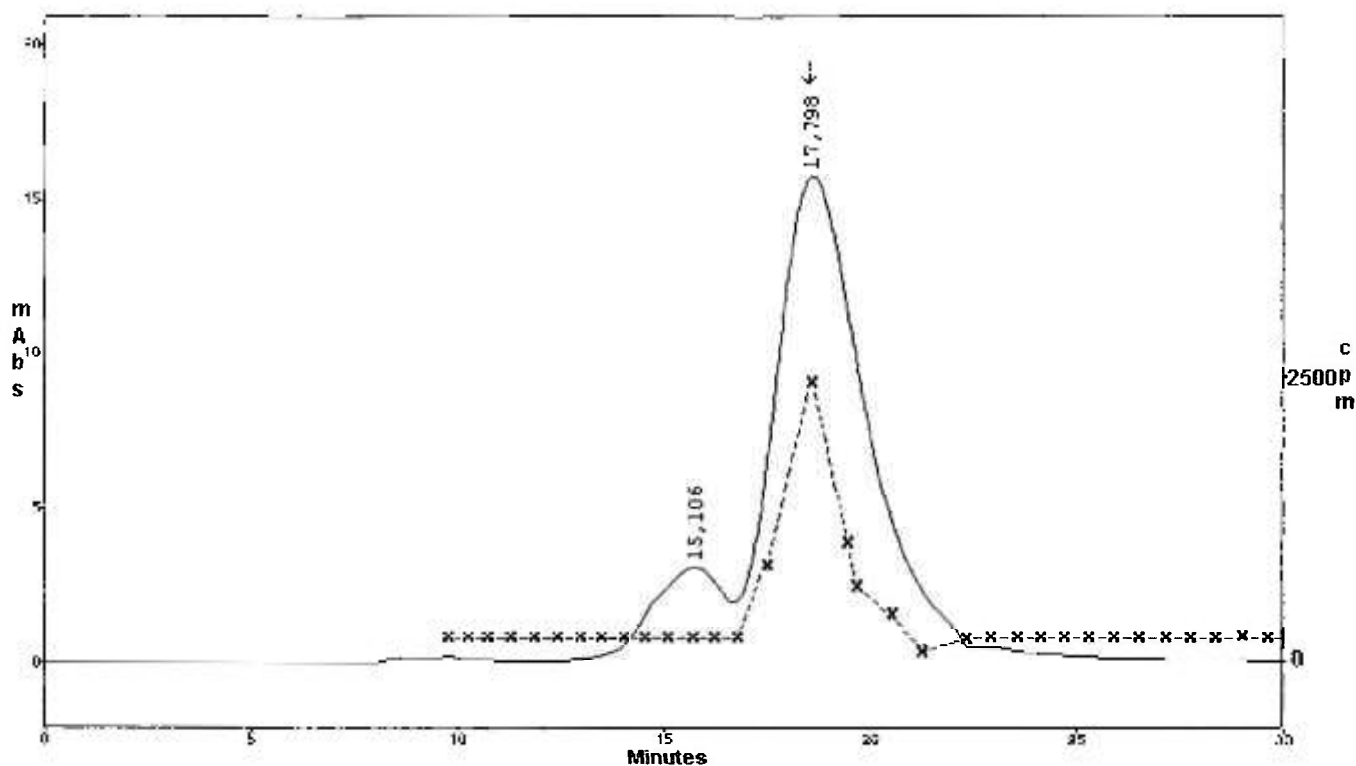


Figura 34 Análise em HPSEC do pool obtido após purificação em coluna de interação hidrofóbica em Sephacryl S-100 High Resolution. A preparação de referência apresenta neste dia um $t_R = 17,60$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

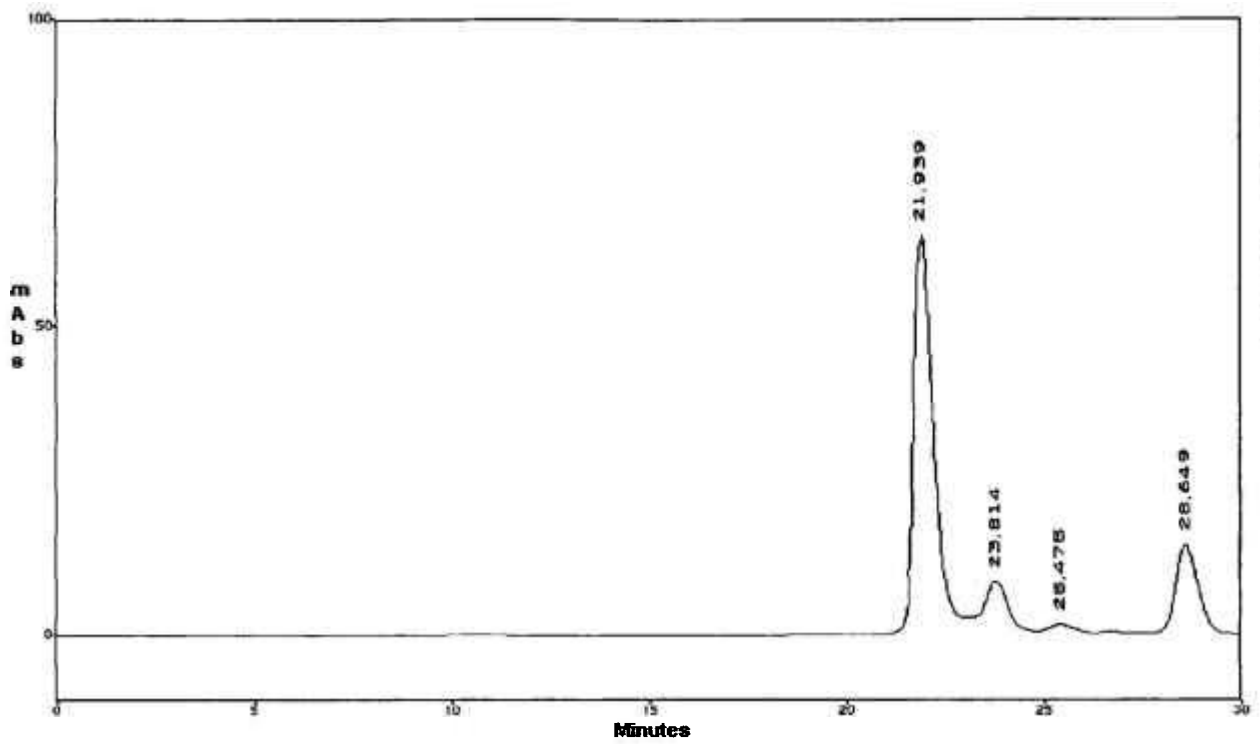


Figura 35 Análise em HPSEC do tampão de eluição utilizado na purificação em Sephacryl S-100 High Resolution.

_____ A 220 nm

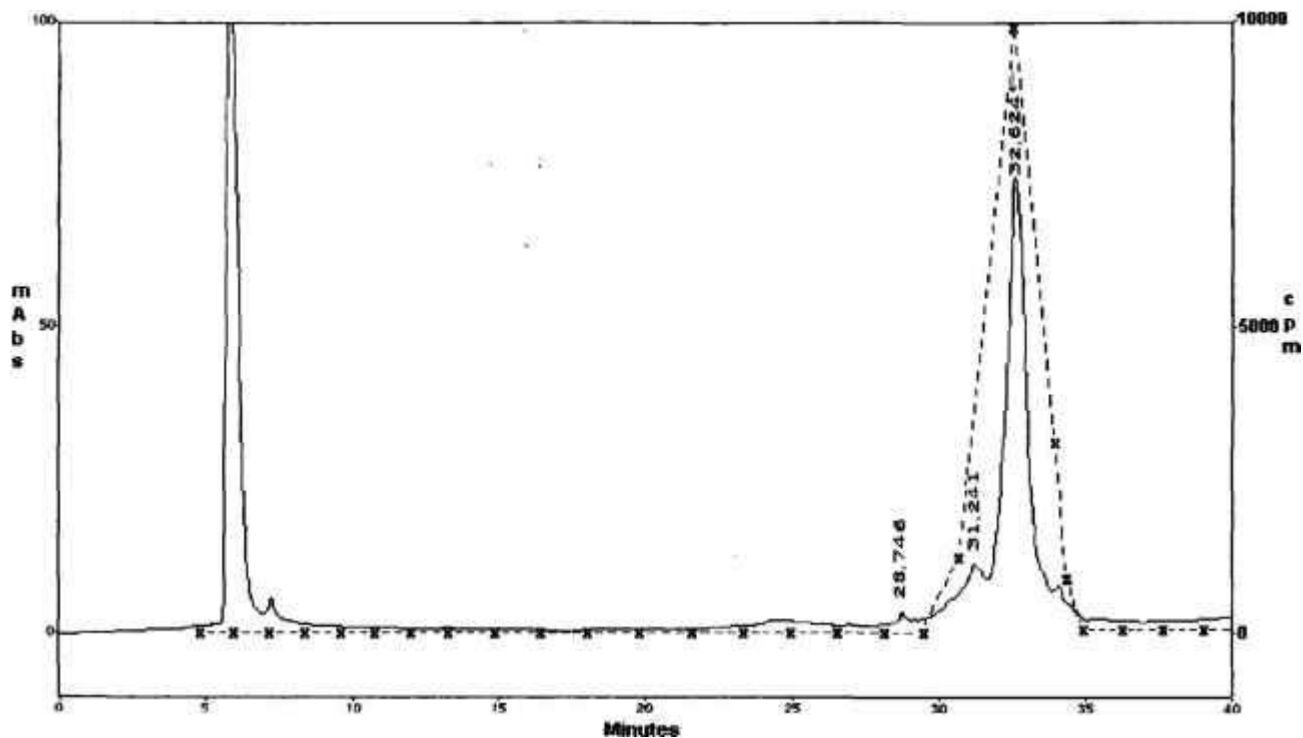


Figura 36 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação por afinidade seguida de Sephacryl S-100 High Resolution. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,7$ min.

————— A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

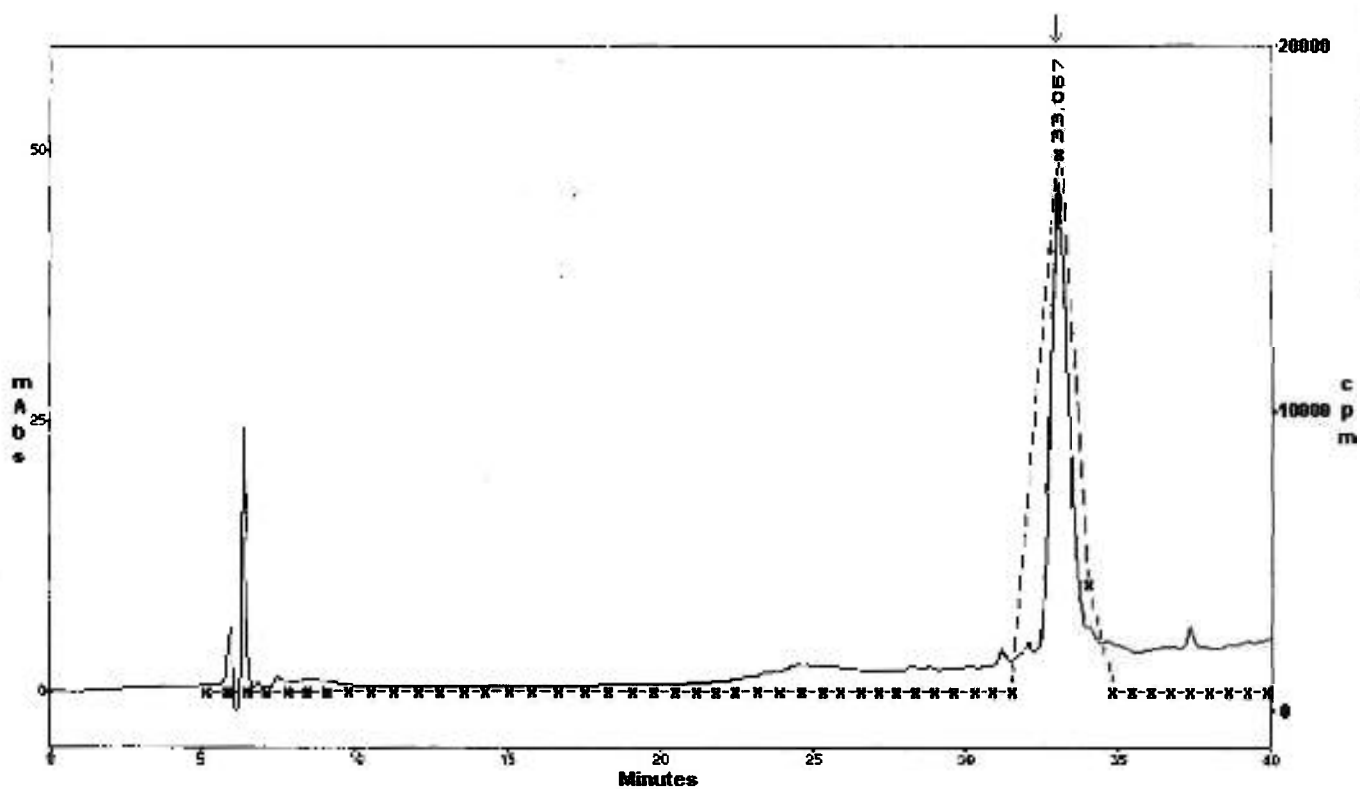


Figura 37 Análise em RP-HPLC do pool obtido após purificação mediante coluna de hidrofobicidade e em Sephacryl S-100 High Resolution. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,78$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

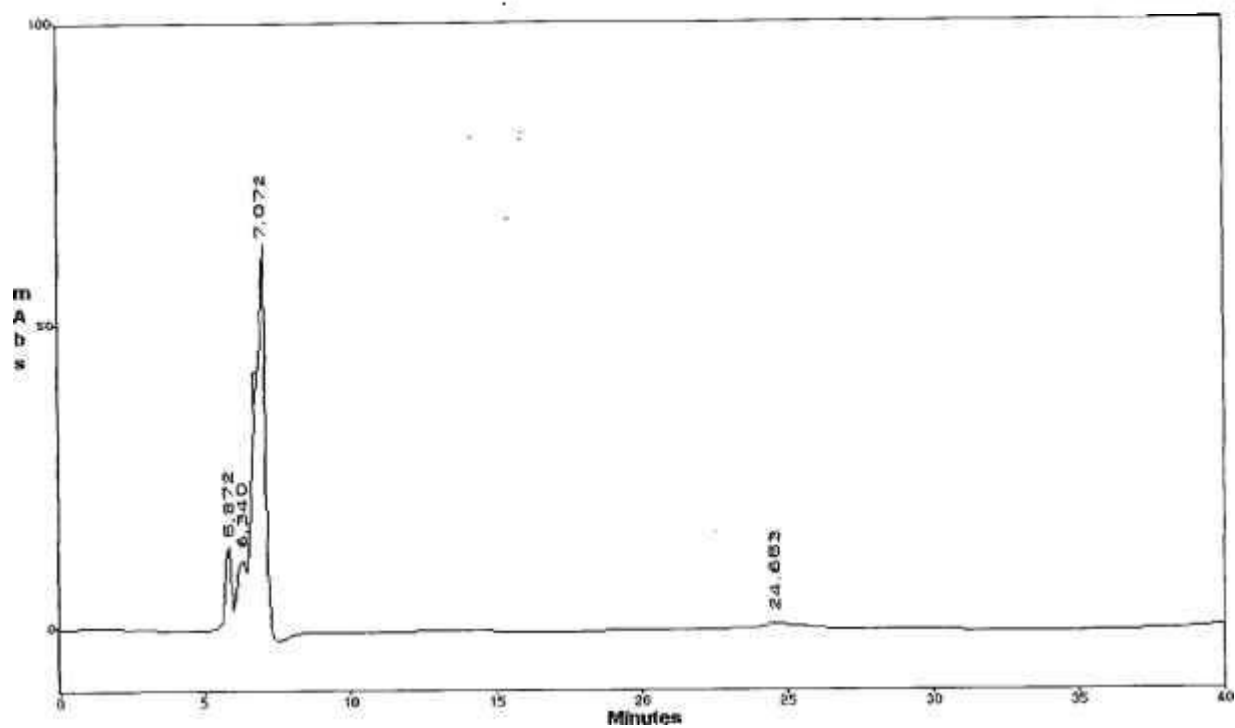


Figura 38 Análise em RP-HPLC do tampão utilizado na purificação em Sephacryl S-100 High Resolution.

_____ A 220 nm

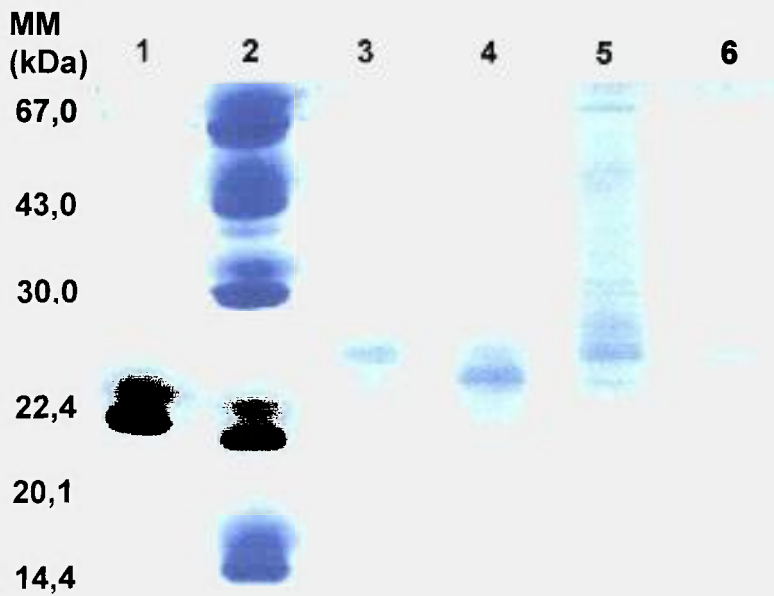


Figura 39 SDS-PAGE, sem redução, de diferentes preparações de hTSH após coloração com Comassie Brilliant Blue G.

- 1- rec-hGH (WHO);
- 2- Marcadores de massa molecular;
- 3- rec-hTSH-Thyrogen;
- 4- pit-hTSH (NIDDK);
- 5- rec-hTSH-IPEN (estratégia: Afinidade - Exclusão Molecular);
- 6- rec-hTSH-IPEN (estratégia: Interação Hidrofóbica - Exclusão Molecular).

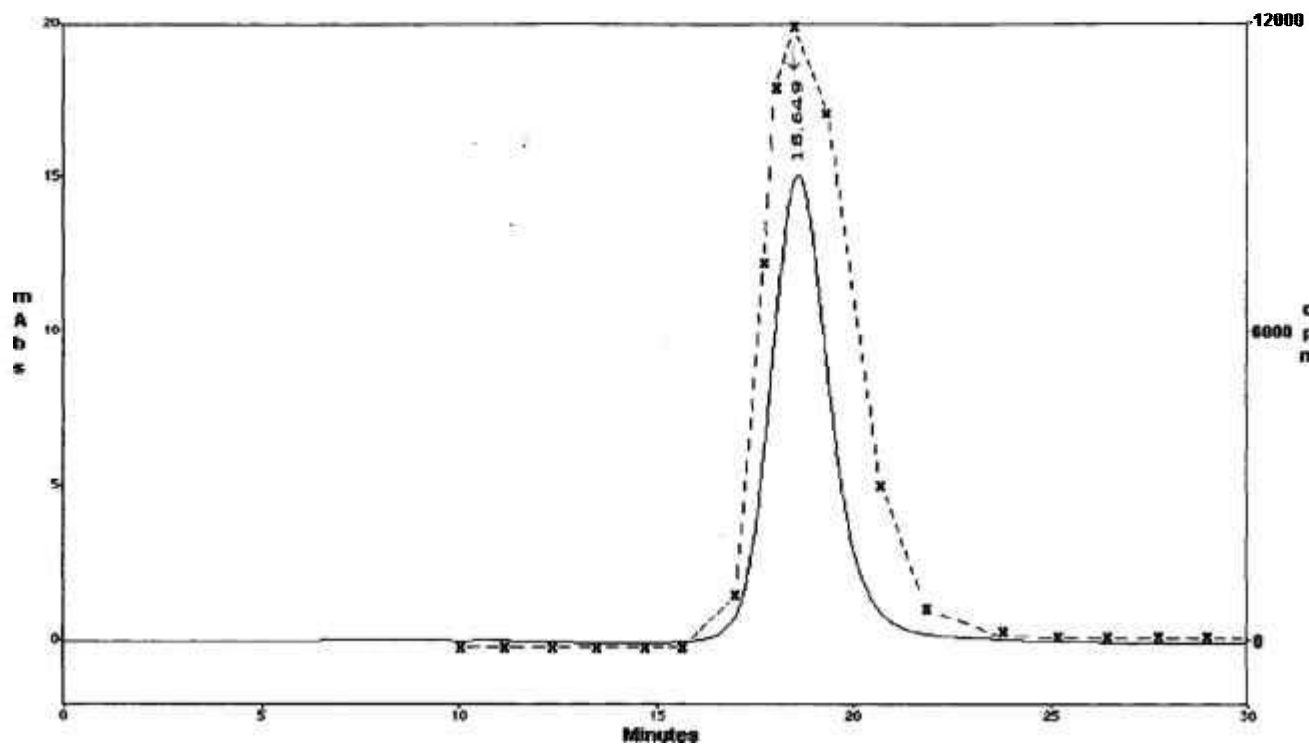


Figura 40 Análise em HPSEC do pool obtido mediante purificação por interação hidrofóbica e exclusão molecular após ulterior purificação em HPSEC. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 18,6$ min.

_____ A 220 nm

x-----x IRMA (cpm)

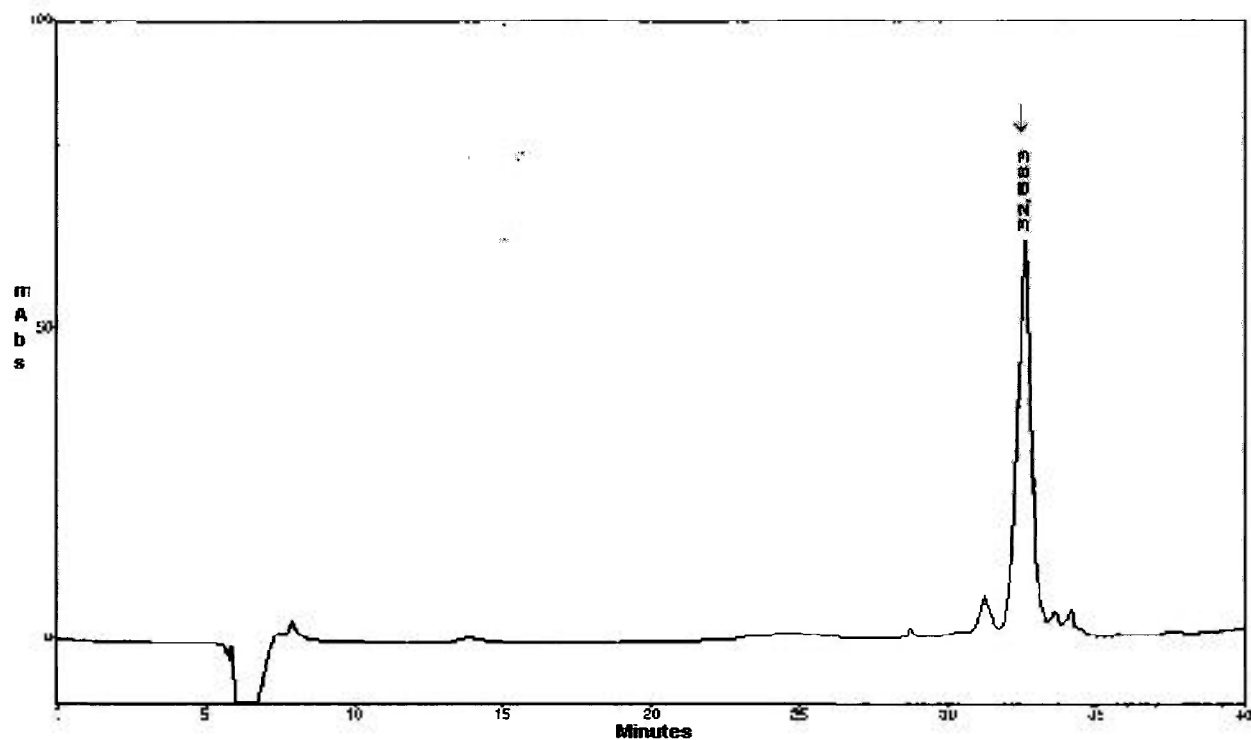


Figura 41 Análise em RP-HPLC do pool obtido mediante cromatografia de interação hidrofóbica e exclusão molecular após ulterior purificação em HPSEC. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 32,69$ min.

_____ A 220 nm

3.5.3- Estratégia 3: Afinidade – Interação Hidrofóbica – Exclusão Molecular

A terceira estratégia consistiu na associação das cromatografias utilizadas na estratégia anterior. Foi então realizada a cromatografia de afinidade ao corante (Blue Dye Affinity Sepharose Fast Flow) como primeira etapa, seguida da interação hidrofóbica e por fim da exclusão molecular. A Figura 42 apresenta a análise em HPSEC do produto obtido segundo esta estratégia.

Quando analisado em SDS-PAGE, este produto apresentou o comportamento apresentada na Figura 43. Perfil semelhante foi obtido para o produto purificado segundo a estratégia 1 (Figura 21).

A recuperação final do processo quando esta estratégia foi utilizada foi de 34% e a pureza de 98,7%.

3.6- Estudo da liofilização

O rec-hTSH purificado foi liofilizado em quatro condições diferentes:

- Condição 1: 5 µg hTSH purificado sem adição de qualquer excipiente. O produto está no tampão da última coluna, de exclusão molecular (Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0 e NaCl 0,15 M).
- Condição 2: Igual a condição 1, porém adicionando diferentes concentrações de Lactose.
- Condição 3: Igual a condição 1, porém adicionando diferentes concentrações de Sacarose.
- Condição 4: Igual a condição 1, porém adicionando diferentes concentrações de Glicina.

As concentrações estudadas de lactose, sacarose e glicina foram de: 30, 20, 10, 5 e 1 mg/mL.

A Tabela 14 mostra o aumento de formas alteradas (Δ) e a recuperação de rec-hTSH que ocorreu quando a liofilização do produto purificado foi realizada em cada uma destas condições.

Com relação à recuperação do rec-hTSH, apenas a condição 3 apresentou baixa recuperação nas concentrações de sacarose de 5 e 1 mg/ml.

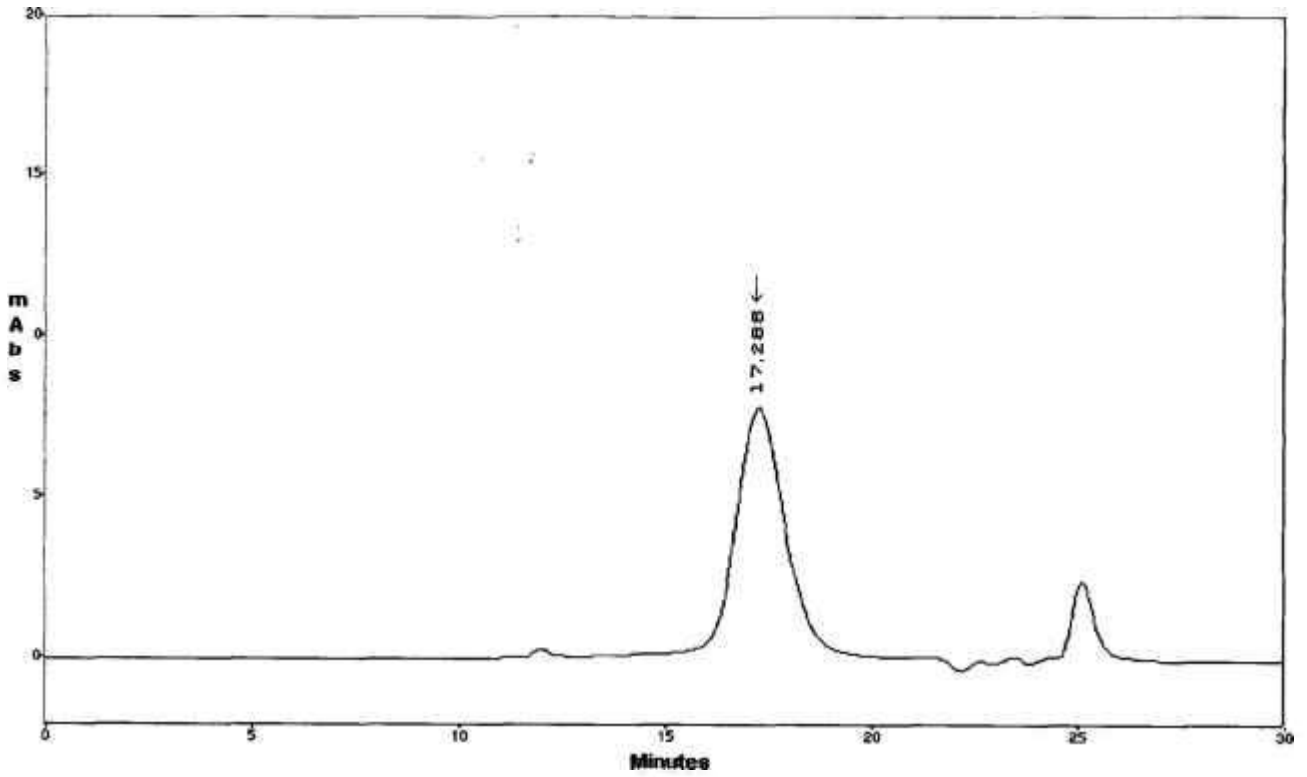


Figura 42 Análise em HPSEC do produto final obtido pela terceira estratégia. A preparação de referência (Thyrogen) apresenta neste dia um $t_R = 16,87$ min.

_____ A 220 nm

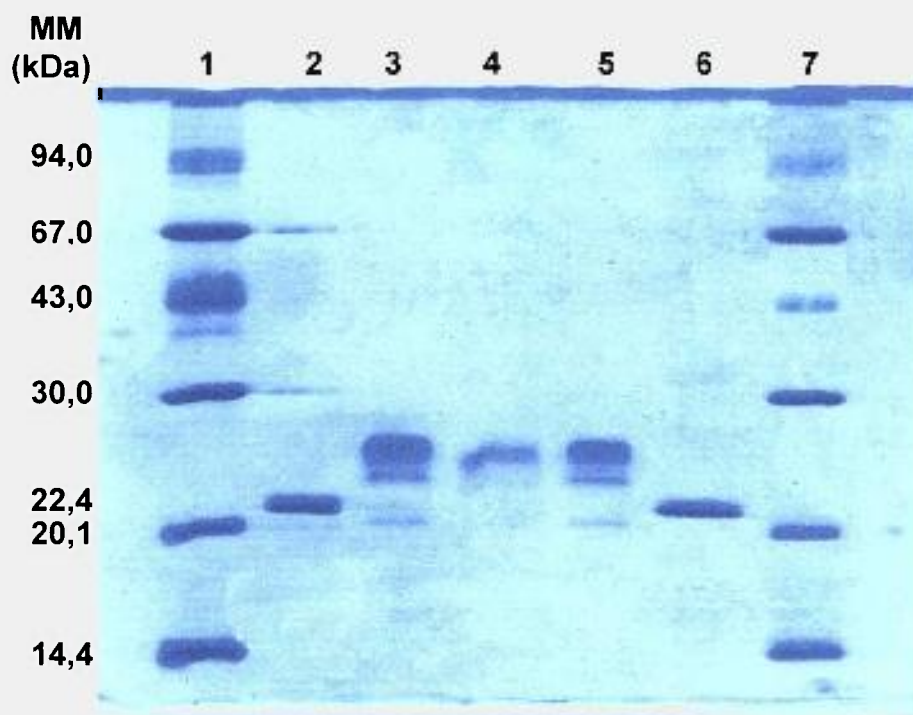


Figura 43 SDS-PAGE sem redução de diferentes preparações de hTSH após coloração com Comassie Brilliant Blue G.

- 1- Marcadores de massa molecular;
- 2- rec-hGH (WHO);
- 3- rec-hTSH-Thyrogen;
- 4- rec-hTSH-IPEN (estratégia: Afinidade - Interação Hidrofóbica - Exclusão Molecular);
- 5- rec-hTSH-Thyrogen;
- 6- rec-hGH (WHO);
- 7- Marcadores de massa molecular.

Tabela 14 Estudo de diferentes condições de liofilização de rec-hTSH purificado.

Excipiente adicionado	Recuperação de hTSH (%)	Δ Formas alteradas (%)
Sem adição de excipiente	101,0	11,5
Lactose (1,0 mg/mL)	107,0	7,4
Lactose (5,0 mg/mL)	100,0	12,4
Lactose (10,0 mg/mL)	79,0	8,4
Lactose (20,0 mg/mL)	112,0	3,5
Lactose (30,0 mg/mL)	107,0	2,5
Sacarose (1,0 mg/mL)	50,8	17,7
Sacarose (5,0 mg/mL)	67,2	17,5
Sacarose (10,0 mg/mL)	110,7	10,9
Sacarose (20,0 mg/mL)	86,9	14,9
Sacarose (30,0 mg/mL)	107,9	6,7
Glicina (1,0 mg/mL)	95,4	2,6
Glicina (5,0 mg/mL)	97,5	5,8
Glicina (10,0 mg/mL)	111,7	5,7
Glicina (20,0 mg/mL)	123,9	3,4
Glicina (30,0 mg/mL)	144,2	13,3

Os menores aumentos (Δ) de formas alteradas ocorreram nas condições 2 e 4, podendo ser consideradas estas as condições ideais para liofilização do produto purificado.

Ressalta-se que, em geral, a concentração de rec-hTSH no produto final é baixa, sendo portanto, mais adequado utilizar uma condição satisfatória, porém baixa concentração de excipiente. Foi escolhida portanto a condição "Lactose 1 mg/mL" para a liofilização do nosso produto.

3.7- Caracterização do rec-hTSH-IPEN purificado

3.7.1- Avaliação da atividade imunológica:

Quando o rec-hTSH IPEN e a preparação recombinante da Genzyme (Thyrogen) são utilizados como padrão no IRMA observa-se um paralelismo entre as duas preparações (Figura 44).

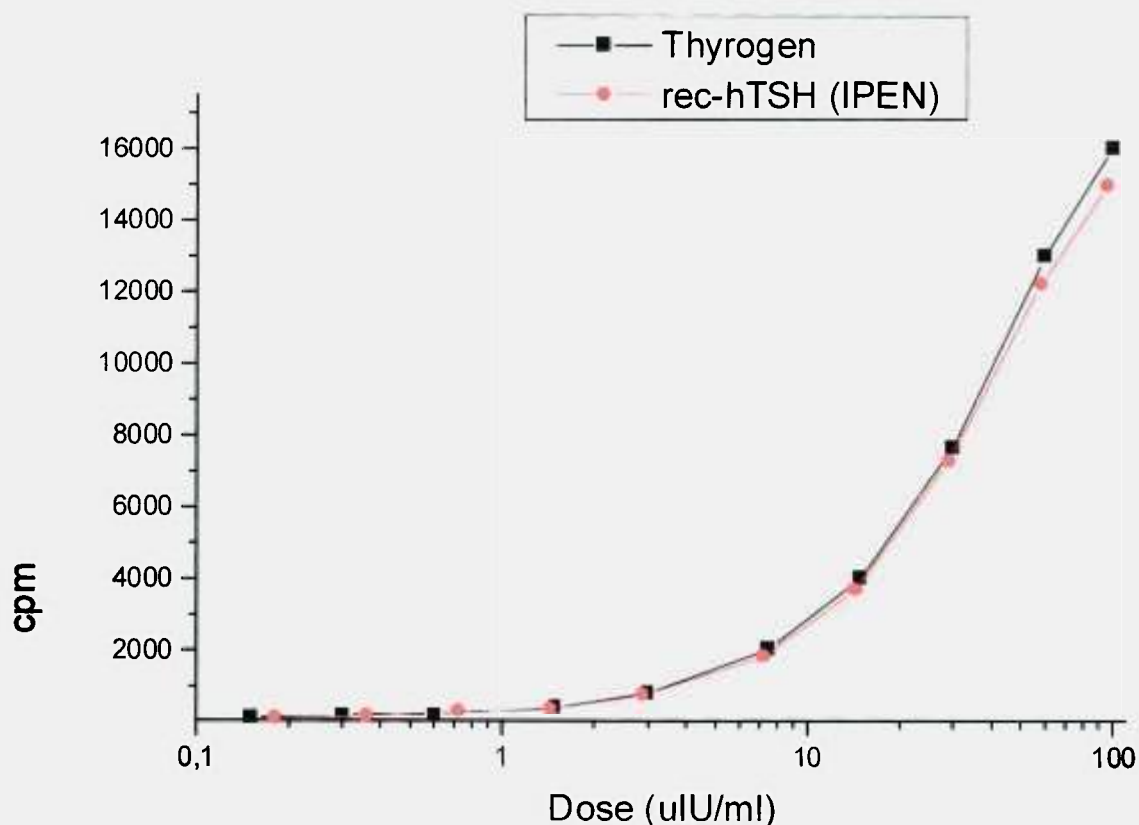


Figura 44 Utilização do rec-hTSH IPEN em curva imunoradiométrica (IRMA) em comparação ao Thyrogen.

O rec-hTSH-IPEN foi marcado com ^{125}I e o cromatograma obtido relativo à purificação do produto marcado é apresentado na Figura 45. Nela estão indicados o volume de exclusão molecular (V_0), a posição em que sai o iodo livre (^{125}I) e as posições correspondentes aos coeficientes de distribuição (k_D) de 0,195; 0,344 e

0,516. Estas três regiões assinaladas foram analisadas quanto a ligação específica (%B/T) ao anticorpo de referência anti-hTSH do NIDDK, para várias diluições de anticorpo (Tabela 15). Observa-se que na região de $k_D= 0,344$ a ligação ao anticorpo é constantemente maior, mostrando ser esta a região do hTSH heterodimérico radioiodado. De fato, um k_D semelhante ($k_D= 0,310$) para o rec-hTSH Thyrogen foi observado em trabalho anterior realizado em nosso laboratório (64). As outras formas ($k_D= 0,195$ e $0,516$) podem ser artefatos de marcação, possivelmente uma forma dimérica e subunidades livres. Estes resultados mostram que o produto radioiodado obtido pode ser usado como traçador em sistemas de radioimunoensaio ou para estudos de biodistribuição.

Estas análises evidenciaram a viabilidade da utilização da nossa preparação como reagente de imunoenaios: padrão de referência ou produto para marcação.

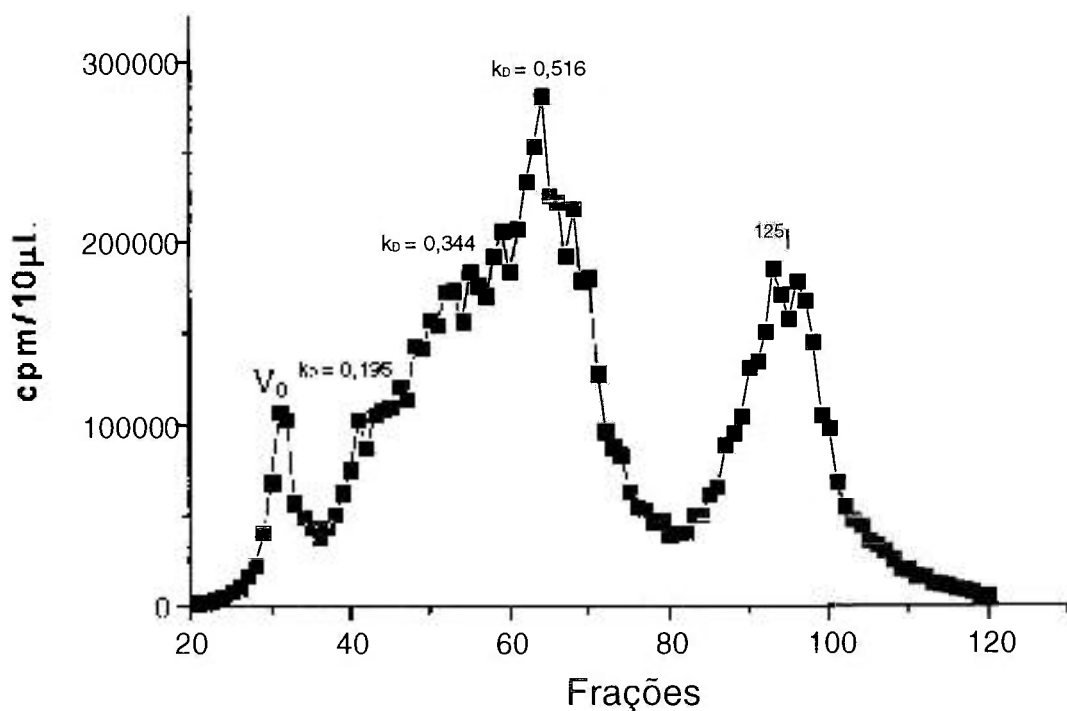


Figura 45 Purificação do rec-hTSH radioiodado em coluna Sephadex G-100.

Tabela 15 Ligação específica ao anticorpo anti-hTSH (B/T) do produto marcado presente em diferentes regiões do cromatograma de purificação.

Diluição	$k_D = 0,195$ %B/T	$k_D = 0,344$ %B/T	$k_D = 0,516$ %B/T
1:96000	16,7	54,5	48,6
1:288000	14,8	42,5	24,9
1:576000	9,9	30,0	15,0
1:748000	9,3	26,4	13,8
1:1122000	8,2	22,2	11,0

3.7.2- Avaliação da potência biológica

Bioensaios *in vivo* realizados com o nosso produto (I), com a preparação recombinante Thyrogen (T) e com a preparação hipofisária NIDDK (N) forneceram curvas dose resposta como a da Figura 46.

Os dados de quatro ensaios independentes correspondentes à potência biológica e à potência relativa do rec-hTSH IPEN, utilizando rec-hTSH Thyrogen como padrão, são apresentados na Tabela 16. A potência relativa foi derivada de secções paralelas (no mínimo 5 em cada ensaio) das curvas dose resposta das preparações de hTSH analisadas, e a potência biológica em IU/mg, considerando a potência relativa e a biológica declarada da preparação Thyrogen de 4,0 IU/mg (30). A potência relativa do nosso produto com relação ao Thyrogen variou de 0,55 a 0,93 e a potência biológica variou de 2,2 IU/mg a 3,7 IU/mg. Com relação ao pit-hTSH NIDDK (Tabela 17), o nosso produto apresentou uma potência relativa que variou de 1,5 a 2,6. Não foi possível calcular a potência do nosso produto em IU/mg com base no pit-hTSH NIDDK, pois para esta preparação de referência é declarada somente a potência imunológica. A potência dessa preparação hipofisária, utilizando o hTSH-Thyrogen como referência, foi de $1,47 \pm 0,36$ IU/mg.

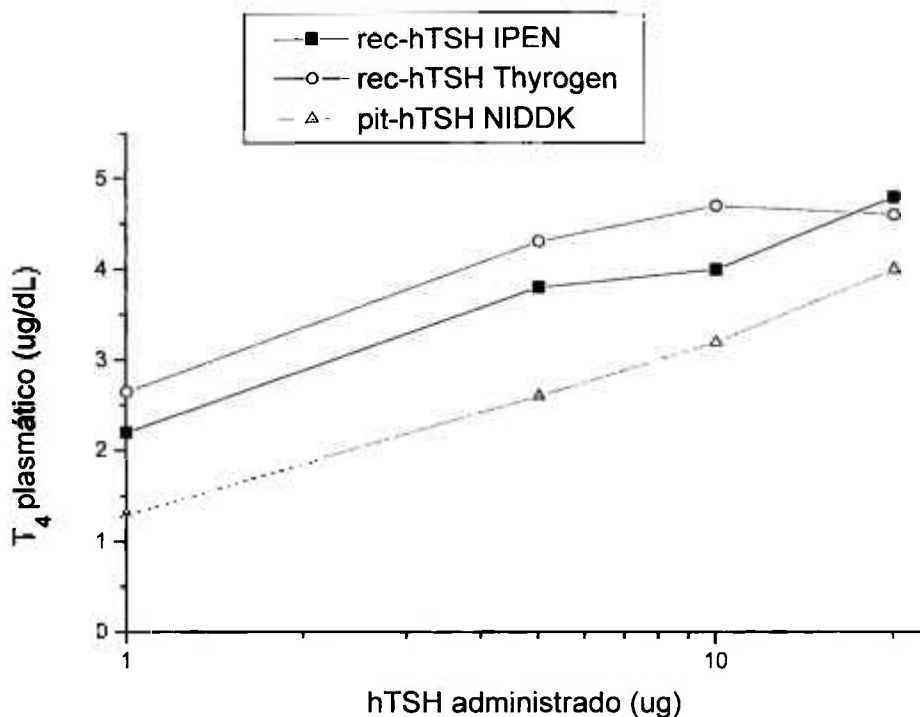


Figura 46 Bioatividade *in vivo* do rec-hTSH IPEN, rec-hTSH Thyrogen e pit-hTSH NIDDK. Cada ponto, representa a média da determinação de T₄ no soro de 3 animais.

Tabela 16 Potência biológica do rec-hTSH IPEN (I) com base no rec-hTSH Thyrogen (T).

Ensaio	Potência relativa I/T	Potência IU/mg
1	0,93	3,72
2	0,55	2,20
3	0,74	2,96
4	0,88	3,52
Média ± σ	0,78 ± 0,17	3,10 ± 0,68

Tabela 17 Potência relativa do rec-hTSH IPEN (I) com base no pit-hTSH NIDDK (N).

Ensaio	Potência relativa I/N
1	2,24
2	2,63
3	1,45
Média $\pm \sigma$	2,11 \pm 0,60

3.7.3- Seqüenciamento da porção N-terminal

O hTSH é uma glicoproteína heterodimérica onde as duas seqüências das subunidades alfa e beta devem estar presentes em quantidades equimolares no seqüenciamento da porção N-terminal. Na análise da nossa amostra foram porém encontradas 2 seqüências presentes em quantidades de 55 pmol e 10 pmol. A seqüência N-terminal presente na quantidade maior resultou ser A P D V Q como pode ser visto nos histogramas (Figura 47). Essa seqüência é exatamente a seqüência prevista para a subunidade α . A outra seqüência menor detectada foi: G M (T, L) M E, que não corresponde a seqüência para a subunidade β . O não aparecimento da subunidade β leva a crer que exista um possível bloqueio dessa subunidade no N-terminal, por acilação ou por outra modificação que impede o seqüenciamento por degradação de Edman. Várias evidências como atividade biológica do hormônio, cuja especificidade é essencialmente determinada pela subunidade β , ou a análise do hormônio em HPSEC mostrando-o na forma íntegra, provam a existência da subunidade β . O laboratório Commonwealth Biotechnologies Inc. informou é pouco freqüente, neste tipo de técnica e no caso de dímeros, uma das cadeias estar bloqueada e a outra não.

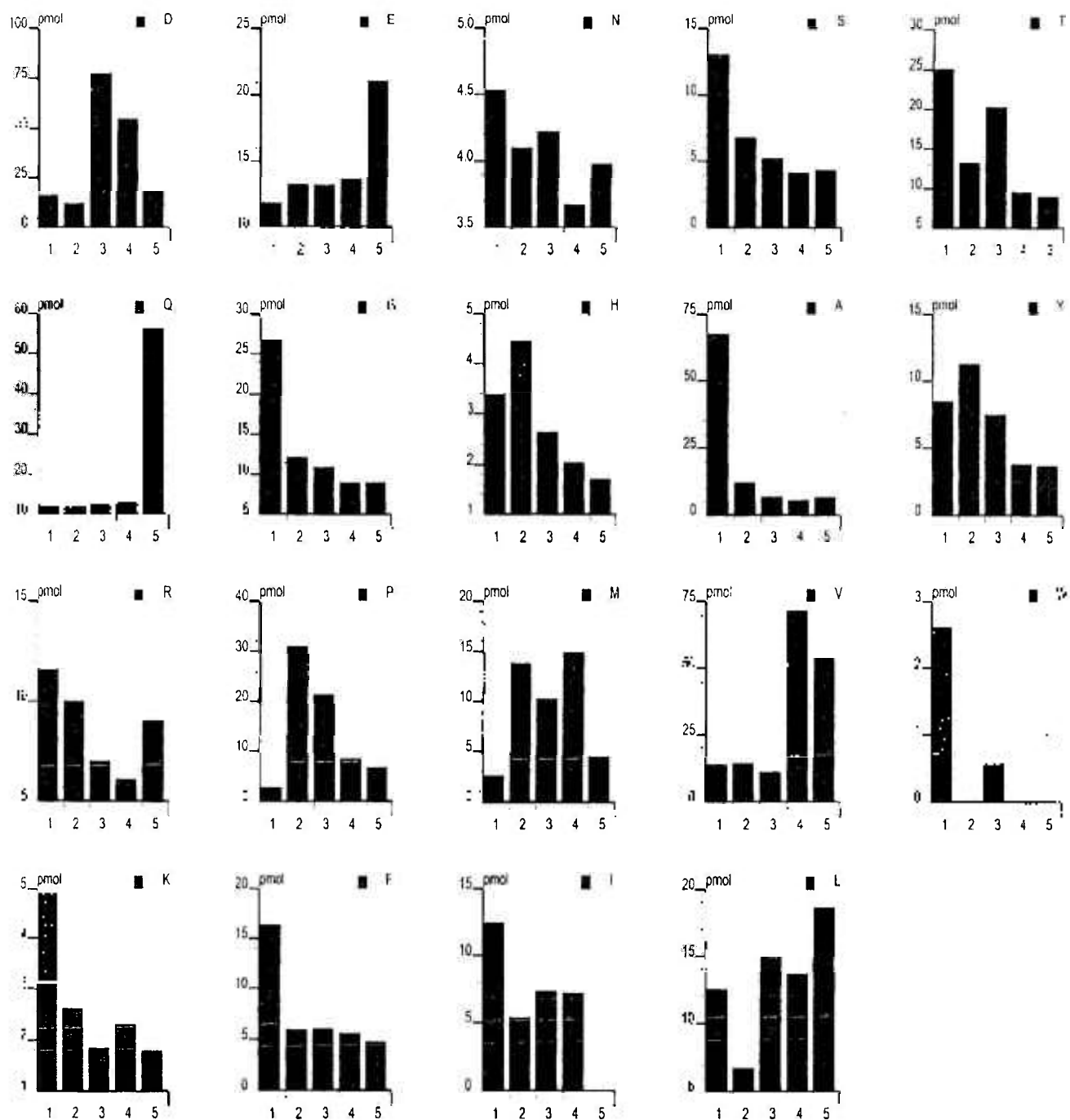


Figura 47 Histogramas relativos à seqüência de aminoácidos da porção N-terminal do rec-hTSH IPEN purificado e submetido a cinco ciclos de degradação de Edman.

3.7.4- Determinação da massa molecular (MM) do hTSH

As massas moleculares das preparações rec-hTSH IPEN, rec-hTSH Thyrogen e pit-hTSH NIDDK foram determinadas por duas técnicas: espectrometria de massa MALDI TOF e HPSEC.

3.7.4.1- Espectrometria de massa MALDI - TOF

Foram realizados dois ensaios independentes de espectrometria de massa MALDI-TOF para as preparações recombinantes Thyrogen e IPEN e para a preparação hipofisária hTSH-NIDDK.

A Figura 48 mostra o espectro de massa obtido para essas três preparações em uma das análises.

As massas moleculares dessas três preparações e de suas subunidades são apresentadas na Tabela 18. Observa-se uma pequena diferença entre a massa molecular determinada experimentalmente para o heterodímero e aquela resultante da soma de suas respectivas subunidades, 1,3% para o rec-hTSH-IPEN, 1,2% para o pit-hTSH-NIDDK e 0,6% para o rec-hTSH-Thyrogen. Uma alta precisão interensaio foi observada, com cv_s que são iguais ou menores que 1%.

3.7.4.2- HPLC

A partir de uma calibração realizada em HPSEC com diferentes proteínas de referência (Figura 49) obteve-se a seguinte curva de calibração: $\log MM = -0,1006 t_R + 3,2688$ $r = 0,9925$ ($n = 4$). As massas moleculares das três preparações de hTSH foram obtidas a partir desta curva: MM Thyrogen = 34,5 kDa, MM IPEN = 32,6 kDa e MM NIDDK = 31,7 kDa.

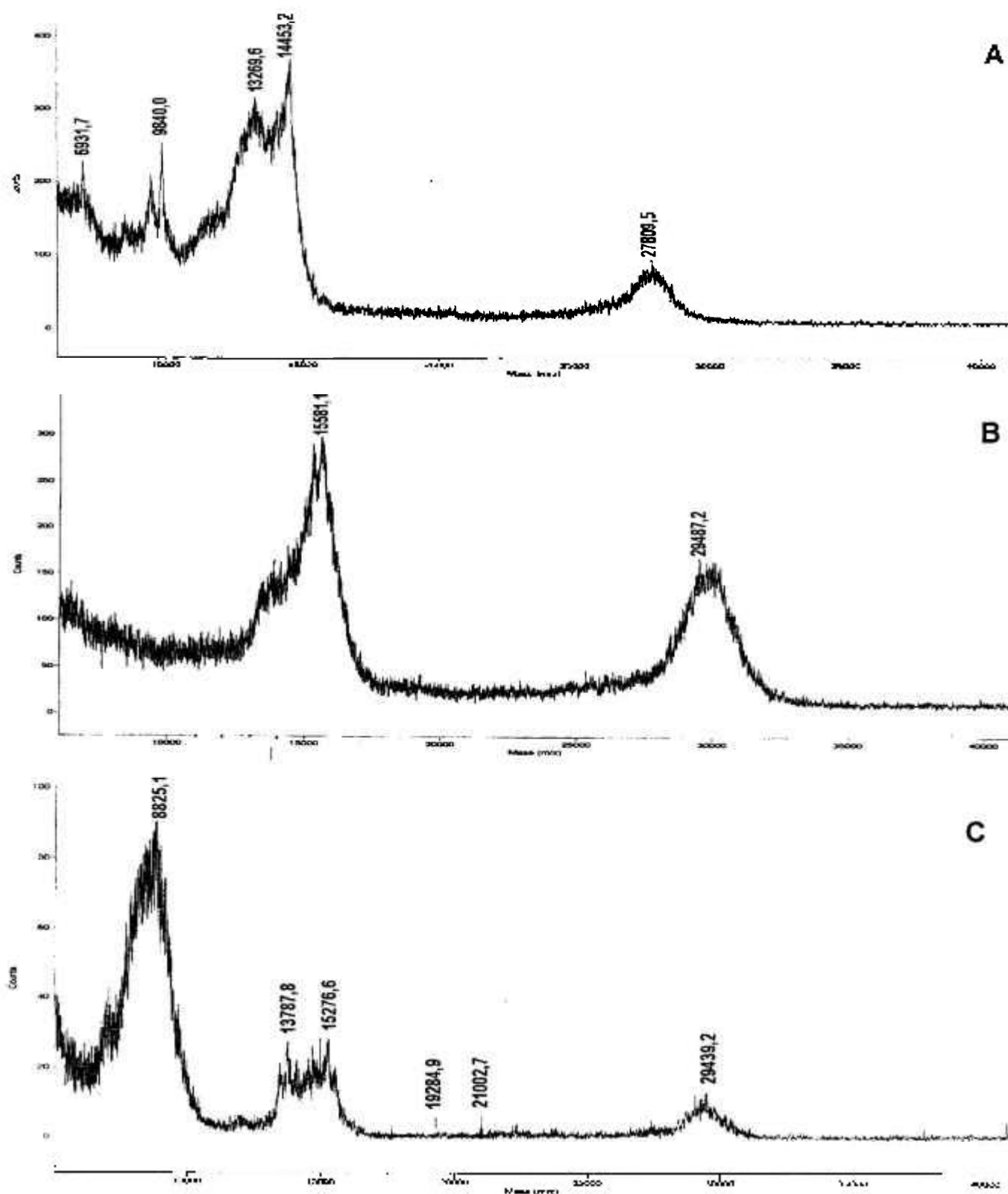


Figura 48 Análise de espectrometria de Massa MALDI-TOF das preparações pit-hTSH NIDDK (A), rec-hTSH Thyrogen (B) e rec-hTSH IPEN (C).

TABELA 18 Determinação da massa molecular (MM) de diferentes preparações de hTSH por MALDI - TOF.

Preparação		Subunidade α MM (Da)	Subunidade β MM (Da)	Heterodímero MM (Da)	
				Experimental	$\alpha + \beta$
rec-hTSH IPEN	ensaio 1	13788	15277	29439	
	ensaio 2	14000	15307	29692	
	MM \pm SD	13894,0 \pm 149,9	15292,0 \pm 21,2	29565,5 \pm 178,9	29186,0
rec-hTSH Thyrogen	ensaio 1	13900	15581	29487	
	ensaio 2	13817	15580	29736	
	MM \pm SD	13859,5 \pm 58,7	15580,5 \pm 0,71	29611,5 \pm 176,1	29440,0
pit-hTSH NIDDK	ensaio 1	13270	14453	27810	
	ensaio 2	12767	14498	27848	
	MM \pm SD	13018,5 \pm 355,7	14475,5 \pm 21,8	27829,0 \pm 26,9	27494,0
Valor teórico para o Thyrogen ^a		13820	15840	29660	

^aMassa molecular teórica derivada da sequência de aminoácidos, adicionando a contribuição devido aos carboidratos (14).

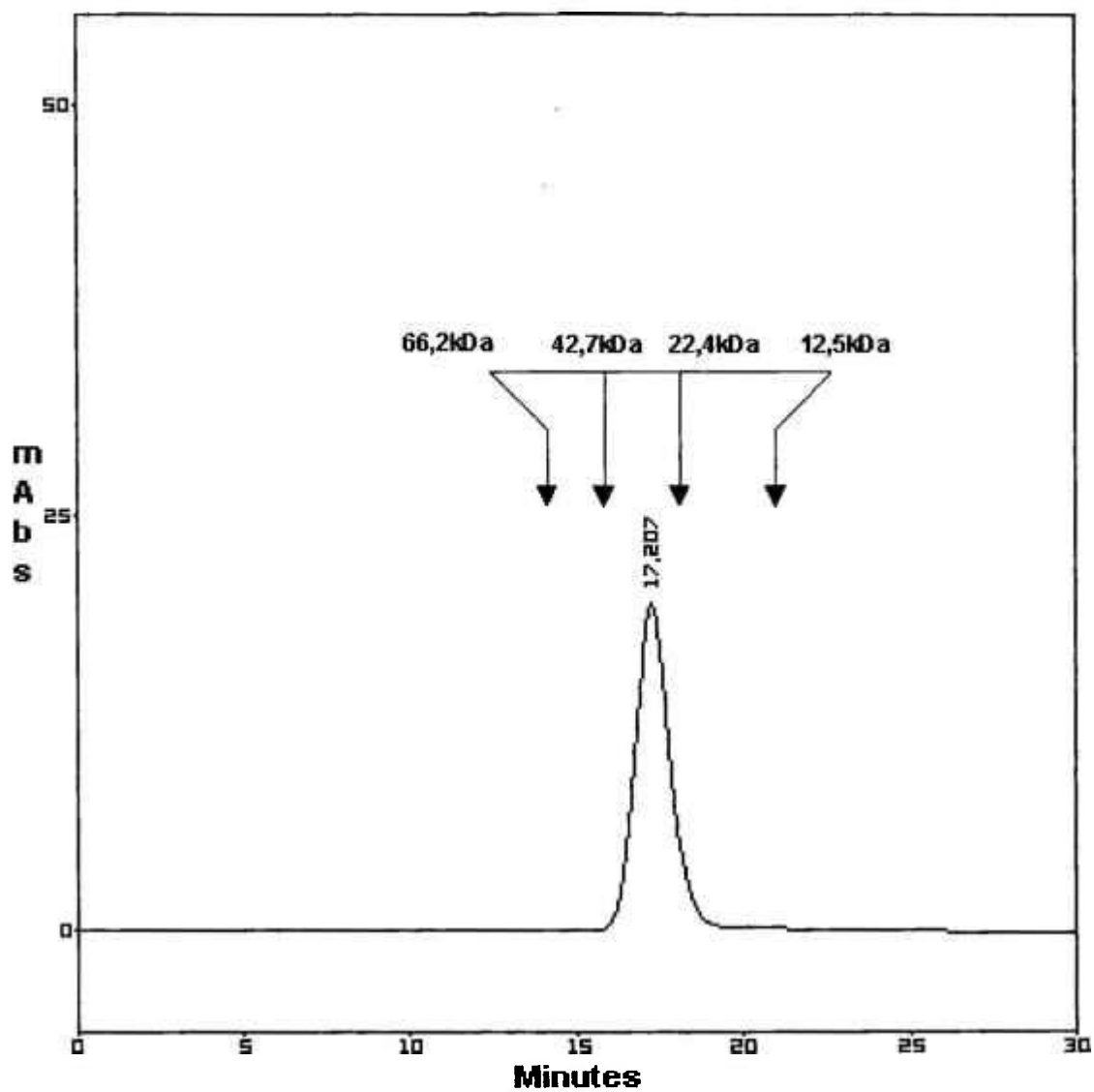


Figura 49 Perfil de eluição em HPSEC do rec-hTSH Thyrogen. As setas indicam a posição das diferentes proteínas: BSA (66,2 kDa); Ovoalbumina (42,7 kDa); rec-hGH WHO (22,4 kDa) e Citocromo-C (12,5 kDa).

3.7.5- Avaliação da meia vida circulatória do hTSH em camundongos

O desaparecimento do hTSH da circulação de camundongos aos quais foi administrado $1\mu\text{g}$ de rec-hTSH-IPEN e rec-hTSH-Thyrogen pode ser observado na Figura 50. Ambas as preparações de hTSH tiveram um desaparecimento rápido, sendo que apenas cerca de 20% do hTSH administrado ainda está presente após 180 minutos. As características do clearance do rec-hTSH IPEN foram idênticas ao rec-hTSH Thyrogen com meia vida de fase rápida de 5 minutos e de fase lenta de 65 minutos, o que sugere uma similaridade entre as estruturas glicídicas destas preparações.

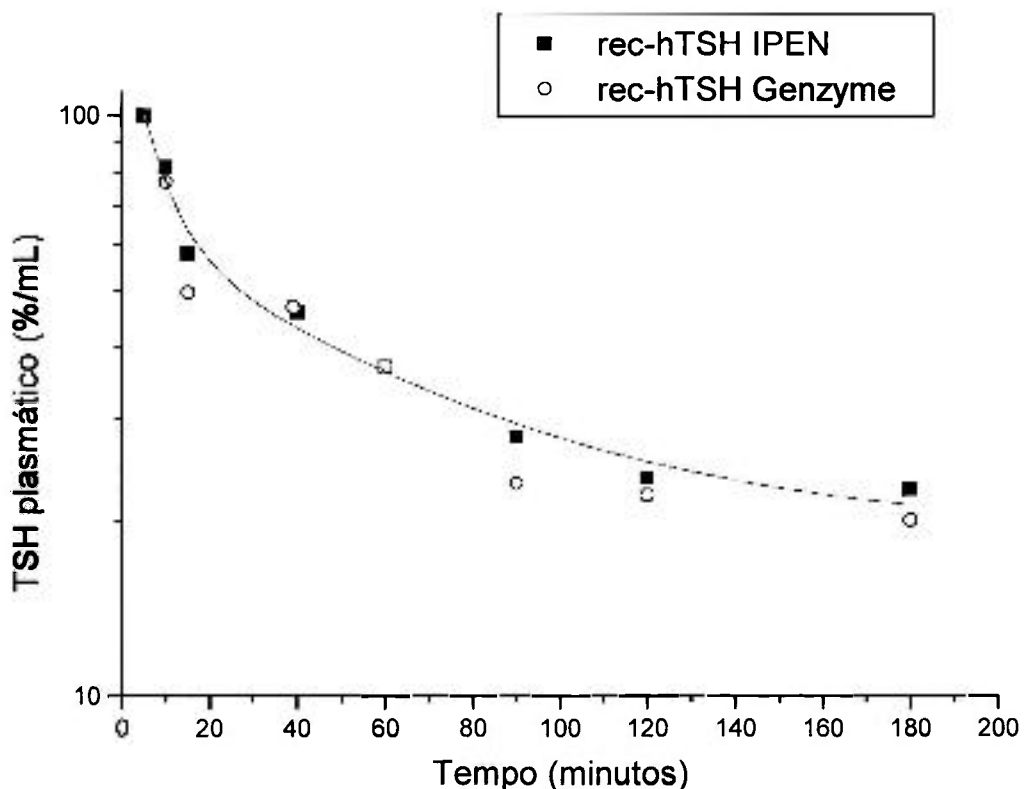


Figura 50 Clearance do rec-hTSH IPEN e rec-hTSH Thyrogen. Cada ponto representa a média da concentração plasmática de rec-hTSH em três camundongos. A concentração de hTSH presente em cada mL de plasma, em diferentes tempos foi expressa como porcentagem da dose máxima de hTSH determinado.

4- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a tireotrofina humana recombinante purificada (rec-hTSH-IPEN), obtida em nosso laboratório, satisfaz critérios de identidade, pureza e potência necessários para justificar o seu uso como reagente químico, seja para uso *in vitro* (como padrão ou traçador), assim como para bioensaios, estudos de biodistribuição ou ainda para estudos de estrutura-função.

Os dois sistemas de produção de rec-hTSH estudados neste trabalho, biorreator e frascos de cultura, mostraram-se úteis para uma produção laboratorial e piloto deste hormônio. Utilizando um biorreator “big foot” disponível em nosso laboratório, com volume extracapilar de 50 mL, obteve-se uma produção média de 1 mg de hTSH/dia. Produção análoga (0,9 mg/dia) foi conseguida no sistema de frascos de cultura, considerando um volume coletado de 200 mL (10 frascos), que pode ser facilmente incrementada aumentando o número de garrafas, só havendo como fator limitante o espaço na incubadora com CO₂.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura relativos à purificação do hTSH (14, 73, 78). Cole e colaboradores (14), os únicos a descreverem um processo completo para obtenção de produto injetável, iniciaram o processo de produção de hTSH, derivado de células CHO, com um meio condicionado contendo aproximadamente 25µg hTSH/mL e uma fração de massa de 0,26. Após clarificação por filtração e concentração foi realizada uma primeira etapa cromatográfica de troca catiônica (S-Sepharose Fast Flow) seguida de uma cromatografia de afinidade ao corante (Trisacryl Blue) e de uma troca aniônica (Q-Sepharose Fast Flow). Finalmente, após uma concentração de 10-20 vezes, a preparação foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200R). Após as duas primeiras colunas a fração de massa era 0,96, indicando que as duas últimas etapas cromatográficas foram somente polimento do produto. A recuperação individual de cada etapa foi de 90%, com exceção da recuperação final da etapa de exclusão molecular, que foi de 78% devido a uma amostragem mais restritiva. O rendimento

total obtido foi de 54%, com uma pureza de 99%, determinada por SDS-PAGE, RP-HPLC e HPSEC. Skudlinski e colaboradores (73) utilizando um esquema semelhante ao de Cole (troca catiônica, afinidade pelo corante e cromatografia aniônica opcional), obtiveram um produto cuja pureza, avaliada por SDS-PAGE, foi maior que 99%. Rendimento e grau de pureza menor, 32% e 97% respectivamente, foi relatado por Thotakura e colaboradores (78) para a purificação de hTSH utilizado para estudos de estrutura-função. Foram utilizadas nestes estudos cromatografias de afinidade por corante, troca aniônica e troca catiônica. Dados satisfatórios foram obtidos para a purificação do rec-hTSH-IPEN, sempre lembrando que a nossa fração de massa inicial era de 0,032 e o fator de purificação obtido foi de 25-40 vezes nas diferentes estratégias.

As várias estratégias de purificação estudadas neste trabalho, com duas ou três etapas, mostraram-se eficientes para obtenção de um grau de pureza de reagente químico, com rendimentos satisfatórios para este tipo de produto. Foi obtida uma preparação purificada de rec-hTSH-IPEN, em forma estável, possível de ser caracterizada, independentemente da estratégia adotada. As cromatografias de afinidade e de hidrofobicidade foram as mais eficientes para eliminar o principal contaminante presente no produto inicial, identificado na HPSEC como um pico eluindo com t_R aproximadamente 15 min e na RP-HPLC com t_R aproximadamente 30 min enquanto a cromatografia de exclusão molecular foi eficiente para eliminar outro contaminante cuja eluição ocorre em torno de t_R aproximadamente 11 min na HPSEC e <10 min na RP-HPLC. A purificação do rec-hTSH mediante cromatografia por afinidade ao corante já tinha sido utilizada e descrita na literatura por Cole e colaboradores (14) e por Szkudlinski e colaboradores (73), porém não encontramos registros na literatura da utilização de separação hidrofóbica para o rec-hTSH. Esta alternativa é de grande interesse principalmente para produtos para aplicações clínicas, em vista de potenciais problemas de segurança e toxicidade relacionados com a eluição indesejada do ligante imobilizado à matriz, em cromatografias de afinidade, com conseqüente contaminação do produto (37). Utilizando essas duas cromatografias individualmente, associadas à exclusão molecular (estratégia 2), obtivemos grau de pureza de aproximadamente 90%, entretanto a associação de

ambas levou à uma pureza de praticamente 99%(estratégia 3). Grau de pureza semelhante foi também conseguido mediante a associação da cromatografia por afinidade ao corante com uma cromatografia de troca iônica (estratégia 1). Este último esquema foi aquele seguido por Szkudlinski e colaboradores para a purificação do seu produto (73).

Em comparação com a preparação recombinante comercial Thyrogen, rec-hTSH-IPEN mostrou uma potência imunológica análoga, semelhantemente ao encontrado em trabalho anterior (64) para a preparação pituitária do NIDDK e para a preparação Thyrogen. A viabilidade de sua utilização como padrão e traçador em imunoenaios foi aqui também demonstrada.

As preparações de rec-hTSH-IPEN mostraram-se biologicamente ativas, mostrando-se em média cerca de 2 vezes mais potentes que a preparação hipofisária do NIDDK e aproximadamente 20% menos potente que a preparação recombinante comercial Thyrogen. Estes diferentes graus de bioatividade encontrados podem estar relacionados a diferenças no grau de sialilação (adição de ácido siálico) das cadeias de carboidratos presentes nessas preparações, o que confirmaria os dados da literatura (18, 73, 78).

A massa molecular do rec-hTSH-IPEN de 29565,5 Da mostrou similaridade (diferença de -0,16%) com a massa molecular do Thyrogen, ambas determinadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, enquanto uma diferença de + 6,2% foi detectada com relação à preparação hipofisária. Em relação ao valor teórico relatado por Cole e colaboradores (73) para o Thyrogen e derivado da seqüência de aminoácidos acrescida da contribuição dos carboidratos, a diferença observada foi de -0,32%. Outras técnicas físico-químicas, SDS-PAGE e HPSEC, também evidenciaram alguma diferença de massa molecular entre as preparações recombinantes e a pituitária. Em todas elas, a massa molecular da preparação de rec-hTSH-IPEN foi maior daquela da preparação pituitária do NIDDK e menor daquela da preparação recombinante comercial Thyrogen. Diferenças nos tempos de

retenção, observadas em HPSEC, refletindo diferenças de massa molecular da preparação hipofisária e dessas preparações recombinantes, foram também descritas na literatura em trabalho do nosso grupo que inclui parte dos dados desta dissertação (54). Foi relatado neste trabalho diferenças do tempo de retenção do Thyrogen e do rec-hTSH-IPEN respectivamente de 2,56% e 1,25% com relação à preparação hipofisária.

Ressalta-se a importância da utilização das técnicas analíticas de HPLC, de exclusão molecular e fase reversa, no início do processo de purificação e no acompanhamento das etapas de purificação, que permitiu detectar os principais contaminantes indesejados, facilitando a sua eliminação, além de identificar, como no caso da cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose, o procedimento que permite sua eliminação. Um maior conhecimento sobre as características de cada contaminante é extremamente útil no planejamento e na otimização do melhor esquema de purificação a ser adotado. Salienciamos que não encontramos na literatura este tipo de análise realizada no material inicial o que dá bastante confiabilidade aos dados aqui apresentados.

A quantificação do hTSH realizada no meio de cultura, antes de iniciar a purificação, foi baseada em técnica de RP-HPLC, previamente padronizada em nosso laboratório (54) que, revelou-se uma ferramenta bastante importante. Nas etapas iniciais do processo, as determinações são particularmente críticas e inexatas, especialmente devido à heterogeneidade das amostras e às interferências presentes. Conseqüentemente, a avaliação da recuperação de rec-hTSH após purificação bem como seus rendimentos e fatores de purificação, só poderão ser conhecidos de maneira exata se o conteúdo de hTSH no material de partida for corretamente quantificado. Esta metodologia de quantificação foi validada quanto à exatidão, precisão e sensibilidade. Relativo a este último parâmetro, um limite de detecção nunca obtido para o hTSH por outras técnicas físico-químicas foi confirmado por um enfoque teórico, bem como por testes práticos de recuperação. Este método mostrou-se robusto, tendo-se obtido a quantificação de amostras, com precisão aceitável, a partir de uma curva padrão pré-determinada, sem a

comparação com um padrão novo em cada análise. Isto é particularmente importante em vista do alto custo e disponibilidade limitada de preparações puras de hTSH.

Podemos concluir que os resultados obtidos neste trabalho deverão facilitar enormemente o trabalho que ainda deve ser realizado para a obtenção de uma preparação farmacêutica, injetável, de tireotrofina recombinante para uso humano. As técnicas físico-químicas padronizadas e aplicadas, assim como toda a caracterização do hTSH de diferentes origens aqui realizadas deverão também permitir a formulação de monografia relativa a este hormônio para a Farmacopéia Brasileira. Lembramos a este respeito que o hTSH ainda não consta em nenhuma das principais farmacopéias de referência internacional.

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSSON, M.; RAMBERG, M.; JOHANSSON, B.L. The influence of the degree of cross-linking type of ligand and support on the chemical stability of chromatography media intended for protein purification. **Process Biochem.**, v. 33, p. 47-55, 1998.
2. ANDREWS A.T.; NOBLE, I.; KEERATIPIBUL, S.; ASENJO, J.A. Physicochemical properties of the matrix proteins of three main culture vehicles. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 29-37, 1994.
3. ANSPACH, F.B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W.D.; Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **J. Chromatogr. A**, v. 865, p. 129-144, 1999.
4. BARTH, H.G.; BOYES, B.E.; JACKSON, C. Size exclusion chromatography. **Anal. Chem.**, v. 68, p. R445-R466, 1996.
5. BECKER, G.W.; HSIUNG, H.M. Expression, secretion and folding of human growth-hormone in *Escherichia-coli* purification and characterization. **FEBS Lett.**, v. 204, p. 145-150, 1986.
6. BERG, G.; LINDSTEDT, D.; SUURKULA, M.; JANSSON, S. Radioiodine ablation and therapy in differentiated thyroid cancer under stimulation with recombinant human thyroid-stimulating hormone **J. Endocrinol. Invest.**, v. 25(1), p. 44-52, 2002.
7. BONNERJEA, J.; OH, S.; HOARE, M.; DUNHILL, P. Protein purification - the right step at the right time. **Bio-Technol**, v. 4, p. 954-958, 1986.
8. BOSCHETTI, E. Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. **J. Chromatogr. A**, v. 658 (2), p. 207-236, 1994.
9. BURNETTE, N.W. Western blotting - electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein-A. **Anal. Biochem.**, v. 112(2), p. 195-203, 1981.
10. CAILLEUX, A.F.; BAUDIN, E.; TRAVAGLI, J.P.; RICHARD, M. Is diagnostic iodine-131 scanning useful after total thyroid ablation for differentiated thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 85, p. 175-178, 2000.

11. CANONNE, C.; PAPANDREOU, M.J.; MEDRI, G.; VARRIER, B.; RONIN, C. Biological and immunochemical characterization of recombinant human thyrotrophin. *Glycobiology*, v. 5, p. 473-481, 1995.
12. CHASE, H.A. The use of affinity adsorbents in expanded bed adsorption. *J. Mol. Recognit.*, v. 11 (1-6), p. 217-221, 1998.
13. COLE, E.S.; NICHOLS, E.H.; LAUZIÈRE, K.; EDMUNDS, T.; MC PHERSON, J.M. Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin - implications for posttranslational modification of the hormone *in vivo*. *Endocrinol.*, v. 129 (5), p. 2639-2646, 1991.
14. 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.; MC PHERSON, J.M., PRATT, B. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. *Bio-Technol.*, v. 11, p. 1014-1023, 1993.
15. DALMORA, S.; De 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 (2), p. 199-210, 1997.
16. De 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.
17. DYR, J.D.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. *J. Chromatogr. B*, v. 699, p. 383, 1997.
18. EAST-PALMER, J.; SZKUDLINSKI, M.W.; LEE, J.; THOTAKURA, N.R.; WEINTRAUB, B.D. A novel nonradiative *in vivo* bioassay of thyrotropin (TSH). *Thyroid*, v. 5(1), p. 55-59, 1995.
19. ELRASSI, Z. Recent progress in reversed - phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *J. Chromatogr. A*, v. 720, p. 93-118, 1996.
20. EMERSON, C.H.; TORRES, M.S.T. Recombinant human thyroid-stimulating hormone – Pharmacology, clinical applications and potential uses. *Biodrugs*, v. 17(1), p. 19-38, 2003.

21. FLODH, H.; Human growth hormone produced with recombinant DNA technology development and production. **Acta Paediatr. Scand.**, v. 325, p. 1-9, 1986.
22. FRANCHI, E.; MAISANO, F.; TESTORI, S.A.; GALLI, G.; TOMA, S.; PARENTE, L.; DE FERRA, F.; GRANDI, G. A new human growth - hormone production process using a recombinant *Bacillus-subtilis* strain. **J. Biotechnol.**, v. 18, p. 41-54, 1991.
23. GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspective of immobilized - metal affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 335-360, 2001.
24. GIOVANNI, V.; ARIANNA, L.G.; ANTONIO, C.; FRANCESCO, F.; MICHELE, K. GIOVANNI, S.; MARCO, S.; GIOVANNI, L. The use of recombinant human TSH in the follow-up of differentiated thyroid cancer: experience from a large patient cohort in a single centre, **Clin. Endocrinol.**, v.56(2), p. 245-250, 2002.
25. GOCHEE, C.F.; MONICA T Environmental effects on protein glycosylation. **Bio-Technol.**, v. 8, p. 421-427, 1990.
26. GOCHEE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSEN, D.C.; BAHR, J.B.; RASMUSSEN, J.R. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. **Bio-Technology**, v. 9, p. 1347-1355, 1991.
27. GOCHEE, C.F.; GRAMER, M.J.; ANDERSEN, D.C.; BAHR, J.B. The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties. In: Sikdar TP, Bier SK (Eds) **Frontiers in Bioprocessing**. Washington: American Chemical Society, v. 11, p. 199-240, 1992
28. 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**, v. 39, p. 247-254, 1985.
29. GROSSMANN, M.; WONG, R.; TECH., 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*. **Endocrinol.**, v. 138, p. 92-100, 1997.

30. HAUGHEN, B.R.; PACINI, F.; REINERS, C.; SCHLUMBERGER, M.; LADENSON, P.W.; SHERMAN, S.I.; SKARULIS, M.C.; DAVIES, T.F.; DEGROOT, L.J.; MAZZAFERRI, E.L.; DANIELS, G.H.; ROSS, D.S.; LUSTER, M.; SAMUELS, M.H.; BECKER, D.V.; MAXON, H.R.; CAVALIERI, R.R.; SPENCER, C.A.; MC ELLIN, K.; WEINTRAUB, B.D.; RIDIGWAY, E.C. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 84, p. 3877-3885, 1999.
31. 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.
32. 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.
33. JÓNSDÓTTIR, I.; SKOOG, B.; EKRE, H.P.T.; PAVLU, B.; PERLMANN, P. Purification of pituitary and biosynthetic human growth - hormone using monoclonal-antibody immunoabsorbent. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 46, p. 131-135, 1986.
34. JUNGBAUER, A.; BOSCHETTI, E. Manufacture of recombinant proteins with safe and validated chromatographic sorbents. **J. Chromatogr.B**, v. 662, p. 143-179, 1994.
35. KASHWAI, 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.
36. KRAUSZ, Y.; UZIELY, B.; NESHER, R.; CHISIN, R.; GLASER, B. Recombinant thyroid-stimulating hormone in differentiated thyroid cancer, **Israel Med. Assoc. J.**, v. 3(11), p.843-+, 2001.
37. LABROU, N.E. Design and selection of ligands for affinity chromatography, **J. Chromatogr. B**, v.790, p. 67-68, 2003.
38. LADENSON, P.W. Strategies for thyrotropin use to monitor patients with treated thyroid carcinoma. **Thyroid**, v. 9, p. 429-433, 1999.

39. LEFORT, S.; FERRARA, P. Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures. *J. Chromatogr.*, v. 361, p. 209-216, 1986.
40. LEONARD, M. New packing materials for protein chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 699, p. 3-27, 1997.
41. LESER, E.W.; ASENJO, J.A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. *J. Chromatogr.*, v. 584, p. 43-57, 1992.
42. LIENQUEO, M.E.; LESER, E.W.; ASENJO, J.A. An expert system for the selection and synthesis of multistep protein separation process. *Comput. Chem. Eng.*, v. 20, p. S189-S194, 1996.
43. LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein process. *Comput. Chem. Eng.*, v. 24, p. 2339-2350, 2000.
44. LIESIENE, J.; RACAITYTE, K.; MORKEVICIENE, M.; VALANCIUS, P.; BUMELIS, V. immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone-effect of ligand density. *J. Chromatogr. A* v. 764 (1), p. 27-33, 1997.
45. MAISANO, F.; TETORI, S.A. GRANDI, G. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human growth hormone. *J. Chromatogr.* v. 472 (2), p. 422-427, 1989.
46. MATTALIANO, R. J.; WHITTAKER, B.G.; LOSAPIO N. M.; CHENEY, L.; COLE, E.S.; PRATT, B.M. Analysis of bioactivity of recombinant human thyroid stimulating hormone in TT4 suppressed mice. *Thyroid*, v. 5, p. S1-S225, 1995.
47. MCKENZIE, J.M. The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology*, v. 63, p. 372-382, 1958.
48. 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.; DE GROOT, L.J.; CURRAN, P.; MC ELLIN, 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.
49. MONACO, L.; MARC, A.; EONDUVAL, A.; ARCERBIS, G.; DISTEFANO, G.; LAMOTTE, D.; ENGASSER, J.M.; SORIA, M.; JENKINS, N. Genetic engineering of alpha 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon-gamma. *Cytotechnology*, v. 22, p. 197-203, 1996.

50. MORGANTI, L.; HUYER, M.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)(6)-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPRL) secreted in the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 23, p. 67-75, 1996.
51. MUKHIJA, R.; RUPA, P.; PILLAI, D.; GARG, L.C. High level production and one-step purification of biologically-active human growth-hormone in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 165, p. 303-306, 1995.
52. NARAYANAN, S.R. Preparative affinity-chromatography of proteins. **J. Chromatogr. A**, v. 658, p. 237-258, 1994.
53. NIIMI, S.; HAYAKAWA, T.; OSHIZAWA, T.; UCHIDA, E.; YAMAHA, T.; TERAO, T.; OHTSUKA, E.; IKEHARA, M. Purification and characterization of the product of chemically synthesized human growth-hormone gene-expression in *Escherichia coli*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 4221-4228, 1987.
54. OLIVEIRA JE, MENDONÇA F, PERONI CN, BARTOLINI P, RIBELA MTCP. Determination of chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **J Chromatogr. B.**, v. 787, p. 345-355, 2003.
55. OLSON, K.C.; FENNO, J.; LIN, N.; HARKINS, R.N.; SNIDER, C.; KOHR, W.H.; ROSS, M.J.; FODGE, D.; PRENDER, G.; STEBBING, N. Purified human growth-hormone from *Escherichia coli* is biologically active. **Nature**, v. 293, p. 408-411, 1981.
56. PERONI, C.N.; RIBELA. M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Sensitive human thyrotropin immunoradiometric assay set up by the identification and minimization of non specific bindings. **J. Immunoassay**, v. 18, p. 247-265, 1997.
57. PERONI CN, SOARES CRJ, GIMBO E, MORGANTI L, RIBELA MTCP, BARTOLINI P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 35, p. 19-26, 2002.
58. PERSANI, L.; BORGAT, S.; ROMOLI, R.; ASTENA, 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.

59. QUEIROZ, J.A.; TOMAZ, C.T.; CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of protein. *J. Biotechnol.*, v. 87, p. 143-159, 2001.
60. RAFFERTY, B.; GAINES, DAS R. Comparison of pituitary and recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) in a multicenter collaborative study: establishment of the first World Health Organization reference reagent for rhTSH. *Clin. Chem.*, v. 45, p. 2207-2215, 1999.
61. REINERS, C.; FARAHATI, J. ^{131}I therapy of thyroid cancer patients. *Q. J. Nucl. Med.*, v. 43, p. 324-335, 1999.
62. RIGGIN, R.M.; SHAAR, C.J.; DORULLA, G.K.; LEFEBER, D.S.; MINER, D.J. High performance size exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone product. *J. Chromatogr.*, v.435, p. 307-318, 1988.
63. RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P.; The use of recombinant human growth hormone for radiodination and standard preparation in radioimmunoassay . *J. Immunol. Methods.*, v. 159, p. 269-274, 1993.
64. 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.
65. RIBELA, M.T.C.P.; CAMARGO, I.M.C., De OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. Single-step purification of recombinant human growth hormone (hGH) directly from bacterial osmotic shock fluids, for the purpose of ^{125}I -hGH preparation. *Protein Exp. Purif.*, v. 18, p. 115-120, 2000.
66. RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J. Chromatography B*, v. 790, p. 285-316, 2003.
67. RODBARD, D. Statistical estimation of minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assay. *Anal. Biochem.*, v. 90, p. 1-12, 1978.
68. 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.

69. SENDAK, R.A.; WANG, F.; GEAGAN, L.B.; ARMSTRONG, L.A.; THYNE, C.D.; COLE, E.S.; MATTALIANO, R.J. Comparison of two *in vitro* methods for the measurement of recombinant human TSH bioactivity. **Biologicals**, v. 30, p. 245-254, 2002.
70. SHAAF, L.; LEIPRECHT, A.; SAJI, M.; HUBNER, V.; 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.
71. SHIN, N.K.; KIM, D.Y.; SHIN, C.S.; HONG, M.S.; LEE, J.; SHIN, H.C. High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. **J. Biotechnol.**, v. 62, p. 143-151, 1998.
72. STROKOVSKAYA, L.; BARTOSZEWICZ, Z.; SZOLAJSKA, E.; KIKHNO, I.; SOLOMKO, A.; MICHALIK, Expression and one-step purification of intracellular human prolactin in insect cells. **J. Protein Exp. Purif.**, v. 22, p. 242-248, 2001.
73. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; BUCCI, I.; JOSHI, L.R.; TSAI, A.; EAST-PALMER, J.; SHILOACH, J.; WEINTRAUB, B. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by chinese hamster ovary cells: the role of sialylation and sulfatation in TSH bioactivity **Endocrinology**, v. 133, p. 1490-1503, 1993.
74. SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; TROPEA, J.E.; GROSSMANN, M.; WEINTRAUB, B.D. Asparagine-linked oligosaccharide structures determine clearance and organ distribution of pituitary and recombinant thyrotropin. **Endocrinol.**, v.136 (8), p. 3325-3330, 1995.
75. SZKUDLINSKI, M.W.; GROSSMANN, M.; LEITOLF, H.; WEINTRAUB, B.D. Human thyroid-stimulating hormone: structure-function analysis. **Methods**, v. 21, p. 67-81, 2000.
76. SZKUDLINSKI, M.W.; FREMONT, V.; RONIN, C.; WEINTRAUB, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 473-502, 2002.
77. TAKATA, K.; WATANABE, S.; HIRONO, M.; TANAKO, M.; TERAOKA, H.; HAYASHIZAKI, Y. The role of the carboxyl-terminal aminoacid extension of human TSH β subunit. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 165, p. 1035-1042, 1989.

78. 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.
79. THOTAKURA, N.R.; DESAI, R.K.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. The role of the oligosaccharide chains of the thyrotropin alpha-subunit and beta-subunit in hormone action. **Endocrinology**, v. 131, p. 82-88, 1992.
80. THOTAKURA, N.R.; SZKUDLINSKI, M.W.; WEINTRAUB, B.D. Structure-function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrotropin by sequential deglycosylation. **Glycobiology**, v. 4(4), p. 525-533, 1994.
81. UEDA, E.K.M.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts. **J. Chromatogr. A**, v. 922, p. 165-175, 2001.
82. VASQUEZ-ALVAREZ, E. Optimal synthesis of protein purification process. **Biotechnol. Progr.**, v.17(4), p. 685-696, 2001.
83. 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. Bioph. Res. Co.**, v. 149, p. 1149-1155, 1987.
84. WONDISFORD, F.E.; USALA, S.J.; DE CHERNEY, G.S.; CASTREN, M.; RADOVICK, S.; GYVES, P.W.; TREMPE, J.P.; KERFOOT, B.P.; NIKODEM, V.M.; CARTER, B.J.; WEINTRAUB, B.D. Cloning of the thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically-active human thyrotropin after gene transfection. **Mol. Endocrinol**, v. 2, p. 32-39, 1988.
85. ZEFAOUNI, M.; RONIN, C. Glycosylation is the structural basis for changes in polymorphism and immunoreactivity of pituitary glycoprotein hormones. **Eur. J. Clin. Chem.Clin. Biochem.** v. 34, p. 749-753, 1996.