



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Superprodução do Interferon β 1 Humano Recombinante
em *Escherichia coli***

Autor

Anne Drumond Villela

Orientador

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre
Março de 2008



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Superprodução do Interferon β 1 Humano Recombinante
em *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
como requisito para a obtenção
do grau de Mestre.

Autor

Anne Drumond Villela

Orientador

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre
Março de 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Diógenes Santiago Santos e Prof. Luiz Augusto Basso pela oportunidade, ensinamentos e apoio dispensado na realização deste trabalho.

À Jocelei Chies, Gaby Renard e Claudia Paiva Nunes pela ajuda, apoio, atenção e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Aos colegas da Quatro G Ltda. Pesquisa & Desenvolvimento Ltda e do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional pelo carinho, amizade, ajuda e força nos momentos mais difíceis que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS.

Ao Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A. (Farmasa) pela bolsa fornecida durante o mestrado.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma forma, contribuíram não só para a realização deste trabalho, como também para a minha formação pessoal e profissional. Muito obrigada a todos.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução	1
1. Interferons	1
1.1 Tipos de interferons e seus receptores	3
1.2 Rotas de sinalização intracelular	4
1.3 Atividades biológicas	5
1.4 Aplicações terapêuticas	6
2. Interferon β 1 e esclerose múltipla	7
2.1 Esclerose múltipla	8
2.2 Efeitos do interferon β 1 na EM	11
3. Biofármacos	12
3.1 Formulações de interferon β 1 disponíveis comercialmente	13
3.2 Custos	14
4. Interferon β 1 humano recombinante	15
Objetivos	19
Manuscrito do trabalho experimental	20
1. Title page	21
2. Abstract	23
3. Background	25
4. Results and discussion	27
5. Conclusions	31

6. Methods	32
7. List of abbreviations	37
8. Competing interests	37
9. Authors' contributions	37
10. Acknowledgements	38
11. References	39
12. Figures	42
Considerações finais	46
Anexo I	49
Testes de expressão da proteína IFN- β 1 clonada no vetor pET23a(+)	49
Testes de solubilização da proteína IFN- β 1 clonada no vetor pET23a(+)	52
Anexo II	55
Testes de expressão da proteína IFN- β 1 _{ser17} clonada no vetor pET30a(+)	55
Testes de solubilização da proteína IFN- β 1 _{ser17} clonada no vetor pET30a(+)	56
Anexo III	58
Testes de purificação da proteína IFN- β 1 _{ser17} clonada no vetor pET30a(+)	58
Anexo IV	60
Documento de confirmação de submissão do manuscrito	60
Referências bibliográficas	61

LISTA DE ABREVIATURAS

2', 5'-OAS: 2', 5'-Oligoadenilato sintetase

APCs: Células apresentadoras de antígenos

CHO: linhagem derivada de células de ovário de hamster chinês

DTT: Ditionitreitol

E. coli: *Escherichia coli*

EM: Esclerose múltipla

FDA: Departamento de Controle de Drogas e Alimentos (*Food and Drug Administration*)

gor: gene que codifica para glutationa redutase

HSV: vírus herpes simplex

huIFN- β 1: Interferon β 1 humano

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IFNs: Interferons

IFN- α : Interferon Alfa

IFN- β : Interferon Beta

IFN- β _{ser17}: Interferon Beta contendo uma serina na posição 17

IFN- γ : Interferon Gama

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

ISREs: Elemento de resposta estimulado por interferon

Jaks: Janus cinases

kDa: Quilo Dalton

LB: meio de cultura Luria – Bertani

lon: gene que codifica uma protease dependente de ATP

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

NK: células matadoras naturais (*natural killer*)

OD₆₀₀: Densidade Óptica a 600 nm

omp T: gene que codifica uma protease de membrana

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pI: Ponto isoelétrico

PPMS: Esclerose múltipla progressiva primária

rhIFN-β1a: Interferon β1a humano recombinante

rhIFN-β1b: Interferon β1b humano recombinante

RNAm: RNA mensageiro

RNAt: RNA transportador

rne131: gene que codifica uma enzima RNase

RPMS: Esclerose múltipla progressiva recorrente

RRMS: Esclerose múltipla surto-remissão

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SNC: Sistema nervoso central

SPMS: Esclerose múltipla progressiva secundária

STATs: Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

SUS: Sistema único de saúde

TGF-β: Fator de crescimento e transformação β

TNF-α: Fator de necrose tumoral α

txrB: gene que codifica para a tioredoxina redutase

RESUMO

Interferons são proteínas expressas por diferentes células humanas e sintetizadas como resposta a muitos agentes químicos e biológicos. Eles estão envolvidos em repostas antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória, atuando na manutenção da homeostase e na proteção do organismo contra patógenos. Devido a essa atividade biológica, os interferons são atualmente aprovados no mundo inteiro para o tratamento de várias desordens virais, malignas e imunológicas. Interferon β 1, por exemplo, é uma das poucas substâncias que provou ser efetiva na supressão das manifestações da esclerose múltipla que é uma doença crônica do sistema nervoso central. Ele é produzido comercialmente em microorganismos como *Escherichia coli*, utilizando a tecnologia do DNA recombinante e é chamado de biofármaco. As patentes de muitos biofármacos originais estão expirando e uma nova geração de moléculas, chamadas “biossimilares”, está em desenvolvimento. O interferon β 1 foi aprovado para uso no tratamento da esclerose múltipla surto-remissão pelo Departamento de Controle de Drogas e Alimentos dos EUA em 1993 e perdeu sua proteção de patente em 2007, tornando-se um alvo para a produção do biossimilar pelas indústrias farmacêuticas. O desenvolvimento do biossimilar interferon β 1 é uma alternativa para o alto custo do biofármaco original. Desenvolvemos um protocolo para produzir grandes quantidades do interferon β 1, no qual aproximadamente 3 mg da proteína recombinante homogênea podem ser obtidos a partir de 1 g de células de *E. coli* Rosetta(DE3). As análises por seqüenciamento N-terminal de aminoácidos e espectrometria de massas proveram evidências para a identidade e pureza da proteína recombinante. A análise por cromatografia líquida de fase reversa demonstrou que o conteúdo de deamidados e sulfóxidos foi similar ao padrão comercial, e nenhuma forma heterogênea da proteína rhIFN- β 1_{ser17} foi detectada. A análise por cromatografia líquida de exclusão molecular demonstrou a ausência de agregados de alta massa molecular e de dímeros. O protocolo desenvolvido poderá ser utilizado para a produção do biossimilar pelas indústrias farmacêuticas e deste modo, diminuir os custos do Ministério da Saúde e dos consumidores com este biofármaco.

Palavras-chave: interferon β 1 humano recombinante, biofármacos, biossimilares.

ABSTRACT

Interferons are proteins expressed by different human cells and synthesized in response to many chemical and biological agents. They are involved in antiviral, antiproliferative and immunomodulatory responses, acting to both maintain homeostasis and in host defense. Because of this biological activity, interferons are now licensed worldwide for the treatment of various viral, malignant and immune disorders. Interferon β 1, for instance, is one of the few substances which has proved to have effectiveness in suppressing manifestations of multiple sclerosis that is a chronic disease of the central nervous system. It is commercially produced in microorganisms such as *Escherichia coli* by using recombinant DNA techniques and is thus designated as biopharmaceutical. The patents for many originator biopharmaceuticals are expiring, and a new generation of follow-on molecules, termed “biosimilars”, is under development. Interferon β 1 was approved for use in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis by U.S. Food and Drug Administration in 1993 and lost its patent protection in 2007 becoming a target to biosimilar production for pharmaceutical industries. The development of interferon β 1 biosimilar is an alternative to the high cost of the originator biopharmaceutical. We have developed a protocol to produce large quantities of pure interferon β 1 in which approximately 3 mg of homogeneous recombinant protein could be obtained from 1 g of *E. coli* Rosetta(DE3) cells. N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry analysis provided evidence for the identity and purity of the recombinant protein. Reverse phase liquid chromatography analysis demonstrated the content of deamidates and sulfoxides were similar to a commercial standard, and no heterogeneous forms of rhIFN- β 1_{ser17} were detected. Size exclusion chromatography analysis demonstrated the absence of high molecular mass aggregates and dimers. The protocol developed may be used to biosimilar production by pharmaceutical industries and thereby lower costs to healthcare payers and consumers.

Key words: recombinant human interferon β 1, biopharmaceuticals, biosimilars.

INTRODUÇÃO

1. Interferons

Interferons (IFNs) são proteínas expressas por diferentes células humanas em resposta a infecções virais, a certas bactérias ou na presença de fatores que estimulem o sistema imunológico ¹. Eles atuam como mediadores na comunicação entre células por meio da ligação a receptores específicos de superfície ². Esta ligação é seguida da ativação de cascatas de sinalização intracelular que resultam na alteração de níveis de expressão de alguns genes regulados pelo IFN e na conseqüente síntese de proteínas que medeiam atividades pleiotrópicas, incluindo as seguintes respostas:

- Antiviral: a maioria das células infectadas por vírus é capaz de sintetizar interferon alfa (IFN- α) e interferon beta (IFN- β) em cultura de células. Em contraste, o interferon gama (IFN- γ) é sintetizado somente por certas células do sistema imunológico, incluindo as células NK (*natural killer*), as células T_H1 CD4 e as células T do tipo CD8. Estas células respondem á infecção viral por meio de um aumento de IFN sintetizado, o qual estimula a síntese de produtos de múltiplos genes que inibem a replicação viral em células infectadas, tanto ao nível de transcrição como de tradução ³. O produto desses genes antivirais são geralmente enzimas, sendo as mais importantes a 2', 5'-oligoadenilato sintetase (2', 5'-OAS) e a cinase eIF-2 α ⁴. Essas enzimas permanecem no estado inativo após sua síntese e são ativadas quando expostas a RNA viral dupla fita. A 2', 5'-OAS, quando ativada, polimeriza o ATP em uma série de oligômeros com ligações 2', 5' entre os nucleotídeos dos ácidos nucléicos ⁵. Esses oligômeros de ATP ativam uma RNase celular que cliva o RNA viral prevenindo a tradução de proteínas virais (**Figura 1A**) ^{3, 4, 5}. A enzima eIF-

2 α , quando ativada, leva à fosforilação do seu substrato eIF-2 α (subunidade menor do fator de iniciação 2), que bloqueia a construção da subunidade ribossomal menor e previne a tradução do RNAm viral e celular (**Figura 1B**)⁴.

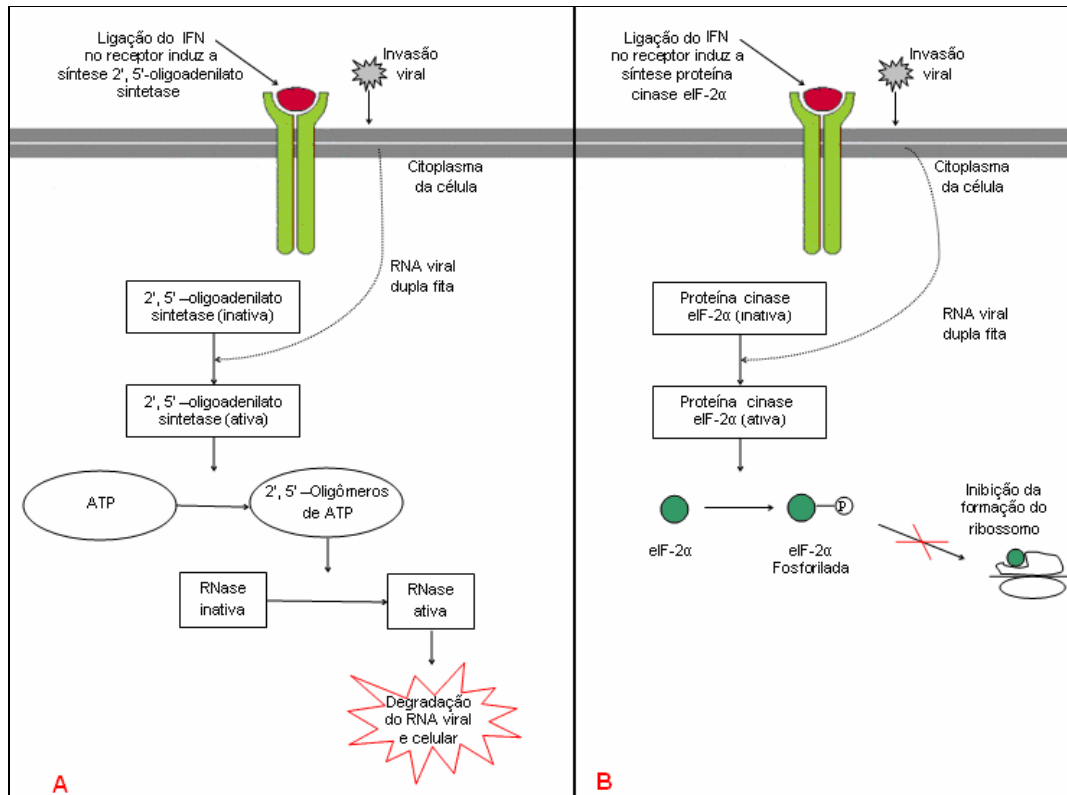


Figura 1: Inibição da replicação viral por meio de produtos de genes ativados pelo IFN. **A.** A ligação do IFN no receptor estimula a síntese da enzima 2', 5' – oligoadenilato sintetase que é ativada por RNA viral, polimerizando ATP em 2', 5' – oligômeros que ativam uma RNase celular a qual cliva RNAs virais. **B.** A ligação do IFN no receptor estimula a síntese da enzima eIF-2 α que quando ativada pela exposição a RNAs virais leva à fosforilação do seu substrato eIF-2 α , o qual inibe a formação do ribossomo. (Figura adaptada de Walsh. Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology, 2ª ed., Ireland: Wiley; 2004).

- Antiproliferativa: O IFN tem efeito em células cancerosas por meio da interferência no ciclo celular, alongando ou bloqueando a fase G1, levando à morte celular. A indução de apoptose, que é importante na eliminação de células lesadas,

pode ocorrer por meio de caspases ativadas por IFNs, resultando na fragmentação do DNA, alterações mitocondriais e alterações na membrana plasmática. A ativação imune indireta pelos IFNs também pode produzir efeito antiproliferativo, através da estimulação da expressão do MHC (complexo principal de histocompatibilidade – que são glicoproteínas codificadas pelos genes MHC classe I e MHC classe II envolvidas na apresentação do peptídeo antigênico às células T), e ativação das células T citotóxicas e células NK ^{3, 5}.

- **Imunomodulatória:** A proteína IFN- β inibe respostas inflamatórias, diminui a expressão de moléculas do MHC nas APCs (células apresentadoras de antígenos) e diminui a liberação de citocinas inflamatórias. Além disso, o IFN- β acentua a função supressora das células T, que é importante na diminuição da inflamação e também estimula a produção de fatores de crescimento em células imunológicas que auxiliam no reparo do tecido lesionado ³.

Dessa forma, os IFNs atuam na manutenção da homeostase e na proteção do organismo contra patógenos ^{3, 4}.

1.1 Tipos de Interferons e seus Receptores

Em humanos, distintos IFNs são produzidos, sendo os principais classificados em dois tipos de acordo com suas propriedades físicas e funcionais ². O IFN- α e o IFN- β pertencem à classe I, enquanto o IFN- γ faz parte da classe II ¹. O IFN- α e o IFN- β apresentam semelhança na seqüência de aminoácidos (30%) e se ligam a um receptor comum composto por duas cadeias distintas IFNAR1 e IFNAR2 (receptor IFNAR); já o IFN- γ se liga ao seu próprio receptor composto por cadeias α e β ^{3, 4, 6}. Os IFNs de classe I possuem a capacidade de se ligarem ao receptor em orientações diferentes, induzindo conformações distintas. Isso resulta no

envolvimento de segundos mensageiros diferentes e na ativação de genes distintos, sendo assim, obtidas respostas biológicas específicas para cada ligante ^{3,6}.

1.2 Rotas de Sinalização Intracelular

A ligação dos IFNs tipo I no receptor IFNAR, promove a dimerização das subunidades do receptor e a associação com as *Janus Cinases* (Jaks), família de proteínas tirosina cinases ³. As subunidades IFNAR-1 e 2 se associam com as tirosinas cinases Tyk2 e Jak1, respectivamente. Tyk2 e Jak1 fosforilam, reciprocamente, suas tirosinas e assim são ativadas, resultando na rápida fosforilação de resíduos específicos de tirosina nas subunidades IFNAR-1 e 2 ⁷. Essa fosforilação de resíduos do IFNAR promove a ligação direta entre um ou mais membros de uma família de proteínas citoplasmáticas, as STATs (Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição; do inglês, *Signal Transducers and Activators of Transcription*) nas fosfotirosinas específicas do receptor ⁸. Subsequentemente as STATs são fosforiladas e ativadas pelas Jaks. As STATs dissociam-se do receptor, dimerizam e migram para o núcleo (**Figura 2**) ^{3,7,8}.

O domínio SH2, presente em todas as STATs, é responsável pela ligação destas nas fosfotirosinas da superfície do receptor. Esse domínio também é necessário para que ocorra a interação STAT/JAKs, e é responsável pela dimerização das STATs ^{4,7}.

No núcleo, as STATs interagem com proteínas reguladoras de genes e com regiões reguladoras de genes (**Figura 2**) ³. Essas regiões reguladoras de genes são chamadas de ISREs (Elemento de Resposta Estimulado por Interferon; do inglês, *Interferon Stimulated Response Element*), que leva à indução ou ao aumento da expressão de genes específicos ^{3,4,8}.

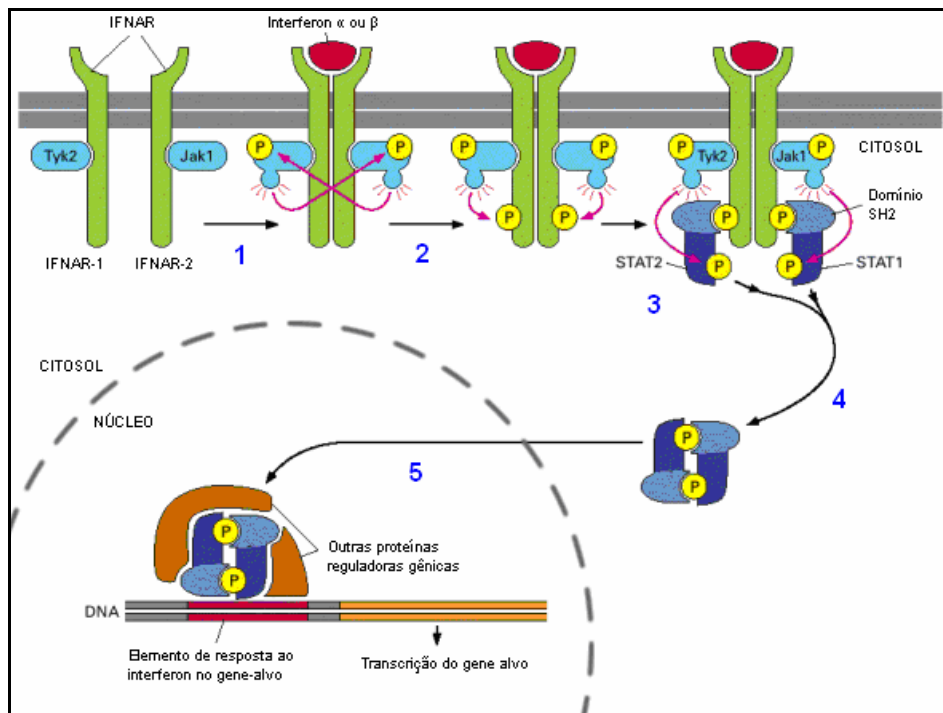


Figura 2: Rota de sinalização Jak-STAT ativada por Interferon α ou β . 1- Ligação do Interferon provoca a dimerização do receptor e as Jaks fosforilam suas tirosinas reciprocamente. 2- Jaks ativadas fosforilam as tirosinas do receptor. 3- STATs ancoram nas fosfotirosinas do receptor e são fosforiladas pelas Jaks. 4- STATs dissociam-se do receptor e dimerizam, por meio do seu domínio SH2. 5- STATs migram para o núcleo, ligam-se ao DNA e a outras proteínas reguladoras gênicas. (Figura adaptada de Alberts et al. *Biologia Molecular da Célula*, 4^o ed, Brasil: São Paulo. 2004).

1.3 Atividades Biológicas

Os IFNs induzem muitos efeitos biológicos. Os IFNs tipo I induzem efeitos similares, os quais são distintos dos induzidos pelo IFN- γ . O IFN- α , produzido por leucócitos quando estes são expostos a vírus, e o IFN- β , produzido por fibroblastos estimulados, apresentam atividade antiviral e antiproliferativa em vários tipos de células, porém estas atividades se diferenciam de um tipo de IFN para outro^{1, 3, 4}. A base molecular dessa variação na atividade biológica dos IFNs tipo I não é totalmente entendida, já que eles ligam no mesmo receptor⁴.

O IFN- γ , produzido por linfócitos ativados, possui atividade antiviral e antiproliferativa mais fraca ^{1, 3, 4}. Ele está diretamente envolvido na regulação de respostas imunes, além de promover ativação, crescimento e diferenciação de muitos tipos de células envolvidas nesses processos fisiológicos ⁴.

Devido a essas atividades biológicas, a maioria dos interferons é utilizada no tratamento de doenças, como no caso do aumento da resposta imune contra agentes infecciosos, doenças autoimunes e tratamento de alguns tipos de câncer ⁴.

1.4 Aplicações Terapêuticas

O potencial terapêutico dos IFNs tem sido extensivamente explorado nas últimas três décadas, culminando com a aprovação de vários IFNs para o tratamento de doenças ⁴.

O IFN- α , produzido pelo Laboratório Hoffmann–LaRoche (Roferon-A) e pelo Laboratório Schering-Plough (Intron-A), foi aprovado para ser utilizado no tratamento de várias doenças, na maioria, formas de câncer e infecções virais ⁹. Atualmente este biofármaco é aprovado em mais de 50 países para mais de 16 indicações ⁴. O Intron A foi primeiramente aprovado nos Estados Unidos da América em 1986 para o tratamento da leucemia de células pilosas (*Hairy cell leukaemia*), promovendo uma regressão significativa no câncer em mais de 90% dos pacientes ⁴.

O IFN- α e o IFN- β foram eficientes na redução da carga viral e nas manifestações clínicas das infecções de herpes zoster, vírus herpes simplex (HSV) e citomegalovírus ⁹. Estudos clínicos iniciais com o IFN- β para tratamento de hepatite foram menos promissores quando comparados com IFN- α que apresentou efeitos benéficos ⁹. IFN- α 2 tem sido largamente utilizado no tratamento das hepatites virais dos tipos B, C e D ^{4, 9}. Esses tipos de hepatite freqüentemente causam uma infecção crônica levando a cirrose e carcinoma hepatocelular ⁹.

O IFN- β 1 foi aprovado como tratamento para esclerose múltipla, seus efeitos nessa doença estão descritos no próximo item deste trabalho. Foram realizados testes clínicos para investigar os possíveis efeitos benéficos dos IFNs α e γ nesta doença^{9, 10}. O IFN- γ mostrou induzir as exacerbações da doença, o que levou ao seu reconhecimento como citocina endógena responsável pela resposta inflamatória na esclerose múltipla¹⁰. O IFN- α não mostrou efeito benéfico na redução da frequência de surtos como mostrou o IFN- β ¹⁰. O IFN- β 1 também mostrou ser eficaz em modelos animais de artrite reumatóide, ajudando a diminuir a inflamação das articulações e a destruição dos ossos por meio da modulação das citocinas^{1, 11, 12}.

O IFN- γ tem aplicação médica principalmente na doença granulomatosa crônica, uma doença genética rara, na qual as células fagocíticas dos portadores são incapazes de ingerir ou destruir agentes infecciosos como bactérias⁴. Essa citocina também mostrou ser promissora no tratamento da leishmaniose, doença caracterizada pela presença de protozoários do gênero *Leishmania* nas células imunológicas, na qual o IFN- γ parece estimular os macrófagos a produzir óxido nítrico que é tóxico para o parasita⁴.

2. Interferon β 1 e Esclerose Múltipla

O IFN- β 1 exerce seu efeito biológico por meio da ligação a receptores específicos na superfície das células, iniciando uma complexa cascata de eventos intracelulares, que desencadeiam atividades antivirais, antiproliferativas, anti-infecciosas e imunomodulatórias^{13, 14}. Devido a estas atividades, o IFN- β 1 humano recombinante tem aplicação médica principalmente no tratamento da esclerose múltipla, uma doença crônica do sistema nervoso¹.

Por outro lado, o IFN- β 2 é uma citocina, também conhecida como Interleucina 6, que potencializa a resposta imune ⁴. O interesse clínico do IFN- β 2 está na sua habilidade de inibir o crescimento de algumas células cancerosas e estimular o crescimento de células hematopoéticas *in vitro* ⁴.

2.1 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica, que afeta muitos (**múltipla**) locais do sistema nervoso central (SNC), conduzindo a lesões e cicatrizes (**esclerose**) no cérebro e/ou medula espinhal. A doença é caracterizada por danos na bainha de mielina que envolve os neurônios do sistema nervoso central, comprometendo a função neural. Caracteriza-se por ser auto imune, onde elementos do sistema imunológico (principalmente linfócitos e macrófagos) atacam proteínas da mielina levando à inflamação e desmielinização (destruição da mielina) ^{1, 4, 15}.

Evidências indicam que a EM está relacionada com a ativação e proliferação de linfócitos T contra antígenos específicos da mielina ⁴. Uma explicação alternativa para a inflamação crônica, que é a principal característica da EM, é a presença de vírus ou agentes infecciosos que infectam o sistema nervoso persistentemente ¹⁶. Entretanto, nenhum agente infeccioso foi isolado, embora tenham sido extensivamente procurados ¹⁶.

O processo inflamatório está associado com uma complexa cascata de moléculas e mediadores inflamatórios ¹⁶. A doença é induzida pela geração de uma população de células T_H1 predominantes (responsáveis pela resposta pró-inflamatória) contra antígenos da mielina ^{3, 16}. As células precursoras T_HP são induzidas à diferenciação em células T_H1, que são reativas à mielina, quando um antígeno que tem reação cruzada com antígenos da mielina é apresentado para as

células T pelas células apresentadoras de antígenos na presença de interleucina 12 (IL-12) e moléculas co-estimulatórias (**Figura 3**)¹⁶. As células T_{H1} infiltram-se por meio da barreira hematoencefálica, migrando para o SNC onde encontram os antígenos da mielina apresentados pela microglia (células apresentadoras de antígenos no cérebro)¹⁶. Assim, as células T_{H1} são novamente estimuladas para iniciar uma cascata inflamatória destrutiva mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias (**Figura 3**)^{4, 15, 16}. As células T_{H1} secretam IFN- γ e mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral α (TNF- α)¹⁶. O IFN- γ induz a expressão de moléculas de MHC de classe II nas APCs, o que facilita a interação entre as células T e as APCs³.

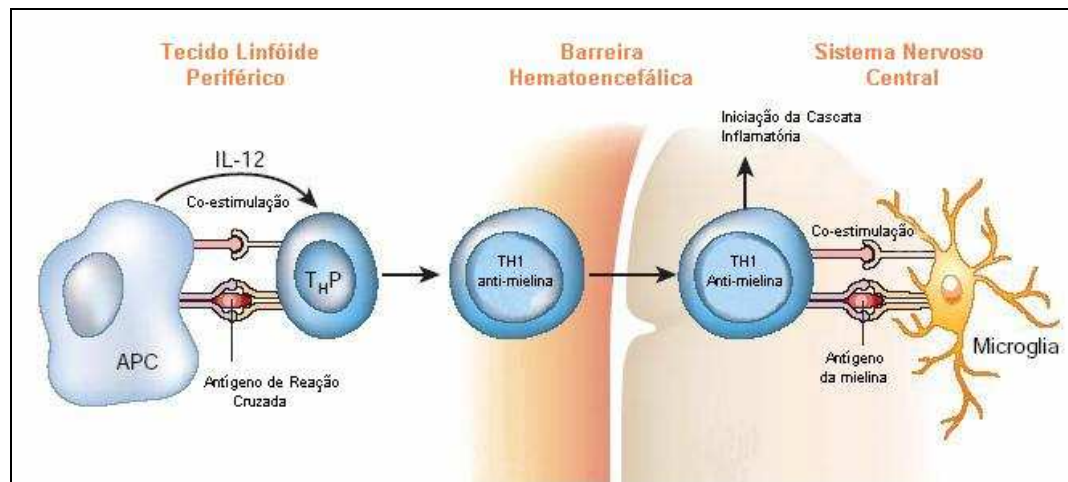


Figura 3: Mecanismos imune e inflamatório na EM. As células precursoras T_{H1}P são induzidas à diferenciação em células T_{H1}, reativas à mielina, pela apresentação de um antígeno de reação cruzada com antígenos da mielina pela APC na presença de IL-12. As células T_{H1} migram para o sistema nervoso central onde encontram os antígenos da mielina apresentados pela microglia e são novamente estimuladas para iniciar uma cascata inflamatória destrutiva. (Figura adaptada de Weiner and Selkoe. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. Nature. 2002; 420: 879 – 884).

A resposta inflamatória e outros elementos do sistema imunológico levam à desmielinização por meio da destruição da mielina, diminuição local da resposta imune do SNC pela microglia residente ou por causar a morte de oligodendrócitos (células encarregadas de produzir e manter a bainha de mielina) pela toxicidade causada pela citocina TNF- α ^{3, 4}. A desmielinização faz com que os axônios fiquem expostos e, assim, as fibras nervosas falham na transmissão de sinais ^{3, 4}.

A área do cérebro ou medula espinhal afetada determina os sintomas causados pela doença. Os sintomas, que são resultado da desmielinização, podem incluir: dor, perda de visão, visão dupla, rigidez, fraqueza, falta de equilíbrio, dormência, problemas no controle de bexiga e intestino, fadiga, mudanças emocionais e comprometimento intelectual ^{3, 17}.

A etiologia da EM é desconhecida, no entanto, esta é uma doença comumente multifatorial, envolvendo susceptibilidade genética, fatores ambientais, como a exposição a antígenos específicos, dieta, autoimunidade e processos neurodegenerativos ^{3, 4, 15}. Essa doença afeta mais de dois milhões de pessoas no mundo e é a maior causa de invalidez na população adulta jovem ³.

A EM é classificada em quatro subtipos, de acordo com seu curso clínico:

- Surto-remissão (RRMS): é o tipo mais comum e afeta mais de 85% da população que apresenta a doença. Caracteriza-se por exacerbações clínicas agudas e inflamatórias na atividade do SNC, seguida por períodos de estabilidade clínica ^{3, 17, 18}.
- Progressiva primária (PPMS): neste tipo ocorre deterioração clínica sem surtos e remissões identificáveis ^{3, 17, 18}.
- Progressiva secundária (SPMS): deterioração clínica lenta independente de surtos clínicos ^{3, 17, 18}.

- Progressiva recorrente (RPMS): é caracterizada por deterioração clínica com sobreposição de surtos clínicos ^{3, 17, 18}.

Não há cura para a EM, entretanto, terapias imunomodulatórias são disponíveis para amenizar a doença ³. Dentre diversos medicamentos aprovados disponíveis, o biofármaco Interferon β 1 é um dos mais utilizados, sendo considerado um dos tratamentos de primeira linha para RRMS ^{3, 19}.

2.2 Efeitos do Interferon β 1 na EM

O biofármaco IFN- β 1 altera significativamente a progressão da doença, reduzindo a frequência de surtos, progressão de invalidez e o acúmulo de lesões cerebrais do tipo surto-remissão ^{18, 20, 21}. O IFN- β 1 também parece reduzir evidências clínicas e radiográficas da atividade da doença na SPMS ^{18, 20, 22}. Nenhum benefício foi demonstrado na PPMS, já que o IFN- β 1 parece ser mais eficiente em reduzir a frequência de surtos ^{14, 22}.

O mecanismo celular e molecular que faz com que o IFN- β 1 desencadeie seu efeito benéfico na EM é complexo e não completamente entendido ^{23, 24}. Sabe-se que a produção de interferon endógena é deficiente na EM, por isso talvez a administração de IFN- β 1 ao paciente corrija esta deficiência ¹⁰.

Outro efeito benéfico do IFN- β 1 deve ser devido a suas propriedades imunomodulatórias que são bem caracterizadas ^{24, 25}. Este diminui a expressão de MHC classe II pelos APCs, inibe a ativação das células T_H1 e diminui a secreção de citocinas inflamatórias, além de reduzir a permeabilidade da barreira hematoencefálica, e conseqüentemente, a penetração de leucócitos no SNC (**Figura 4**) ^{16, 25}. Desta forma, a infiltração inflamatória no SNC diminui, levando à redução da desmielinização ^{24, 25}. Acredita-se que parte do efeito terapêutico do IFN- β 1 na EM seja devido à ativação das células T do tipo CD8, que são responsáveis pela

supressão da resposta inflamatória, já que na EM a função regulatória da célula CD8 é defeituosa²⁰. O IFN- β 1 também estimula a secreção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β que inibem as células T_H1 e diminuem a secreção de IFN- γ (**Figura 4**)^{3, 16}.

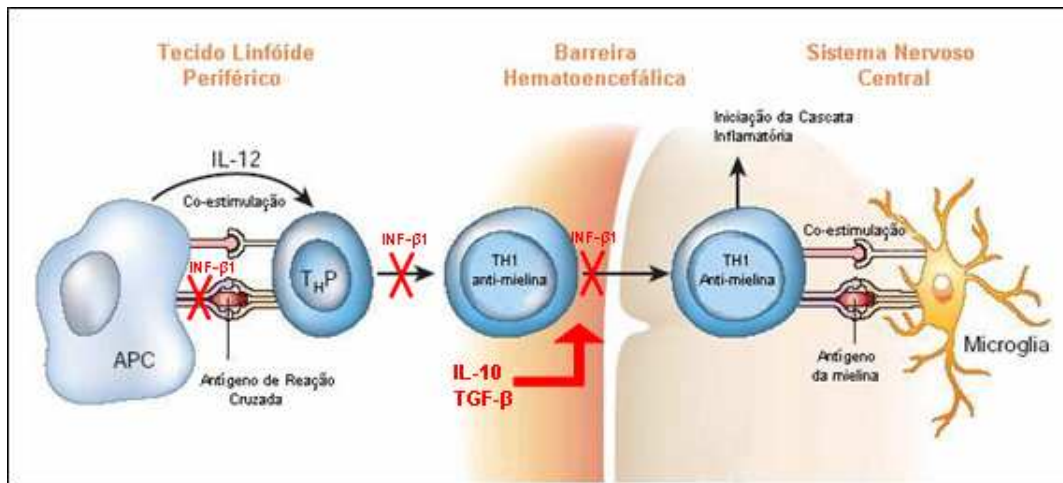


Figura 4: Efeitos imunomodulatórios do Interferon β 1 na EM. O IFN- β 1 diminui a expressão de MHC classe II pelos APCs, inibe a ativação das células T, reduz a permeabilidade da barreira hematoencefálica e estimula a secreção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β que inibem as células T_H1. (Figura adaptada de Weiner and Selkoe. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. Nature. 2002; 420: 879 – 884).

3. Biofármacos

O IFN- β 1 utilizado clinicamente é chamado de biofármaco. O termo “biofármaco” é aceito como parte do vocabulário farmacêutico e se refere às proteínas terapêuticas produzidas por engenharia genética (ou via tecnologia de hibridomas, no caso de alguns anticorpos monoclonais). Os biofármacos podem ser definidos como fármacos cujos princípios ativos são proteínas terapêuticas recombinantes obtidas por processo biológico, seja em cultura de células, em

tecidos, em órgãos ou em organismos inteiros ²⁶. Essas proteínas terapêuticas recombinantes são moléculas muito mais complexas do que as drogas tradicionais quimicamente produzidas. Elas exigem um processo de produção bastante elaborado e sofisticado e suas propriedades são altamente dependentes do processo utilizado ²⁷.

Os biofármacos têm revolucionado as opções de tratamento para muitas doenças. Muitos biofármacos originais, ou seja, os primeiros produtos aprovados para a venda estão perdendo sua proteção de patente ²⁸. Assim, uma nova geração de moléculas, chamadas biossimilares, está sendo desenvolvida ^{27, 28, 29}. Essas moléculas poderão ser alternativas de menor custo para os biofármacos originais ²⁸. Entretanto, a segurança e a eficácia dos biossimilares devem ser comprovadas e devem equivaler ao produto original ^{27, 28, 29}.

3.1 Formulações de IFN-β1 Disponíveis Comercialmente

O biofármaco IFN-β1, aprovado para uso médico no tratamento de RRMS, apresenta as seguintes formulações disponíveis comercialmente:

- Betaferon[®] / Betaseron[®] (Laboratório Bayer Schering / Chiron)
- Avonex[®] (Laboratório Biogen Idec)
- Rebif[®] (Laboratório Merk Serono)

O Betaseron[®] é conhecido fora dos Estados Unidos da América e do Canadá pela marca registrada Betaferon[®] ³⁰. Esses produtos são produzidos em células de *Escherichia coli* (*E. coli*), gerando um produto não-glicosilado. Entretanto, a falta de glicosilação não afeta a eficácia terapêutica desses produtos. Estes biofármacos diferem da proteína humana porque a cisteína 17 foi substituída por uma serina, com o intuito de aumentar a sua produção biologicamente ativa ¹³. Esses produtos são chamados de Interferon β1 recombinante humano b (rhIFN-β1b) ^{17, 31}.

Os dois últimos são produzidos em uma linhagem de células derivadas de ovário de hamster chinês (CHO), gerando IFN- β 1 na forma glicosilada, que deve ser estruturalmente indistinguível do IFN- β 1 humano na sua seqüência primária e são chamados de Interferon β 1 recombinante humano a (rhIFN- β 1a)^{13, 17, 31}.

O Betaseron[®] foi aprovado pelo Departamento de Controle de Drogas e Alimentos (FDA - EUA) em 1993 para o tratamento de esclerose múltipla do tipo surto-remissão¹⁷. O Avonex[®] foi aprovado pelo FDA em 1996 e também provou ser capaz de reduzir a freqüência e severidade de exacerbações da EM em pessoas afetadas com o tipo surto-remissão, além de reduzir o risco de progressão da doença¹⁷.

3.2 Custos

As formulações de IFN- β 1 não são produzidas no Brasil, o que resulta em um alto custo na importação desses medicamentos. O tratamento com Avonex[®], por exemplo, custa em média R\$ 10.500 por ano para cada pessoa³². O Ministério da Saúde, que compra esse medicamento para suprir o SUS, gastou aproximadamente 69 milhões de reais no ano de 2004 com o biofármaco IFN- β 1³³. O mercado global para este produto em 12 meses (junho 2005 a junho de 2006) foi de 3,7 bilhões de dólares americanos e o mercado estimado para o biossimilar IFN- β 1 para 2010 na União Européia é de 131 milhões de dólares americanos³⁴.

Segundo a Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina existem 15 pacientes portadores de EM por 100.000 habitantes, ou seja, seriam cerca de 25 mil portadores da doença no Brasil e aproximadamente 2,5 milhões no mundo³⁵. O desenvolvimento do IFN- β 1 mostrou ser o maior avanço no tratamento da EM, beneficiando milhares de pacientes no mundo inteiro¹⁰.

4. Interferon β 1 Humano Recombinante

O rhIFN- β 1b é uma proteína de 165 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa. Essa proteína recombinante quando produzida em células de *E. coli* gera uma proteína não-glicosilada, ou seja, não possui os amplos grupos de carboidratos que estão associados à proteína selvagem^{4, 14}, que é uma glicoproteína de 166 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 23 kDa. No entanto, a proteína rhIFN- β 1b apresenta o mesmo efeito biológico da molécula selvagem^{4, 14}. A proteína IFN- β 1 humana madura tem uma metionina no N-terminal, porém, quando a proteína rhIFN- β 1 é produzida em células de *E. coli*, essa metionina é utilizada como um códon de iniciação para direcionar a síntese da proteína, sendo que após o início da tradução ela geralmente é removida¹⁴.

A estrutura cristalográfica do IFN- β 1 humano (huIFN- β 1) se apresenta como um dímero com formação assimétrica (contato das superfícies em lados opostos da molécula) mediada por um sítio de ligação com um íon de zinco entre as duas moléculas (**Figura 5**)^{2, 36}. O íon de zinco não está envolvido com a atividade desta proteína, o que sugere que o dímero visualizado na estrutura seja um artefato cristalográfico que é irrelevante para a função^{36, 37}. Cada molécula dessa estrutura apresenta cinco α -hélices, chamadas de A, B, C, D e E, que são conectadas por alças (**Figura 5**)^{2, 36}. A alça AB, a mais longa, é importante na interação e ligação da molécula com o receptor³⁷. Interações entre resíduos hidrofóbicos, outros resíduos que formam pontes de hidrogênio, e a ponte dissulfeto formada entre a cisteína 31 e a cisteína 141 são fundamentais para a estabilização da molécula^{2, 36}. Segundo Karpusas et al. 1997, a estrutura cristalográfica da proteína rhIFN- β 1 produzida em *E. coli* não foi possível de ser determinada. Embora tentativas tenham sido

exaustivamente executadas não foram obtidos cristais devido a tendência desta proteína a agregação³⁶.

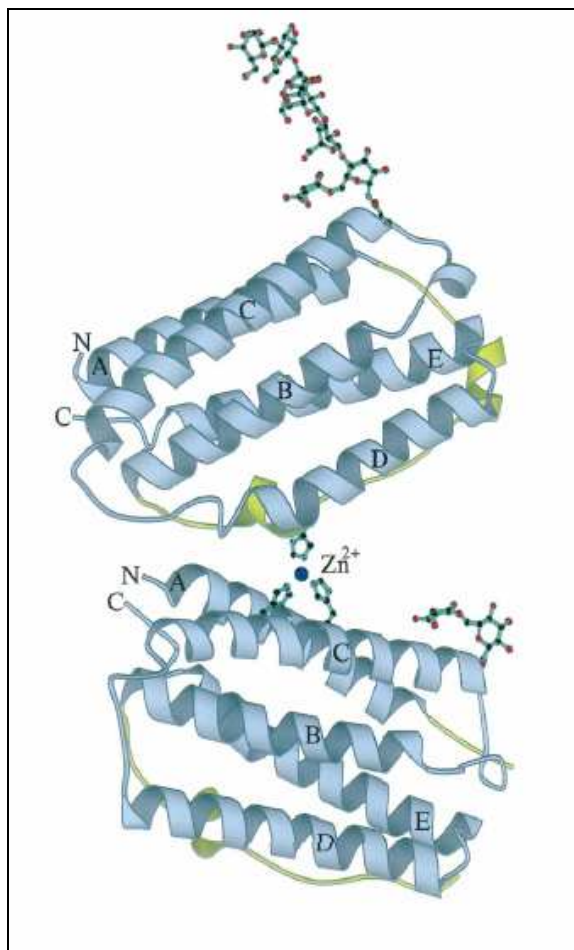


Figura 5: Representação esquemática do dímero cristalográfico do hulFN- β . As α -hélices A, B, C, D, E; as porções N-terminal e C-terminal e os grupos de carboidratos estão indicados. A esfera corresponde ao íon de zinco. A alça AB está com coloração verde. (Figura adaptada de Karpusas et al. The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 11813 – 11818).

O IFN- β 1 possui três resíduos de cisteína, localizados nas posições dos aminoácidos 17, 31 e 141³⁸. Qualquer uma dessas três cisteínas pode estar envolvida na formação da ponte dissulfeto intermolecular, pois podem interagir de forma diferente em cada molécula, resultando em três espécies moleculares na

célula, cada uma com uma das três possíveis pontes dissulfeto intramolecular ^{14, 38}. Entretanto, apenas uma dessas formas apresenta a conformação natural e biologicamente ativa, sendo que as outras espécies resultam na formação de dímeros e oligômeros inativos ^{14, 38}. A cisteína-141 do IFN-β1 está envolvida na ponte dissulfeto com a cisteína-31 ^{14, 39}. Assim, a cisteína-17, que permanece livre, foi escolhida para ser substituída por uma serina ^{14, 38, 39}. Estudos demonstraram que o IFN-β1 contendo uma serina na posição-17 (IFN-β1_{ser17}) preveniu a formação de pontes dissulfeto incorretas resultando em uma molécula de IFN-β1 recombinante humana estável e bioativa ^{14, 38}. Devido à mudança na seqüência, esse IFN-β1 é chamado de rhIFN-β1b ^{14, 31}.

O IFN-β1_{ser17} humano recombinante produzido em *E. coli* tem 14 códons raros na sua seqüência, o que equivale a 8,4% dos códons que codificam os 165 aminoácidos, sendo seu ponto isoelétrico (pI) 9,02.

Um dos maiores desafios na produção do rhIFN-β1 em *E. coli* é a sua baixa solubilidade, que está diretamente relacionada com seu caráter fortemente hidrofóbico ^{14, 39}. A proteína agrega no citoplasma da célula devido às interações hidrofóbicas, formando corpos de inclusão.

Segundo alguns trabalhos sobre a expressão e purificação do IFN-β1, a forma de solubilizar esta proteína é por meio do uso de agentes desnaturantes como detergentes iônicos, por exemplo, o SDS (dodecil sulfato de sódio), detergente não-iônico como Zwittergent 3-14 ou de agentes caotrópicos fortes, como o hidrocloreto de guanidina e uréia com ou sem condições de redução (uso de ditioneitol – DTT) ^{39, 40, 41}.

O uso do SDS na solubilização desta proteína requer altas concentrações deste detergente aniônico durante as etapas de purificação para que a proteína permaneça solúvel ⁴¹. Além disso, o uso deste detergente limita os métodos

analíticos e cromatográficos utilizados, por exemplo, por interferir em cromatografias iônicas ⁴¹. Por outro lado, o Zwittergent 3-14 não interfere em métodos analíticos e cromatográficos, elimina a presença de agregados de alto peso molecular, pode ser removido por diálise e faz com que a proteína permaneça biologicamente ativa ⁴¹. O hidrocloreto de guanidina e a uréia levam à solubilização incompleta desta proteína como mostrado no Anexo I. Entretanto a exposição da proteína a essas condições desnaturantes e ao processo de *refolding* pode impedir que a proteína retorne à sua estrutura biologicamente ativa ⁴².

Outros trabalhos mencionam que é possível obter a proteína solúvel sem a utilização de reagentes desnaturantes e redutores ^{42, 43}. Como através do uso de preparações com etilenoglicol e cloreto de sódio em pH neutro na solubilização da proteína ^{42, 44}. Porém neste estudo a proteína rhIFN- β 1 apresentou apenas solubilidade de 40-50% em etilenoglicol na presença de 0,5 M a 1 M de NaCl ¹⁴. Outro relato mencionou a obtenção da proteína na fração solúvel por meio de cultura de células de *E. coli* à baixa temperatura ⁴³. Essas culturas de células em temperaturas abaixo de 37°C aumentam a solubilidade de proteínas que apresentam propensão à agregação e diminuem a formação de corpos de inclusão ⁴⁵.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um protocolo para produção do rhIFN- β _{1ser17} com alto rendimento, visando o baixo custo e a produção industrial do biosimilar rhIFN- β _{1ser17}. Isso se tornou possível devido à expiração da patente do biofármaco original. O Betaseron[®], produzido pelo Laboratório Bayer Schering / Chiron, perdeu sua proteção por patente (U.S. Patent N° 4.588.585) em 2007.

A produção do biosimilar rhIFN- β _{1ser17}, seria uma alternativa para o alto custo deste biofármaco. A fabricação deste biosimilar no mercado nacional provocaria uma diminuição nas importações desses medicamentos evitando que seus preços variassem conforme a oscilação do mercado internacional. Isso reduziria o preço facilitando o acesso para a população que sofre de esclerose múltipla, além de reduzir substancialmente os gastos do Ministério da Saúde na importação desse biofármaco.

Objetivos específicos

- Construir o gene que codifica a proteína rhIFN- β _{1ser17};
- Clonar o gene no vetor pCR[®]-Blunt (Invitrogen);
- Subclonar no vetor de expressão pET30a(+) (Novagen);
- Expressar a proteína rhIFN- β _{1ser17} em *E. coli*;
- Solubilizar a proteína recombinante;
- Purificar a proteína por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Realizar análises por espectrometria de massas e seqüenciamento N-terminal;
- Realizar análises físico-químicas.

MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Este manuscrito foi submetido para a revista **Microbial Cell Factories**.

Human interferon β _{ser17}: coding DNA synthesis, expression, purification and characterization of recombinant protein

Anne Drumond Villela^{1,2,3}; Gaby Renard³; Mario Sergio Palma⁴; Jocelei Maria Chies³;
Sérgio Luiz Dalmora⁵; Luiz Augusto Basso^{1,2*}; Diógenes Santiago Santos^{1,2*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PUCRS. Av. Ipiranga, 6690 – Partenon – Porto Alegre, ZIP CODE 90610000 / Phone: + 55 51 33203318 – Brazil.

²Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas - PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 – Tecnopuc - Prédio 92A - Partenon - Porto Alegre, ZIP CODE 90619900 / Phone: +55 51 33203629 – Brazil.

³Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA. Av. Ipiranga, 6681 – Tecnopuc - Prédio 92A - Partenon - Porto Alegre, ZIP CODE 90619900 / Phone: +55 51 33526560 – Brazil.

⁴Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Rio Claro, ZIP CODE 13506-900 / Phone: +55 19 35264163 – Brazil.

⁵Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, ZIP CODE 97105-900 / Phone: +55 55 33208952 – Brazil.

*Corresponding authors: Luiz A. Basso; Diógenes S. Santos

E-mails addresses:

ADV: annevillela@hotmail.com

GR: gaby.renard@pucrs.br

MSP: mspalma@rc.unesp.br

JMC: joceleichies@terra.com.br

SLD: sdalmora@ccs.ufsm.br

LAB: luz.basso@pucrs.br

DSS: diogenes@pucrs.br

Abstract

Background

Interferons are proteins expressed by different human cells and synthesized in response to many chemical and biological agents. They are involved in antiviral, antiproliferative and immunomodulatory responses, acting both to maintain homeostasis and in host defense. Interferons can be used to treat a variety of diseases because of their potential therapeutic value. Interferon β 1, for instance, is one of the few substances which can be used to treat multiple sclerosis. It is commercially produced in microorganisms such as *Escherichia coli* by using recombinant DNA techniques and is thus designated as biopharmaceutical. The patents for many originator biopharmaceuticals are expiring, and a new generation of follow-on molecules, termed “biosimilars”, is under development. The development of interferon β 1 biosimilar is an alternative to the high cost of the originator biopharmaceutical. We have developed a protocol to produce large amounts of pure interferon β 1 expressed in *Escherichia coli* which may be used to biosimilar production for pharmaceutical industries.

Results

This work reports the human interferon β 1_{ser17} gene construction, cloning and subcloning, recombinant protein expression in *E. coli* Rosetta(DE3) host cells under isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction, washing of inclusion bodies to remove contaminating proteins. Solubilization of recombinant human interferon β 1 was accomplished by employing a brief shift to high alkaline pH in the presence of non-ionic detergent followed by rapid adjustment to pH 8. The recombinant protein was purified employing three chromatography steps, which yielded approximately 3 mg of homogeneous recombinant protein from 1 g of *E. coli* Rosetta(DE3) host cells. N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry analysis provided

experimental evidences for the identity and purity of the recombinant protein.

Reverse phase liquid chromatography demonstrated the content of deamidates and sulphoxides were similar to a commercial standard, and no heterogeneous forms of recombinant human IFN- β _{1ser17} were detected. Size exclusion chromatography demonstrated the absence of high molecular mass aggregates and dimers.

Conclusion

Since IFN- β 1 aggregates have been shown to have reduced biological activity, the protocol here described represents an efficient and high-yield method to obtain homogeneous monomeric rhIFN- β _{1ser17} protein, which may be amenable to scaling up for industrial processes.

Background

Interferons (IFNs) are proteins expressed by different human cells. They are synthesized and secreted in response to many chemical and biological agents [1, 2]. Binding of IFNs to specific cell surface receptors triggers an intracellular signaling cascade resulting in the synthesis of proteins that mediate antiviral, antiproliferative and immunomodulatory responses. Therefore, they act to both maintain homeostasis and in host defense [1, 3].

Because of their potential therapeutic value, IFNs are now licensed worldwide for the treatment of various viral, malignant and immune disorders [3, 4]. Interferon β 1 (IFN- β 1), for example, is one of the few substances which can be used to treat multiple sclerosis (MS), which is a chronic disease of the central nervous system [3]. This disease is an immune-mediated process in which infiltration of immune cells across the blood-brain barrier causes demyelization and inflammation [5]. There is no cure for MS but immunomodulatory therapies, such as IFN- β 1, are available that ameliorate the symptoms of this disease [5]. IFN- β 1 was shown to reduce frequency of episodes of transient neurological dysfunction (attacks) and severity and to reduce subclinical disease as assessed by magnetic resonance imaging (MRI) measured activity [3, 6]. Lesions detected by MRI reflect inflammation and is employed as a surrogate of clinical effectiveness in MS drug development. MS affects more than 2.5 million people in the world and is the leading cause of nontraumatic disability in young adult population [7]. The development of IFN- β 1 has proven to be a major advance in MS therapeutics, benefiting thousands of patients worldwide [7]. However, improvements in the process of production of IFN- β 1 are needed to reduce costs for life-long, non-curative use for patients.

Based on this clinical application human IFN- β 1 is commercially produced in microorganisms such as *Escherichia coli* (*E. coli*) by using recombinant DNA techniques. The recombinant human IFN- β 1 gene sequence encodes a mature protein of 165 amino acids of approximately 20 kDa. It usually has the following properties: amino terminal methionine is removed during production in *E. coli*, serine is substituted for cysteine 17 and it is non-glycosylated due to its production in *E. coli* [8, 9, 10]. These modifications result in a fully biologically active molecule [9, 10].

The major challenge for the production of recombinant human interferon β 1_{ser17} (rhIFN- β 1_{ser17}) in *E. coli* is its strong hydrophobic character and its consequent deposit as inclusion bodies [10, 11]. It has been reported that IFN- β 1_{ser17} can be solubilized from inclusion bodies using a buffer solution containing sodium dodecyl sulphate (SDS) and the reducing agent dithiothreitol (DTT) [10, 12]. However SDS is required in high concentrations to maintain protein solubility during purification and it is a strong anionic detergent that limited chromatographic and analytic methods [13]. A method for solubilizing rhIFN- β 1_{ser17} from inclusion bodies has been described that employs a nondenaturing detergent and a brief incubation at pH 12 [13]. The detergent used was Zwittergent 3-14 (nonionic and pH-insensitive) which is included in the class of sulfobetaines [14, 15]. Because of its properties, protein solubilized in this manner can be subjected to a variety of purification and analytic methods [13].

This recombinant protein drug produced by biotechnology is named biopharmaceutical [16]. However, the patents for many originator biopharmaceuticals are expiring, and a new generation of follow-on molecules, termed “biosimilars”, is under development [16]. Betaseron[®], produced by Bayer Schering/Chiron laboratories, was approved by the U.S Food and Drug Administration for the treatment of multiple sclerosis in 1993 and its patent expired in 2007, thereby becoming a target to biosimilar production by pharmaceutical industries. The global

market for IFN- β in 12 months (from June 2005 to June 2006) was 3.7 billion U.S. dollars and the predicted IFN- β biosimilar sales for 2010 in European Union market are 131 million U.S. dollars [17]. The development of interferon β 1 biosimilar is an alternative to the high cost of the originator biopharmaceutical in order to significantly decrease costs.

Here we describe the development of a protocol to produce large quantities of pure rhIFN- β 1_{ser17} expressed in *Escherichia coli* which may be used to biosimilar production by pharmaceutical industries. In this paper, we report the rhIFN- β 1_{ser17} gene construction, cloning and subcloning, recombinant protein expression in *E. coli* strain and purification to homogeneity, and physical and chemical analyses.

We hope that the experimental results described here will contribute to improving the production process of rhIFN- β 1_{ser17} and thereby lower costs to healthcare payers and consumers. Our report may be of interest to biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, which offer a great opportunity to scientific, economical and industrial growth.

Results and discussion

Gene synthesis, cloning and expression of rhIFN- β 1_{ser17} protein:

The final PCR product was a single 498 bp DNA fragment (Figure 1), encoding for a mature rhIFN- β 1_{ser17} protein of 165 amino acids in which cysteine 17 has been replaced by a serine to prevent incorrect disulphide bond formation [9]. The DNA fragment with the appropriate size was purified from 2% ultra pure agarose gel containing 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Ethidium Bromide, cloned in the pCR-Blunt[®] cloning vector and subcloned into the pET30a(+) expression vector between the *Nde*I and *Bam*HI restriction sites. Automatic DNA sequencing of the recombinant plasmid sequence

confirmed the identity and integrity of the gene and the absence of PCR introduced mutations. This construction was used to express the recombinant protein in *E. coli* strains.

The rhIFN- β _{ser17} protein was overexpressed in the insoluble fraction of Rosetta(DE3) *E. coli* strain. The presence of the protein was not observed in the soluble fraction of Rosetta(DE3) strain. It should be pointed out that a screening of experimental conditions was carried out to obtain high yield of recombinant protein expression, including growth temperature, medium type, hours of growth after IPTG induction, and hours of growth in the absence of IPTG. However the best results were obtained from Rosetta(DE3) *E. coli* cells for 3 h at 37°C with 0.1 mM of IPTG induction after logarithmic phase. SDS-PAGE analysis showed expression of an insoluble protein with a molecular mass (~20 kDa) consistent with that expected for rhIFN- β _{ser17} protein (Figure 2).

Washing and solubilization of inclusion bodies:

The low solubility of rhIFN- β _{ser17} protein in the absence of solubilization agents is most likely due to its strong hydrophobic character. The protein tends to precipitate out due to protein-protein aggregate formation and is thus deposited as inclusion bodies [13]. Inclusion bodies can be easily isolated by centrifugation and represent, in many cases, a highly enriched form of expressed protein. It is possible to remove contaminating *E. coli* proteins from inclusion bodies using reagents such as detergents or chaotropes, followed by solubilization of rhIFN- β _{ser17} protein [13].

Our strategy used to wash the inclusion bodies was thus carried out in two steps. Urea 6M and 2% sulfobetaine 14 (USB) were used, respectively, in the first and second step to solubilize contaminant *E. coli* proteins. Several *E. coli* contaminant proteins were removed with the washing of the inclusion bodies (Figure

3). Interferon- β 1 protein was then almost completely solubilized by a brief shift to high alkaline pH in the presence of 2.5% sulfobetaine 14 followed by rapid adjustment to pH 8 (Figure 3).

Purification of rhIFN- β 1_{ser17} protein:

The rhIFN- β 1_{ser17} protein was purified to homogeneity by a protocol including gel filtration, followed by cation exchange and elution on gel filtration column. Samples of each chromatography step were analyzed by 12% SDS-PAGE (Figure 3). No contaminants were detected by SDS-PAGE analysis with Coomassie blue staining at the final step of purification (Figure 3). Approximately 3 mg of homogeneous recombinant protein could be obtained from 1 g of *E. coli* Rosetta(DE3) host cells. The purification protocol described here yielded 26% more protein than the method reported by others [12], which included SDS, organic extraction and gel filtration columns. Other advantage of the current protocol is that solubilization of protein was achieved using a non-ionic detergent that can be subjected to a variety of chromatographic and analytic procedures, many of which are not compatible with strong anionic detergents, such as SDS. Other reagents, such as guanidine HCl or urea, lead to incomplete solubilization of rhIFN- β 1_{ser17} protein. Accordingly, the purification protocol here described represents an efficient and high yield method to obtain homogeneous rhIFN- β 1_{ser17} protein.

N-terminal amino acid sequencing:

The first 13 N-terminal amino acid residues of rhIFN- β 1_{ser17} were identified to be SYNLLGFLQRSSN by the Edman degradation method. This result unambiguously identifies the homogeneous recombinant protein as rhIFN- β 1_{ser17} and confirms removal of the N-terminal methionine. Modification at the N-termini is a

common type of co-/post-translational alteration of proteins synthesized in prokaryotic cells. Methionine aminopeptidase catalyzed cleavage of initiator methionine is usually directed by the penultimate amino acid residues with the smallest side chain length (glycine, alanine, serine, threonine, proline, valine, and cysteine) [18]. Removal of N-terminal methionine from rhIFN- β _{1ser17} polypeptide chain conforms to this rule since serine is the penultimate amino acid residue.

Mass spectrometry analysis:

The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) revealed just one peak at the expected mass for rhIFN- β _{1ser17} subunit (19.87 kDa), as shown in Figure 4, which is in agreement with removal of the N-terminal methionine (predicted molecular mass: 20 kDa).

Reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC) analysis:

RP-HPLC has been widely used for the quantification of biological medicines, quality control, and for the analysis of closely related protein variants or degradation products, such as sulfoxide and desamidate forms [19]. Chemical degradations of pharmaceutical proteins have been recognized to be an important cause of inactivation of therapeutic proteins and peptides that may have no or reduced activity [20]. Figure 5 shows the reverse-phase chromatogram of rhIFN- β _{1ser17} demonstrating the resolution of the symmetrical peak that corresponds to rhIFN- β _{1ser17} with the retention time of 28.38 min similar to standard (28.21 min). The deamidates and sulphoxides of the sample were analyzed (Figure 5B) and estimated to be 1.60% and 5.32%, respectively. These values were shown to be similar to the standard (Figure 5A), 1.95% of deamidates and 3.72% of sulphoxides. As described elsewhere, chromatographic peak 2 of the standard (Figure 5A) consists of different

conformational form(s) of rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$ having a primary structure identical to that of peak 1 [11]. Accordingly, the protocol described here is an efficient method to obtain homogeneous monomeric rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$.

Size exclusion liquid chromatography (SEC-HPLC) analysis:

SEC-HPLC was found to be an appropriate technique to detect and separate aggregate species of higher molecular mass, dimers, and intact protein. As described by others, when Betaseron[®] was subjected to SEC-HPLC under physiological conditions, approximately 40 % of rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$ eluted as monomer and 60 % eluted in the excluded volume of the column, corresponding to an apparent molecular mass larger than 600 kDa [1, 21]. IFN- β_1 aggregates have been shown to have reduced biological activity [9]. SEC-HPLC of rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$ demonstrates the absence of high molecular mass aggregates and dimers (Figure 6). The peak represents monomers eluted at a retention time of 20.9 min, as shown in figure 6. This analysis is in agreement with mass spectrometry analysis, in both just one peak was revealed.

Conclusions

In this report, we present the gene synthesis, cloning, expression, purification and characterization of rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$ protein by analytical methods. The protocol developed is an efficient and high-yield method to obtain physical integrity homogeneous rhIFN- $\beta_{1_{\text{ser17}}}$. Laboratory scale production of recombinant human IFN- β_1 represents the first step towards the development of new technologies for the production of an IFN- β_1 biosimilar in large scale. Public and private sectors of a number of countries have been encouraged to share staff, funding and facilities to increase technology transfers between universities and the industry. The data

presented here may be of interest to researchers and biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, which offer a great opportunity to scientific, biotechnological, economical and industrial growth.

Methods

Gene synthesis, cloning and expression of rhIFN- β _{1ser17} protein:

Sixteen oligonucleotides were designed based on the human IFN- β coding DNA sequence of 498 bp (Accession number: NM_002176). The primers were designed to have an overlap of 10 nucleotides. The synthetic recombinant human IFN- β gene sequence was constructed based on the technique of overlap extension, accordingly the patent application PCT/Br 2006/000267, filed by our lab and entitled “Method for the obtention of chimeric nucleotide sequence and chimeric nucleotide sequences” [22]. Primers 1 and 16 were designed to contain, respectively, *NdeI* and *BamHI* restriction sites (underlined). The serine was substituted for cysteine 17 (primer 3) to prevent incorrect disulphide bond formation. The oligonucleotides sequences are given below:

1. 5'-TTC ATA TGA GCT ACA ACT TGC TTG GAT TC-3'
2. 5'-ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT-3'
3. 5'-TCC CAT TCA ATT GCC ACA GGA GCT TCT **GAC** TCT GAA AAT TGC TG-3'
4. 5'-TTG AAT GGG AGG CTT GAA TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT-3'
5. 5'-AAC TGC TGC AGC TGC TTA ATC TCC TCA GGG ATG TCA AAG TTC ATC-3'
6. 5'-TGC AGC AGT TCC AGA AGG AGG ACG CCG CAT TGA CCA TCT ATG-3'
7. 5'-TCT GAA AAT AGC AAA GAT GTT CTG GAG CAT CTC ATA GAT GGT-3'
8. 5'-TAT TTT CAG ACA AGA TTC ATC TAG CAC TGG CTG GAA TGA GAC TAT-3'
9. 5'-TCT GAT GAT AGA CAT TAG CCA GGA GGT TCT CAA CAA TAG TCT CAT-3'
10. 5'-TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA AAA CTG-3'
11. 5'-TGC TCA TGA GTT TTC CCC TGG TAA AAT CTT CTT TCT CCA GTT TTT CT-3'
12. 5'-CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CA-3'

13. 5'-GCA CAG TGA CTG TAC TCC TTG GCC TTC AGG TAA TGC AGA ATC C-3'
14. 5'-GTC ACT GTG CCT GGA CCA TAG TCA GAG TGG AAA TCC TAA GGA ACT TT-3'
15. 5'-TCA GTT TCG GAG GTA ACC TGT AAG TCT GTT AAT GAA GTA AAA GTT CCT T-3'
16. 5'-GGG GAT CCT CAG TTT CGG AGG TAA CCT GTA AG-3'

Standard PCR conditions were used to construct the gene sequence. The final PCR product (498 bp) was purified from agarose gel, cloned into the pCR[®]-Blunt vector (Invitrogen) and subcloned into the pET30a(+) expression vector (Novagen), using the *Nde*I and *Bam*HI restriction enzymes. The recombinant plasmid sequence was analyzed by automatic sequencing. Electrocompetent *E. coli* Rosetta(DE3) cells were transformed with pET30a(+):IFN- β _{1ser17} by electroporation. The same strain was transformed with the pET30a(+) vector as control. A single colony of transformants was grown in 500 mL 4YT culture medium (32g tryptone, 10g NaCl, 20g yeast extract per liter), supplemented with kanamycin (30 μ g mL⁻¹) and chloramphenicol (34 μ g mL⁻¹). The culture was grown at 37°C in a shaker at 180 rpm up to an OD₆₀₀ 0.4, followed by induction with 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Three hours after induction, cells were harvested by centrifugation at 15,900 x g for 30 minutes at 4°C and the pellet was frozen at -20°C. The recombinant protein expression was analyzed by 12% SDS-PAGE [23].

Washing of inclusion bodies and solubilization of rhIFN- β _{1ser17} protein:

The cell pellet (1g of wet cells) was resuspended in 5 mL of buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0) and disrupted using a French press under 137.9 MPa and insoluble material were collected by centrifugation (48,000 x g, 30 minutes, 4°C). The inclusion bodies containing interferon β 1 protein were washed using 6 M urea and 2% sulfobetaine 14 (USB) as previously described [13]. Solubilization of inclusion bodies was brought about by a brief shift to high alkaline pH in the presence of 2.5% of sulfobetaine 14 followed by rapid adjustment to pH 8, as described elsewhere [13],

and centrifuged (48,000 x *g*, 30 minutes, 4°C) to remove non-soluble material. The soluble fraction was concentrated using a 3,000 molecular weight cut off Amicon filter to 7 mL and filtered (0.22 µm).

Purification of rhIFN-β_{1ser17} protein:

An HPLC ÄKTA system (GE Healthcare) was employed in the recombinant protein purification protocol and all chromatographic steps were carried out at constant room temperature (22°C±2°C), and monitoring was carried out by measuring the UV absorbance at 215, 254, and 280 nm simultaneously. Eluted protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, and protein concentrations were determined by the Bradford's method [24] using bovine serum albumin as standard. The soluble sample was loaded on a gel filtration Sephacryl S200 column (size exclusion chromatography, SEC) equilibrated with SEC running buffer (50 mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl and 0.05% sulfobetaine 14), and eluted with 1.5 volumes of SEC running buffer. Pooled fractions were dialyzed against 50 mM Hepes pH 8, 0.05% sulfobetaine 14 and loaded on a cation exchange HiTrap CM FF column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Hepes pH 8 containing 0.05% sulfobetaine 14. Washing (10 x column volume) was carried out to elute unbound material, and bound proteins were eluted with a linear salt gradient (0 – 1 M NaCl). Fractions containing the recombinant IFN-β₁ protein were pooled and loaded on a Sephacryl S200 column and eluted with SEC running buffer. Fractions were then pooled and stored at -80°C.

N-terminal amino acid sequencing:

The N-terminal amino acid residues of homogeneous rhIFN-β_{1ser17} were

identified by automated Edman degradation sequencing using a PPSQ 21A gas-phase sequencer (Shimadzu).

Mass spectrometry analysis:

The subunit molecular mass was assessed by electron-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS), employing some adaptations made to the system described by Chassigne and Lobinski [25]. Samples were analyzed on a triple quadrupole mass spectrometer (model QUATTRO II) equipped with a standard ESI probe (Micromass, Altrincham, United Kingdom) and adjusted to a flow rate of ca. 250 $\mu\text{l min}^{-1}$. The source temperature (80°C) and needle voltage (3.6 kV) were maintained constant throughout experimental data collection, applying a drying gas (nitrogen) flow of 200 liters h^{-1} and a nebulizer gas flow of 20 liters h^{-1} . The mass spectrometer was calibrated with intact horse heart myoglobin and its typical cone voltage-induced fragments. The ESI-MS molecular mass of the rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$ subunit was determined by adjusting the mass spectrometer to give a peak with a half-height of 1 mass unit, and the cone sample to skimmer lens voltage controlling the transfer of ions to the mass analyzer was set to 38 V. About 50 pmol sample was injected into electrospray transport solvent. The ESI spectrum was obtained in the multichannel acquisition mode, with scanning from 500 to 1,800 m/z at a scan time of 7 s. The mass spectrometer is equipped with MassLynx and Transform software for data acquisition and spectrum handling.

Reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC) analysis:

A Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10A_{vp} system controller, LC-10AD_{vp} pump, DGU-14A degasser, SIL-10AD_{vp}

autosampler, and an SPD-M10A_{vp} photodiode array (PDA) detector was employed in RP-HPLC analysis. The detector was set at 214 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] software program. The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C4 column (250 mm x 4.6 mm I.D., with a pore size of 300 Å). The liquid chromatography system was operated at controlled room temperature (25 °C). The elution was performed by a fast gradient at a constant flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Mobile phase A consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and mobile phase B consisted of 0.1% TFA in acetonitrile. The gradient was as follows: 0.01 min 38% of B, from 0.01-35 min linear to 60% of B, from 35.1-38 min linear back to 38% and 38.1-42min 38% of B. The injection volume was 50 µL for both standard and sample, and all determinations were carried out in triplicate. The IFN-β1 standard used was Betaferon[®] (Bayer Schering / Chiron).

Size exclusion chromatography (SEC-HPLC) analysis:

A Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10A_{vp} system controller, LC-10AD_{vp} pump, DGU-14A degasser, SIL-10AD_{vp} autosampler, and an SPD-M10A_{vp} photodiode array (PDA) detector was employed in SEC-HPLC analysis. The detector was set at 214 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] software program. The experiments were carried out on a size exclusion Phenomenex (Torrance, USA) Bio-Sep-SEC-S 2000 column (300 mm x 7.8 mm I.D., with a particle size of 5 µm and pore size of 145 Å). The liquid chromatography system was operated isocratically at 0.5 mL min⁻¹ with controlled ambient temperature (25°C), using a mobile phase of PBS pH 7.4, which was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore,

Berdford, MA, USA). The injection volume was 50 μ L and all determinations were carried out in triplicate.

List of Abbreviations:

DTT: dithiothreitol

E. coli: *Escherichia coli*

ESI-MS: electrospray ionization mass spectrometry

IFNs: interferons

IFN- β 1: interferon β 1

IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

kDa: kilodalton

MS: multiple sclerosis

PCR: polymerase chain reaction

rhIFN- β _{1ser17}: recombinant human interferon β 1 containing a serine in the amino acid position 17.

RP-HPLC: reverse-phase liquid chromatography

SDS: sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SEC: size exclusion chromatography

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ADV performed most of the experiments and drafted the manuscript. GR

supervised cloning, expression and purification experiments and helped draft the manuscript. MSP carried out N-terminal protein sequencing and mass spectrometry analysis. JMC participated in the analysis and interpretation of protein chemistry results. SLD supervised physicochemical analysis and helped draft the manuscript. The study was conceived and coordinated by DSS and LAB, who have also revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by FARMASA (Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.) to Quatro G P & D. Financial support was also provided by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health-Department of Science and Technology (DECIT) and PRONEX/CNPq/FAPERGS (Brazil) to DSS and LAB. DSS (CNPq, 304051/1975-06), LAB (CNPq, 5201182/99-5) and MSP (CNPq, 500079/90-0) are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

References

1. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P: **The structure of human interferon- β : implications for activity.** *Cell Mol Life Sci* 1998, **54**:1203-16.
2. van Holten J, Plater-Zyberk C, Tak PP: **Interferon β for treatment of rheumatoid arthritis?** *Arthritis Research* 2002, **4**:346-52.
3. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR: **Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine.** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:975-990.
4. Walsh G: *Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology.* Ireland: Wiley; 2004.
5. Javed A, Reder AT: **Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis.** *Pharmacol Ther* 2006, **110**:35-56.
6. Arnason BG: **Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon[®]) in multiple sclerosis.** *J Neurol* 2005, **252**:28–33.
7. Bermel RA, Rudick RA: **Interferon- β treatment for multiple sclerosis.** *Neurotherapeutics* 2007, **4**:633-646.
8. Mark DF, Lin LS, Lu SDY: **Human recombinant cysteine depleted interferon- β muteins.** 1986. Patent US 4,588,585.
9. Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS: **Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, **81**:5662-5666.
10. Lin L: **Betaseron.** *Dev Biol Stand* 1998, **96**:97–104.
11. Lin LS, Kunitani MG, Hora MS: **Interferon β -1b (Betaseron[®]): A model for hydrophobic Therapeutic Proteins.** *In Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs Case Histories. Volume 9.* Edited by Pearlman R and Wang YJ. New York and London: Plenum Press; 1996:275–299.

12. Lin LS, Yamamoto R, Drummond RJ: **Purification of recombinant Human Interferon β expressed in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 1986, **119**:183–192.**
13. Russell-Harde D, Knauf M, Croze E: **The use of zwittergent 3-14 in the purification of recombinant human interferon-beta Ser17 (Betaseron). *J Interferon Cytokine Res* 1995, **15**:31–37.**
14. Gonenne A, Ernst R: **Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. *Analytical Biochemistry* 1978, **87**:28-38.**
15. Hjelmeland LM, Chrambach A: **Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol* 1984, **104**:305-18.**
16. Covic A, Kuhlmann MK: **Biosimilars: recent developments. *Int Urol Nephrol* 2007, **39**:261-266.**
17. Pisani J, Bonduelle Y: **Opportunities and barriers in the biosimilar market: evolution or revolution for generics companies?**
[<http://www.ableindia.org/biosimilars.pdf>].
18. Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S: **Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the sidechain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:8247-51.**
19. Barth T, Sangoi MS, Silva LM, Ferretto RM, Dalmora SL. **Assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations by a Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method and Bioassay. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2007, **30**:1-12.**
20. Dalmora SL, Masiero SMK, Oliveira PR, Sangoi MS, Junior LB. **Validation of an RP-LC Method and Assessment of rhG-CSF in Pharmaceutical**

Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay. *J Liq*

Chromatogr Relat Technol 2006, **29**:1753-1767.

21. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al.

Structural and functional differences between glycosylated and nonglycosylated forms of human interferon- β (IFN- β). *Pharm Res* 1998, **15**:641–649.

22. Santos DS, Chies JM, Basso LA, Renard G, Fonseca IO: **Method for the obtention of chimeric nucleotide sequences and chimeric nucleotide sequences.** 2006. Patent application WO2007/068068 A2.

23. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-5.

24. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-54.

25. Chassaigne H, Lobinski R: **Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS.** *Analyst* 1998, **123**:2125-30.

Figures

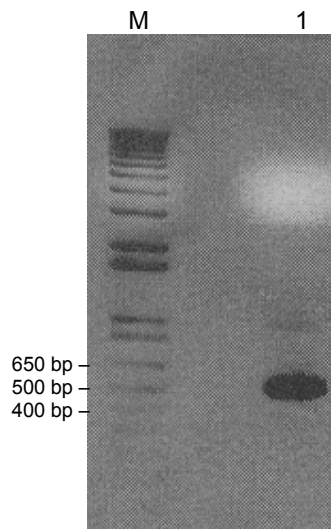


Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR product. Agarose gel (2%) electrophoresis showing the Interferon β 1 DNA fragment amplified by PCR. M - Molecular weight marker 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1- PCR amplified DNA fragment of IFN- β 1 (498 bp).

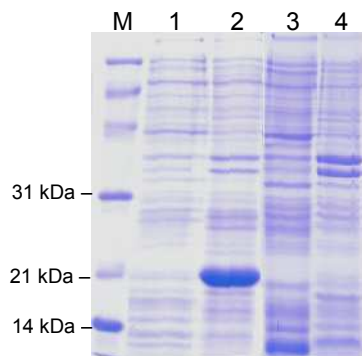


Figure 2: Analysis of recombinant interferon β 1 protein expression by SDS-PAGE. SDS-PAGE (12%) analysis showing the optimized experimental protocol for expression of interferon β 1 in Rosetta(DE3) strain 3 hours post-induction with IPTG. M- Molecular weight marker Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). Lanes 1 and 2 correspond to pET30a(+):IFN- β 1 soluble and insoluble fractions, respectively.

Lanes 3 and 4 correspond to control pET30a(+) soluble and insoluble fractions, respectively.

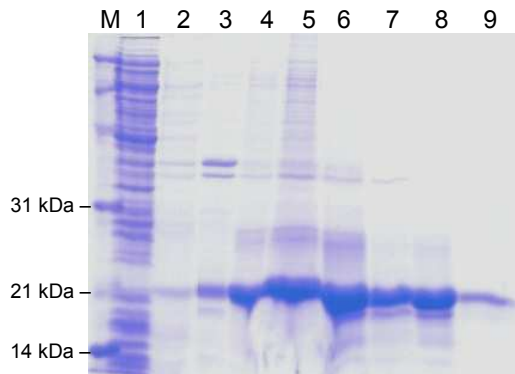


Figure 3: SDS-PAGE analysis of interferon β 1 purification protocol. SDS-PAGE (12 %) analysis of fractions after inclusion bodies washing, solubilization and purification of interferon β 1 protein. M- Molecular weight marker low range (Biorad). Lane 1 corresponds to soluble fraction after cell disruption. Lane 2 corresponds to soluble fraction after washing of inclusion bodies with 6M urea. Lane 3 corresponds to soluble fraction after wash of inclusion bodies with 2% sulfobetaine 14. Lane 4 corresponds to soluble fraction after solubilization with 2.5% sulfobetaine 14 and a brief incubation at pH 12. Lane 5 corresponds to soluble sample loaded on Sephacryl S200 (first column). Lane 6 corresponds to pooled fractions from Sephacryl S200 column. Lane 7 corresponds to sample loaded on HiTrap CM FF column. Lane 8 corresponds to sample loaded on Sephacryl S200 (third column). Lane 9 corresponds to pooled fractions after the third column (purified protein).

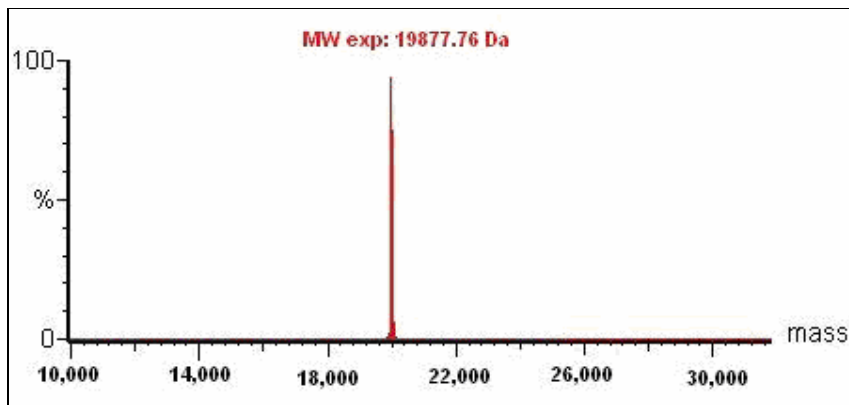


Figure 4: ESI-MS spectrum of rhIFN- β _{1ser17}. ESI-MS revealed just one peak at the expected subunit molecular mass for rhIFN- β _{1ser17} (19.87 kDa).

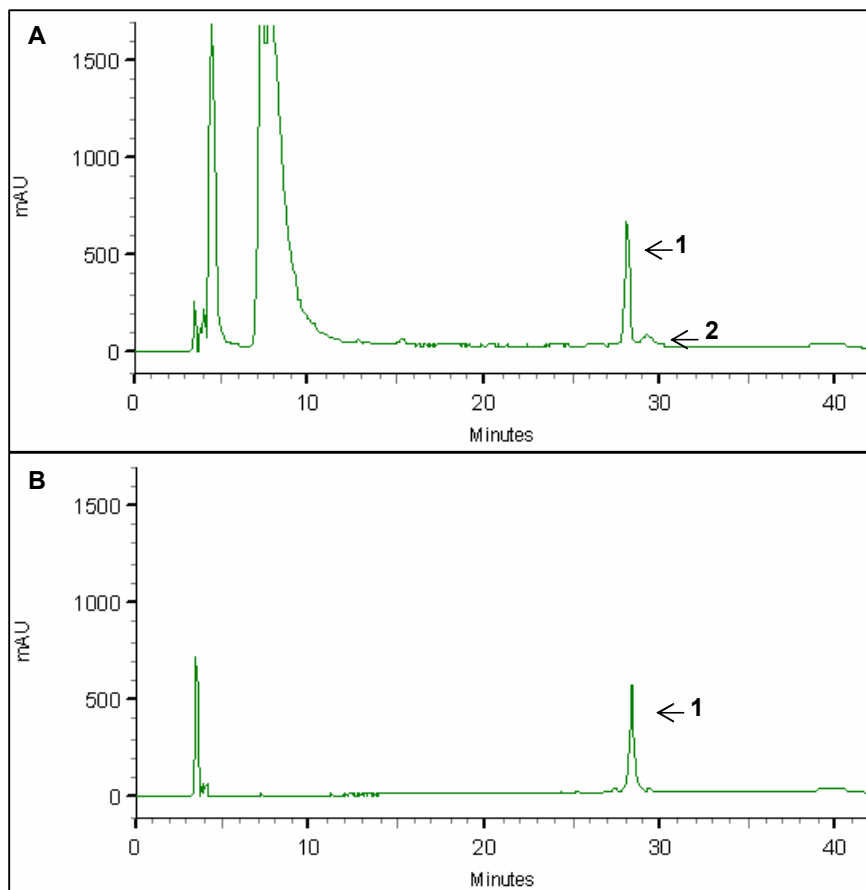


Figure 5: RP-HPLC chromatogram of standard and rhIFN- β _{1ser17}. (A)

standard Betaferon[®], peak 1: main peak, peak 2: consists of a different conformational form(s) of rhIFN- β _{1ser17} having a primary structure identical to that of peak 1. (B) homogeneous rhIFN- β _{1ser17}, peak 1: main peak. Absorbance is in

milliabsorbance units (mAU).

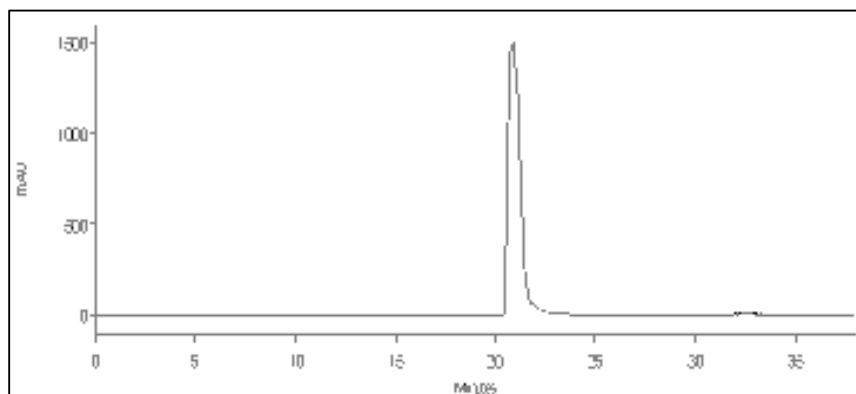


Figure 6: SEC-HPLC chromatogram of rhIFN- β _{1ser17}. SEC-HPLC

demonstrates the absence of high molecular mass aggregates and dimers. Just one peak was revealed and it represents monomers eluted at a retention time of 20.9 min. Absorbance is in milliabsorbance units (mAU).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biofármaco Interferon $\beta 1$ é um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento da esclerose múltipla do tipo surto-remissão, pois altera significativamente a progressão desta doença crônica do sistema nervoso. A EM afeta mais de dois milhões de pessoas no mundo e é considerada a maior causa de invalidez na população adulta jovem ³.

No entanto, este biofármaco não é produzido no Brasil, o que resulta em um alto custo na importação deste medicamento. O tratamento com Avonex[®], formulação de IFN- $\beta 1$ disponível comercialmente, custa em média R\$ 10.500 por ano para cada pessoa ³². O Ministério da Saúde gastou aproximadamente 69 milhões de reais no ano de 2004 com este medicamento para suprir o SUS ³³.

Uma alternativa para contornar o alto custo deste biofármaco seria a produção do biossimilar rhIFN- $\beta 1_{\text{ser17}}$, que oportunizaria uma diminuição nas importações desses medicamentos, reduziria o preço facilitando o acesso para a população que sofre de esclerose múltipla, além de reduzir substancialmente os gastos do Ministério da Saúde na importação desse biofármaco. A produção do biossimilar tornou-se possível devido à expiração da patente do biofármaco original, no caso do rhIFN- $\beta 1_{\text{ser17}}$, a patente do Betaseron[®] (U.S. Patent Nº 4.588.585) ⁴⁶, produzido pelo Laboratório Bayer Schering / Chiron, expirou em 2007.

Assim, visando o desenvolvimento de um protocolo para produção deste biossimilar foi realizada a construção do gene que codifica a proteína IFN- $\beta 1$ contendo uma serina na posição 17, através de método baseado na patente desenvolvida pela empresa Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA em parceria com a PUCRS ⁴⁷. Como produto final das reações de PCR obteve-se um fragmento de DNA de 498 pb. Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pCR-

Blunt[®] e subclonado no vetor de expressão pET30a(+). A identidade e integridade do gene e a ausência de mutações foram confirmadas por seqüenciamento automático de DNA da seqüência do plasmídeo recombinante. Essa construção foi utilizada para expressar a proteína recombinante em cepas de *E. coli*.

Várias condições de cultivo foram testadas na tentativa de obter a proteína IFN- β 1 expressa na fração solúvel, como descrito no Anexo II. Esses testes foram realizados para evitar protocolos de desnaturação e renaturação que não garantem que a proteína permaneça biologicamente ativa. Porém, mesmo assim a proteína rhIFN- β 1_{ser17}, foi expressa somente na fração insolúvel.

Devido ao seu caráter fortemente hidrofóbico, a proteína rhIFN- β 1_{ser17} expressa em *E. coli*, agrega no citoplasma da célula formando corpos de inclusão^{14, 39}. Os corpos de inclusão podem ser facilmente isolados por centrifugação e representam, em muitos casos, uma fração altamente concentrada da proteína expressa. Outro ponto positivo da expressão de proteínas na fração insolúvel é a possibilidade de remover proteínas contaminantes de *E. coli* por meio da lavagem dos corpos de inclusão. Com esta finalidade, utilizamos um tampão contendo 6 M uréia e posteriormente 2% sulfobetaine 14 para lavar os corpos de inclusão. Nesta etapa várias proteínas contaminantes são eliminadas e a proteína rhIFN- β 1_{ser17} permanece insolúvel. Logo, a proteína rhIFN- β 1_{ser17} é quase completamente solubilizada através de uma mudança rápida para pH alcalino na presença de 2,5% de sulfobetaine 14 seguida de um rápido ajuste para pH 8. Este detergente não-iônico não interfere em métodos analíticos e cromatográficos.

As proteínas contaminantes restantes foram eliminadas utilizando sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare). Várias colunas cromatográficas foram utilizadas para avaliar qual seria o melhor protocolo quanto ao rendimento e otimização do processo, como descrito

no Anexo III. O protocolo, definido após a otimização do processo, incluiu 3 colunas cromatográficas: gel filtração, seguida por uma troca catiônica e a eluição da proteína pura novamente na gel filtração. Seguindo este protocolo de purificação, aproximadamente 3 mg da proteína recombinante homogênea podem ser obtidas a partir de 1 g de células de *E. coli* Rosetta(DE3). O protocolo de purificação descrito representa um método eficiente e com alto rendimento, no qual a proteína rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$ é obtida com pelo menos 98% de pureza. Os valores das massas moleculares, experimental (19,87 kDa) e teórico (20,00 kDa), quando comparados entre si revelaram uma diferença de 131 unidades, sugerindo a ausência de um resíduo de metionina, o que foi confirmado pelo seqüenciamento N-terminal por Química Degredativa de Edman. A análise por cromatografia líquida de fase reversa demonstrou que o conteúdo de deamidados e sulfóxidos foi similar ao padrão comercial, e nenhuma forma heterogênea da proteína rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$ foi detectada. A análise por cromatografia líquida de exclusão molecular demonstrou a ausência de agregados de alta massa molecular e de dímeros. O protocolo descrito representa um método eficiente e de alto rendimento para a obtenção da proteína rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$ homogênea e monomérica, o qual poderá ser utilizado em processos industriais.

Devemos ressaltar que o desenvolvimento de um protocolo para produção da proteína rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$ em escala laboratorial é o primeiro passo para o escalonamento destas novas tecnologias para a produção do biossimilar rhIFN- $\beta_{1\text{ser}17}$. Os setores públicos e privados de vários países têm incentivado, com financiamentos e facilidades, o aumento da transferência de tecnologia entre universidades e indústrias. Os dados apresentados aqui poderão ser importantes para pesquisadores e indústrias farmacêuticas interessadas no desenvolvimento de biossimilares, os quais oferecem uma oportunidade excelente para o crescimento científico, biotecnológico, econômico e industrial.

ANEXO I

Testes de expressão da proteína IFN- β 1 clonada no vetor pET23a(+)

A expressão da proteína IFN- β 1 recombinante humana, contendo uma cisteína na posição 17 e clonada no vetor de expressão pET23a(+), foi comparada em diferentes cepas de *E. coli*, como BL21(DE3), BL21Star(DE3), BL21 Codon Plus(DE3), BL21trxB(DE3), Rosetta(DE3), Rosetta-gami(DE3) e Origami(DE3) (Tabela 1). As diferentes cepas de *E. coli* foram transformadas, por eletroporação, com o plasmídeo recombinante pET23a(+) contendo o gene que codifica para a região madura da proteína IFN- β 1. O mesmo procedimento foi realizado com o vetor pET23a(+), sem o gene de interesse clonado, para controle negativo de expressão. As células transformadas foram selecionadas em meio LB sólido contendo os antibióticos apropriados para cada cepa de *E. coli* (Tabela II). Uma colônia foi utilizada para inocular 50 mL de meio de cultura contendo os mesmos antibióticos e concentrações usadas no meio LB sólido e foram crescidas em agitador a 37°C sob agitação de 180 rpm até alcançarem uma OD₆₀₀ de 0,4. Então, as culturas foram induzidas, ou não, pela adição de diferentes concentrações (0,1, 0,4 e 1 mM) de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubadas em diferentes temperaturas (12, 15, 20, 30 e 37°C). Após 3, 12, 18 e 24 horas de incubação, 1 mL de cada cultura foi coletado. As amostras foram centrifugadas a 20.800 x g, por 5 minutos a 4 °C e estocadas a -20°C para posterior análise.

Tabela I. Cepas de *E. coli* usadas nos experimentos de expressão.

Cepa	Resistência a antibióticos	Derivação	Características
BL21(DE3)	nenhuma	B834	Deficiência de protease <i>lon</i> e <i>ompT</i> , que reduz a degradação das proteínas recombinantes expressas
BL21Star (DE3)	nenhuma	BL21 (DE3)	Deficiência de protease <i>lon</i> e <i>ompT</i> ; mutação <i>rne131</i> que codifica uma enzima RNase truncada, aumentando a estabilidade do RNAm e a capacidade de expressão da cepa
BL21 Codon plus(DE3)	Cloranfenicol	BL21-Gold (Cepa B)	Deficiência de protease <i>lon</i> e <i>ompT</i> ; tem cópias extras de tRNAs raros, facilitando a expressão de genes que codificam códons raros de <i>E. coli</i>
BL21 <trxb (de3)<="" td=""> <td>Kanamicina</td> <td>BL21</td> <td>Deficiência de protease <i>lon</i> e <i>ompT</i>; mutante BL21 <i>trxB</i> que facilita formação de pontes dissulfeto citoplasmáticas</td> </trxb>	Kanamicina	BL21	Deficiência de protease <i>lon</i> e <i>ompT</i> ; mutante BL21 <i>trxB</i> que facilita formação de pontes dissulfeto citoplasmáticas
Rosetta(DE3)	Cloranfenicol	Tuner™ (Cepa B)	Expressão de tRNAs raros, facilitando a expressão de genes que codificam códons raros de <i>E. coli</i> ; deleção mutante BL21 lacZY que permite controle preciso com IPTG
Rosetta-gami (DE3)	Kanamicina + Tetraciclina + Cloranfenicol	Origami (K-12)	Expressão de tRNAs raros, facilitando a expressão de genes que codificam códons raros de <i>E. coli</i> ; facilita formação de pontes dissulfeto
Origami (DE3)	Kanamicina + Tetraciclina	K-12	Mutante <i>trxB/gor</i> que facilita muito a formação de pontes dissulfeto

Tabela II. As cepas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET23a(+) usadas na expressão da proteína IFN- β 1 e os antibióticos apropriados para cada cepa com suas concentrações de uso.

Cepas de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pET23a(+)*	Concentração de uso dos antibióticos
BL21(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina
BL21Star(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina
BL21 Codon plus(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol
BL21trxB(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina e 15 μ g/mL de Kanamicina
Rosetta(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol
Rosetta-gami(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina, 34 μ g/mL de Cloranfenicol, 15 μ g/mL de Kanamicina e 12,5 μ g/mL de Tetraciclina
Origami(DE3)	50 μ g/mL de Ampicilina, 15 μ g/mL de Kanamicina e 12,5 μ g/mL de Tetraciclina

*O plasmídeo pET23a(+) contém um gene para resistência a Ampicilina.

A expressão da proteína foi avaliada por meio do rompimento das células por sonicação em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (5 mL de tampão para cada 1 g de célula). As células rompidas foram então centrifugadas a 20.800 x *g* durante 30 minutos, a 4 °C e o conteúdo protéico das frações solúvel e insolúvel foi analisado em SDS-PAGE 12%.

A proteína foi expressa na fração insolúvel das cepas BL21Star(DE3), Rosetta(DE3) e Rosetta-gami(DE3) em meio LB, a 37°C, com indução de 0,1 mM de IPTG, sendo na cepa Rosetta-gami(DE3) a sua maior expressão (dados não mostrados). Foram realizados outros testes de expressão com a cepa Rosetta-gami(DE3) em meio LB e 4YT com outras temperaturas de cultivo, como 12, 15, 20, 30 e 37°C, conforme descrito acima. Entretanto, com a diminuição da temperatura

de cultivo, não há expressão na fração solúvel e a expressão da proteína na fração insolúvel diminui (dados não mostrados).

Testes de solubilização da proteína IFN- β 1 clonada no vetor pET23a(+)

Vários protocolos de expressão foram testados, como descrito anteriormente, na tentativa de obter a expressão da proteína IFN- β 1 na fração solúvel. Como a proteína recombinante foi expressa apenas na fração insolúvel, diferentes formas de rompimento celular foram primeiramente testadas, para evitar protocolos de desnaturação e renaturação que podem afetar a atividade biológica da proteína.

- **Método congelamento-descongelamento**

Os sedimentos bacterianos foram submetidos a 10 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. Estes ciclos consistem na incubação por 8 minutos em banho de gelo e água, e 2 minutos em banho de gelo seco e etanol. Com esse tratamento, o sedimento bacteriano é exposto a temperaturas entre 0°C e -80°C, formando poros na parede bacteriana, que causam o extravasamento do conteúdo celular. Após esse procedimento, a suspensão celular foi submetida à centrifugação 20.800 x g durante 30 minutos, a 4 °C. As frações solúveis e insolúveis foram separadas e analisadas quanto ao seu conteúdo protéico por SDS-PAGE.

A análise por SDS-PAGE mostrou que a proteína permaneceu na fração insolúvel (dados não mostrados).

- **Prensa de French**

Com base nas especificações do fabricante do aparelho, o rompimento dos corpos de inclusão poderia ocorrer entre 20.000 psi e 27.000 psi. Então, após

crescimento celular, 1g de células foi ressuspensa em 5 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8. O rompimento das células deu-se sob uma pressão de 25.000 psi. As frações foram separadas por centrifugação a 23.000 x *g* a 4°C por 30 minutos e então analisadas por SDS-PAGE (dados não mostrados). A proteína foi observada apenas na fração insolúvel.

- **Agentes caotrópicos**

Como diferentes formas de rompimento celular não foram eficientes para obtermos a proteína na forma solúvel, partimos para testes com agentes caotrópicos, como uréia e hidrocloreto de guanidina. Após crescimento celular, nas condições previamente determinadas, as células foram ressuspensas em tampão Tris HCl 50 mM pH 8 e rompidas por sonicação. A amostra foi dividida em 7 tubos de polipropileno (1,5 mL). As frações insolúveis foram separadas das frações solúveis por centrifugação a 23.000 x *g* a 4°C por 30 minutos. Cada fração insolúvel contida no tubo de polipropileno foi ressuspensa com 500 µL dos seguintes agentes desnaturantes: 2, 4, 6 e 8 M de uréia e 2, 4 e 6 M de hidrocloreto de guanidina. As amostras foram submetidas à agitação por 1 hora a temperatura ambiente e então foram centrifugadas 20.800 x *g* durante 30 minutos, a 4 °C. As frações solúveis foram dialisadas utilizando sacos de diálise com *cut off* de 3,5 kDa contra tampão Tris HCl 50 mM pH 8. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação e analisadas por SDS-PAGE.

A proteína não foi solubilizada com uréia 2, 4, 6, ou 8 M. Entretanto ocorreu a solubilização parcial da proteína com 2 e 4 M de hidrocloreto de guanidina, e com 6 M deste agente solubilizante grande parte da proteína foi solubilizada. Porém após a diálise, apenas uma pequena quantidade da proteína ainda permaneceu solúvel (dados não mostrados). Diferentes tampões, pHs e condições de redução foram

testados com 6 M de hidrocloreto de guanidina, para evitar que a proteína precipitasse após a diálise, mas os mesmos resultados descritos acima foram obtidos (dados não mostrados).

ANEXO II

Testes de expressão da proteína IFN- β _{1ser17} clonada no vetor pET30a(+)

O fragmento de DNA, que codifica para a proteína IFN- β 1 contendo uma serina na posição 17, foi clonado no vetor de clonagem pCR-Blunt[®] e subclonado no vetor de expressão pET30a(+). Ao invés de utilizar o vetor de expressão pET23a(+) utilizado anteriormente (Anexo I) que apresenta um gene de resistência a ampicilina, utilizamos como vetor de expressão o pET30a(+), que apresenta um gene de resistência a kanamicina. Essa mudança foi realizada visando primeiramente à produção industrial desta proteína no futuro já que na Europa a utilização de vetores com esta marca de resistência é plenamente aceita, tendo inclusive um biossimilar já comercializado. Além disso, podemos antever que quando o Brasil tiver sua própria legislação de biofármacos no futuro isso certamente será considerado.

A expressão da proteína IFN- β _{1ser17} recombinante humana, contendo uma serina na posição 17 e clonada no vetor de expressão pET30a(+), foi comparada em diferentes cepas de *E. coli*, como BL21(DE3), BL21Star(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C41pLysS(DE3), C43pLysS(DE3), Rosetta(DE3) e Rosetta-gami2(DE3) (Tabela III). Este teste de expressão foi realizado como descrito no anexo I.

A proteína foi expressa na fração insolúvel das cepas BL21Star(DE3) e Rosetta(DE3) em meio LB, a 37°C, com indução de 0,1 mM de IPTG, sendo na cepa Rosetta(DE3) a sua maior expressão. Foram realizados outros testes de expressão com a cepa Rosetta(DE3) utilizando o meio LB a 15°C. Entretanto, com a diminuição da temperatura de cultivo, não houve expressão da proteína (dados não mostrados). Ainda foram realizados testes com o meio de cultura 4YT a 37°C e foi observado que a expressão da proteína aumenta com o meio de cultura 4YT. Assim, a melhor

condição de expressão foi na fração insolúvel da cepa Rosetta(DE3) em meio de cultura 4YT por 3 horas a 37°C com indução de 0.1 mM de IPTG após a fase logarítmica.

Tabela III. As cepas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET30a(+) usadas na expressão da proteína IFN- β 1 e os antibióticos apropriados para cada cepa com suas concentrações de uso.

Cepas de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pET30a(+)*	Concentração de uso dos antibióticos
BL21(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina
BL21Star(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina
C41(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina
C43(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina
C41pLysS(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol
C43pLysS(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol
Rosetta(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina e 34 μ g/mL de Cloranfenicol
Rosetta-gami2(DE3)	30 μ g/mL de Kanamicina, 34 μ g/mL de Cloranfenicol, 50 μ g/mL de Estreptomicina e 12,5 μ g/mL de Tetraciclina

*O plasmídeo pET30a(+) tem um gene de resistência a kanamicina.

Testes de solubilização da proteína IFN- β 1_{ser17} clonada no vetor pET30a(+)

Como a proteína recombinante foi expressa apenas na fração insolúvel das cepas testadas, foi realizado o protocolo de rompimento celular por pressão utilizando a prensa de French, conforme descrito no Anexo I. Deste modo, baseados

novamente nas especificações do fabricante, pressões maiores foram testadas neste experimento, como 30.000, 35.000 e 40.000 psi na expectativa de romper os corpos de inclusão e obter a proteína alvo na fração solúvel. No entanto, não obtivemos sucesso na solubilização da proteína.

ANEXO III

Testes de purificação da proteína IFN- β _{1ser17} clonada no vetor pET30a(+)

Os testes de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC*) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção de vários comprimentos de onda, pH, temperatura, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras. As células foram preparadas conforme descrito no manuscrito e para a determinação do melhor protocolo de purificação várias colunas cromatográficas foram utilizadas a fim de obter o melhor rendimento e a otimização do processo.

Foram utilizadas colunas cromatográficas de troca catiônica (como a HiTrap SP XL, HiTrap SP FF, HiTrap CM FF e Resource S), de troca aniônica (HiTrap Q XL e HiTrap ANX FF), de interação hidrofóbica (HiTrap Butyl S FF, HiTrap Phenyl FF low sub, HiTrap Phenyl FF high sub, HiTrap Phenyl HP, HiTrap Octyl FF), de gel filtração (Superdex 75, Sephacryl S200) e de afinidade (HiTrap Blue HP).

As trocas catiônicas apresentaram um padrão semelhante, sendo que as colunas HiTrap SP XL e HiTrap CM FF são as que melhor separaram a proteína alvo das proteínas “contaminantes”. Nas trocas aniônicas a proteína alvo foi observada no lavado e principalmente no gradiente, mostrando não ser eficiente na purificação da proteína IFN- β _{1ser17}. Nas colunas de interação hidrofóbica a proteína não interagiu com a resina estando sempre presente no lavado. Na coluna de gel filtração Superdex 75 a proteína alvo elui juntamente com os contaminantes. Na coluna HiTrap Blue HP a proteína permaneceu ligada na resina e não eluiu nem com 2 M de NaCl, desligando da resina somente com NaOH. Apenas as colunas de troca catiônica e a coluna de gel filtração Sephacryl S200 foram eficientes na purificação

da proteína alvo, separando a proteína alvo das proteínas contaminantes, como descrito no manuscrito.

ANEXO IV

Article title: Human interferon beta1 ser17: coding DNA synthesis, expression, purification and characterization of recombinant protein.

MS ID : 5615256401894760

Authors : Anne D Villela, Gaby Renard, Mario S Palma, Jocelei M Chies, Sergio L Dalmora, Luiz A Basso and Diogenes S Santos

Journal : Microbial Cell Factories

Dear Dr Basso

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect.

http://www.microbialcellfactories.com/imedia/5615256401894760_article.pdf (246575 bytes)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.microbialcellfactories.com/imedia/8992950218947782_comment.pdf

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

Regards

The Microbial Cell Factories Editorial Team

Tel: +44 (0)20 7323 0323

Facsimile: +44 (0)20 7631 9923

e-mail: Antoni.Villaverde@uab.es

Web: <http://www.microbialcellfactories.com/>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. van Holten J, Plater-Zyberk C, Tak PP. Interferon β for treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Research*. 2002;4(6):346-52.
2. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. The structure of human interferon- β : implications for activity. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(11):1203-16.
3. Javed A, Reder AT. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*. 2006;110(1):35-56.
4. Walsh G. *Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology*, 2^a ed., Ireland: Wiley; 2004.
5. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença*, 6^a ed., São Paulo: Artmed; 2006.
6. Arduini RM, Strauch KL, Runkel LA, Carlson MM, Hronowski X, Foley SF, et al. Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon- β -1a and its receptor chains. *Protein Sci*. 1999;8:1867– 1877.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter A. *Biologia Molecular da célula*, 4^o ed, Brasil: São Paulo; 2004.
8. Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*. 2006;8(6):907-922.
9. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6: 975-990.
10. Bermel RA, Rudick RA. Interferon- β treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2007;4:633-646.
11. van Holten J, Reedquist K, Sattonef-Roche P, Smeets TJ, Plater-Zyberk C, Vervoordeldonk MJ, et al. Treatment with recombinant interferon β

reduces inflammation and slows cartilage destruction in collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(3):R239-49.

12. Adriaansen J, Fallaux FJ, de Cortie CJ, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Local delivery of beta interferon using an adeno-associated virus type 5 effectively inhibits adjuvant arthritis in rats. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 6):1717-21.

13. Basu A, Yang K, Wang M, Liu S, Chintala R, Palm T, et al. Structure – function engineering of interferon β -1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjug Chem.* 2006;17:618–630.

14. Lin LS, Kunitani MG, Hora MS. Interferon β -1b (Betaseron[®]): A model for hydrophobic Therapeutic Proteins. In: Pearlman R. and Wang Y. J., editors. *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs. Case Histories.* New York and London: Plenum Press; 1996. p. 275–299.

15. Mohr DC, Pelletier D. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis. *Brain Behav Immun.* 2006;20(1):27-36.

16. Weiner HL, Selkoe DJ. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature.* 2002;420:879–884.

17. Kalb RC. *Esclerose múltipla. Perguntas e respostas.* Brasil: São Paulo;2000.

18. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, et al. Disease modifying therapies in multiple sclerosis Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of American Academy of Neurology and MS council for clinical practice guidelines. *Neurology.* 2002;58(2):169-78.

19. Kappos L, Hartung HP. 10 years of interferon beta-1b (Betaferon[®]) therapy. *Journal of Neurology*. 2005;252 Suppl 3:1–2.
20. Arnason BG. Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon[®]) in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2005;252(3):28–33.
21. Lublin F. History of modern multiple sclerosis therapy. *Journal of Neurology*. 2005;252 Suppl 3:3–9.
22. Karp CL, van Boxel-Dezaire AH, Byrnes AA, Nagelkerken L. Interferon- β in multiple sclerosis: altering the balance of interleukin-12 and interleukin-10? *Curr Opin Neurol*. 2001;14(3):361-8.
23. Billiau A, Kieseier BC, Hartung HP. Biologic role of interferon beta in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2004;251 Suppl 2:10–14.
24. Heine S, Ebnet J, Maysami S, Stangel M. Effects of interferon-beta on oligodendroglial cells. *J Neuroimmunol*. 2006;177(1-2):173-80.
25. Sättler MB, Demmer I, Williams SK, Maier K, Merkler D, Gadjanski I, et al. Effects of interferon-beta-1a on neuronal survival under autoimmune inflammatory conditions. *Exp Neurol*. 2006;201:172–181.
26. Spada S, Walsh G. Directory of approved biopharmaceutical products. Boca Raton London New York Washington, DC: CRC press; 2005.
27. Kuhlmann M, Covic A. The protein science of biosimilars. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21 Suppl 5:v4-8.
28. Covic A, Kuhlmann MK. Biosimilars: recent developments. *Int Urol Nephrol*. 2007;39(1):261-266.
29. Schellekens H. How similar do 'biosimilars' need to be? *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1357-9.
30. Bayer deal with Novartis improves profit outlook for Betaseron[®] franchise. Bayer Schering Pharma AG, Germany. 2007 Mar. [capturado 2007 Dez]

Disponível em:

http://www.viva.vita.bayerhealthcare.com/index.php?id=386&tx_ttnews%5Btt_news%5D=11736&tx_ttnews%5BbackPid%5D=386&cHash=2f4cb8b1fd

31. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon- β (IFN- β). *Pharm Res.* 1998;15(4):641–649.

32. Esclerose Múltipla, enfermidade pouco conhecida na Baixada. *Ciência online.* 1997 Mai. [capturado 2005 out] Disponível em: www.stcecilia.br/pages/online/260497/ciencia.html

33. A Revolução dos Biofármacos. *Revista de Manguinhos.* Coordenadoria de Comunicação social / Presidência – Fiocruz. Rio de Janeiro. 2005;8:24–27.

34. Pisani J, Bonduelle Y. Opportunities and barriers in the biosimilar market: evolution or revolution for generics companies? *Pharmaceutical strategy consultants at PricewaterhouseCoopers LLP*[<http://www.ableindia.org/biosimilars.pdf>]

35. New Interferon for Multiple Sclerosis Therapy. License for first VPM project – Agreement with Fraunhofer Institute. Fraunhofer Institut Grenzflächen-und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart. 2003 Dec. [capturado 2005 Mar] Disponível em: [http://www.igb.fraunhofer.de/WWW/Presse/Jahr/2003/en/PI_IFN-beta_VPM_0312.en.html]

36. Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meier W, Lipscomb WN, Goelz S. The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(22):11813-8.

37. Runkel L, deDios C, Karpusas M, Betzenhauser M, Muldowney C, Zafari M, et al. Systematic mutational mapping of sites on human interferon- β -1a that are important for receptor binding and functional activity. *Biochemistry.* 2000;39(10):2538-51.

38. Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984;81:5662:5666.
39. Lin L. Betaseron. Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products. *Dev Biol Stand.* 1998;96:97–104.
40. Lin LS, Yamamoto R, Drummond RJ. Purification of recombinant Human Interferon β expressed in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1986;119:183–192.
41. Russell-Harde D, Knauf M, Croze E. The use of zwittergent 3-14 in the purification of recombinant human interferon-beta Ser17 (Betaseron). *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15(1):31–37.
42. Kimura S, Utsumi J, Yamazaki S, Shimizu H. Disulfide bond interchange in *Escherichia coli*-derived recombinant human interferon- β 1 under denaturing conditions. *J Biochem.* 1988;104(1):44-7.
43. Mizukami T, Komatsu Y, Hosoi N, Itoh S, Oka T. Production of active human interferon- β in *E. coli*. I. Preferential production by lower culture temperature. *Biotechnol Lett.* 1986;8(9):605–610.
44. Utsumi J, Yamazaki S, Hosoi K, Kimura S, Hanada K, Shimazu T, et al. Characterization of *E. coli* – Derived Recombinant Human Interferon- β as compared with Fibroblast Human Interferon- β . *J Biochem.* 1987;101(5):1199-208.
45. Vera A, González-Montalbán N, Arís A, Villaverde A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperature. *Biotechnol Bioeng.* 2007;96(6):1101-6.
46. Mark DF, Lin LS, Lu SDY: Human recombinant cysteine depleted interferon- β muteins. 1986. Patent US 4,588,585.

47. Santos DS, Chies JM, Basso LA, Renard G, Fonseca IO: Method for the obtention of chimeric nucleotide sequence and chimeric nucleodite sequence. 2006. Patent PCT/Br 2006/000267.