

B12 Clonagem e expressão do hormônio do crescimento humano recombinante (hGH) em *Escherichia coli*

Thiago Santos Chaves¹, Daniel Tait Vareschini², Fernanda de Almeida², Cristiane Pinheiro Pestana², Haroldo Cid da Silva Junior², Marco Alberto Medeiros²

¹ Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinante, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

² Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinante, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: O hGH (*Human growth hormone*) é um polipeptídeo de cadeia simples com 191 resíduos de aminoácidos. Em Junho de 2013, o Ministério da Saúde Brasileiro anunciou parcerias entre laboratórios públicos e privados para incentivo da produção nacional de biofármacos, entre eles a somatotropina, nome comercial dado ao hGH. Com o objetivo de desenvolver competências e qualificar profissionais para atuar no desenvolvimento e acompanhamento de novos processos relacionados a este produto foi realizado o trabalho de otimização de códon, clonagem e expressão de hGH recombinante em *E. coli*, desde a construção *in silico* até o crescimento e expressão em escala de bancada.

Objetivo: Este trabalho tem como objetivo obter hGH recombinante.

Metodologia: O gene que codifica o hGH, foi avaliado *in silico* e os códons otimizados para expressão em *E. coli*. O gene foi amplificado por PCR, o amplicon purificado e digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII*, clonado no vetor de expressão e amplificado em *E. coli* TOPO10. A clonagem foi confirmada por PCR e sequenciamento de nucleotídeos demonstrando identidade. Os clones positivos foram expandidos e o hormônio recombinante expresso em *E. coli* BL21 star DE3 em meio *Terrific Broth* (TB) contendo canamicina e IPTG. Os ensaios de expressão foram realizados em shaker e biorreator.

Resultados: A sequência de hGH foi otimizada para a expressão em *E. coli* obtendo um CAI (*Codon Adaptation Index*) de 0,76. O gene foi amplificado por PCR e analisado em gel de agarose confirmando o tamanho do amplicon gerado. O amplicon foi purificado, quantificado e clonado no vetor de expressão. O produto da clonagem foi transformado em *E. coli* TOP10 resultando, após seleção, em 3 clones recombinantes, confirmados por PCR e sequenciamento. Os clones foram expandidos, seu DNA extraído e utilizado para transformação em *E. coli* BL21 para expressão. Um dos clones obtidos em *E. coli* BL21 foi cultivado em shaker em meio TB suplementado com canamicina a uma temperatura de 37°C e induzido com IPTG a 28 °C

com agitação de 200 rpm, produzindo 0,6 g/L de proteína solúvel, representado 76% da proteína total expressa no extrato bruto. Na condição de cultivo em biorreator, com aeração de 1 vvm e 6 horas de cultivo, sendo 4 de indução, obtivemos 1 g/L, mantendo a solubilidade e atingindo um aumento de 40% em relação ao cultivo em shaker.

Conclusão: Utilizando condições padrões do laboratório, conseguimos demonstrar a expressão de hGH recombinante em *E. coli*, solúvel e em alta concentração, 1g/ L de cultura. Este resultado confirma a qualificação para o desenvolvimento de novos insumos e processos dentro da Unidade. Cabe ressaltar que experimentos de otimização utilizando planejamento experimental poderão aumentar ainda mais a produtividade do hormônio em reatores.

Palavras-Chave: hGH, Biofármacos, Expressão, Clonagem