



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JULEANE LUNARDI

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESTREPTOQUINASE
(*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) EM BIORREATOR UTILIZANDO
DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE BATELADA ALIMENTADA**

Porto Alegre

2011

JULEANE LUNARDI

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESTREPTOQUINASE
(*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) EM BIORREATOR UTILIZANDO
DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2011

JULEANE LUNARDI

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESTREPTOQUINASE
(*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) EM BIORREATOR UTILIZANDO
DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Nadja Schroder – PUCRS (Relatora)

Dra. Rosane Rech - UFRGS

Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Porto Alegre

2011

Dedico este trabalho aos meus pais
Jultir e Lecir Lunardi, que me incentivaram e
apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores Diógenes Santiago Santos e Luiz Augusto Basso, agradeço por terem acreditado em meu potencial e me proporcionado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisas, por me possibilitar um maior aprendizado e pelo exemplo científico a ser seguido.

A Doutora Giandra Volpato por todo conhecimento compartilhado com muita paciência e carinho e por todo o tempo dedicado, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas da empresa Quatro G P&D Ana Christina Dias, Alessandra Raupp, Cristiano Neves, Gustavo Roth, José Eduardo Sacconi, Lara Krumberg Schüller, Maria Gleci A. Ferreira, Natasha Kuniechick, Rafael Munareto, Renilda Trapp de Mello e Thiago Milech pela ajuda e dedicação. Gostaria de agradecer também a Dra Cláudia Paiva Nunes, Dra. Gaby Renard e Dra. Joice Maria Chies pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos e colegas do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, principalmente a Diana C. Rostirolla e Priscila L. Wink por todo apoio, carinho, conselhos, por estarem sempre presentes nos momentos felizes e nos momentos difíceis, por todas as risadas compartilhadas e pela amizade a mim dedicada que me ajudaram tanto a prosseguir.

Um agradecimento especial aos meus familiares Jultir, Lecir e Fabrício pelo carinho, companheirismo, conforto, compreensão pela minha ausência em alguns momentos e, principalmente, pelo amor incondicional que foi essencial para esta conquista.

RESUMO

A estreptoquinase (SK) é uma proteína extracelular produzida por uma variedade de linhagens de *Streptococcus* beta-hemolíticos, é uma proteína ativadora do plasminogênio composta de 414 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 47 kDa. A SK forma um complexo equimolar com o plasminogênio. Esse complexo resultante pode converter diretamente outra molécula de plasminogênio em plasmina, a protease ativa que degrada a fibrina presente nos coágulos sanguíneos. Esta enzima é hoje amplamente usada como agente trombolítico no tratamento do infarto agudo do miocárdio e outras desordens circulatórias. A baixa produtividade da estreptoquinase a partir das células de *Streptococcus* e a patogenicidade deste microorganismo são as principais razões para a exploração da tecnologia de DNA recombinante para produção desta importante proteína. *Escherichia coli* é o microorganismo mais comum utilizado para produção de proteínas heterólogas e o método de preferência para o aumento da concentração de proteínas recombinantes proporcional à densidade de células e produção de produtos específicos da célula, é a estratégia em batelada-alimentada. Sendo o Brasil totalmente dependente da importação de biofármacos, uma alternativa à estreptoquinase seria a produção desse biofármaco por meio de técnicas de DNA recombinante com experimentos de superexpressão e cultivo em biorreator, purificação e o ensaio de atividade da proteína estreptoquinase recombinante. Neste trabalho foram realizados cultivos de estreptoquinase de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* grupo C (SKC) em biorreator através de técnicas de batelada alimentada, testando diferentes meios de alimentação, estratégias de alimentação e tempos de indução com IPTG. Após definidas as melhores condições de cultivo a proteína recombinante foi purificada e sua forma homogênea foi utilizada para realização dos ensaios de atividade biológica. A máxima biomassa alcançada foi de 18,94 g/L em meio de cultura Luria - Bertani (LB) usando uma estratégia de alimentação linear na presença de glicose e MgSO₄. Aproximadamente 21 mg de SKC homogênea foram obtidas a partir de 2 g de célula úmida usando um protocolo de purificação de três etapas com duas colunas cromatográficas. Quando comparada com o Padrão Internacional no ensaio colorimétrico, a atividade específica de SKC foi de aproximadamente 99%, mostrando que a SKC recombinante obteve uma atividade específica muito similar ao padrão.

Palavras-chave: Cultivo em biorreator; batelada alimentada; tempo de indução; proteína recombinante; estreptoquinase; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

ABSTRACT

Streptokinase (SK) is a group of extracellular proteins produced by a variety of streptococci beta-hemolytic strains, and is a plasminogen activator composed of 414 amino acids with a molecular mass of 47 kDa. SK forms a high affinity equimolar complex with a plasminogen. The resulting complex can convert plasminogen to plasmin, the active protease that degrades fibrin in the blood clot. This protein is now widely used as a thrombolytic agent in the treatment of acute myocardial infarction and others circulatory disorders. The low SK production yields from natural host and its pathogenicity are the main reasons for exploration of recombinant DNA technology route for this important protein. *Escherichia coli* is the most commonly used host for heterologous protein production and the preferred method for increasing the concentration of heterologous recombinant protein, which is proportional to both cell density and specific cellular product yield, is the fed-batch strategy. Being the Brazil totally dependent on the import of this biopharmaceutical, an alternative to streptokinase was the production of this biopharmaceutical by recombinant DNA techniques with expression experiments and bioreactor cultivation, purification and the protein activity assay of the recombinant streptokinase. In this work were performed SKC bioreactor cultivations through fed-batch techniques, testing different feeding media, feeding strategies and induction time with IPTG. After defining the best conditions for growing the recombinant protein was purified and its homogeneous form was used to perform of biological activity assay. The maximum biomass achieved was 18.94 g/L in LB medium using linear fed-batch strategy in the presence of glucose and MgSO₄. Approximately 21 mg of homogeneous SKC were obtained from 2 g of wet weight cells using a three-step protocol with two chromatography columns. When compared to an International standard in a colorimetric assay, the specific activity of SKC was approximately 99%, showing that recombinant SKC has a very similar specific activity to the standard.

Keywords: Bioreactor cultivation; feed-batch; induction time; recombinant protein; streptokinase; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Plasminogênio	15
Figura 2: Ativação do plasminogênio	18

LISTA DE ABREVIACÕES

DO-stat – Controle do suprimento de oxigênio dissolvido

E. coli – *Escherichia coli*

FPLC - Cromatografia líquida de alta performance

HCDC – Cultura de alta densidade celular (do inglês *high cell-density culture*)

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IPTG – Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – quilo Dalton

LB – Meio de cultura Luria - Bertani

OD₆₀₀ – Densidade óptica a 600 nm

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Plg – Plasminogênio

PN - Plasmina

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

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

S. equisimilis – *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

S. pyogenes – *Streptococcus pyogenes*

SK – Estreptoquinase

SKC – Estreptoquinase de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* grupo C HQ629621 (GenBank)

TB - Terrific Broth

TPA – Ativador de plasminogênio tipo tecidual (do inglês *tissue-type plasminogen activator*)

UK – Uroquinase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Infarto Agudo do Miocárdio	14
1.2. Sistema Fibrinolítico.....	15
Figura 1: Plasminogênio - Domínios estruturais do plasminogênio.....	16
1.3. Terapia Trombolítica	17
1.4. Estreptoquinase	18
1.5. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> do grupo C	20
1.6. Cultivo em biorreator.....	21
1.7. Biofármacos	23
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. Manuscrito	29
3. Results and discussion.....	39
5. Considerações Finais	62
REFERÊNCIAS	68
Anexos.....	75
ANEXO I.....	76
ANEXO II.....	79

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infarto Agudo do Miocárdio

As doenças cardiovasculares têm um papel preponderante nos indicadores de morbimortalidade no Brasil, sendo a primeira causa de mortalidade no país desde a década de 60 (Melo *et al*, 2006). A doença isquêmica do coração, incluindo o infarto agudo do miocárdio (IAM), é o componente principal dessa mortalidade nas cidades da Região Sul e Sudeste, afetando homens e mulheres acima de trinta anos de idade (Escousteguy *et al*, 2003; Melo *et al*, 2006). Na década de 50, o IAM já era considerado a maior causa de mortes nos países industrializados, representando um grande problema para a saúde pública (Sarmiento-Leite *et al*, 2001). No Brasil, o total de internações hospitalares em 2008 para todas as faixas etárias foi de 10.743.603. Dessas, 10,21% foram devidas a doenças do sistema circulatório, conforme relatório do DATASUS de 2009, perdendo apenas para as internações por doenças do sistema respiratório e para problemas da gravidez, parto e pós-parto. Para a faixa etária acima de 70 anos de idade, este valor é de 1.270.638 internações, sendo que 28,21% estão relacionadas com doenças deste sistema, sendo a maior causa de internações nesta faixa de idade. (<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>).

O IAM é um evento agudo que requer internação hospitalar, tendo um diagnóstico clínico relativamente simples e bem estabelecido, geralmente baseado no trio: história clínica, evolução eletrocardiográfica e curva enzimática. Pela facilidade de administração e segurança, os agentes trombolíticos tornaram-se o tratamento padrão e mais aplicado no IAM, reduzindo as taxas de mortalidade. No final dos anos 80 a estreptoquinase (um agente fibrinolítico) começou a ser aplicada por via intravenosa em pacientes (anteriormente aplicada por infusão intracoronariana), mostrando que nas primeiras três horas pós-infarto existia uma

redução de 19% no risco relativo de mortalidade (GISSI, 1988). Esta enzima é hoje amplamente usada como agente trombolítico no tratamento de IAM, incluindo trombose coronária (Kim *et al*, 2000).

1.2. Sistema Fibrinolítico

O desenvolvimento de coágulos sangüíneos no sistema circulatório pode causar bloqueio vascular, levando a várias conseqüências como obstrução da luz de artérias como coronárias ou carótidas; necrose do coração, cérebro e outros órgãos, e inclusive à morte. Um sistema hemostático saudável suprime o desenvolvimento de coágulos sangüíneos na circulação normal, e reage extensivamente no evento de injúria vascular para prevenir a perda de sangue. Conseqüências da falha na hemostasia incluem embolia pulmonar, trombose venosa profunda e infarto agudo do miocárdio (IAM). As patologias envolvendo uma falha na hemostasia e o desenvolvimento de coágulo requerem intervenção clínica que consiste na administração intravenosa de agentes trombolíticos ou anti-trombóticos (Banerjee *et al*, 2004).

O coágulo sangüíneo, ou trombo, consiste de células sangüíneas envolvidas em uma matriz de fibrina. A dissolução do coágulo de fibrina mediada por enzimas é conhecida como trombólise ou fibrinólise. Na circulação de mamíferos, a enzima responsável pela fibrinólise é a plasmina, uma serino protease da família das tripsinas, originada a partir da molécula de plasminogênio.

A ativação do plasminogênio (pró-enzima) em plasmina (enzima ativa) é realizada pela hidrólise da ligação peptídica entre os aminoácidos Arg₅₆₁-Val₅₆₂. A plasmina é capaz de hidrolisar a fibrina e várias proteínas da coagulação plasmática, incluindo o fibrinogênio (Castellino, 1981).

O plasminogênio humano é uma glicoproteína, com massa molecular de aproximadamente 92 kDa, e contém sete domínios estruturais: um peptídeo N-terminal, cinco domínios chamados de “*Kringles*” e um domínio catalítico de serino protease (Weisel *et al*, 1994). O plasminogênio nativo, contendo um ácido glutâmico em seu resíduo N-terminal, é referido como Glu-Plg. Após a sua ativação em plasmina, a porção N-terminal é removida por uma clivagem na ligação peptídica Lys₇₇-Lys₇₈ (Violand *et al*, 1976; Loy *et al*, 2001). A incubação do Glu-Plg com a plasmina também resulta na remoção do resíduo N-terminal (NTP), gerando o chamado Lys-Plg (Castellino, 1981; Loy *et al*, 2001). Os *kringles* do plasminogênio contêm sítios de ligação a lisina, que interagem com os resíduos de lisina de outras proteínas, incluindo a fibrina. O domínio catalítico do plasminogênio, desprovido de todos os *kringles*, é denominado μ Plg, enquanto que este mesmo domínio acompanhado do *kringle* 5 é chamado de mini-Plg (**Figura 1**), ambas as formas são capazes de serem ativadas pelos ativadores de plasminogênio (Loy *et al*, 2001).

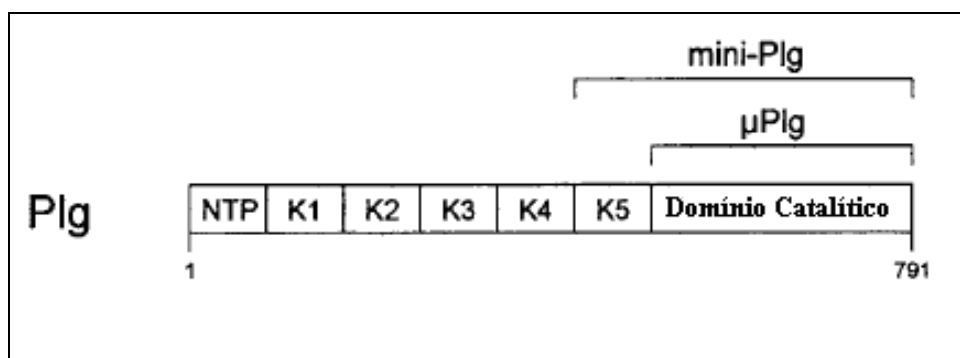


Figura 1: Plasminogênio - Domínios estruturais do plasminogênio.

A conformação do plasminogênio é mediada através dos sítios de ligação com a lisina dos *kringles*. Como resultado da interação entre a porção N-terminal e os sítios de ligação com a lisina do *Kringle* 5, o Glu-Plg livre adota uma conformação de espiral compacta e fechada (Weisel *et al*, 1994; Loy *et al*, 2001).

1.3. Terapia Trombolítica

A terapia trombolítica com agentes fibrinolíticos tem revolucionado o tratamento de diversas patologias circulatórias tais como o embolia pulmonar, trombose venosa profunda e infarto do miocárdio. Essas desordens são as maiores causas de mortalidade na sociedade moderna por todo o mundo (Kunamneni *et al*, 2007). As doenças da artéria coronária e o infarto do miocárdio são responsáveis por 40% de todas as mortes que ocorrem por ano nos EUA (Wang *et al*, 2007).

Os agentes fibrinolíticos mais comumente usados na terapia trombolítica são a estreptoquinase (SK), a uroquinase (UK) e o ativador de plasminogênio tipo tecidual (TPA) (estes dois últimos são encontrados na corrente sanguínea; Banerjee *et al*, 2004). O TPA e a UK, apesar de serem relativamente inertes imunologicamente quando comparados à SK, possuem significativa redução de meia-vida *in vivo*, além de serem consideravelmente mais caros que a SK; portanto, a estreptoquinase é a droga de escolha no tratamento trombolítico (Kunamneni *et al*, 2007).

Existem cinco agentes trombolíticos aprovados nos Estados Unidos, utilizados para o infarto agudo do miocárdio: estreptoquinase, alteplase (TPA recombinante-rTPA), anistreplase (estreptoquinase), reteplase (rTPA) e tecneplase (com aminoácidos modificados-TNK-tpA); dois no Canadá: estreptoquinase e TPA; e quatro drogas estão sendo usadas na Índia: streptokinase (SK), indikinasa (estreptoquinase recombinante de *Streptococcus equisimilis*-rSK), TPA e UK (revisão em Baruah *et al*, 2006). Além disso, em Cuba, uma estreptoquinase recombinante obtida a partir do gene de *S. equisimilis* está sendo utilizada sob o nome de heberkinase. Esta estreptoquinase recombinante expressa em células de *E. coli* chega a produzir 10 vezes mais o agente fibrinolítico do que as culturas de *S. equisimilis* (Estrada *et al*, 1992). Quanto ao menor custo da estreptoquinase, drogas trombolíticas de

segunda e terceira geração podem chegar ao custo de \$ 2196,00 a dose para Alteplase ou Reteplase e a \$ 2750,00 no caso da Tecneteplase. A estreptoquinase pode custar até 10 vezes menos (American Heart Association) (Hernández *et al*, 2005).

Em um estudo de 2005, de Hermentin *et al*, foram testadas 16 preparações de estreptoquinase (três delas recombinantes). A sua atividade e seqüência N-terminal foram comparadas às da estreptoquinase nativa. Quatro dessas preparações estão presentes no mercado brasileiro, todas elas importadas da Coréia do Sul. Na análise de atividade, apenas 3 das 16 estreptoquinasas estudadas atingiram os requisitos mínimos da *European Pharmacopoeia* (atividade fibrinolítica de 90-111%), nenhuma delas utilizada no Brasil. Foi constatada uma grande variação na pureza e composição destes produtos, sendo que a estreptoquinase recombinante proveniente da China produziu uma reação cinética anormal no ensaio cromogênico de atividade, o que não permitiu determinar a sua composição. A deficiência de atividade e variação de pureza e composição dessas preparações estudadas e, principalmente, importadas pelo Brasil, podem acarretar implicações clínicas muito graves.

1.4. Estreptoquinase

As estreptoquinasas (EC 3.4.99.22) são um grupo de proteínas extracelulares produzidas por uma variedade de linhagens de *Streptococcus* beta-hemolíticos dos grupos A (SGA), C (SGC) e G (SGG) de Lancefield (Lancefield, 1933). Essa proteína é um ativador de plasminogênio composto por 414 aminoácidos com uma massa molecular de 44 – 50 kDa. A identidade entre a seqüência de aminoácidos da estreptoquinase produzida pelos grupos A, C e G é de 80–98% (Lähtenmäki *et al*, 2001), e o primeiro gene de estreptoquinase (*skc*) clonado e seqüenciado foi o de *Streptococcus dysgalatae* subsp. *equisimilis* (do grupo C de Lancefield) (Christensen, 1945). Anos mais tarde, outras seqüências nucleotídicas de cepas de *Streptococcus* dos grupos A e G foram elucidadas (revisão em Malke *et al*, 1995).

Diferentemente da UK e do TPA, que realizam uma proteólise direta, a SK forma um complexo equimolar de alta afinidade com o plasminogênio ou plasmina (**Figura 2**) (Kim *et al*, 2000; Christensen 1945; Castellino, 1981; Banerjee *et al*, 2007; Kunamneni *et al*, 2007). Esse complexo resultante (SK-Plg) pode converter diretamente outra molécula de plasminogênio em plasmina, a protease ativa que degrada a fibrina presente nos coágulos sanguíneos (Wu *et al*, 1998).

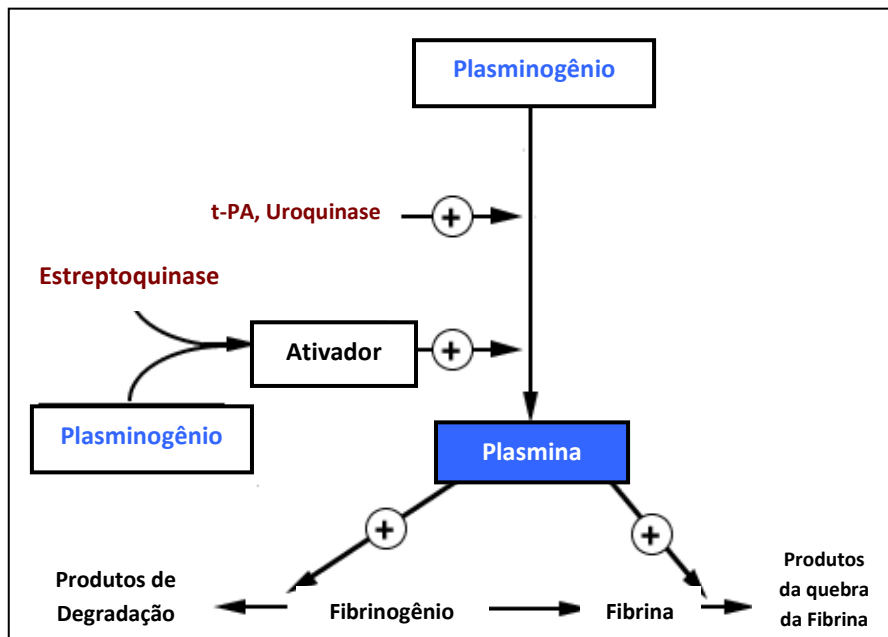


Figura 2: Ativação do plasminogênio. Formação do complexo SK- Plg.

A estreptoquinase possui múltiplos domínios estruturais com diferentes propriedades funcionais associativas, chamados domínios α (aminoácido 1 ao 150), β (aminoácido 151 ao 287) e γ (aminoácido 288 ao 414) (Wang *et al*, 1999; Lizano *et al*, 2005). Estudos mostraram que o domínio α está posicionado próximo ao sítio ativo do complexo SK-Plg e proporciona o reconhecimento da molécula de substrato plasminogênio (Wang *et al*, 1998; Loy *et al*, 2001). A região N-terminal da proteína (resíduos 1-59) complementou a baixa capacidade de ativar o plasminogênio dos resíduos 60-414 da enzima (Wang *et al*, 1999). Evidências bioquímicas sugerem que a isoleucina N-terminal da SK é importante na geração do sítio ativo do complexo SK-Plg (Wang *et al*, 1999; Wang *et al*, 2007), hipótese gerada pela alta

similaridade entre as sequências do N-terminal de SK e do N-terminal do Plg (Loy *et al*, 2001). O domínio γ da estreptoquinase é essencial para a ativação do plasminogênio, já o domínio β está envolvido na formação do complexo SK-Plg (Banerjee *et al*, 2004).

O plasminogênio é ativado pela estreptoquinase por mecanismos dependentes e independentes de fibrina, e a porção C-terminal do polipeptídeo está envolvida com o reconhecimento e ativação do substrato plasminogênio (Zhai *et al*, 2003), ou seja, é responsável pela alta afinidade de ligação da enzima ao plasminogênio (Young *et al*, 1998). Os primeiros 59 aminoácidos da estreptoquinase possuem múltiplas funções na enzima. A perda destes resíduos da porção N-terminal desestabiliza a estrutura secundária da enzima, reduzindo a atividade do fragmento remanescente (resíduos 60-414) (Shi *et al*, 1994).

1.5. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* do grupo C

A identificação das linhagens de *Streptococcus dysgalactiae* é complexa e fornece pouca informação para os clínicos ou epidemiologistas. *S. dysgalactiae* consiste de pelo menos cinco subgrupos distintos, com base em sorogrupos e biótipos. Estudos revelaram que existem duas subpopulações de cepas dentro de *S. dysgalactiae*. O nome *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* é proposto para cepas de origem animal (exceto humanos). Essas linhagens pertencem aos sorogrupos C e L de Lancefield (Lancefield *et al*, 1933). Eles podem ser alfa-, beta- ou gama-hemolíticos, não apresentam atividade de estreptoquinase sobre o plasminogênio humano ou atividade proteolítica sobre a fibrina humana. O nome *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* é proposto para isolados humanos. Essas cepas dos sorogrupos C e G de Lancefield são beta-hemolíticos e exibem atividade de estreptoquinase sobre o plasminogênio humano e atividade proteolítica sobre a fibrina humana. As cepas do grupo C (beta-hemolíticas) ocorrem em humanos e em outros animais, mas os isolados de animais não ocorrem em humanos e vice-versa (Vandamme *et al*, 1996).

1.6. Cultivo em biorreator

As culturas em agitador orbital de bancada (*shaker*) são normalmente realizadas em batelada, sendo todos os componentes da cultura adicionados no início do cultivo, sem monitoramento nem controle de nenhum parâmetro como pH ou níveis de oxigênio dissolvido. Sob tais circunstâncias, altas densidades celulares não podem ser alcançadas, pois a taxa respiratória das bactérias em crescimento é muito alta e rapidamente excede a capacidade de transferência de oxigênio do frasco (Vassala *et al*, 2006).

Culturas em *shaker* têm sido muito usadas durante as duas últimas décadas, muitas vezes com bastante sucesso, para produzir proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. Neste sistema, a produção proteica requer a indução da síntese da proteína recombinante durante o crescimento exponencial quando a razão de crescimento é alta. A produção da proteína recombinante pode gerar um impacto na manutenção celular, que resulta em uma densidade celular muito baixa ao final do cultivo. Um sistema ideal para a produção de proteínas recombinantes deve combinar alta densidade celular e alta produtividade por célula (Krause *et al*, 2010).

Técnicas de culturas com alta densidade celular (do inglês *High cell-density culture* – HCDC) para cultivo de *E. coli* têm sido desenvolvidas a fim de aumentar a produtividade e proporcionar vantagens como a redução do volume da cultura e redução do investimento em equipamento. O cultivo em biorreator visa à produção rentável do produto desejado usando técnicas de alta produtividade (Lee *et al*, 1996).

Um dos métodos mais usados para alcançar alta densidade celular, que é necessária para uma maior produtividade e rendimento, é a cultura em batelada alimentada (Kim *et al.*, 2004, Yee *et al*, 1992). Este cultivo é um método simples e efetivo para o aumento da produtividade e da concentração da cultura, e tem sido amplamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes em células de *E. coli* (Ramalingam *et al*, 2007).

Entretanto, a técnica de HCDC tem alguns problemas que devem ser superados para que as culturas possam atingir altas densidades celulares. A limitação da capacidade de transferência de oxigênio, a formação de produtos que inibem o crescimento celular, a inibição pelo substrato e a limitação da dissipação de calor, são alguns exemplos (Lee *et al*, 1996). Células em batelada alimentada podem sofrer estresse devido à elevada pressão osmótica causada pela alimentação, a indução da expressão de proteínas heterólogas e a falta de nutrientes. A produção de acetato é resultado do crescimento de *E. coli* sob condições anaeróbicas ou limitantes de oxigênio. Ela pode ocorrer quando o fluxo de carbono do metabolismo excede a demanda da biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula, a saturação do ciclo do ácido tricarboxílico e a cadeia de transporte de elétrons podem ser as principais causas. A alta concentração de acetato pode reduzir a razão de crescimento, a produção de biomassa e a densidade máxima de células viáveis em HCDCs (Shiloach *et al*, 2005; Lee *et al*, 1996).

A indução com IPTG também aparece como causadora de uma variedade de respostas ao estresse na célula e, desse modo, pode levar inclusive a uma perda de plasmídeo (Kosinski *et al*, 1992; Sorensen *et al*, 2005). A inibição temporária da proteína H35 (normalmente presente somente durante a fase exponencial de crescimento) foi encontrada após a indução, sugerindo que as células devem adaptar-se a baixos níveis de crescimento com a expressão induzida com IPTG. A degradação proteolítica de proteínas anormais pode ser influenciada pelos níveis de indução com IPTG; a degradação por algumas vias pode aumentar ou diminuir conforme os níveis de IPTG (Kosinski *et al*, 1991). Portanto, a razão de crescimento específico das células em batelada pode ser reduzida pela indução com IPTG durante a fase logarítmica de crescimento (Bentley *et al*, 1991). Além disso, altos níveis de expressão da proteína recombinante pelo uso de IPTG também pode induzir a expressão de uma variedade de proteases presente no meio onde as concentrações de certos aminoácidos podem ser limitantes (Harcum *et al*, 1993). Possivelmente, a inibição do crescimento celular após a indução pode ocorrer porque a célula utiliza a maior parte da sua energia para a expressão protéica, ao invés de utilizá-la para o crescimento.

As culturas de linhagens recombinantes em biorreator passam por um grande número de gerações, com sua produtividade fortemente afetada durante o cultivo, sendo as células geradas e propagadas possivelmente sem o plasmídeo. Assim, ao final do cultivo, uma larga

concentração de biomassa é obtida sem produzir a proteína recombinante (Kumar *et al*, 1991). Para tentar reduzir a instabilidade, pode-se fazer uso da estratégia de pressão seletiva, como o uso de alguns genes de resistência a antibióticos no plasmídeo, seguido pela adição do antibiótico correspondente ao meio de crescimento. Além disso, a concentração de antibiótico pode ser diminuída no cultivo, como acontece com o uso da ampicilina, que é degradada em função do tempo pelo gene da β -lactamase (bla) existente no plasmídeo ou por mudanças no pH (Friehs *et al*, 2004; pET System Manual - Novagen 2003; Sorensen *et al*, 2005).

A hidrólise do anel β -lactâmico é catalisada quando este é secretado para o periplasma. Assim, a ampicilina no meio de cultivo é suscetível a degradação pela β -lactamase secretada, ou por condições ácidas em culturas de alta densidade. Este último efeito é diminuído pelo uso de outros antibióticos como: canamicina, carbanicilina, cloranfenicol e tetraciclina; que interferem com a síntese proteica através da ligação às áreas críticas do ribossomo (Sorensen *et al*, 2005).

1.7. Biofármacos

A estreptoquinase utilizada clinicamente é chamada de biofármaco. O termo “biofármaco” é aceito como parte do vocabulário farmacêutico e se refere a proteínas terapêuticas produzidas por engenharia genética. 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 (Spada *et al*, 2005). 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 (Kuhlmann *et al*, 2006).

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 (Covic *et al*, 2007). Assim, uma nova geração de moléculas, chamadas biossimilares, está sendo desenvolvida. Essas moléculas poderão ser alternativas de menor custo para os biofármacos originais (Kuhlmann *et al*, 2006; Covic *et al*, 2007; Schellekens, 2004). Entretanto, a segurança e a eficácia dos biossimilares devem ser comprovadas e devem equivaler ao produto original.

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A estreptoquinase é a droga escolhida na terapia trombolítica principalmente por apresentar um baixo custo comparado a outros ativadores de plasminogênio. O custo da dose dos trombolíticos de segunda e terceira geração pode chegar a \$ 2196,00 para Alteplase ou Reteplase e a \$ 2750,00 no caso da Tecneteplase, já o custo/dose para SK pode ser dez vezes menor (dados Custo/dose pela *American Heart Association*). Um dos principais problemas na utilização da estreptoquinase é a sua meia-vida curta, uma vez que a plasmina rapidamente processa a estreptoquinase em pequenos fragmentos (Wu *et al.*, 1998). Embora no Brasil estejam disponíveis comercialmente cinco estreptoquinases de *Streptococcus equisimilis* (Streptase®, Unitinase®, Solustrep®, Streptonase® e Streck®), nenhuma dessas são enzimas recombinantes. Esses produtos são obtidos a partir de culturas de estreptococos, e a desvantagem desse processo é a necessidade de atenções especiais à biossegurança, já que as cepas produtoras de estreptoquinase são patogênicas, e o fibrinolítico derivado de culturas de estreptococos contém estreptolisina e estreptodornase, que são tóxicas (Banerjee *et al.*, 2004; Kunamneni *et al.*, 2007). A vantagem de se obter uma estreptoquinase recombinante é minimizar todos os riscos mencionados acima, além de poder modificar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desse biofármaco.

O avanço científico tem permitido o emprego industrial de microorganismos ou células modificadas geneticamente, objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na saúde humana.

O Brasil é totalmente dependente da importação de biofármacos, uma alternativa a estreptoquinase seria a produção desse biofármaco por meio de técnicas de DNA recombinante com experimentos de superexpressão, purificação e o futuro escalonamento da proteína estreptoquinase recombinante. Tais experimentos visam à produção em larga escala para suprir a demanda do mercado nacional. Portanto, a fabricação dessa proteína no mercado nacional provocaria uma diminuição nas importações desse biofármaco de origem bacteriana, evitando que seu preço varie conforme a oscilação do mercado internacional.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a produção da proteína estreptoquinase codificada pelo gene *skc* de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* do grupo C, em cepa de *E. coli*, de modo a obter uma linhagem de bactéria capaz de produzir elevados níveis de estreptoquinase para uso como agente trombolítico, minimizando os efeitos colaterais das estreptoquinases de origem bacteriana e diminuindo o custo da importação da proteína.

3.2. Objetivos Específicos

Este trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer condições de cultivo em biorreator;
- Purificar a proteína superexpressa por meio de Cromatografia Líquida de Rápida Performance (*FPLC*);
- Determinar e comparar a atividade biológica da proteína recombinante com o Padrão Internacional.

4. Manuscrito

Bioreactor production of recombinant streptokinase (*Streptococcus dysgalactie* subsp. *equisimilis*) using different fed batch strategies.

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Biotechnology*.

Bioreactor production of recombinant streptokinase (*Streptococcus dysgalactie* subsp. *equisimilis*) using different fed batch strategies

Juleane Lunardi^{a,b,d}, Heique M. Bogdawa^a, José Eduardo Sacconi Nunes^a, Gustavo Roth^a, Thiago Millech^b, Sérgio L. Dalmora^c, Cláudia Paiva Nunes^a, Gaby Renard^a, Joice Maria Chies^a, Luiz Augusto Basso^{a,b}, Giandra Volpato^a, Diógenes Santiago Santos^{a,b,d*}.

^aQuatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA – Tecnopuc, Porto Alegre – RS, 90619-900, Brazil.

^bCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – RS, 90619-900, Brazil.

^cDepartamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 97105-900 – Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PUCRS – Porto Alegre – RS, 90610-000, Brazil.

*Corresponding author:

Diógenes Santiago Santos (diogenes@puers.br)

Av. Ipiranga 6681, Prédio 92A. CEP 90619-900, Porto Alegre – RS

Phone: +55 51 3352 6560

Abbreviations

Abs(405 nm): Absorbance at 405 nm; BSA: bovine serum albumin; *E. coli*: *Escherichia coli*; HCDC: High cell-density culture; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; LB: Luria Bertani; MCB: Master cell bank; Pg: plasminogen; SK: streptokinase; SKC: streptokinase from *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* group C HQ629621 (GenBank); TB: Terrific Broth; TCA: tricarboxylic acid; TPA: tissue type plasminogen activator; UK: urokinase.

Abstract

The availability of streptokinase at low cost makes it the drug of choice for thrombolytic therapy, particularly in economically poorer countries. Fed-batch culture techniques for culturing *E. coli* have been developed to improve productivity, and also to provide advantages such as reduced culture volume, enhanced downstream processing and reduced investment in equipment. Here we describe the cloning of *skc* gene, its expression in *E. coli* BL21(DE3) by a simple and low-cost process, which is amenable to scaling-up the production of the streptokinase (SKC), and purification of recombinant protein. Different fed-batch strategies, feeding medium, and induction time were studied. The maximum biomass achieved was 18.94 g/L in LB medium using linear fed-batch strategy in the presence of glucose and MgSO₄. Approximately 21 mg of homogeneous SKC were obtained from 2 g of wet weight cells using a three-step protocol with two chromatography columns. When compared to an International standard in a colorimetric assay, the specific activity of SKC was approximately 99%, showing that recombinant SKC has a very similar specific activity to the standard.

Keywords: Bioreactor cultivation; feed-batch; induction time; recombinant protein; streptokinase; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

1. Introduction

Thrombolytic therapy with fibrinolytic agents has revolutionized the treatment of various circulatory diseases such pulmonary embolism, deep venous thrombosis and myocardial infarction. Such disorders are the leading causes of death in modern society worldwide (Kunamneni et al, 2007).

Streptokinase (SK), urokinase (UK) and tissue type plasminogen activator (TPA) are the fibrinolytic agents most commonly used in thrombolytic therapy, being the latter two found in the bloodstream (Banerjee et al, 2004). TPA and UK despite being relatively immunologically inert when compared to SK, possess significantly lower *in vivo* half-lives. In addition, TPA and UK are considerably more expensive than SK. Therefore, SK is the drug of choice in thrombolytic treatment (Kunamneni et al, 2007).

Cultures in shake flasks have been used for over two decades, often fairly successfully, to produce recombinant proteins in *Escherichia coli*. The production of recombinant protein can generate an impact on cellular maintenance, resulting in a very low cell density at the end of cultivation. An ideal system for recombinant protein production would allow for both high cell densities and high protein productivity per cell (Krause 2010).

High cell-density culture (HCDC) techniques for culturing *E. coli* have been developed in order to improve productivity, and to provide advantages such as reduced culture volume, enhanced downstream processing and reduced investment in equipment (Lee 1996). Fed-batch cultivation is an effective and simple method to increase the productivity of

a culture by increasing cell concentration, and have been widely used for recombinant protein production in *E. coli* (Kim et al., 2004; Ramalingam et al., 2007).

Various fed-batch strategies have been investigated for production of various recombinant therapeutic proteins using feedback control (Choi et al, 2009, García-Arrazola et al, 2005, Jeong et al, 2004, Tabandeh et al, 2004) or non-feedback control techniques (Goyal et al, 2009, Khalilzadeh et al., 2008, Ramalingam et al, 2007, Khalilzadeh et al., 2003).

The aim of this work was the improvement of recombinant production of streptokinase from *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of the C group in *E. coli* strain (SKC), using a bioreactor, along with its purification. The effects of different processes and nutritional parameters like feeding media, fed-batch strategies and induction time were studied to increase biomass and streptokinase production.

2. Material and Methods

2.1. Genomic DNA extraction:

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* of the group C was obtained from a swab sample (collected at the Department of Microbiology of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, by Dra. Ângela Castro). The DNA was extracted using a Proteinase K-Phenol-Chlorophorm method including a lysozyme incubation step, at 55°C for 1h (Sambrook and Russel., 1989).

2.2. Amplification and cloning:

Streptokinase gene (*skc*) HQ629621 (GenBank), was amplified by PCR using specific primers containing *Nde*I (5' GAATTCCATATGATTGCTGGACCTGAGTGG 3') and *Bam*HI (5' GGCGGATCCTTATTTGTCGTTAGGGTTATC 3') restriction sites. This amplicon was

cloned into pCR-Blunt vector (Invitrogen), and subcloned into pET30a(+) expression vector (Novagen) using *NdeI* e *BamHI* restriction enzymes. The construction (pET30a(+):skc) was transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells (Novagen).

2.3. Shaker cultivation:

A master cell bank (MCB) was made in 50% glycerol and stored at -20°C. Recombinant cells were selected on LB agar plates containing 30 µg/mL of kanamycin (Sigma Chemical CO.). A single colony was grown overnight in LB medium pH 7.2 containing the same antibiotic, at 37°C. An aliquot of this culture was used to inoculate (final OD 0.08) flasks containing different culture media (LB (tryptone, 10 g/L; yeast extract, 5 g/L; NaCl, 10 g/L), TB (tryptone 12 g/L, yeast extract 24 g/L, K₂HPO₄ 12.5 g/L, KH₂PO₄ 2.3 g/L, glycerol 4 mL/L) and M9 (NaCl, 0.5 g/L; NH₄Cl, 1 g/L; yeast extract, 20 g/L; Na₂HPO₄, 6 g/L; KH₂PO₄, 3 g/L; glucose, 500 g/L; MgSO₄, 0.1 g/L; thiamine, 1 g/L; 1 mL of trace solution (FeSO₄, 2.8 g/L; MnCl₂, 2 g/L; CaCl₂, 2 g/L; CuCl₂, 0.26 g/L; ZnSO₄, 0.3 g/L)) containing 30 µg/mL of kanamycin, in a shaker at 30°C and 37°C, 180 rpm. Recombinant protein expression was tested either with addition of 1 mM IPTG when the cell density (OD₆₀₀) reached 0.4–0.6 or without induction. Samples were harvested after induction. The cells were disrupted and the expression of streptokinase was analyzed in the soluble and insoluble fractions by 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue. Unstained Protein Molecular Weight Marker and PageRuler® Unstained Protein Ladder (Fermentas Life Science) were used as markers.

2.4. Bioreactor cultivation:

The pre-inoculum medium was prepared with 250 mL of LB, 30 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin added with 150 μL of MCB. The culture was grown overnight in shaker at 180 rpm, 37°C. This culture was then used to inoculate the bioreactor at $\text{OD}_{600} = 0.1$.

Batch and fed-batch culture experiments were conducted in a BIOSTAT B Plus bioreactor (Sartorius Stedium, Germany) with two, 2 L stirred tank, filled with 1 L of culture medium, at 30°C, pH 7. For pH control, 12% (v/v) ammonium hydroxide and 10% (v/v) phosphoric acid were used. The bioreactor was equipped with two Rushton turbines, and with agitation, aeration, temperature and pH controllers. A polarographic electrode was used to measure the dissolved oxygen concentration (DOC) in the culture. The experiments were performed in duplicate.

2.4.1. Batch cultivation:

In the batch culture the dissolved oxygen concentration was maintained at 30% by cascading agitation (400-1,000 rpm) with constant aeration rate (1 vvm) and the process was finished when the biomass reached stationary phase.

2.4.2. Fed-batch cultivation:

Fed-batch cultivations were started as batch cultures and the feedings were started at 5 hours (approximately OD_{600} 4.0). DOC was maintained at 30%, and aeration at 1 vvm.

Initially, five different feed media (Table 1) were tested using DO-stat strategy and induction at 24h of cultivation. After choosing feed medium, four feeding strategies were tested, two with fed-batch control, DO-stat and pH-stat, and two without fed-batch control, exponential and linear. In DO-stat fed-batch culture, the agitation was maintained at 600 rpm

and in pH-stat, linear and exponential fed-batch cultures, DOC was maintained in cascade with agitation.

Exponential feeding was calculated in order to keep specific growth rate constant at about 0.10-0.15 h⁻¹, and the feeding profile was defined as:

$$F = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{Y S_0}$$

where F is the feeding rate (mL/min), μ the specific growth rate (h⁻¹), X_0 the cell concentration at time zero and V_0 the initial volume starting the fed-batch (g/L), t the cultivation time after initiation of the fed-batch culture (min), S_0 the glucose feeding concentration, and Y the yield coefficient (g_{cell}/g_{glucose}), pre-determined in batch experiments.

The linear ascending feeding profile had the form of:

$$F = at + b$$

where F is the feeding rate (mL/min), t the cultivation time after initiation of the fed-batch culture (min) and, a and b the feeding constants. The b constant was defined as 0.064 mL/min, the a constant was 1.28 x 10⁻⁴ mL/min², for the linear ascending feeding profile of 25 h.

After selecting the feeding strategy, different induction times were tested (6, 12 and 24 hours after the starting of cultivation) using 1 mM of IPTG.

2.5. Purification:

Liquid chromatography purification steps were performed using Äkta purification system (GE Healthcare) at 4°C. The culture performed in the bioreactor was centrifuged at 7,690 x g for 30 min. Cells (2 g wet weight) were suspended in 20 mL of 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 buffer (buffer A), and incubated with 0.2 mg/mL lysozyme (Sigma) for 30 min. Cells were disrupted by sonication (Vibra cell, SONICS) (4 times for 10 s at amplitude 60%), and

centrifuged at 38,900 x g, 30 min. Nucleic acids were precipitated with 1% streptomycin sulfate (Sigma) for 30 min, and removed by centrifugation at 38,900 x g for 30 min. The supernatant was precipitated with 1.5 M ammonium sulfate and centrifuged at 38,900 x g, 30 min. The pellet was suspended in 20 mL of buffer A treated with ammonium sulfate (final concentration 0.8M) (buffer B), stirred for 30 min and centrifuged (38,900 x g for 30 min). The sample was loaded on a Butyl Sepharose High Performance chromatography column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer B. The non-interacting proteins were eluted in 10 CV of buffer B and the adsorbed material was eluted with a linear gradient from buffer B to buffer A in 20 CV, at a flow rate of 1 mL/min. The eluted sample was dialyzed against buffer A, centrifuged and loaded on a HiLoad Q Sepharose High Performance column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The non-interacting proteins were eluted with 10 CV of buffer A and the adsorbed material was eluted by a linear gradient from buffer A to buffer C (buffer A, containing 0.25 M NaCl) in 20 CV at a flow rate of 1 mL/min. The homogenous recombinant protein was dialyzed against buffer A. Fractions were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue and Silver Stain Kit (Bio-Rad).

2.6. SK activity assay:

SK activity was measured by the method of Jackson *et.al.* (1981) adapted by Couto et al. (2004), using chromozyme PL (Roche) as an artificial substrate. Human plasminogen (Roche) was activated by SKC at 37°C for 15 min and amyolytic activity of this complex was monitored at 405 nm after the addition of synthetic plasmin substrate, chromozyme PL. One unit was defined as the amount of enzyme activity that converts 1 μ mol of substrate per minute per mL. Euglobulin clot lysis assay was performed (Couto et al, 2004) using human thrombin (10 IU/mL) (Sigma). Blood was obtained by venipuncture from the antecubital vein

of healthy volunteer at rest, with minimum stasis. The turbidity in the wells was measured as absorbance at 340 nm. Both assays were performed using 96-well plates and absorbance was measured at every 30 s for 30 min using a SPECTRAmax M2 microplate spectrophotometer (Molecular Devices). The streptokinase was diluted to a concentration of 0.24 µg/mL, 0.64 µg/mL, 30 µg/mL and 720 µg/mL, and samples were measured in triplicate. In the euglobulin clot lysis assay, SKC was compared with the commercial streptokinase (Streptase 1500,000 – CSL Bering).

Colorimetric tests of homogeneous SKC was carried out by the Development of Tests and Pharmaceutics Assays Center (CTEFAR) of the Universidade Federal de Santa Maria, accredited by the National Agency for Sanitary Surveillance of Brazil. For colorimetric assay, the pharmaceutical streptokinase samples were diluted in 0.05 M Tris-HCl buffer solution pH 7.4, to final concentrations of 2.0 to 40.0 IU per millilitre (UI/mL). The 25 µl dilutions of streptokinase sample solution and the dilutions of the reference preparation were added to a 96-well plate at 37°C. The activation reaction was initiated by adding 50 µl of the reconstituted human plasminogen 1.5 mg (Chromogenix) to the wells. Then, 100 µl of the chromogenic substrate were added to S-2251 (25 mg (Chromogenix)) solution. For blank wells, 25 µl of 0.05 M Tris-HCl buffer solution pH 7.4 were used. The reaction was allowed to proceed at 37°C and was stopped after exactly 12 min by adding 90 µl of a 20% V/V solution of glacial acetic acid. The absorbance was measured at 405 nm in a microplate reader. The assay was performed in triplicate.

2.7. Analytical methods:

Samples were withdrawn periodically for quantitative analysis along the cultivation. Experiments were carried out in duplicates. Cell growth was monitored by measuring the

optical density at 600 nm in a spectrophotometer, calibrated against dry cell weight at 80°C to constant weight. One optical density unit was found to be equivalent to 0.449 g/L of dry cell weight. Glucose concentration in the medium was measured with a glucose analyzer (model 2700 select, Yellow Springs Instruments, USA). Acetate concentration was determined by high performance liquid chromatography (Äkta Purifier, GE, Sweden) equipped with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories, USA), using 0.005 M H₂SO₄ as mobile phase.

The plasmid stability was verified using the replica plating technique (Lederberg, J. and Lederberg, E.M., 1952). The protein expression was analyzed by SDS-PAGE 12% and densitometry to determine the best feeding medium, feeding strategy and induction time.

The SKC produced in this work and Streptase, was analyzed by Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad) to determinate the total protein and, by densitometry technique (Quantity One 4.6.6 software and GS-700 Imaging densitometer (Bio-Rad)) to quantify the streptokinase concentration. Bovine serum albumin was used as standard in the Bradford assay (Bradford, 1976).

Statistical analyses of the activity assay data were carried out according to Finney (1978), by parallel line methods (5 x 5), using PLA 2.0 Program (Stegmann System-Beratung, Rodgau, Germany). Analysis of variance was performed for each assay and the assumption of linearity and parallelism of the log dose-log response lines was tested (P<0.05).

3. Results and discussion

3.1. Cloning of *skc* and expression of recombinant SKC on shaker:

A PCR amplification product consistent with the expected size for the *S. equisimilis* *skc* (1431 bp) coding sequence was cloned into of pET-30a(+) expression vector (pET-30a(+):SKC). Automated DNA sequencing was carried out to both confirm the identity of the insert and ensure that no mutations were introduced by the PCR amplification step.

E. coli BL21(DE3) cells were transformed with the construct by electroporation. Analysis by SDS-PAGE (Fig. 1) showed the presence of the soluble recombinant protein, with an apparent molecular mass of 47 kDa, in the three tested media induced with IPTG, either at 30°C or 37°C. The SKC expression was also observed, in absence of IPTG induction, in TB and M9 media.

3.2. Bioreactor cultivation:

Since the SKC expression was not observed without IPTG induction in LB, this medium was chosen in order to facilitate the expression control in bioreactor cultivation. The adopted culture temperature was 30°C, as the use of growth temperatures lower than 37°C can reduce the nutrient uptake and growth rate, decreasing the formation of toxic by-products and the generation of metabolic heat (Lee, 1996).

In batch cultivation the maximum biomass production was approximately 1.72 g/L at 5 h of cultivation. The culture entered the stationary phase after stabilization of biomass. Therefore, this stage was selected to start the fed batch phase. The entire fed-batch phase was carried out at 30% DOC set point under restricted glucose supply.

The influence of five feeding media on growth parameters was studied (Table 2). The medium I showed statistically significant lower values in growth parameters when compared to other ones. This difference may be related to the absence of MgSO₄ (25g/L) in the feed-medium I, as all the other media contain this salt. The low growth of BL21(DE3) in the

absence of magnesium has already been reported by Studier (2005), who studied the components of both complex and defined media and their effect on growth and induction. Studier showed that the presence of 1 mM MgSO₄ in two different media caused an increase, of approximately 2-fold, in biomass.

Medium II was used in feeding strategy tests as it showed the best yields in biomass and productivity (14.17 ± 0.910 g/L and 0.706 ± 0.167 g/L.h, respectively) (Table 2), and because it is a simple media (Table 1).

The results of biomass and productivity showed on Table 3 were analyzed aiming at defining the most adequate feeding strategy to be used. The best results were obtained with linear feeding strategy. Even though the exponential feeding also achieved good results in biomass and productivity, accumulation of glucose was observed in the growth media (data not shown).

The combination of parameters for biomass production and SKC expression were evaluated to determine the best induction moment (Fig. 2, 3 and 4; Table 4). Induction at 6 h after the start of cultivation resulted in 12 g/L of biomass production. The cultures induced at 12 h and 24 h showed better results, both with approximately 19 g/L. Densitometry analysis (Table 4) revealed that the highest yields of SKC expression occurred when the culture was induced with 6 h (0.645 mg/mL) and 12 h (0.597 mg/mL), while in 24 h lower expression was observed. Considering the two results (biomass and expression) the best condition was achieved in the culture induced with 12 h. Possibly the cellular growth inhibition after induction occurs because the cells shift most of its energy to protein expression, which previously was used for growing.

Figure 5 shows the time course of biomass production, acetate formation, plasmid stability, and glucose consumed by *E. coli* BL21 (DE3), cultivated under linear feeding and

induced at 12 h of cultivation. The maximum biomass obtained and glucose consumed, in these conditions, were approximately 19 g/L and 60 g/L, respectively. The conversion rate of substrate in cells ($Y_{X/S}$) was 0.33 g_{cells}/g_{glucose}. The maximum acetate production was approximately 0.7 g/L in 30 h of cultivation. In the literature it is reported that values above 5 g/L at pH 7.0 reduces growth rate, biomass yield, and maximum attainable cell densities in HCDCs (Lee 1996). When *E. coli* is grown aerobically in the presence of excess glucose, acetate can be produced (Vollbrecht 1981, Varma et al. 1993, Holms 1996). In our work the acetate production was not significant in any of the conditions studied. Approximately 100% of viable cells retained recombinant plasmid along 30 h of cultivation. This plasmid maintenance occurred in all conditions tested in this study. This result may be related to the use of expression vector containing the kanamycin resistance gene, since other authors reported plasmid instability probably linked to rapid ampicillin degradation in fed-batch cultures (Ensley, 1984; Yee and Blanch, 1992, Friehs, 2004; Sorensen, 2005). Goyal et al. (2009) reported the production of recombinant streptokinase in *E. coli*, with ampicillin resistance gene, using fed-batch culture. Their results showed that only 20% of cells retained recombinant plasmid 2 hours post-induction, while most of the cells lost their recombinant plasmid at 5 hours post-induction.

3.3. Purification:

Table 5 and Figure 6 show the SKC purification results using a three-step protocol. The ammonium sulphate precipitation step resulted in 1.7-fold protein purification. Recombinant SKC in 0.8M ammonium sulfate was loaded on a Butyl Sepharose High Performance hydrophobic interaction column resulting in 33-fold protein purification. In a third step, pooled fractions, eluted in 0.392 M of ammonium sulphate from hydrophobic

interaction chromatography, were loaded on a HiLoad Q Sepharose High Performance column, from which homogeneous SKC eluted at approximately 0.145 M of NaCl, yielding approximately 108% of homogeneous SKC in solution. This 13.3-fold purification protocol yielded approximately 21.53 mg of homogeneous SKC from 2 g of wet weight cells. The remarkable increased yield over the course of purification can be attributed to a possible inhibition of SKC by any contaminant present in crude extract.

Other authors reported the streptokinase purification comprising hydrophobic interaction. Pupo et al. (1999) when using ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography and then hydrophobic interaction to purify SK reached 92% purity. Goyal et al, 2007 used hydrophobic interaction expanded bed absorption chromatography and ion exchange, yielding 63% recovery, and Balagurunathan and collaborators (2008) used a one-step hydrophobic interaction chromatography with non-linear gradient reached 68% recovery.

Table 5 shows the results of the purification steps, including determination of SKC specific activity with Chromozym PL measured using a SpectraMax M2 Spectrophotometer. The best specific activity was obtained with the sample eluted from the hydrophobic interaction chromatography. It was observed that the increase of the yield was proportional to the SKC dilution. This fact was confirmed using SKC in different dilutions, as showed in Figure 7. A similar behavior was reported by Boxrud and Bock (2004) in a kinetic study of the plasminogen activation by streptokinase. The authors observed the inhibition mechanism of plasmin formation by high SK concentration. The proteolytic cycle is inhibited by high SK concentration because of the dual role of Pg as the catalytic component of Pg*SK (Wang et al, 2008) and as substrate for this complex. At high SK concentration, proteolytic Pg activation is inhibited because the free Pg concentration is depleted by formation of the Pg*SK (Chibber et al, 1986; Boxrud et al 2000).

3.4. Evaluation of SK activity

In the colorimetric assay performed by CTEFAR, SKC exhibited 99% of specific activity compared to the Streptokinase Pharmaceutical International Standard sample. Hermentin et al (2005) compared sixteen different formulations of streptokinases commercialized in Brazil, India, Kingdom of Jordan, China, Pakistan, and Europe. Among these, three are recombinant streptokinases (Heberkinase (Cuba), STPase (India), and recombinant SK (China)). The measured activity was 37.2% for Heberkinase and 20.8% for STPase of the declared value when compared to the standard Streptase. The authors could not determine the activity of the recombinant SK from China as it produced abnormal reaction kinetics in the chromogenic assay. The European Pharmacopoeia (2002) demands a fibrinolytic activity of 90–111% of the declared value.

The analyses of euglobulin clot lysis assay results, calculated by absorbance variation per time, demonstrated no significant difference between SKC and Streptase.

5. Conclusions:

In this work we studied different fed batch cultures strategies aiming at obtaining high yields of biomass and productivity of streptokinase from *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* of the group C in *E. coli* cells. Linear feeding was the best culture condition achieved with the tested parameters showing the influence of feeding medium and induction time. A three-step purification protocol of the recombinant protein was devised. The results found in our work are extremely important for medicine products, since this protein is the drug of choice for thrombolytic treatment. Further efforts will aim at the scaling-up of the process, reducing the costs of production and its applications.

References:

- Balagurunathan, B., Ramchandra, N.S., Jayaraman, G., 2008. Enhancement of stability of recombinant streptokinase by intracellular expression and single step purification by hydrophobic interaction chromatography. *Biochemical Engineering Journal*. 39, 84-90.
- Banerjee, A., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2004. Streptokinase- a clinical useful thrombolytic agent. *Biotechnology Advances*. 22, 287-307.
- Boxrud, P.D., Fay, W.P., Bock, P.E., 2000. Streptokinase binds to human plasmin with high affinity, perturbs the plasmin active site, and induces expression of an a substrate recognition exosite for plasminogen. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 14579-14589.
- Boxrud, P.D., Bock P.E., 2004. Coupling of conformational and proteolytic activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 35, 36642-36649.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7, 248-254.
- Chibber, B.A.K., Radek, J.T., Morris, J.P., Castellino, F.J., 1986. Rapid formation of an anion-sensitive active site in stoichiometric complexes of streptokinase and human [Glu] plasminogen. *Biochemistry*. 83, 1237-1241.
- Choi, J.H., Ryu, Y.W., Park, Y.C., Seo, J.H., 2009. Synergistic effects of chromosomal ispB deletion and dxs overexpression on coenzyme Q10 production in recombinant

- Escherichia coli* expressing *Agrobacterium tumefaciens dps* gene. *Journal of Biotechnology*. 144, 64-69.
- Couto, L.T., Donato, J.L., Nucci, G., 2004. Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and the plasminogen activation assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37, 1889-1894.
- Ensley, B.D., 1984. Stability of recombinant plasmids in industrial microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*. 4, 263–277.
- European Pharmacopoeia, 4th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines – Council of Europe. Strasbourg: EDCM; 2002.
- Finney, D.J.: *Statistical methods in biological assay*. Charles Griffin: London, 1978.
- Friehs, K., 2004. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 86, 47–82.
- García-Arrazola, R., Siu, S.C., Chan, G., Buchanan, I., Doyle, B., Titchener-Hooker, N., Baganz, F., 2005. Evaluation of a pH-stat feeding strategy on the production and recovery of Fab' fragments from *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 23, 221–230.
- Goyal, D., Sahoo, D.K., Sahni, G., 2007. Hydrophobic interaction expanded bed adsorption chromatography (HI-EBAC) based facile purification of recombinant streptokinase from *E. coli* inclusion bodies. *Journal of Chromatography B*. 850, 384-391.
- Goyal, D., Sahni, G., Sahoo, D.K., 2009. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*. 100, 4468-4474.

- Hermentin, P., Cuesta-Linker, T., Weisse, J., Schmidt, K.H., Knorst, M., Scheld, M., Thimme, M., 2005. Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations. *European Heart Journal*. 26, 933-40.
- Holms, H., 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Rev.* 19, 85–116.
- Jackson, K.W., Esmon, N., Tang, J.: Streptokinase and Staphylokinase (1981), in *Methods Enzymol.* Vol. 80, 387–394.
- Jeong, K.J., Choi, J.H., Yoo, W.M., Keum, K.C., Yoo, N.C., Lee, S.Y., Sung, M.H., 2004. Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant rpoS-*Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 36, 150-156.
- Khalilzadeh, R., Shojaosadati, A.S., Bahrami, A., Maghsoudi, N., 2003. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 25, 1989–1992.
- Khalilzadeh, R., Mohammadian-Mosaabadi, J., Bahrami, A., Nazak-Tabbar, A., Nasiri-Khalili, M.A., Amouheidari, A., 2008. Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35, 1643–1650.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, Y.K., Chang, H. N., 2004. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 26, 147-150.

- Krause, M., Ukkonen, K., Haataja, T., Ruottinen, M., Glumoff, T., Neubauer, A., Neubauer, P., Vasala, A., 2010. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories*. 9,11.
- Kunamneni, A., Abdelghani, T.T.A., Ellaiah, P., 2007. Streptokinase- the drug of choice for thrombotic therapy. *Journal of Thrombosis Thrombolysis*. 23, 9-23.
- Lederberg, J., Lederberg, E.M., 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*. 63, 399-406.
- Lee, S.Y., 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 3, 98-105.
- Pupo, E., Baghbaderane, B.A., Lugo, V., Fernandez, J., Paez, R., Torrens, I., 1999. Two Streptokinase genes are expressed with different solubility in *Escherichia coli* W3110. *Biotechnology Letters*. 21, 1119-1123.
- Ramalingam, S., Gautam, P., Mukherjee, K.J., Jayaraman, G., 2007. Effects post-induction feed strategies on secretory production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 33, 34-41.
- Sambrook, J. and Russel, D.W., 2001; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Vol. 3, Cold Spring Harbor, New York.
- Sorensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 115, 113–128.

- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 41, 207–234.
- Tabandeh, F., Shojaosadati, S.A., Zomorodipour, A., Khodabandeh, M., Sanati, M.H., Yakhchali, B., 2004. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 26, 245–250.
- Varma, A., Boesch, B.W., Palsson, B.O., 1993. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Applied Environmental Microbiology*. 59, 2465–73.
- Vollbrecht, D., 1982. Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 15, 111–6.
- Wang, X., Lin, X., Loy, J.A., Tang, J., Zhang, X.C., 1998. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase. *Science*. 281, 1662-1665.
- Yee, L., Blanch, H.W., 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia Coli*. *Nature Biotechnology*. 10, 1550-1556.

Figure:

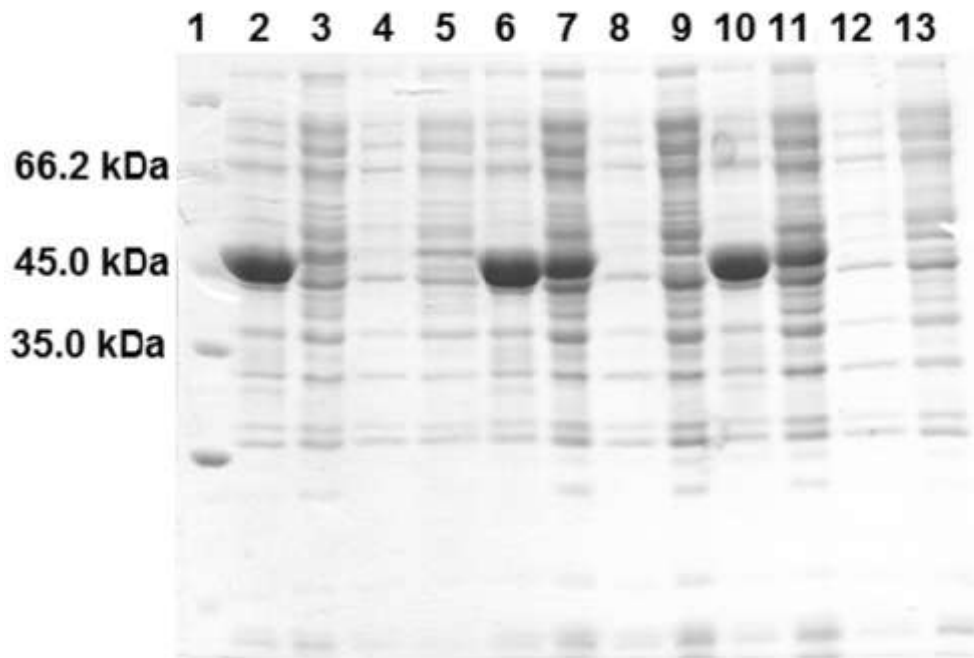


Figure 1 - SDS-PAGE analysis of soluble SKC expression at 6h of growth, in shaker. Lane 1 – protein marker; lanes 2-5: LB medium, lanes 6-9: TB medium and, lanes 10-13: M9 medium; lanes 2, 6, 10 – induced SKC; lanes 3, 7, 11 – SKC without induction; lanes 4, 8, 12 – induced control; lanes 5, 9, 13 – control without induction. The predicted molecular mass of SKC is 47 kDa.

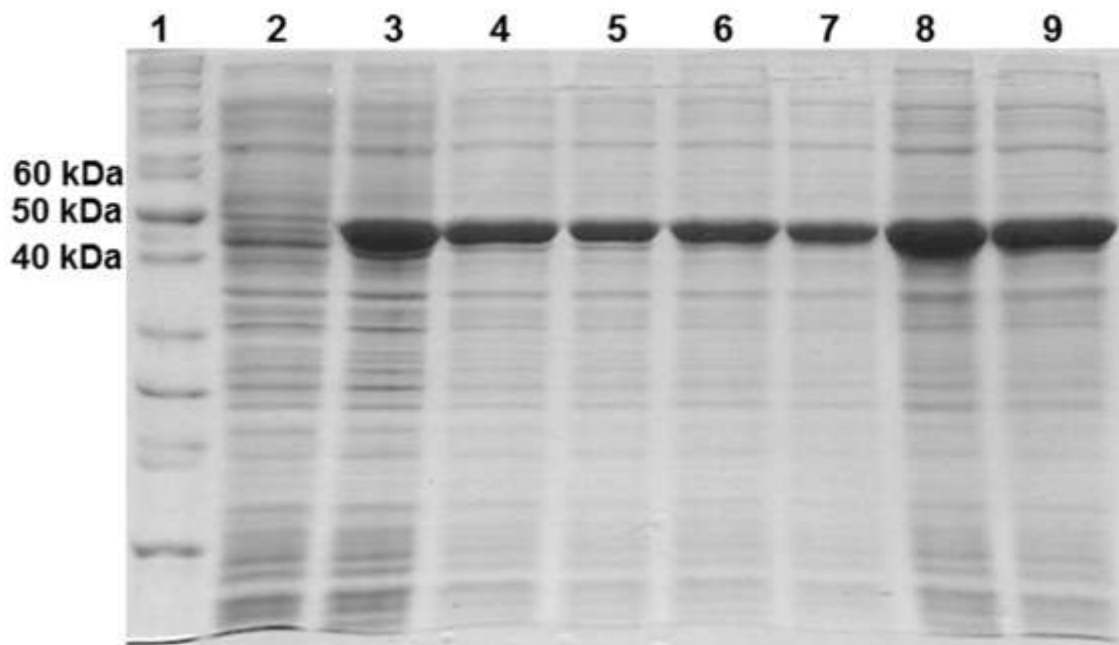


Figure 2 - SDS-PAGE analyses of soluble SKC expression in bioreactor with induction time of 6 h. Lane 1: protein marker; lanes 2-9: samples with 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 22 h, 26 h, and 30 h of cultivation, respectively. The predicted molecular mass of SKC is 47 kDa.

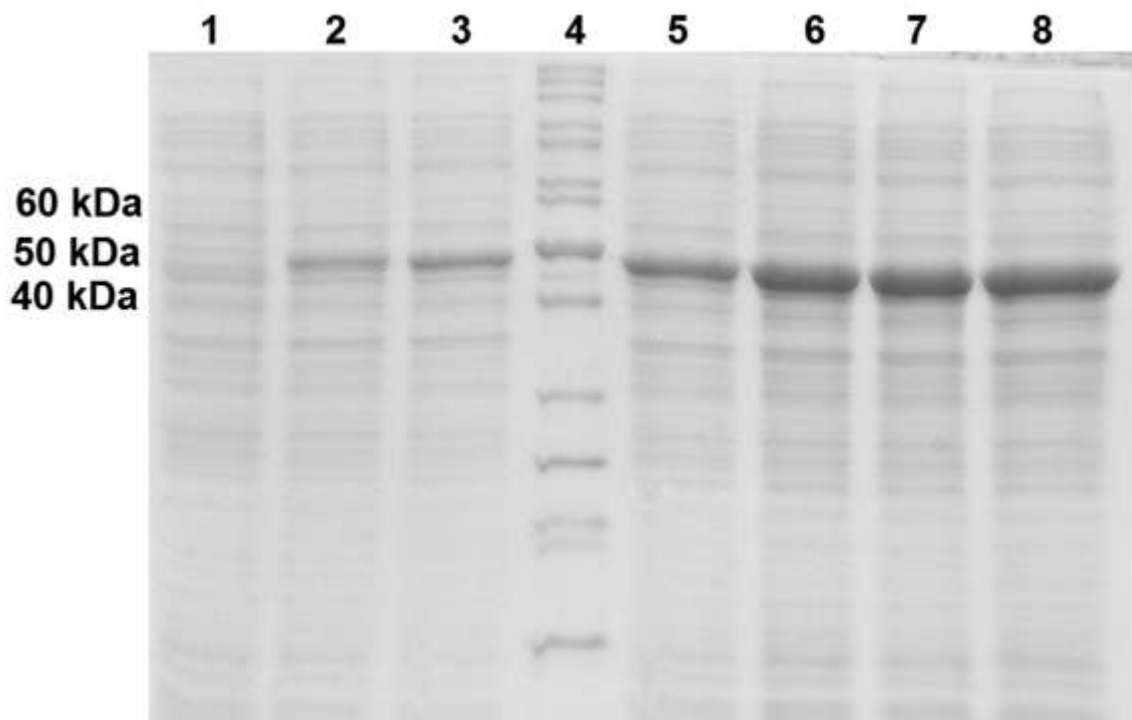


Figure 3 - SDS-PAGE analysis of soluble SKC expression in bioreactor with induction time of 12h. Lanes 1-3 and 5-8: samples with 12 h, 15 h, 18 h, 21 h, 24 h, 27 h, and 30 h of cultivation, respectively; lane 4: protein marker. The predicted molecular mass of SKC is 47 kDa.

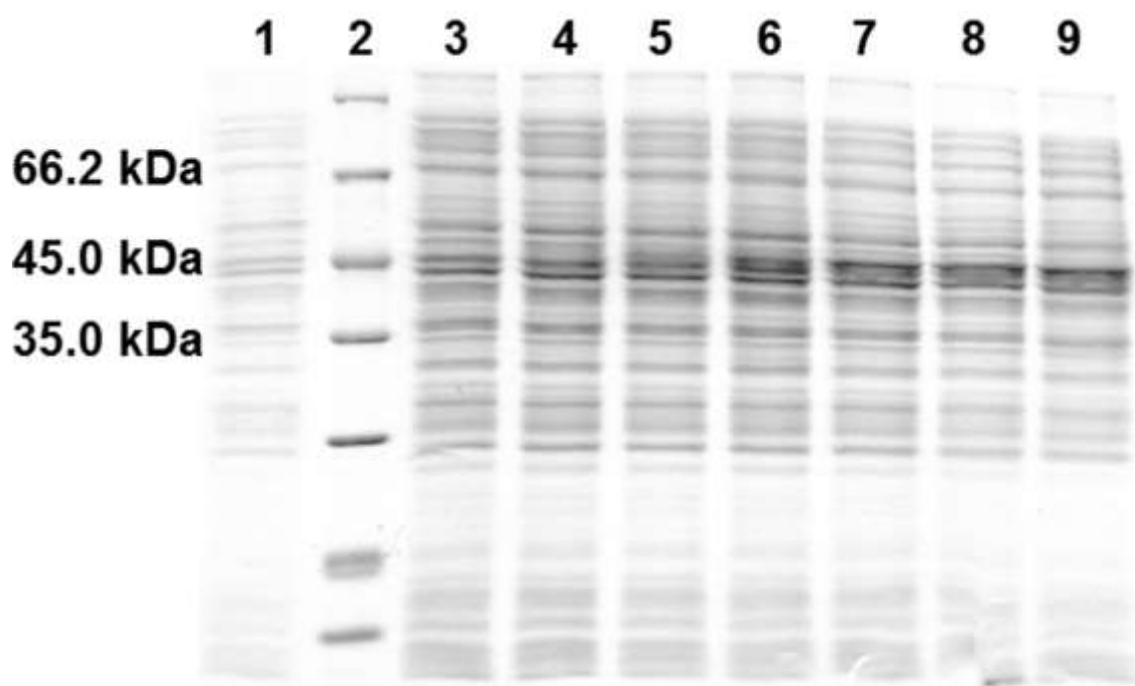


Figure 4 - SDS-PAGE analysis of soluble SKC expression in bioreactor with induction time of 24h. Lane 1 and 3-9: samples of 23 h, 24 h, 25 h, 26 h, 27 h, 28 h, 29 h and 30 h of cultivation; lane 2: protein marker. The predicted molecular mass of SKC is 47 kDa.

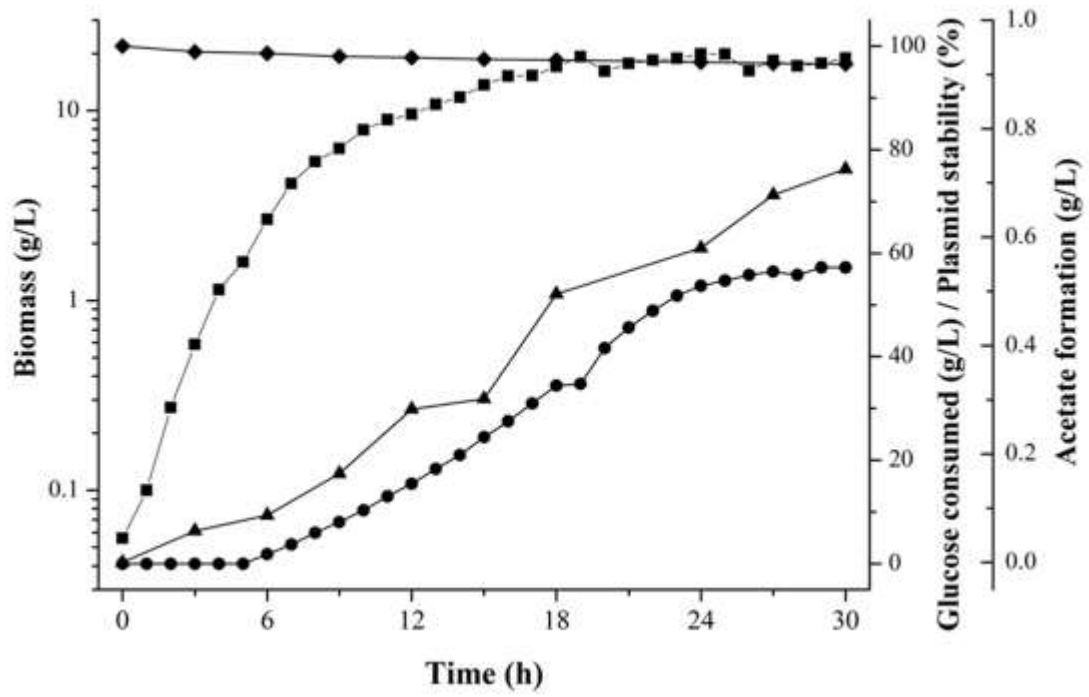


Figure 5 - Biomass, consumed glucose, plasmid stability and acetate formation data per cultivation time. Biomass (■); Glucose consumed (●); Plasmid stability (◆); Acetate formation (▲).

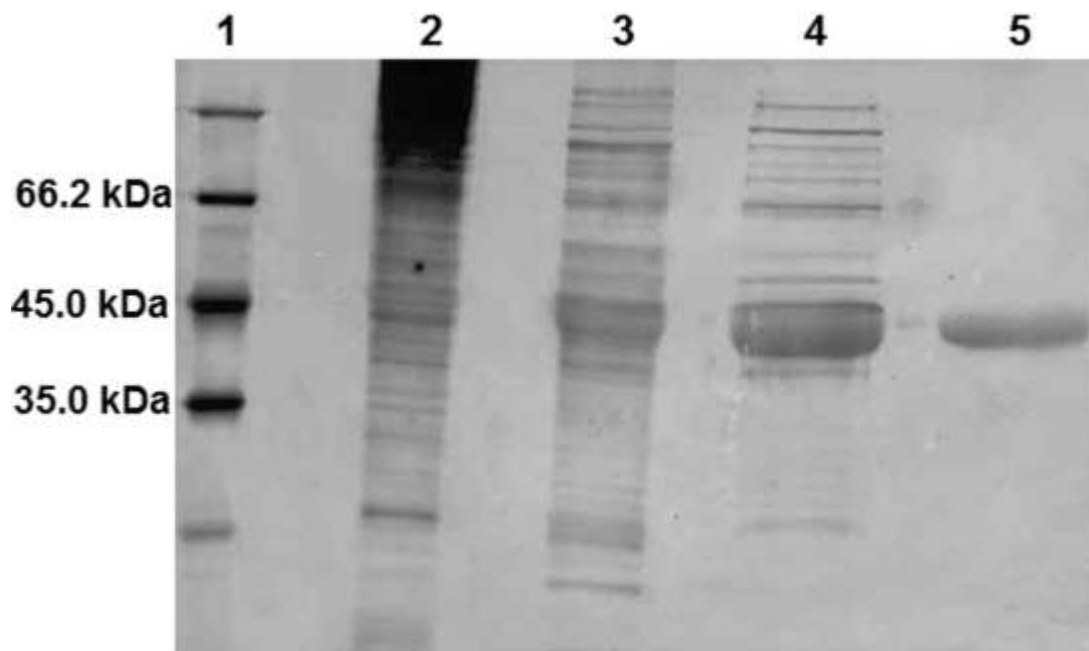


Figure 6 - SDS-PAGE of SKC purification steps, stained with silver. Lane 1: molecular marker; lane 2: crude extract; lane 3: sample after ammonium sulfate precipitation; lane 4: sample eluted from Butyl Sepharose HP column; lane 5: homogeneous SKC eluted from Q Sepharose HP column. The predicted molecular mass of SKC is 47 kDa.

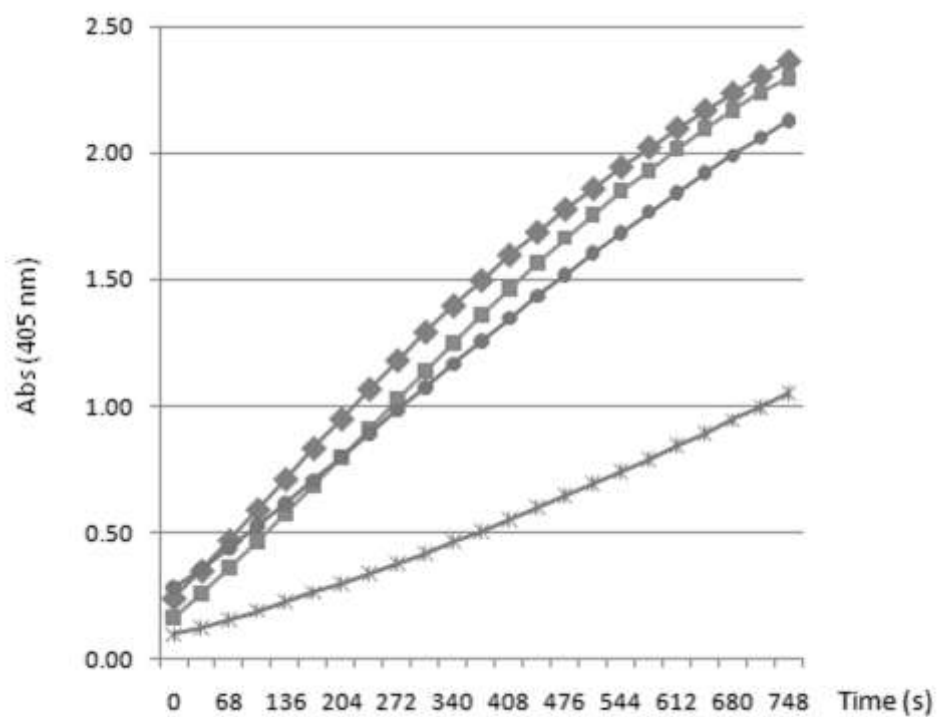


Figure 7 – Variation of absorbance per time with different SKC concentrations. SKC 0.24 µg/mL (♦); SKC 0.64 µg/mL (■); SKC 30 µg/mL (●) and SKC 720 µg/mL (*).

Table 1. Quantity of additives in different feed media

Medium	LB (x)	Glucose (g/L)	MgSO₄ (g/L)	Yeast Extract (g/L)	Tryptone (g/L)
I	2	400	-	-	-
II	-	400	25	-	-
III	1	400	25	-	-
IV	-	400	25	10	-
V	-	400	25	-	10

Table 2. Influence of the feeding media on growth parameters

Feeding media	Biomass (g/L)	Y x/s	μ (h⁻¹)	P (g/L.h)
I	3.65 ± 0.240 ^b	0.08 ± 0.005 ^b	0.063 ± 0.003	0.074 ± 0.008 ^b
II	14.17 ± 0.910 ^a	0.34 ± 0.040 ^a	0.076 ± 0.005	0.706 ± 0.167 ^a
III	13.62 ± 0.790 ^a	0.27 ± 0.030 ^a	0.071 ± 0.008	0.516 ± 0.075 ^a
IV	12.66 ± 0.150 ^a	0.33 ± 0.040 ^a	0.059 ± 0.004	0.489 ± 0.038 ^a
V	12.88 ± 0.520 ^a	0.36 ± 0.060 ^a	0.064 ± 0.004	0.496 ± 0.022 ^a

^{a, b} same letters represent values no statistical difference.

Conversion rate of substrate in cells ($Y_{x/s}$)

Specific velocity of growth (μ)

Productivity (P)

Table 3. Influence of feeding strategies on biomass and productivity of cultivation

Feeding strategies	Biomass (g/L)	Productivity (g/L.h)
DO-stat	14.16 ± 0.920 ^b	0.55 ± 0.060
pH-stat	6.71 ± 0.690 ^c	0.43 ± 0.100
Exponential	16.45 ± 0.410 ^{ab}	0.58 ± 0.017
Linear	19.66 ± 0.400 ^a	1.01 ± 0.144

a, b, c same letters represent values no statistical difference.

Table 4. Influence of induction time on biomass and expression of recombinant protein

Induction time	Biomass (g/L)	SKC (mg/mL)
6 h	12.17 ± 0.380	0.645 ± 0.061
12 h	19.34 ± 0.740	0.597 ± 0.048
24 h	19.65 ± 0.390	0.083 ± 0.079

Table 5. Purification of SKC from *E. coli* BL21(DE3)

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	263.40	4180.00	15.86	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	82.47	2217.70	26.89	1.7	53
Butyl Sepharose HP	31.70	16602.96	523.75	33.0	397
HiLoad Q HP	21.53	4538.52	210.80	13.3	108

*Protein activity measured by colorimetric method with chromozym PL substrate and in SpectraMax M2 Spectrophotometer.

5. Considerações Finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

SKC foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) na fração solúvel com aparente massa molecular de 47 kDa a 30 e 37°C em meio LB, TB e M9, com a indução de IPTG, sendo que em TB e M9 a expressão também ocorreu sem a indução de IPTG. Para os cultivos em biorreator, utilizamos meio LB para um melhor controle da expressão por indução, em temperatura de 30°C, pois o uso de temperaturas abaixo de 37°C pode reduzir a absorção de nutrientes e a razão de crescimento, diminuindo a formação de produtos tóxicos e a geração de calor metabólico (Lee, 1996).

Testamos a influência de cinco diferentes meios de alimentação sobre os parâmetros de crescimento (biomassa, velocidade de crescimento, produtividade e conversão de substrato em células) e encontramos uma diferença significativa entre o meio com ausência de sal para os outros meios que continham MgSO₄. O baixo crescimento de células BL21(DE3) na ausência de magnésio já havia sido reportado por Studier (2005), que estudou o efeito dos componentes de meios complexos e definidos sobre o crescimento e a indução. Studier mostrou que a presença de 1 mM MgSO₄ nos dois diferentes meios levaram ao aumento da biomassa em aproximadamente duas vezes.

O meio de alimentação contendo glicose (400 g/L) e MgSO₄ (25 g/L) foi o meio utilizado para os testes de estratégias de alimentação, pois apresentou os melhores resultados de biomassa e produtividade. Além disso, o crescimento de *E. coli* pode ser inibido quando alguns nutrientes estão presentes em determinadas concentrações na cultura (Lee, 1996) e este foi o meio mais simples utilizado.

Os testes para definir a melhor estratégia de alimentação, entre DO-stat, pH-stat, linear ascendente e exponencial para SKC, levaram em consideração os valores de biomassa e produtividade obtidos. Os melhores resultados foram alcançados com uma estratégia de alimentação linear ascendente, embora a estratégia exponencial também tenha mostrado bons resultados para estes dois parâmetros. Na estratégia exponencial foi observado um acúmulo acentuado de glicose ao final dos cultivos no meio de crescimento.

O sistema T7, presente no vetor utilizado, tem a habilidade de render altos níveis de expressão, mas para isso requer que as células sejam induzidas na metade da sua fase exponencial de crescimento. A indução dos genes clonados sob o promotor T7 reduz

significativamente a razão de crescimento específico das células recombinantes, o que pode resultar em conseqüente baixa da concentração do produto por mL de cultura. Em contraste, a indução no final da fase exponencial de crescimento pode compensar a baixa expressão pela alta concentração de biomassa, levando a um significativo aumento na concentração protéica da cultura (Ramalingam *et al* 2007, Yazdani and Mukherjee 1998).

A combinação dos parâmetros de produção de biomassa e expressão da proteína SKC foi considerada para determinar o melhor momento para a indução do cultivo. Quando o cultivo foi realizado 6 h após o seu início, a biomassa produzida foi em torno de 12 g/L. As culturas induzidas com 12 e 24 h mostraram melhores resultados, em torno de 19 g/L. As análises de densitometria revelaram que altos rendimentos de SKC ocorreram quando a cultura foi induzida com 6 h (0,645 mg/mL) e 12 h (0,597 mg/mL). Quando a indução foi realizada com 24 h de cultivo, uma perda na expressão de SKC (0,083 mg/mL) foi observada. Considerando os resultados de biomassa e expressão, a melhor condição foi encontrada na cultura induzida com 12 h de cultivo, o que leva em consideração os achados de Yazdani and Mukherjee (1998), de que a combinação de concentração de biomassa com altos níveis de expressão levam a um significativo aumento na concentração de proteína na cultura.

O cultivo com alimentação linear e induzido após 12 h mostrou uma biomassa máxima e um consumo de glicose em torno de 19 g/L e 60 g/L, respectivamente. A razão de conversão de substrato em células foi 0,33 g de células/g de glicose. A máxima produção de acetato foi aproximadamente 0,7 g/L em 30 h de cultivo. Na literatura é reportado que valores ao redor de 5 g/L a pH 7.0 reduzem a razão de crescimento, o rendimento de biomassa e a máxima densidade celular alcançável em HCDCs (Lee 1996). Quando células de *E. coli* são crescidas em condições aeróbias, na presença de excesso de glicose, somente acetato é produzido (Vollbrecht 1981, Varma *et al.* 1993, Holms 1996). Em nosso trabalho, a produção de acetato não foi significativa em nenhuma condição estudada. Aproximadamente 100% das células viáveis continham o plasmídeo recombinante após 30 h de cultivo, fato que se repetiu em todas as condições testadas em nosso estudo. Este resultado pode estar relacionado com o uso de um vetor de expressão que contém um gene de resistência a canamicina, já que outros autores descreveram a provável ligação da instabilidade plasmidial com a rápida degradação da ampicilina em culturas de batelada alimentada (Ensley, 1984; Yee and Blanch, 1992). Goyal *et al.* (2009), observou a produção de estreptoquinase recombinante em células de *E. coli*, com vetor contendo o gene de resistência a ampicilina, usando cultura em batelada

alimentada. Seus resultados mostraram que somente 20% das células retinham o plasmídeo recombinante após duas horas da indução, e que a maioria das células havia perdido o plasmídeo 5 horas após a indução.

A purificação de SKC foi iniciada com a precipitação com sulfato de amônio resultando em um fator de purificação de 1,7 vezes. Após esta etapa, a proteína foi aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica (*Butyl Sepharose High Performance*) que mostrou um fator de purificação de 33 vezes. Na terceira etapa da purificação, a amostra foi eluída em aproximadamente 0,392 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e aplicada em uma coluna de troca iônica (*HiLoad Q Sepharose High Performance*). A proteína homogênea eluiu em aproximadamente 0,145 M de NaCl, rendendo em torno de 108 % de SKC homogênea em solução. O protocolo de purificação produziu 21,53 mg de proteína homogênea a partir de 2 g de célula úmida. É possível notar que o rendimento da SKC aumentou no decorrer da purificação, o que pode estar relacionado com a inibição desta proteína recombinante por alguns contaminantes presentes no extrato bruto. Foi possível observar que as amostras de SKC que estavam mais diluídas obtiveram os melhores resultados de atividade específica, caso da amostra que eluiu da etapa de interação hidrofóbica. Este fato foi confirmado pelo ensaio colorimétrico de atividade que realizamos com SKC em diferentes diluições. Isto também foi observado por Boxrud e Bock (2004) em um estudo cinético sobre a ativação do plasminogênio pela estreptoquinase, no qual, ocorreu a inibição da formação de plasmina na presença de altas concentrações de estreptoquinase, o ciclo proteolítico é inibido por altas concentrações de estreptoquinase devido ao duplo papel do plasminogênio, como componente catalítico do Plg^*SK e como substrato deste complexo, em altas concentrações de SK, a ativação proteolítica do plasminogênio é inibida porque há a diminuição do Plg livre para a formação do complexo Plg^*SK (Chibber et al, 1986; Boxrud et al 2000).

Outros autores já descreveram a purificação da estreptoquinase utilizando a técnica de interação hidrofóbica. Pupo e colaboradores (1999) utilizaram precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e, então, interação hidrofóbica, obtendo um grau de pureza em torno de 92 %. Goyal e colaboradores (2007) usaram cromatografia de absorção por interação hidrofóbica em leito expandido e troca iônica, obtendo um rendimento de 63 %, Balagurunathan e colaboradores (2008) usaram uma etapa cromatográfica de interação hidrofóbica com um gradiente não linear obtendo 68% de rendimento.

Amostras da SKC homogênea foram enviadas para realização de teste colorimétrico realizado pelo professor Sérgio Dalmora, no Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos (CTEFAR) situado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Farmácia Industrial (DFI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), credenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para realização deste ensaio. A atividade da SKC neste ensaio colorimétrico apresentou aproximadamente 99 % da atividade do Padrão Internacional. Hermentin *et al* (2005) comparou dezesseis diferentes formulações de estreptoquinases comercializadas no Brasil, na Índia, Jordânia, China, Paquistão e Europa. Destas dezesseis, três eram estreptoquinases recombinantes: Heberkinase (Cuba), STPase (Índia), e SK recombinante (China). Os resultados de atividade foram de 37.2% para Heberkinase e 20.8% para STPase da atividade declarada quando comparadas com a padrão Streptase. A atividade da SK chinesa não pôde ser determinada, pois ela produziu uma reação anormal no ensaio cinético do teste colorimétrico. A Farmacopéia Européia exige uma atividade fibrinolítica de 90 a 111 % do padrão (European Pharmacopoeia, 2002).

Outro ensaio realizado para análise da atividade de SKC foi o de lise do coágulo de euglobulina, que foi calculado através da variação da absorbância pelo tempo. Neste teste, não obtivemos diferença significativa entre os resultados da SKC e da amostra de estreptoquinase comercial (Streptase 1.500.000 UI - CSL Behring).

Neste trabalho, foram estudadas diferentes estratégias de batelada alimentada, visando altos rendimentos de biomassa e produtividade da proteína estreptoquinase de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* do grupo C em células de *E. coli*. A alimentação linear foi a melhor condição de cultivo para a produção da proteína recombinante. Também demonstrou-se a importância do meio de alimentação e do tempo de indução na biomassa e expressão de SKC. Determinamos o protocolo de purificação em três etapas.

É interessante ressaltar que os resultados obtidos neste estudo são extremamente importantes para a produção nacional deste agente trombolítico bem como sua utilização na medicina. Outros estudos são necessários para o escalonamento do processo, reduzindo os custos de produção e suas aplicações.

Referências

REFERÊNCIAS

- BALAGURUNATHAN, B., RAMCHANDRA, N.S., JAYARAMAN, G., 2008. Enhancement of stability of recombinant streptokinase by intracellular expression and single step purification by hydrophobic interaction chromatography. **Biochemical Engineering Journal**. 39, 84-90.
- BANERJEE, A., CHISTI, Y. BANERJEE, U. C., 2004. Streptokinase- a clinical useful thrombolytic agent. **Biotechnology Advances**. 22, 287-307.
- BARUAH, B. D., DASH, R.N., CHAUDHARI, M.R., KADAM, S.S., 2006. Plasminogen activators: a comparison. **Vascular Pharmacology**. 44, 1-9.
- BENTLEY, W.E., DAVIS, R.H., KOMPALA, D.S., 1991. Dynamics of CAT expression in *E. coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. 38, 749-760.
- BOXRUD, P.D., FAY, W.P., BOCK, P.E., 2000. Streptokinase binds to human plasmin with high affinity, perturbs the plasmin active site, and induces expression of an a substrate recognition exosite for plasminogen. **The Journal of Biological Chemistry**. 275, 14579-14589.
- BOXRUD, P.D., BOCK P.E., 2004. Coupling of conformational and proteolytic activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase. **The Journal of Biological Chemistry**. 35, 36642-36649.
- CASTELLINO, F. J., 1981. Recent advances in chemistry of the fibrinolytic system. **Chemical Reviews**. 81, 431-446.
- CHIBBER, B.A.K., RADEK, J.T., MORRIS, J.P., CASTELLINO, F.J., 1986. Rapid formation of an anion-sensitive active site in stoichiometric complexes of streptokinase and human [Glu] plasminogen. **Biochemistry**. 83, 1237-1241.
- CHRISTENSEN, L. R., 1945. Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. **Journal of General Physiology**. 28, 363-383.

- COVIC, A, KUHLMANN, M. K., 2007. Biosimilars: recent developments. **International Urology and Nephrology**. 39, 261-266.
- DATASUS, Banco de Dados. **Indicadores e Dados Básicos - Brasil**, 2009. Disponível em <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acessado em 22 de Janeiro de 2011.
- ENSLEY, B.D., 1984. Stability of recombinant plasmids in industrial microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**. 4, 263–277.
- ESCOSTEGUY, C. C. PORTELA, M.C., MEDRONHO, R.A., VASCONCELLOS, M.T.L., 2003. Infarto agudo do miocárdio: perfil clínico-epidemiológico e fatores associados ao óbito hospitalar no município do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 80, 593-599.
- ESTRADA M.P., 1992. Recombinant streptokinase for the treatment of thrombotic disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 667, 424-7.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4^a Edition. European Directorate for the Quality of Medicines – **Council of Europe**. Strasbourg: EDCM; 2002.
- FRIEHS, K., 2004. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 86, 47–82.
- GISSI- Grupo italiano per lo studio della streptochinase nell' infarto miocárdico, 1988. Effectiveness of intravenous thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. **Lancet**. 1, 397-402.
- GOYAL, D., SAHOO, D.K., SAHNI, G., 2007. Hydrophobic interaction expanded bed absorption chromatography (HI-EBAC) based facile purification of recombinant streptokinase from *E. coli* inclusion bodies. **Journal of Chromatography B**. 850, 384-391.
- GOYAL, D., SAHNI, G., SAHOO, D.K., 2009. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. **Bioresource Technology**. 100, 4468-4474.

- HARCUM, S.W., BENTLEY, W.E., 1993. Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDA proteases in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**. 42, 675-685.
- HERMENTIN, P., CUESTA-LINKER, T., WEISSE, J., SCHMIDT, K.H., KNORST, M., SCHELD, M., THIMME, M., 2005. Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations. **European Heart Journal**. 26, 933-40.
- HERNÁNDEZ, L., MARRERO, M.A., 2005. Streptokinase: about of a thrombolytic patented in Cuba. **Biotechnologia Aplicada**. 22,191-198.
- HOLMS, H., 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Rev**. 19, 85–116.
- KIM, D. M., Lee, S.J., Kim I.C., Kim, T.S., Byum, S.M., 2000. Asp41-His48 Region of Streptokinase Is Important in Binding to a Substrate Plasminogen. **Thrombosis Research**. 99, 93-98.
- KIM, B.S., LEE, S.C., LEE, S.Y., CHANG, Y.K., CHANG, H. N., 2004. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 26, 147-150.
- KOSINSKI, M.J., BAILEY, J.E., 1991. Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal/3-galactosidase in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 18, 55-68.
- KOSINSKI, M.J., RINAS, U., BAILEY, J.E., 1992. Isopropyl-13-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**. 36, 782-784.
- KRAUSE, M., UKKONEN, K., HAATAJA, T., RUOTTINEN, M., GLUMOFF, T., NEUBAUER, A., NEUBAUER, P., VASALA, A., 2010. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. **Microbial Cell Factories**. 9, 11.
- KUHLMANN, M, COVIC, A., 2006. The protein science of biosimilars. **Nephrol Dial Transplant**. 5, 4-8.

- KUNAMNENI, A., ABDELGHANI, T. T. A., ELLAIAH, P., 2007. Streptokinase- the drug of choice for thrombolytic therapy. **Journal of Thromb Thrombolysis**. 23, 9-23.
- LÄHTEENMÄKI, K., KUUSELA, P., KORHONEN, T. K., 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiology Reviews**. 25, 531-552.
- LANCEFIELD, R. C., 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *Streptococci*. **The Journal of Experimental Medicine**. 57, 571-95.
- LEE, S.Y., 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, 3, 98-105.
- LIZANO, S., JOHNSTON, K. H., 2005. Strutral Diversity of Streptokinase and Activation of Human Plasminogen. **Infection and Immunity**. 4451-4453.
- LOY, A. J, LIN, X., SCHENONE, M., CASTELLINO, F.J., ZHANG, X.C., TANG, J., 2001. Domain Interactions between Streptokinase and Human Plasminogen. **Biochemistry**. 40, 14686-14695.
- MALKE, H. STEINER, K., GASE, K., MECHOLD, U., ELLINGER, T., 1995. The streptokinase gene: allelic variation, genomic environment, and expression control. **In: Genetics of streptococci, enterococci and lactococci**. Ferreti, J. J., Gilmore, M. S., Klaenhammer, T. R, Brown, F. eds. p:183-193, Karger, Basel..
- MELO, E. C. P., CARVALHO, M. S., TRAVASSOS, C., 2006. Distribuição espacial da mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 22, 1225-1236.
- PUPO, E., BAGHBADERANE, B.A., LUGO, V., FERNANDEZ, J., PAEZ, R., TORRENS, I., 1999. Two Streptokinase genes are expressed with different solubility in *Escherichia coli* W3110. **Biotechnology Letters**. 21, 1119-1123.
- RAMALINGAM, S., GAUTAM, P., MUKHERJEE, K.J., JAYARAMAN, G., 2007. Effects post-induction feed strategies on secretory production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**. 33, 34-41.

- SARMENTO-LEITE, R., KREPSKY, A. M. GOTTSCHALL, A. M., 2001. Infarto agudo do miocárdio. Um século de história. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 77, 593-601.
- SCHELLEKENS, H., 2004. How similar do 'biosimilars' need to be? **Nature Biotechnology**. 22, 1357-1359.
- SHI, G. Y., CHANG, B.I., CHEN, S.M., WU, D.H., WU, H.L., 1994. Function of streptokinase fragments in plasminogen activation. **Biochemistry Journal**. 304, 235-241.
- SHILOACH, J., FASS, R. 2005. Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**. 23, 345–357.
- SORENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 115, 113–128.
- SPADA, S., WALSH G., 2005. Directory of approved biopharmaceutical products. Boca Raton London New York Washington, DC: CRC press.
- STUDIER, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**. 41, 207–234.
- VANDAMME, P., POT, B., FALSEN, E., KERSTERS, K., DEVRIESE, L.A., 1996. Taxonomic Study of Lancefield Streptococcal Groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and Proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 774-781.
- VARMA, A., BOESCH, B.W., PALSSON, B.O., 1993. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. **Applied Environmental Microbiology**. 59, 2465–73.
- VASALA, A., PANULA, J., BOLLOK, M., ILLMANN, L., HALSIG, C., NEUBAUER, P., 2006. A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. **Microbial Cell Factors**, 5:8.

- VIOLAND, B. N., CASTELLINO J. F., 1976. Mechanism of the Urokinase-catalyzed Activation of Human Plasminogen. **The Journal of Biological Chemistry**. 251, 3906-3912.
- VOLLBRECHT, D., 1982. Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. 15, 111–6.
- WANG, X., LIN, X., LOY, J. A., TANG, J., ZHANG, X.C., 1998. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase. **Science**. 281, 1662.
- WANG, X. TANG, J., HUNTER, B., ZHANG, X.C., 1999. Crystal structure of streptokinase β -domain. **FEBS Letters**. 459, 85-89.
- WANG, X., INAPAGOLLA, R., KANNAN, S., LIEH-LAI, M., KANNAN, R.M., 2007. Synthesis, Characterization, and in vivo Activity of Dendrimer – Streptokinase Conjugates. **Bioconjugate Chem**. 18, 791-799.
- WEISEL, J. W., NAGASWAMI, C., KORSHOLM, B., PETERSEN, L.C., SUENSON, E., 1994. Interactions of Plasminogen with Polymerizing Fibrin and its Derivatives, Monitored with a Photoaffinity Cross-linker and Electron Microcopy. **Journal of Molecular Biology**. 235, 1117-1135.
- WU, X-C ,YE, R., DUAN, Y., WONG, S-L., 1998. Engineering of plasmin-resistnt forms of streptokinase and their production in *Bacillus subtilis*: streptokinase with longer functional half-life. **Applied and Environmental Microbiology**. 64, 824-829.
- YAZDANI, S.S., MUKHERJEE, K.J., 1998. Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy. **Biotechnology Letters**. 20, 923-927.
- YEE, L., BLANCH, H.W., 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia Coli*. **Nature Biotechnology**. 10, 1550-1556.
- YOUNG, K. C., SHI G.I., WU D.H., CHANG, L.C., CHANG, B.I., PEI OU, C., WU, H.L. , 1998. Plaminogen activation by streptokinase via a unique mechanism. **Journal of Biological Chemistry**. 273, 3110-3116.

ZHAI, P., WAKEHAM, N., LOY, J.A., ZHANG, X.C., 2003. Functional roles of streptokinase C-terminal flexible peptide in active site formation and substrate recognition in plasminogen activation. **Biochemistry**. 42, 114-20.

Anexos

ANEXO I

Seqüência de nucleotídeos depositada no banco de dados do GenBank

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis*

Grupo C

GenBank: **HQ629621.1**

Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis strain 04/04 streptokinase (skc) gene, complete cds

GenBank: HQ629621.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS HQ629621 1248 bp DNA linear BCT 16-JAN-2011
DEFINITION Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis strain 04/04
streptokinase (skc) gene, complete cds.
ACCESSION HQ629621
VERSION HQ629621.1 GI:317411290
KEYWORDS .
SOURCE Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis
ORGANISM [Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis](#)
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae;
Streptococcus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1248)
AUTHORS Lunardi,J., Bogdawa,H.M., Chies,J.M., Basso,L.A. and Santos,D.S.
TITLE Scale Up of the Recombinant Streptokinase (Streptococcus
dysgalactiae subsp. equisimilis) Production in Bioreactor
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1248)
AUTHORS Lunardi,J., Bogdawa,H.M., Chies,J.M., Basso,L.A. and Santos,D.S.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (01-OCT-2010) Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento, Av.
Ipiranga 6681 - 92A - TECNOPUC, Porto Alegre, RS 90619900, Brasil
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1248
/organism="Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="04/04"
/isolation_source="oropharynx swab collected from female
child"
/sub_species="equisimilis"
/db_xref="taxon:[119602](#)"
/country="Brazil"
/collection_date="09-Mar-2004"
/collected_by="Angela Christina Dias de Castro"
/identified_by="Angela Christina Dias de Castro"
/note="Streptococcus beta-hemolytic C group"
[gene](#) 1..1248

[CDS](#) /gene="skc"
1..1248
/gene="skc"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="streptokinase"
/protein_id="[ADV18975.1](#)"
/db_xref="GI:317411291"

/translation="MIAGPEWLLDRPSVNNSQLVVSVAGTVEGTNQDISLKFFEIDLT

SRPAHGGKTEQGLSPKSKPFATDSGAMSHKLEKADLLKAIQEQLIANVHSNDDYFEVI

DFASDATITDRNGKVYFADKDGSVTLPTQPVQEFLLSGHVVRVPYKEKPVQNQAQSV
D

VKYTVQFKPLNPDDDFRPGLKDKTKLLKTLAIGDTITSQELLAQAQSILNKTHPGYTIY

ERDSSIVTHDNDIFRTILPMDQEFTYRVKNREQAYRINKKSGLNEEINNTDLISEKYY

VLKKGEKPYDPFDRSHLKLFTIKYVDVNTNELLKSEQLLTASERNLDFRDLYDPRDK
A

KLLYNNLDAFGIMDYTLTGKVEDNHDDTNRIITVYMGKRPEGENASYHLAYDKDRY
TE

EEREVYSYLRYTGTPIDNPNDK"

ORIGIN

1 atgattgctg gacctgagtg gctgctagac cgtccatctg tcaacaacag ccaattagtt
61 gtagcgttg ctggtactgt tgaggggacg aatcaagaca ttagtcttaa atttttgaa
121 atcgatctaa catcacgacc tgctcatgga ggaaagacag agcaaggctt aagtccaaaa
181 tcaaaacctt ttgctactga tagtggecgc atgtcacata aacttgagaa agctgactta
241 ctaaaggcta tcaagaaca attgatcgct aacgtccaca gtaacgacga ctactttgag
301 gtcattgatt ttgcaagcga tgcaaccatt actgatcgaa acggcaaggt ctactttgct
361 gacaaaagtg gttcggtaac cttgccgacc caacctgtcc aagaatfff gtaagcgga
421 catgtgcgcg ttagaccata taaagaaaaa ccagtacaaa accaagcgaa atctgtagat
481 gtgaaatata ctgtacagtt taaaccctta aacctgatg acgatttcag accaggtctc
541 aaagatacta agctattgaa aacctagct atcggtgaca ccatcacatc tcaagaatta
601 ctagctcaag cacaaagcat ttaaacaaa accaccag gctatacgat ttatgaacgt
661 gactcctcaa tegtactca tgacaatgac atttccgta cgattttacc aatggatcaa
721 gagtttactt accgtgttaa aaatcgggaa caagcttata ggatcaataa aaaatctggt
781 ctgaatgaag aaataaaca cactgacctg atctctgaga aatattacgt ccttaaaaaa
841 ggggaaaagc cgtatgatcc ctttgatcgc agtcactga aactgttcac catcaaatc
901 gttgatgta acaccaacga attgctaaaa agtgagcagc tctaacagc tagcgaacgt
961 aacttagact tcagagattt atacgatcct cgtgataagg ctaaactact ctacaacaat
1021 ctgatgctt ttggtattat ggactatacc ttaactggaa aagtagaaga taatcacgat
1081 gacaccaacc gtatcataac cgtttatatg ggcaagcgac ccgaaggaga gaatgctagc
1141 tatcatttag cctatgataa agatcgttat accgaagaag aacgagaagt ttacagctac
1201 ctgcgttata cagggacacc tatacctgat aacctaacg acaataa

ANEXO II

Carta de submissão à revista *Journal of Biotechnology*.

Fwd: A manuscript number has been assigned to JBIOTEC-D-11-00431 Entrada X

Cláudia Paiva Nunes para mim, joceleichies, Gaby	mostrar detalhes 16 mar	Responder
---	---	---------------------------

----- Forwarded message -----
From: **Journal of Biotechnology** <jbiotech@cebitec.uni-bielefeld.de>
Date: 2011/3/16
Subject: A manuscript number has been assigned to JBIOTEC-D-11-00431
To: cpaivanunes@gmail.com

Ms. Ref. No.: JBIOTEC-D-11-00431
Title: Bioreactor production of recombinant streptokinase (*Streptococcus dysgalactie* subsp. *equisimilis*) using different fed batch strategies
Journal of Biotechnology

Dear Claudia,

Your submission entitled "Bioreactor production of recombinant streptokinase (*Streptococcus dysgalactie* subsp. *equisimilis*) using different fed batch strategies" has been assigned the following manuscript number: JBIOTEC-D-11-00431.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>.

Your username is: cpaiva

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/jbiotec/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

A. Pühler
Chief Editor
Journal of Biotechnology

Elsevier Policies and Services for Authors
Author Rights
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/authorsrights>

Funding Body Compliance
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/fundingbodyagreements>

Language Improvement
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languagepolishing>

Author Discounts on Elsevier Publications
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/authordiscount>

Cláudia Paiva Nunes
4G P&D - TECNOPUC
Porto Alegre - RS

[Responder](#) [Responder a todos](#) [Encaminhar](#) cpaivanunes não está disponível para bater papo