



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013

**PEDRO RICARDO
FERREIRA SILVA**

**Optimização da Produção de scFv anti-LDL(-) por *Pichia
pastoris***



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2013

**PEDRO RICARDO
FERREIRA SILVA**

Optimização da Produção de scFv anti-LDL(-) por *Pichia pastoris*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, no Ramo de Especialização Industrial e Ambiental, realizada sob orientação do Doutor Adalberto Pessoa Júnior, Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil, e co-orientação do Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.

Aos meus pais e à minha irmã.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal

Prof. Auxiliar Convitado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Prof. Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Patricia Marques Ventura

Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Adalberto Pessoa Júnior

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Professor João Coutinho por me ter concedido a oportunidade de realizar a tese de mestrado no Brasil.

Agradeço ao Professor Adalberto Pessoa Júnior por me ter aceite no seu laboratório, pela sua orientação, apoio, incentivo e disponibilidade em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Valker Feitosa, por me receber, por me ajudar, por me acompanhar ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que se criou durante este período.

Ao pessoal do laboratório, o César, o João, o André, a Angela, o Alex, o Luiz, pela ajuda, pela motivação, pela boa disposição e por me integrarem no grupo.

À professora Gisele Monteiro, pela companhia no café da manhã, pelas conversas, pela boa disposição, ajuda e disponibilidade.

Ao André Reigoto e ao Cédric Figueiredo, apoio incondicional e companhia regular em São Paulo.

Agradeço à Inês Rocha, por ter estado comigo todo este tempo e por ser sempre a primeira pessoa a lembrar que é possível.

Aos meus pais e irmã, pelo esforço que sei que fizeram para que eu pudesse realizar este projeto e pelo apoio e incentivo.

À minha família.

palavras-chave

Pichia pastoris; scFv anti-LDL(-); sorbitol; glicerol; Casaminoácidos; FenilMetanoSulfonilFluoreto

Resumo

Foram avaliadas, em frasco Erlenmeyer e em bio-reactor, as vantagens da alimentação escalonada de fontes de carbono, glicerol e sorbitol, complementares ao metanol na fase de indução de produção. A concentração máxima do fragmento de anticorpo monoclonal recombinante scFv anti-LDL(-) obtida após 120h de tempo de cultivo foi de $148,7 \pm 18,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para os cultivos aos quais foi adicionado glicerol, assim como a concentração celular mais elevada no final do cultivo, de $15,6 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$. Nos estudos realizados em bio-reactor, observou-se uma taxa específica de crescimento máxima de $\mu_{\text{máx}}=0,43\text{h}^{-1}$, nas primeiras 6h de cultivo. No final do tempo de cultivo, foram obtidas concentrações celulares na ordem dos 30 g.L^{-1} . Estudo adicional foi realizado para avaliar a influência de casminoácidos e FenilMetanoSulfonilFluoreto (PMSF) na produção de scFv ant-LDL(-). A adição de casaminoácidos revelou-se mais significativa do que a adição de PMSF, na produção de scFv anti-LDL(-).

keywords

Pichia pastoris; scFv anti-LDL(-); sorbitol; glycerol; casaminoacids; PhenylMethaneSulfonylFluoride

abstract

It was studied, in shake flask and bioreactor, the advantages of mixed feeds of sorbitol or glycerol with methanol in the induction phase for production of recombinant monoclonal antibody fragment scFv anti-LDL(-) with *Pichia pastoris*. The maximum scFv anti-LDL(-) concentration of $148,7 \pm 18,3 \text{ mg.L}^{-1}$ was obtained for the glycerol feed strategy, as well as the highest cell density, $15,6 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$. In bioreactor, it was observed the exponential growth phase at first 6h of culture, with a maximum specific growth rate of $\mu_{\text{max}}=0,43\text{h}^{-1}$. The highest cell density achieved was about 30 g.L^{-1} . An additional study was performed to evaluate the influence of casaminoacids and PhenylMethaneSulfonylFluoride (PMSF) in the production of scFv anti-LDL(-). In comparison with PMSF, it was observed that casaminoacids have the most significant influence and its presence induce a higher protein production.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. scFv anti-LDL(-)	3
2.2. Produção de proteínas recombinantes na Indústria Farmacêutica	5
2.3. <i>Pichia pastoris</i>	8
2.3.1. <i>Marcadores Selectivos e Vectores de Expressão</i>	9
2.3.2. <i>Promotores</i>	10
2.3.3. <i>Condições de cultivo</i>	12
2.3.4. <i>Actividade Proteolítica</i>	15
2.4. Produção de scFv por <i>P. pastoris</i>	17
3. Materiais e Métodos	21
3.1. <i>Pichia pastoris</i>	21
3.2. Manutenção e Reactivação da <i>Pichia pastoris</i>	21
3.3. Cultivos para produção de scFv anti-LDL(-)	22
3.3.1. <i>Alimentação escalonada de glicerol e sorbitol na fase de indução</i>	22
3.3.2. <i>Adição de Casaminoácidos e PMSF</i>	23
3.4. Determinação da concentração celular	24
3.5. Purificação de scFv anti-LDL(-)	25
3.6. Quantificação de scFv anti-LDL(-)	25
3.7. Quantificação de Glicerol e Sorbitol	26
3.8. Determinação de parâmetros de cultivo	27
4. Resultados e Discussão	29
4.1. <i>Alimentação escalonada de glicerol e sorbitol na fase de indução</i>	29
4.1.1. <i>Crescimento celular</i>	29
4.1.2. <i>Produção de scFv-anti-LDL(-)</i>	31
4.2. Cultivos em Bio-reactor	33
4.2.1. <i>Crescimento celular</i>	33
4.2.2. <i>Consumo de Substrato</i>	36

4.2.2.1. Determinação das curvas de calibração _____	36
4.2.2.2. Consumo de substrato nos cultivos em bio-reactor _____	40
4.3. Análise da influência da adição de Casaminoácidos e PMSF _____	43
5. Conclusões _____	47
6. Perspectivas Futuras _____	49
7. Referências Bibliográficas _____	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo de estruturas de anticorpo monoclonal (IgG) e fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-Fc, scFv e Fab. Nas estruturas, os domínios a azul representam as regiões variáveis e os domínios a vermelho, amarelo e laranja representam as regiões constantes da estrutura de um anticorpo. Os peptídeos artificiais que estabelecem a ligação entre os diferentes domínios dos fragmentos recombinantes estão representadas a roxo. Adaptado de [7].	4
Figura 2 - Gráfico representativo do crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, nas diferentes condições testadas. Log X: Logaritmo da concentração de biomassa.	30
Figura 3 – Gráfico representativo do crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, nas diferentes condições testadas.	31
Figura 4 – Gráfico representativo do crescimento celular nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor.	34
Figura 5 – Gráfico representativo das curvas de crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, em bio-reactor, nas diferentes condições testadas.	35
Figura 6 - Curvas de calibração das soluções com diferentes rácios glicerol:sorbitol. ♦ glicerol:sorbitol 1:0 (m/m) ; ■ glicerol:sorbitol 0,75:0,25 (m/m); ▲ glicerol:sorbitol 0,50:0,50 (m/m); • glicerol:sorbitol 0,25:0,75 (m/m); + glicerol:sorbitol 0:1 (m/m).	37
Figura 7 - Decréscimo linear do declive das curvas de calibração das soluções glicerol:sorbitol de acordo com o aumento da proporção do sorbitol	38
Figura 8 - Curvas de calibração das soluções: ■ concentração de sorbitol 10,0 g.L ⁻¹ constante e variação da concentração de glicerol; ♦ concentração de glicerol 10,0 g.L ⁻¹ constante e variação da concentração de sorbitol.	39
Figura 9 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a azul) e consumo de glicerol (linha a preto), nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor.	40
Figura 10 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a cinzento), consumo de glicerol nas primeiras 24h de cultivo (linha a preto) e da concentração de sorbitol na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo (linha a azul escuro), nos cultivos realizados em bio-reactor na condição sor.	41

Figura 11 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a verde) e concentração de glicerol e sorbitol na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo (linha a laranja), nos cultivos realizados em bio-reactor na condição gli/sor. _____ 42

Figura 12 - Superfície de resposta do planeamento 3^2 com 4 repetições do ponto central da produção de scFv anti-LDL(-) de acordo com as variáveis Casaminoácidos e PMSF. _____ 46

Figura 13 – Curva de calibração da quantificação de proteína **Error! Bookmark not defined.**

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Produtos recombinantes na indústria farmacêutica. Adaptado de [22].	7
Tabela 2 - Proteínas recombinantes produzidas por <i>P. pastoris</i> com alimentação escalonada de sorbitol na fase de indução. anti-MUC1 VHH (<i>anti-Mucina1 camelid heavy chain antibody</i>); ROL (<i>Rhizopus oryzae lipase</i>); APL (<i>Alkaline polygalacturonate lyase</i>); rHuEPO (<i>recombinant Human Erythropoietin</i>); rhGH (<i>recombinant human Growth Hormone</i>); ; rFSH (<i>recombinant Follicle-Stimulating Hormone</i>); srAFP (<i>sea raven Antifreeze Protein</i>).	15
Tabela 3 – Produção de fragmentos scFv de anticorpos recombinantes por <i>P. pastoris</i> . t_i (tempo total de cultivo com indução por Metanol).	18
Tabela 4 – Níveis codificados das variáveis em estudo no planejamento factorial	23
Tabela 5 – Tabela descritiva das condições de cultivo do planejamento factorial 3^2 com 4 repetições do ponto central para análise da influência da adição de casaminoácidos e PMSF ao meio de cultivo de <i>P. pastoris</i> para produção de scFv anti-LDL(-)	24
Tabela 6 – Resultados obtidos no estudo de produção de scFv anti-LDL(-). μ : taxa específica de crescimento, na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo; [scFv anti-LDL(-)]: Concentração final de scFv anti-LDL(-).	32
Tabela 7 – Velocidade específica de crescimento (μ) e Biomassa total produzida (g) por Litro, nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor. t: intervalo de tempo de cultivo.	34
Tabela 8 – Velocidade específica de crescimento (μ) e Biomassa total produzida (g) po litro, na fase de indução (entre as 24h e 120h)	36
Tabela 9 - Tabela descritiva das condições de cultivo e respectivos valores de concentração de scFv anti-LDL(-) (mg.L^{-1}) do planejamento factorial 3^2 com 4 repetições do ponto central para análise da influência da adição de casaminoácidos e PMSF ao meio de cultivo de <i>P. pastoris</i> para produção de scFv anti-LDL(-)	44
Tabela 10 – Parâmetros da análise de variância (ANOVA) da produção de scFv anti-LDL(-) de acordo com as variáveis Casaminoácidos e PMSF. SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática.	45

Símbolos e Abreviaturas

1,4-DHP	1,4-Dihidropiridina dicarboxilato
ADE1	Gene de codificação da Amidoimidazol Succinocarboxamida sintetase
ANOVA	Análise de Variância
AOX1	Enzima Álcool Oxidase 1
AOX2	Enzima Álcool Oxidase 2
APL	Poligalacturonato liase alcalina
ARG4	Gene de codificação da Arginina Succinato liase
BAFF	<i>B-Cell Activating Factor</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino
C_G	Concentração de Glicerol
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
C_S	Concentração de Sorbitol
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
DHAS	Enzima Dihidroxiacetona sintetase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ErbB2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FLD	Enzima Formaldeído desidrogenase
GAP	Enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GL	Graus de Liberdade
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HIS4	Gene de codificação da Histidina desidrogenase
His-tag	“cauda” de Histidina
IgG	Imunoglobulina G
IMAC	Cromatografia de Afinidade por Iões Metálicos Imobilizados

LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LDL(-)	Lipoproteína de baixa densidade Electronegativa
m₁	Declive da curva de calibração com variação da concentração de glicerol
m₂	Declive da curva de calibração com variação da concentração de sorbitol
m_g	declive da curva de calibração correspondente a glicerol:sorbitol 1:0 (m/m)
m_s	declive da curva de calibração correspondente a glicerol:sorbitol 0:1 (m/m)
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MQ	Média Quadrática
MUC1	Mucina 1
MUC1-VHH	Mucina 1 <i>camelid heavy chain antibody</i>
Mut⁺	Fenótipo de <i>P. pastoris</i> de assimilação rápida do metanol
Mut⁻	Fenótipo de <i>P. pastoris</i> de não assimilação do metanol
Mut^S	Fenótipo de <i>P. pastoris</i> de assimilação lenta do metanol
N_C	Valor do nível codificado da variável
pAOX1	promotor do gene de codificação da enzima álcool oxidase 1
pAOX2	promotor do gene de codificação da enzima álcool oxidase 2
pDHAS	promotor do gene de codificação da enzima Dihidroxiacetona sintetase
PEX8	Proteína do Peroxissoma
pFLD1	promotor do gene de codificação da enzima Formaldeído desidrogenase
pGAP	promotor do gene de codificação da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
pGK1	promotor do gene de codificação da enzima Fosfoglicerato cinase
PHO1	Fosfatase ácida de <i>P. pastoris</i>
pICL1	promotor do gene de codificação da enzima Isocitrato liase
PMSF	FenilMetanoSulfonilFluoreto (<i>PhenylMethaneSulfonylFluoride</i>)
Prod. Esp.	Produtividade Específica

Prod. Vol.	Produtividade Volumétrica
rFSH	<i>recombinant Follicle-Stimulating Hormone</i>
rhGH	<i>recombinant human Growth Hormone</i>
rHuEPO	<i>recombinant Human Erythropoietin</i>
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i> lipase
S	Concentração de substrato
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
scFv anti-LDL(-)	<i>single chain Fragment variable</i> específico pela Lipoproteína de baixa densidade Electronegativa
scFv-Fc	<i>single chain Fragment variable – Fragment constant</i>
SIG	<i>Secretion Signal Sequence</i>
SQ	Some Quadrática
srAFP	<i>sea raven Antifreeze Protein</i>
t	tempo
URA3	gene de codificação da enzima Orotidina 5'-fosfato descarboxilase
V₀	Valor real da variável no ponto central
V_R	Valor real da variável
X₀	Concentração inicial de biomassa
X	Concentração de biomassa
Y'_{X/S}	Factor de rendimento Biomassa/Substrato
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
α-MF	<i>S. cerevisiae α-mating factor</i>
μ	Taxa específica de crescimento
μ_{máx}	Taxa específica de crescimento máxima
ΔS	Variação da concentração de substrato
ΔV_R	Diferença entre os valores reais da variável em níveis codificados consecutivos.
ΔX	Variação da concentração de biomassa

1. Introdução

Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos em termos de engenharia de bioprocessos têm vindo a desencadear elevado interesse na produção de proteínas recombinantes e outros bioprodutos. [1] Muitos destes são de elevado interesse para a Indústria Farmacêutica devido às suas aplicações terapêuticas e no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico. Neste sentido, a utilização de sistemas de expressão de proteínas heterólogas como a levedura *Pichia pastoris* tem sido cada vez mais estudado. A *P. pastoris* possui um sistema de expressão que apresenta inúmeras vantagens na produção de proteínas heterólogas com aplicação terapêutica, nomeadamente os fragmentos de anticorpos monoclonais scFv, por apresentar maiores rendimentos e menores custos de produção quando comparados com outros sistemas de expressão, como as células animais. [2]

scFv anti-LDL(-) é um fragmento de anticorpo monoclonal com especificidade pela LDL(-), molécula responsável pelo aparecimento da aterosclerose. [3, 4] A sua aplicação no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e terapêuticas implica, assim, a necessidade de optimização do processo de produção, por *P. pastoris*.

Desta forma, o objectivo geral deste projecto é o estudo da produção do fragmento de anticorpo monoclonal scFv anti-LDL(-) por *P. pastoris*. De modo a cumprir com este objectivo, foi realizado um estudo de produção de scFv anti-LDL(-), em frasco e em bio-reactor, com alimentação escalonada de fontes de carbono (glicerol e sorbitol) complementares ao metanol na fase de indução de produção. Deste modo, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Crescimento celular
- Produção de scFv anti-LDL(-)
- Consumo de substrato – glicerol e sorbitol

Foi ainda realizado um estudo de modo a avaliar a influência da adição de casaminoácidos (fonte de azoto) e PMSF (inibidor proteolítico) na produção de scFv anti-LDL(-).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. scFv anti-LDL(-)

A aterosclerose é uma doença crónica da parede arterial que se caracteriza pela acumulação de lípidos e um intenso processo inflamatório e é responsável por complicações médicas como a ruptura da placa aterosclerótica, trombose e até enfartes do miocárdio. [3–6] O evento inicial da doença consiste na migração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoproteins*) para a parede arterial, induzindo uma resposta inflamatória e, por acção de enzimas e espécies reactivas de oxigénio, a LDL é modificada. [3–6] A resposta imunológica induzida pela presença da LDL modificada resulta numa acumulação excessiva destas e a consequente formação de células espumosas e estrias gordurosas. [3–6] A LDL electronegativa - LDL(-) é um dos tipos de LDL modificada e é apontada como uma das maiores responsáveis pelo aparecimento da doença. [3, 4]

Anticorpos recombinantes e fragmentos de anticorpos recombinantes são utilizados actualmente em análises imunológicas, na imunohistoquímica, e em citometria de fluxo, para além de poderem ser utilizados em técnicas de diagnóstico para detecção de doenças, patógenos ou toxinas e até mesmo para efeitos terapêuticos, tornando-os de elevado interesse para a indústria farmacêutica. [7–9] A necessidade da criação de técnicas de diagnóstico para a prevenção e controlo da aterosclerose resultou no desenvolvimento de um fragmento de anticorpo monoclonal recombinante com especificidade pela LDL(-), o fragmento scFv anti-LDL(-), com potencialidade de aplicação tanto a nível de diagnóstico como terapêutico. [10–13]

Anticorpos policlonais são largamente utilizados em técnicas de diagnóstico e, em termos de pesquisa, como reagentes de detecção. [7] Este tipo de anticorpos é produzido por diferentes linhagens de células imunológicas e caracterizados pela especificidade pelo mesmo antígeno, no entanto, com estruturas diferentes de acordo com o epítipo do antígeno pelo qual são específicos. Por sua vez, os anticorpos monoclonais são anticorpos provenientes da mesma linhagem celular e apresentam a mesma estrutura e especificidade pelo antígeno. [7, 14–16]

Um anticorpo é formado por quatro cadeias polipeptídicas - 2 cadeias pesadas (*Heavy Chains* – H) e 2 cadeias leves (*Light Chains* – L) - unidas por ligações dissulfureto e estabilizadas por interações não covalentes, formando uma estrutura complexa de vários domínios. No terminal amina das cadeias peptídicas, existem as porções variáveis (*Variable Heavy* – VH e *Variable Light* – VL), assim denominadas por se constituírem como a região de variação entre os diferentes anticorpos e, conseqüentemente, responsáveis pela especificidade do anticorpo pelo antígeno. As porções constantes (*Constant Heavy* – CH e *Constant Light* – CL) são similares entre anticorpos e a sua função baseia-se nas actividades biológicas do anticorpo, como a activação dos linfócitos T e promover a fagocitose. [7, 14–16]

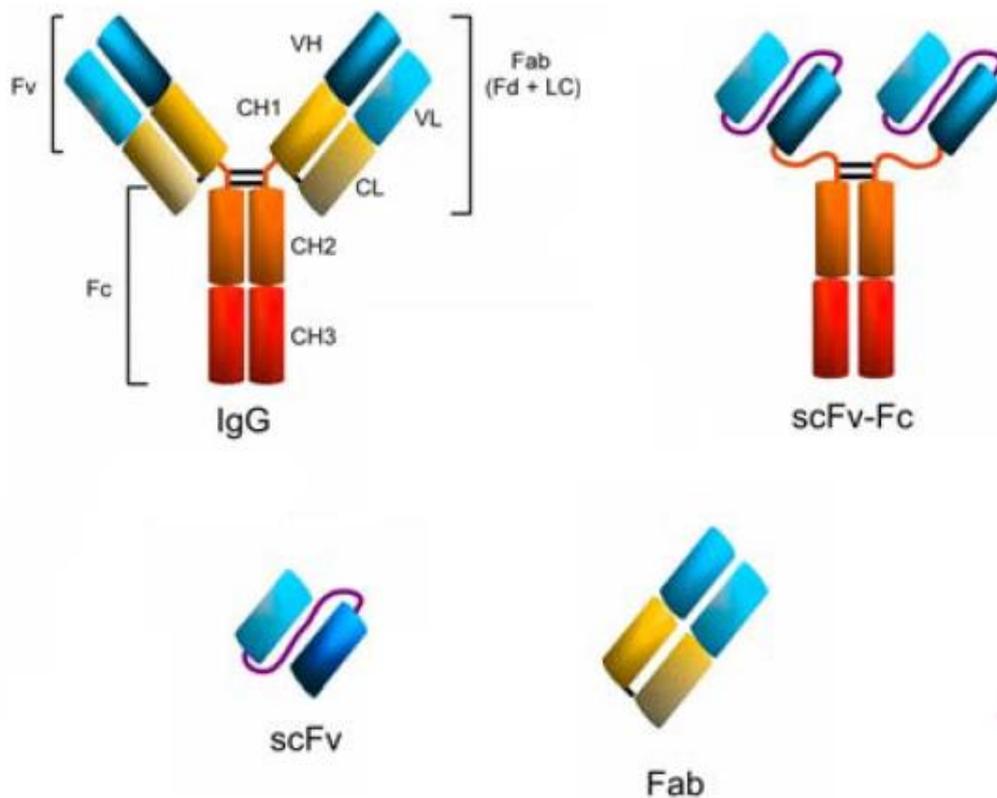


Figura 1 – Esquema representativo de estruturas de anticorpo monoclonal (IgG) e fragmentos de anticorpos recombinantes scFv-Fc, scFv e Fab. Nas estruturas, os domínios a azul representam as regiões variáveis e os domínios a vermelho, amarelo e laranja representam as regiões constantes da estrutura de um anticorpo. Os peptídeos artificiais que estabelecem a ligação entre os diferentes domínios dos fragmentos recombinantes estão representadas a roxo. Adaptado de [7].

A complexidade deste tipo de molécula é um dos maiores desafios no que diz respeito à sua produção em sistemas de expressão como a *P. pastoris*. [7] Um esquema da estrutura de um anticorpo (IgG) está representada na Figura 1, assim como de alguns dos diferentes fragmentos recombinantes produzidos actualmente.

Os fragmentos scFv e Fab representados na Figura 1 são, actualmente, dois dos mais usualmente produzidos na indústria farmacêutica no que diz respeito à produção de fragmentos de anticorpos monoclonais. [7] O fragmento Fab (*Fragment antigen binding*) é constituído pela cadeia leve e por parte da cadeia pesada, a porção variável e um dos domínios da porção constante. [7, 14–16] No que diz respeito ao fragmento scFv (*single chain Fragment variable*), é constituído apenas pelas regiões variáveis das cadeias leve e pesada, ligadas por uma cadeia peptídica. [7, 9, 12, 13, 17–21] A produção de fragmentos e não estruturas íntegras de anticorpos recombinantes justifica-se, por um lado, pela complexidade da estrutura integral do anticorpo que dificulta a sua expressão como proteína heteróloga e, por outro, pelo facto de fragmentos como scFv e Fab manterem as propriedades funcionais do anticorpo, como a especificidade e capacidade de ligação com o antigénio, para além de apresentarem vantagens no que diz respeito à sua aplicação terapêutica, como maior facilidade de absorção e circulação e menor imunogenicidade. [7, 8, 10, 12, 13, 17, 19, 21]

2.2. Produção de proteínas recombinantes na Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, a produção de proteínas recombinantes tem-se mostrado uma alternativa de elevada importância para o desenvolvimento e produção de fármacos. [22, 23] A utilização de sistemas de expressão para produção de proteínas recombinantes, para além de proporcionar a qualidade do produto necessária, apresenta também vantagens no que diz respeito aos custos do processo de produção. [22] São vários os sistemas de expressão utilizados actualmente, desde microrganismos procariotas como a *Escherichia coli* (Tabela 1) e *Bacillus subtilis*, leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 1), *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* (Tabela 1) e *Pichia pastoris*, fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum* e células animais como células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) (Tabela 1) e BHK (*Baby Hamster Kidney*) (Tabela 1). [22, 23]

A *E. coli*, por ser um microrganismo muito bem caracterizado genética e fisiologicamente, pela facilidade de manipulação, pelo conhecimento estabelecido das condições de cultivo e pela capacidade de acumulação de proteínas heterólogas até 20% das proteínas totais da célula, é o microrganismo procariota mais utilizado na produção de proteínas heterólogas. [23, 24] No entanto, a nível farmacêutico, a sua utilização é limitada, devido ao facto de não apresentar uma secreção eficiente do produto por formação de corpos de inclusão [10, 23, 25, 26] e, por ser um organismo procariota, não efectuar as modificações pós-transducionais características dos organismos eucariotas, que são de elevada importância neste tipo de produtos. [23, 24, 27, 28]

No que diz respeito às leveduras, estas são consideradas organismos de elevada relevância na produção de proteínas heterólogas por apresentarem crescimento rápido em meios de cultivo de custo reduzido, por operarem a elevadas densidades celulares, pela capacidade de efectuar modificações pós-transducionais características dos organismos eucariotas, pela eficiência na secreção das proteínas e por não serem, geralmente, pirogênicas nem patogênicas. [12, 21] A *S. cerevisiae*, a levedura melhor caracterizada a nível genético, é a mais utilizada a nível da indústria farmacêutica, sendo que a *P. pastoris* é a mais utilizada na produção de proteínas recombinantes na sua generalidade. [23, 24] É importante referir que a glicosilação, uma das mais comuns modificações pós-transducionais nas proteínas, realizada pelas leveduras difere daquelas que são verificadas nas células animais. [24] Na *S. cerevisiae* são descritas hiperglicosilações que podem resultar na perda da actividade da proteína e, no que diz respeito a proteínas de interesse farmacêutico e suas aplicações terapêuticas, uma resposta imunogênica não desejada pode ser desencadeada. [24] Por sua vez, a *P. pastoris* é conhecida pela formação de oligossacarídeos de cadeia mais curta e mais similar áquelas que se verificam nas células animais. [24]

Os fungos filamentosos são extensivamente utilizados na indústria para produção de enzimas, ácidos e antibióticos. As vantagens da sua utilização, quando comparados com as leveduras são, essencialmente, as modificações pós-transducionais mais complexas, similares às realizadas por células animais. No entanto, para a produção de fármacos recombinantes, um melhor conhecimento a nível genético e metabólico destes organismos ainda precisa ser adquirido. [22]

Tabela 1 – Produtos recombinantes na indústria farmacêutica. Adaptado de [22].

Produto	Sistema de expressão	Empresa
Factores de coagulação do sangue (VII, VIII e IX)	Células BHK/CHO	Novo-Nordisk/Bayer/Centeon/Genetics Baxter/Wyeth
Calcitocina	<i>E. coli</i> /Células CHO	Unigene
Dnase	Células CHO	Roche
Eritropoietina	Células CHO	Janssen-Cilag/Amgen/Boehringer
Darbepoetina	Células CHO	Amgen
Folitropina	Células CHO	Serono/Organon
Hormona de Luteinização	Células CHO	Serono
Gonadotropina	Células CHO	Serono
Glucagon	<i>S. cerevisiae</i>	Novo-Nordisk
Glucocerebrosidase	Células CHO	Genzyme
Somatotropina	<i>E. coli</i> /Células CHO	Pharmacia & Upjohn/Lilly/Novo-Nordisk/Ferring/Genentech/Serono/Bio-Technology General Corp
Eutropina	<i>S. cerevisiae</i>	LG Chemical
GCSF, GMCSF (Factores de crescimento)	<i>E. coli</i> /Células CHO	Novartis/Essex/Amgen/Roche/Chunga Pharmaceuticals
Vacina Hepatite B	<i>S. cerevisiae</i> / <i>H. polymorpha</i>	GlaxoSmithKline/RheinBiotech
Hirudina	<i>S. cerevisiae</i>	Aventis/Novartis
Insulina	<i>E.coli</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Bio-Technology General Corp/Novo-Nordisk
Interferão α	<i>E. coli</i>	Roche/Essex/Yamanouchi
Interferão β	<i>E. coli</i> /Células CHO	Schering/Biogen/Serono
Interferão γ	<i>E. coli</i>	Amgen/Boehring
Interleucina 2	<i>E. coli</i>	Chiron
Oprelvecina	Linhagem de células humanas ROMI 8866	Wyeth
OP-1 (Factor Neuroprotectivo)	<i>E. coli</i>	Curis/Striker
Activador Plasminogénico Recombinante	<i>E. coli</i>	Genentech/Roche/Boehring
Factor Necrose Tumoral	<i>E. coli</i>	Boehring
Activador Plasminogénico de Tecido	Células CHO	Genentech/Roche/Boehring
Factor células estaminais	Células CHO	Amgen

No que diz respeito às células animais e de insecto, estas são as mais similares às células humanas, nomeadamente no que diz respeito às modificações pós-transdacionais, tornando-as de elevado interesse na produção de proteínas heterólogas para a indústria farmacêutica. No entanto, estas apresentam desvantagens em relação aos outros sistemas de expressão anteriormente apresentados, nomeadamente em termos de custos de

produção, por requererem tempos de cultivo mais longos e meios de cultivo complexos e dispendiosos. [22, 25]

Na Tabela 1 estão descritos alguns dos produtos farmacêuticos recombinantes comercializados até ao ano de 2004, assim como os sistemas de expressão utilizados para a sua produção.

2.3. *Pichia pastoris*

Na década de 70, a *Phillips Petroleum* em conjunto com o *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA)* desenvolveram a *P. pastoris* como organismo para produção de proteínas heterólogas, na presença de metanol, em cultivos de elevada densidade celular ($>100 \text{ g.L}^{-1}$). Os investigadores isolaram o promotor e o gene da enzima álcool oxidase 1 (AOX1) e desenvolveram protocolos para a manipulação genética da levedura. [1, 29–32]

Desde então, a *P. pastoris*, uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar metanol, [1, 8, 23, 31–33] tem vindo a revelar-se como uma das leveduras mais versáteis para a expressão de proteínas heterólogas. [12, 23] Esta levedura é de particular interesse devido: 1) ao seu promotor pAOX1 – promotor do gene que codifica para a enzima álcool oxidase 1 - induzido por metanol [1, 8, 10, 20, 21, 31, 34–37]; 2) à facilidade e simplicidade de manipulação genética, sendo já conhecidos e bem caracterizados diversos vectores de expressão, havendo inclusive *kits* de expressão comerciais disponíveis [1, 10, 12, 36]; 3) à sua capacidade para libertar para o meio extracelular as proteínas heterólogas produzidas [1, 8, 19, 20, 31, 37–39]; 4) à sua capacidade para efectuar modificações pós-transducionais incluindo glicosilação, metilação, acilação e formação de ligações dissulfureto [1, 8, 10, 24, 31, 36]; 5) à possibilidade de operação em elevadas concentrações celulares com elevados rendimentos de produção [1, 10, 24, 35, 37]; 6) à possibilidade de operação em meios de cultivo de custos reduzidos [8, 40, 41] e 7) ao facto de ser uma levedura anaeróbia facultativa, [1, 36] possibilitando a operação em ambiente aeróbio, o que diminui os efeitos negativos de alguns produtos secundários relativos aos processos fermentativos, como o etanol. [1, 42, 43]

O genoma da *P. pastoris* é relativamente simples de manipular e actualmente já existem *kits* de expressão comerciais. [1, 10, 12, 36] As proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem também ser direccionadas para vias metabólicas secretórias através de

peptídeos sinal, o que simplifica os processos *downstream* para recuperação e purificação do produto. [1, 7, 24] A utilização de vectores integrativos é também uma das vantagens da utilização da *P. pastoris*, na medida em que a integração dos vectores no genoma permite não só uma maior estabilidade dos mesmos mas também a possibilidade de ter um número elevado de cópias do gene de interesse. [1, 29, 30, 34] Mais de 500 proteínas recombinantes foram expressas por *P. pastoris* [1] com níveis de expressão que atingem até 80% de proteínas totais secretadas [1] e até 30% de proteínas totais da célula. [38, 44]

2.3.1. Marcadores Selectivos e Vectores de Expressão

Vários marcadores selectivos têm sido utilizados em *P. pastoris* e, tipicamente, são utilizados mais do que um na mesma estirpe. O mais comumente utilizado é a supressão do gene *his4* que codifica para a histidina desidrogenase. Com a inserção no vector de expressão do gene *HIS4*, que complementa a ausência do *his4* no genoma, a selecção das células transformadas é realizada pela sua capacidade de crescimento em meios de cultivo na ausência de histidina. [2] Outros marcadores são referenciados, como os genes *ARG4* (arginina succinato liase), *ADE1* (PR-amidoimidazol succinocarboxamida sintetase) e *URA3* (orotidina 5'-fosfato descarboxilase). [2, 30, 32]

Actualmente, já se encontram disponíveis comercialmente uma série de vectores de expressão de *P. pastoris*. [24] Tipicamente, estes vectores de expressão são constituídos por: promotor, na maioria dos casos o *pAOX*; uma sequência de codificação de um peptídeo sinal (*SIG* - *Secretion Signal Sequence*) como o *PHO1* (*P. pastoris acid phosphatase*) ou o α -*MF* (*S. cerevisiae α -mating factor*); um local de inserção do gene heterólogo (*MCS* - *Multiple cloning site*); um local de terminação de transcrição; um marcador selectivo, como os referenciados anteriormente; um elemento de replicação para propagação do plasmídeo em *E.coli*. [29] Outros elementos podem ser também integrados no vector de expressão, como uma sequência de codificação de uma “cauda” (*tag*) de resíduos Histidina (*His-tag*) no C- ou N-terminal da proteína heteróloga, [10, 36] que traz vantagens na purificação por *IMAC* (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*), dada a afinidade apresentada pela histidina por iões metálicos, como o Níquel ou o Cobalto. [45–49] Os vectores *pHIL-S1*, *pPIC9*, *pPIC9K* são alguns dos vectores referenciados na literatura que apresentam estas propriedades. [24, 37]

2.3.2. Promotores

Na literatura, é referido que o rendimento do processo de produção de proteínas heterólogas é afectado por diversos parâmetros a nível genético, entre os quais o conteúdo em Guanina (G) e Citosina (C) do gene exógeno e o número de cópias do mesmo, os locais de glicosilação e clivagem proteolítica da proteína heteróloga e o promotor escolhido. [1, 19, 31, 32, 37]

Ao promotor pAOX1 é atribuído o sucesso da *P. pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas. [1, 29, 32] Este promotor é responsável pela expressão do gene que codifica para a enzima álcool oxidase, que representa até 35% das proteínas totais da célula. [1, 50] Existem dois genes que codificam para a enzima álcool oxidase, AOX1 e AOX2. [1] Ambos codificam para enzimas funcionais, sendo que o primeiro representa cerca de 95% da enzima total expressa. [1] Os sistemas que utilizam o promotor pAOX1 são os mais utilizados para produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, apesar de já terem sido apresentados resultados com o promotor pAOX2. Apesar de ser o promotor mais comumente utilizado e ser reconhecida a sua eficiência, o facto de ser induzido por metanol implica a necessidade de armazenamento do mesmo em processos de larga escala, o que levanta algumas questões de segurança. [1, 32, 51]

Existem 3 fenótipos de *P. pastoris* sensíveis a metanol: Mut⁺, Mut^S e Mut⁻. [1, 24, 32] As estirpes Mut⁺, nas quais os genes AOX1 e AOX2 estão presentes, apresentam velocidade de crescimento como a estirpe selvagem em meios contendo metanol, o que requer elevadas quantidades do mesmo durante o cultivo. A sensibilidade das estirpes Mut⁺ a elevadas concentrações de metanol torna estes sistemas complicados no aumento de escala, para além de que a expressão dos genes AOX1 e AOX2 pode competir pela maquinaria celular disponível com a produção das proteínas recombinantes, o que diminui o rendimento. [1, 2, 24] Nas estirpes Mut^S, a sensibilidade a metanol é menor que a das estirpes selvagens, dado que o gene AOX1 é removido e o crescimento é limitado pela expressão do gene AOX2. [1, 24] Por apresentarem velocidades de crescimento mais baixas, problemas associados a cultivos com elevadas densidades celulares não se verificam, como, por exemplo, a limitação de oxigénio. [1] A menor sensibilidade a metanol torna também mais fácil o aumento de escala do processo. [1] Estirpes Mut⁻ não

expressam nenhum dos genes AOX e, conseqüentemente, não crescem na presença de metanol. [1, 24]

O promotor constitutivo pGAP é, assim como o pAOX1, um dos mais utilizados na produção de proteínas heterólogas neste tipo de sistemas de expressão. [1, 31, 32] No entanto, ao contrário do que acontece com o pAOX1, nos sistemas com este promotor constitutivo, envolvido na expressão do gene que codifica para a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP), o crescimento celular e a produção de proteínas heterólogas ocorrem simultaneamente em meios de cultivo com glucose ou glicerol. [1, 24, 32, 51, 52] Na literatura, é referido que são possíveis cultivos estáveis e eficientes com produções efectivas de proteínas heterólogas ao longo de longos períodos de tempo, até 30 dias, com necessidades mínimas de controlo operacional. [1]

Outros promotores são referidos na literatura como possíveis alternativas aos apresentados anteriormente. O promotor pFLD1 do gene que codifica para a enzima formaldeído desidrogenase (FLD) é uma alternativa ao pAOX1 na medida em que a regulação da expressão das proteínas pode ser feita através da indução por metanol (fonte de carbono) ou metilamina (fonte de azoto). [1, 29, 31, 32] O promotor pDHAS do gene que codifica para a enzima dihidroxiacetona sintetase (DHAS), envolvida na via metabólica de assimilação do metanol, é também induzido por metanol, sendo que a produção da enzima DHAS pode alcançar cerca de 20% das proteínas totais de célula. [1, 29] Entre os promotores que não requerem metanol como indutor, de referir o promotor para a proteína do peroxissoma PEX8, que pode ser induzido tanto por metanol como por ácido oleico, [1, 29] e o promotor pICL1, induzido por etanol. [1, 29] Para além do pGAP, existem outros promotores constitutivos utilizados na produção de proteínas heterólogas, entre os quais o pYPT1, no entanto pouco utilizado devido aos baixos níveis de expressão apresentados, [1, 29] o promotor constitutivo pPGK1, do gene que codifica para a enzima glicolítica fosfoglicerato cinase, eficiente na presença de glucose, glicerol e metanol. [1, 29]

Dado que o promotor pAOX1 é o mais utilizado para produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* e o da estirpe estudada neste projeto, a revisão bibliográfica será baseada nos sistemas de expressão que utilizam este promotor.

2.3.3. Condições de cultivo

As condições de cultivo são importantes factores no rendimento de produção das proteínas heterólogas neste sistema de expressão. [1, 24] A definição do meio de cultivo óptimo para crescimento e produção é uma das principais etapas no desenvolvimento de um processo de produção. [1, 24] As variáveis que apresentam influência directa no rendimento de expressão são o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido, para além da composição do meio, nomeadamente no que diz respeito à fonte de carbono. [1, 31, 32] Na literatura, os cultivos de *P. pastoris* apresentam valores de pH que variam entre os 3 e 7, [21, 31, 38] sendo que, fora desta gama de valores, verificam-se velocidades de crescimento celular mais baixas, [38] pode ocorrer precipitação de sais do meio e a estabilidade das proteínas pode ser afectada. [31] No que diz respeito à temperatura, 30°C é estabelecida como temperatura óptima de crescimento. [31, 38] No entanto, temperaturas mais baixas podem também ser operadas sem afectar significativamente o crescimento celular e com a vantagem da possível diminuição da actividade de algumas proteases. [31, 32] Como já referido anteriormente, a *P. pastoris*, por ser um organismo anaeróbio facultativo, possibilita a operação em meios com arejamento, [1, 41] sendo que, em meios onde o oxigénio é limitado, pode ocorrer fermentação e produtos secundários não desejados podem interferir negativamente no rendimento de produção. [1, 42, 43]

No que diz respeito aos modos de operação dos processos biológicos de produção de proteínas recombinantes, existem, basicamente, três diferentes classificações de acordo com o regime de alimentação dos nutrientes: processos descontínuos, processos contínuos e processos com alimentação escalonada. Os dois primeiros constituem a base de todos os processos em bio-reactores. Nos descontínuos, todos os constituintes do meio de cultura são adicionados no início do processo - com excepção do oxigénio (no caso de processos aeróbios) e das soluções para controlo de pH e espuma - e todo o produto é retirado no final. Em relação aos processos contínuos, a alimentação dos nutrientes, como o próprio nome indica, é efectuada ao longo de todo o processo, assim como a retirada do produto, mantendo-se o volume do cultivo constante. Os processos com alimentação escalonada, que se caracterizam pela adição dos nutrientes ao longo do processo e pela recolha do produto só no final, são normalmente preferíveis aos contínuos por se conseguir obter concentrações celulares mais elevadas e o controlo do processo ser mais simplificado. No

entanto, os processos contínuos são mais longos e apresentam maiores produtividades volumétricas. [53]

Tipicamente, os cultivos de *P. pastoris* para produção de proteínas heterólogas são processos com alimentação escalonada e apresentam três etapas distintas: numa primeira etapa, que pode ter duração até 24h e que pode ser considerada como um processo descontínuo, o produto de interesse é biomassa. O glicerol (<40 g.L⁻¹) é utilizado como fonte de carbono e não ocorre a produção da proteína recombinante de interesse. Posteriormente, uma fase intermediária é iniciada com a adição controlada de glicerol, de uma forma constante ou escalonada, com o intuito de se alcançar elevadas concentrações celulares. Assim que se verifica o esgotamento do glicerol e o máximo de concentração celular é alcançado, inicia-se a última fase, denominada fase de indução, durante a qual é adicionado metanol ao meio de cultivo para que a produção das proteínas recombinantes seja induzida. [29, 31, 43, 54–57] Na fase de indução pode ainda ser adicionado glicerol (ou outra fonte de carbono) ao meio de cultivo, de modo a garantir uma maior estabilidade e viabilidade celular e possibilitando que o próprio metanol seja utilizado apenas para indução do promotor e não consumido como fonte de energia. [31, 43] No entanto, a utilização do glicerol pode diminuir o rendimento do processo de produção, na medida em que este é um repressor do promotor pAOX1 [29, 33, 54] e o metabolismo de assimilação desta fonte de carbono pode desencadear uma acumulação de subprodutos fermentativos como o etanol ou acetato. [42, 43]

De modo a aumentar a produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* e a obter maiores densidades celulares, umas das técnicas utilizadas consiste na adição ao meio de cultivo, na fase de indução, de outras fontes de carbono para além do metanol. [31, 43, 54] Sorbitol e Glicerol, comparativamente a outras fontes de carbono, são os substratos na presença dos quais o fluxo de aminoácidos produzidos é superior, e a sua utilização no meio de cultivo resulta num maior crescimento celular e uma maior produção de proteínas recombinantes durante a fase de indução. No caso de sistemas que utilizam o promotor pAOX, o sorbitol é o mais indicado, dado que o glicerol é repressor do promotor. [31, 54] Outras vantagens da utilização do sorbitol durante a fase de indução são apresentadas na literatura, entre as quais o facto de a sua acumulação no meio de cultivo não afectar a produtividade [58] e se verificar menor produção de calor, dado que a entalpia de combustão do sorbitol é menor que a do metanol e do glicerol, e menor consumo de

oxigénio. [58, 59] Estes aspectos são muito importantes principalmente em processos de elevadas densidades celulares em larga escala. No que diz respeito à viabilidade e crescimento celular, a utilização simultânea de sorbitol e metanol na fase de indução apresenta também resultados positivos, principalmente nos fenótipos Mut^S. [58]

Rahbarizadeh e seus colaboradores realizaram um estudo de produção de um fragmento de anticorpo, anti-MUC1 VHH, com *P. pastoris*, no qual, antes da fase de indução, as células foram inoculadas em meio hipertónico com 1M de sorbitol. Neste verificaram um menor número de células viáveis mas um aumento no rendimento de produção (Tabela 2). [60]

Jungo e colaboradores, testaram a adição de sorbitol em conjunto com metanol, na fase de indução, em diferentes proporções das duas fontes de carbono e verificaram um aumento de produção de avidina recombinante com o aumento da concentração de metanol, até um máximo de 0,47 Metanol / 0,53 Sorbitol C-mol.C-mol⁻¹. A produtividade volumétrica foi aumentada 1,3-1,4 vezes comparativamente a cultivos onde apenas o metanol é utilizado como fonte de carbono na fase de indução (Tabela 2). [58]

Num estudo realizado por Resina *et al.*, [61] foram avaliados a viabilidade de utilização do promotor pFLD e a adição de sorbitol como fonte de carbono e metilamina como fonte de azoto na fase de produção da proteína recombinante *Rhizopus oryzae* lipase em *P. pastoris*. Os resultados revelam a eficiência deste promotor para produção de proteínas recombinantes, apresentando inclusive melhores resultados que os apresentados por sistemas que utilizam o promotor pAOX, e, com a utilização de concentrações não limitantes de sorbitol e metilamina, a produtividade era aumentada e mais longos tempos de cultivo com produção efectiva eram alcançados, até 90h (Tabela 2). [61]

Ramón *et al.*, [62] realizou um estudo no qual verificou a influência dos fenótipos Mut⁺ e Mut^S na assimilação do sorbitol e metanol em cultivos para produção de *Rhizopus oryzae* lipase. Os estudos revelam que a estirpe com fenótipo Mut⁺ apresenta um consumo sequencial, metabolizando primeiro o metanol, enquanto que as estirpes de fenótipo Mut^S, com menor capacidade de assimilação do metanol, apresentam um consumo simultâneo das duas fontes de carbono. No caso das Mut^S, a produtividade volumétrica foi 5,1 vezes superior à verificada no fenótipo Mut⁺. Outro aspecto interessante deste estudo prende-se no facto de, no início da fase de indução, a acumulação da proteína heteróloga ser 2 vezes superior nas Mut^S, no entanto o rácio intra/extracelular é inferior, sugerindo que, para este

fenótipo, a utilização do sorbitol em conjunto com metanol na fase de indução pode ter efeitos benéficos no que diz respeito à secreção das proteínas para o meio extracelular (Tabela 2). [62]

Tabela 2 - Proteínas recombinantes produzidas por *P. pastoris* com alimentação escalonada de sorbitol na fase de indução. anti-MUC1 VHH (*anti-Mucina1 camelid heavy chain antibody*); ROL (*Rhizopus oryzae lipase*); APL (*Alkaline polygalacturonate lyase*); rHuEPO (*recombinant Human Erythropoietin*); rhGH (*recombinant human Growth Hormone*); ; rFSH (*recombinant Follicle-Stimulating Hormone*); srAFP (*sea raven Antifreeze Protein*).

Estirpe	Promotor	Fenótipo	Proteína	Produção	Ref
<i>P. pastoris</i> GS115	pAOX	Mut ^S	anti-MUC1 VHH	10-15 mg.L ⁻¹	[60]
<i>P. pastoris</i> GS115	pAOX	Mut ⁺	Avidina	5-6 mg.L ⁻¹	[58]
<i>P. pastoris</i> X33	pFLD	-	ROL	385 U.mL ⁻¹	[61]
<i>P. pastoris</i> X33	pAOX	Mut ^S	ROL	380 U.mL ⁻¹	[62]
<i>P. pastoris</i> GS115	pAOX	Mut ⁺	APL	1593 U.mL ⁻¹	[59]
<i>P. pastoris</i> E17	pAOX	Mut ⁺	rHuEPO	130 mg.L ⁻¹	[63]
<i>P. pastoris</i> hGH	pAOX	Mut ⁺	rhGH	270 mg.L ⁻¹	[64]
<i>P. pastoris</i> GS115	pAOX	Mut ^S	rFSH	280 mg.L ⁻¹	[65]
<i>P. pastoris</i> GS115	pAOX	Mut ^S	srAFP	191 mg.L ⁻¹	[66]

2.3.4. Actividade Proteolítica

A actividade de proteases no meio de cultivo é um dos maiores problemas associados à produção de proteínas recombinantes [1] e, nos cultivos de *P. pastoris*, geralmente são encontradas proteases de várias classes, entre as quais proteases serínicas e aspárticas. A utilização do metanol no meio de cultivo na fase de produção pode causar stress à célula, resultando numa possível sobre-expressão de proteases, o que pode reduzir o rendimento de produção, por um lado pela degradação das proteínas heterólogas de interesse por parte das proteases produzidas e, por outro, porque o metabolismo celular pode ser desviado para a produção destas. [1] A elevada taxa de mortalidade celular na fase de indução, atribuída à acumulação dos produtos do metabolismo de assimilação do metanol, como o formaldeído ou o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), é também uma causa da elevada

actividade proteolítica, dado que, após a morte ocorre a lise celular e a consequente libertação das proteases intracelulares para o meio de cultivo. [1]

A utilização de estirpes deficientes em proteases, tais como SMD1163, SMD1165 e SMD1168, tem sido uma técnica utilizada para minimizar a actividade proteolítica, de modo a aumentar os rendimentos de produção e melhorar a estabilidade das proteínas heterólogas produzidas. [1, 24, 29, 32, 34, 37] Estas estirpes apresentam disrupções dos genes que codificam para as proteases vacuolares proteinase A, proteinase B e carboxipeptidase Y, entre outras. [32] No entanto, alguns autores defendem que estas modificações apresentam desvantagens quando comparadas com as não modificadas, nomeadamente em termos de viabilidade e crescimento celular, dado que a actividade das proteases da célula é necessária para um correcto processamento e activação de outras proteínas. [29, 38]

Ao nível das condições de cultivo, existem vários parâmetros que podem ser regulados de modo a reduzir a actividade proteolítica, nomeadamente o pH, temperatura e constituintes do meio. No que diz respeito ao pH, na literatura são referidas condições de cultivo que variam entre o pH 3 e 7, sem que a essa variação influencie significativamente o crescimento e viabilidade celulares nem o rendimento de produção. Assim sendo, o pH pode ser ajustado para um valor no qual a actividade das proteases seja reduzida. [1, 21] No que diz respeito à temperatura, e como já foi referido anteriormente, a operação a temperaturas baixas, como 15°C, pode reduzir significativamente a actividade das proteases, sem influência significativa no crescimento e produção. [1, 38] A adição de suplementos, como casaminoácidos e peptona, ao meio de cultivo pode ser também uma alternativa, na medida em que estes, sendo fontes de azoto para a célula, reprimem a produção de proteases e a consequente degradação das proteínas. [32, 34, 38] A adição de inibidores de proteases é também uma estratégia a adoptar. No entanto, a utilização destes suplementos implica um aumento do custo do processo e é necessário ter em conta que existem inibidores proteolíticos com propriedades citotóxicas. [1]

2.4. Produção de scFv por *P. pastoris*

Como já referenciado anteriormente, são diversos os sistemas de expressão utilizados para a produção de proteínas heterólogas, nomeadamente as leveduras. No que diz respeito a moléculas com possibilidade de utilização em aplicações terapêuticas, como os fragmentos scFv de anticorpos monoclonais, a *P. pastoris*, por apresentar melhores capacidades de secreção das proteínas heterólogas, pela preferência por processos aeróbios, pela capacidade de operação a elevadas densidades celulares e, principalmente, pelas modificações pós-transdacionais mais “humanizadas”, é um sistema de expressão extensivamente utilizado e estudado. Na literatura já são encontrados diversos estudos de produção deste tipo de moléculas, apresentando produtividades entre 1,0 mg.L⁻¹ até 4,8 g.L⁻¹ (Tabela 3), o que demonstra a sua eficiência como sistema de expressão deste tipo de moléculas. [39]

Tabela 3 – Produção de fragmentos scFv de anticorpos recombinantes por *P. pastoris*. t_i (tempo total de cultivo com indução por Metanol).

Estirpe	Especificidade	Fragmento	Produção (mg.L ⁻¹)	t _i (h)	pH	T (°C)	Ref. ^a
<i>P. pastoris</i> X33	Antigénio da Raiva	scFv-Fc	60,0	30	5,0	28	[25]
<i>P. pastoris</i> MP36	Antigénio Carcinoembriónico	scFv	440,0	41	5,5	30	[12]
<i>P. pastoris</i> KM71H	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (HER2)	scFv	15,0-20,0	72	6,0	30	[10]
<i>P. pastoris</i> GS115	Antigénio MUC1	Fab-scFv	36,8	144	nd	nd	[35]
		Fab-(scFv) ₂	12,0				
<i>P. pastoris</i> KM71H	Antigénio CD33	scFv	48,0	96	6,0	30	[8]
<i>P. pastoris</i> KM71	toxina Cyt2Aa1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	scFvC6.5-synct2Aa1(mychis6)	10,0	72	6,0	30	[26]
<i>P. pastoris</i> X33	domínio ED-B da B-Fibronectina	scFv	60,0	24	5,5	30	[13]
<i>P. pastoris</i> X33	integrina αβ6	scFv	115,0	nd	nd	nd	[18]
<i>P. pastoris</i> GS115	micotoxina zearalenona	scFv	328,0	72	6,5	30	[19]
<i>P. pastoris</i> KM71H	<i>B-Cell activating factor</i> (BAFF)	scFv-Fc	56,0	72	5,0	nd	[67]
nd	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i> (CTLA-4)	scFv	16,0-20,0	72	6,0	nd	[68]
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>α-subunit CD25 of the interleukin-2 receptor</i>	scFv	80,0	72-96	5,6-6,0	28	[20]
<i>P. pastoris</i> KM71	<i>cell-surface glycoprotein p185HER2</i>	scFv	70,0	72	6,0	30	[36]
<i>P. pastoris</i> KM71	Serpinas de <i>Mamestra conFigurata</i>	scFv	25,0	168	7,0	15	[38]
<i>P. pastoris</i> KM71H	queratina 8	scFv	21,4	72	7,1	11	[39]
<i>P. pastoris</i> X33	<i>B-type natriuretic peptide</i> (BNP)	ScFv	150,0	96	5,0-7,0	20	[9]

<i>P. pastoris</i> GS115	ErbB2 (HER2) protooncogene	CD86 ₁₁₁ -IgG-scFv(FRP5)	2,0	72-90	6	25	[69]
<i>P. pastoris</i> GS115	Mab B43.13	scFv	100,0	nd	6	nd	[70]
<i>P. pastoris</i> GS115	glicoproteína A33	scFv	4880,0	84	3	25	[21]
<i>P. pastoris</i> GS115	mAb4813	scFv	45,0	90	6	30	[54]
<i>P. pastoris</i> KM71	glicoproteína A33	scFv- α sarcina	1,0-3,0	72	nd	25	[27]
<i>P. pastoris</i> GS115	ErbB2	scFv	15,0	96	7	30	[71]
<i>P. pastoris</i> X33	Metamidofos	scFv	25,0	72	6,5	30	[44]

3. Materiais e Métodos

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica. Para preparação das soluções foi utilizada água deionizada (*Merck Millipore Milli-Q® Direct Water Purification System*). Os meios de cultivo foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, com exceção do YNB (*Yeast Nitrogen Base*) e Biotina, filtrados em membrana de 0,22 µm.

3.1. *Pichia pastoris*

Neste projecto, foi utilizada a levedura *Pichia pastoris* SMD1168 (Invitrogen®): $\Delta pep4::URA3 \Delta kex1::SUC2his4ura3$ para a expressão do fragmento de anticorpo recombinante scFv anti-LDL(-). A estirpe da *P. pastoris* foi fornecida pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e foi construída pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Andrea Maranhão do Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

3.2. Manutenção e Reactivação da *Pichia pastoris*

As células de *P. pastoris* eram repicadas, a cada três meses, em meio sólido YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) (Extrato de Levedura 10,0 g.L⁻¹, Peptona de Caseína 20,0 g.L⁻¹, Glucose 20,0 g.L⁻¹ e Agar 12,0 g.L⁻¹) e incubadas a 30°C por 24h. Posteriormente, as colónias eram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500,0 mL com 100,0 mL de meio líquido YPD a 30°C e 250 rpm por 24h. As células eram então inoculadas em meio YPD com Glicerol 200,0 g.L⁻¹ e armazenadas em *vials* de 2,0 mL a -70°C.

A primeira etapa (pré-inóculo) do cultivo de células consistia na reactivação das células armazenadas a -70°C. Em frascos Erlenmeyer de 500,0 mL com 200,0 mL de meio BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*) (Peptona de Caseína 10,0 g.L⁻¹, Extracto de Levedura 20,0 g.L⁻¹, Glicerol 10,0 g.L⁻¹, YNB 3,4 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 10,0 g.L⁻¹, 100,0 mM Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0, Biotina 4,0x10⁻⁴ g.L⁻¹) eram inoculados dois *vials* (4,0 mL) do banco de células e incubados a 30°C e 250 rpm por 16h.

3.3. Cultivos para produção de scFv anti-LDL(-)

Foi realizado um estudo de produção de scFv anti-LDL(-), em frasco e em bio-reactor, com alimentação escalonada de fontes de carbono complementares ao metanol na fase de indução de produção – glicerol e sorbitol. Foi ainda realizado um planeamento factorial 3^2 com 4 repetições do ponto central, de modo a avaliar a influência na produção de scFv anti-LDL(-) da adição de casaminoácidos e PMSF.

3.3.1. Alimentação escalonada de glicerol e sorbitol na fase de indução

Um estudo inicial foi realizado em Erlenmeyers de 500,0 mL com 200,0 mL de volume de cultivo, de modo a determinar a influência, no crescimento celular e produção de scFv anti-LDL(-), da adição de diferentes fontes de carbono na fase de indução, em simultâneo com a adição de metanol. A etapa de crescimento celular era realizada em frasco Erlenmeyer de 500,0 mL com 200,0 mL de meio de cultivo BMGY a 30°C e 250rpm por 24h, com o objectivo de obter elevadas concentrações celulares antes de iniciar a fase de indução e produção do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-). Ao meio de cultivo era adicionado um volume de pré-inóculo determinado de forma que a concentração de inicial de células fosse equivalente a $Abs_{600nm}=1,0$.

Após a fase de crescimento celular (0-24h), a todos os cultivos era adicionado metanol (concentração final 1,0% (v/v)) a cada 24h (24h, 48h, 72h, 96h), num período total de cultivo de 120h (96h de indução, entre as 24h e 120h de cultivo). Em simultâneo com a adição de metanol, foi adicionado: glicerol (concentração final 10,0 g.L⁻¹) - **gli**, glicerol (concentração final 5,0 g.L⁻¹) e sorbitol (concentração final 5,0 g.L⁻¹) - **gli/sor** e sorbitol (concentração final 10,0 g.L⁻¹) - **sor**. Foram também realizados cultivos controlo – **controlo**, aos quais não foi adicionada qualquer fonte de carbono para além do metanol. De todos os cultivos foram recolhidas amostras (1,0 mL) a cada 24h e armazenadas a 4°C. No final do cultivo, todo o meio reactivo era armazenado a 4°C para posteriores análises.

As condições de cultivo das variáveis **gli/sor** e **sor** foram então reproduzidas em bioreactor de 3,0 L (New Brunswick BioFlo® 110 Fermentor; New Brunswick BioFlo® 115 Fermentor) com 2,0 L de volume de cultivo, com k_La (coeficiente volumétrico de transferência de massa) constante ($k_La=93,6h^{-1}$), correspondente a uma agitação de 600rpm

e arejamento de 1,0% (vvm). De todos os cultivos em fermentador eram retiradas amostras (15,0 mL) a cada 6h nas primeiras 24h de cultivo e a cada 24h, entre as 24h e 120h de cultivo. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C para posteriores análises.

3.3.2. Adição de Casaminoácidos e PMSF

Um planeamento factorial 3^2 com 4 repetições do ponto central foi desenvolvido para determinar a influência da adição de casaminoácidos e PMSF (*PhenylMethaneSulfonylFluoride*) ao meio de cultivo. Cada uma das variáveis foi avaliada em 3 níveis de variação: -1, 0 e +1. Os valores reais de cada um dos níveis codificados das variáveis em estudo estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Níveis codificados das variáveis em estudo no planeamento factorial

Variável	Níveis Codificados		
	-1	0	+1
Casaminoácidos (g.L ⁻¹)	0,0	20,0	40,0
PMSF (mM)	0,0	1,0	2,0

Desta forma, foram conduzidos cultivos em frascos Erlenmeyer de 500,0 mL com 200,0 mL de meio BMGY nos quais foram testadas as condições descritas na Tabela 5. A etapa de crescimento celular foi realizada conforme descrito anteriormente (secção 3.3.1.). Após a fase de crescimento celular (0-24h), a todos os cultivos era adicionado metanol (concentração final 1,0% (v/v)) a cada 24h (24h, 48h, 72h), num período total de cultivo de 96h (72h de indução, entre as 24h e 96h de cultivo). A adição de casaminoácidos foi realizada no início do cultivo, ao meio BMGY. A adição de uma dose de PMSF, determinada de acordo com o planeamento, foi realizada a cada 24h (24h, 48h, 72h), durante a fase de indução. No final do cultivo, todo o meio reactivo era armazenado a 4°C para posteriores análises.

Tabela 5 – Tabela descritiva das condições de cultivo do planeamento factorial 3² com 4 repetições do ponto central para análise da influência da adição de casaminoácidos e PMSF ao meio de cultivo de *P. pastoris* para produção de scFv anti-LDL(-)

Cultivo	Variáveis	
	Casaminoácidos	PMSF
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	-1
6	0	+1
7	-1	0
8	+1	0
9 a 12	0	0

Os valores das variáveis do planeamento factorial foram codificadas de acordo com a Equação 1:

$$N_C = \frac{(V_R - V_0)}{\Delta V_R} \text{ (Equação 1)}$$

Em que N_C é o valor do nível codificado da variável, V_R é o valor real da variável, V_0 é o valor real da variável no ponto central e ΔV_R é a diferença entre os valores reais da variável em níveis codificados consecutivos.

A análise estatística foi realizada recorrendo ao STATSOFT® STATISTICA.

3.4. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada pelo método de massa seca. Para determinação da concentração celular, as amostras recolhidas foram armazenadas a 4°C em tubos Eppendorf de 2,0 mL com 1,0 mL de amostra e posteriormente centrifugadas a 5000g por 5 minutos. O sobrenadante era recolhido para posterior análise, o *pellet* de células era ressuscitado em água deionizada e submetido novamente a centrifugação 5000g por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e as células eram então colocadas na

estufa a 60°C por 24h, de modo a garantir massa constante, para posterior determinação da massa celular.

3.5. Purificação de scFv anti-LDL(-)

A purificação do fragmento scFv anti-LDL(-) foi realizada por cromatografia de afinidade IMAC em 1,0 mL de resina Ni-Sepharose Fast Flow (GE HealthCare®). 20,0 mL de sobrenadante recolhido das amostras após centrifugação eram adicionados à coluna, previamente equilibrada com 5,0 mL de solução tampão PBS (KCl 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaCl 135,0 mM, Na₂HPO₄ 3,2 mM, pH 7,4). Ao longo de 1h a amostra era mantida na coluna cromatográfica em agitador orbital, a 4°C. Após esta fase, na qual se promoveu a interacção entre os resíduos de histidina da molécula de interesse e os iões Ni²⁺ da coluna cromatográfica, [45–49] a coluna era lavada com 5,0mL de solução tampão de ligação (Na₂HPO₄ 20,0 mM, NaCl 500,0 mM, Imidazol 30,0 mM, pH 7,4) de modo a remover da coluna contaminantes ligados por interacções não específicas. Posteriormente, era adicionado 5,0 mL de uma solução tampão de eluição (Na₂HPO₄ 20,0 mM, NaCl 500,0 mM, Imidazol 500,0 mM, pH 7,4) de modo a eluir o fragmento scFv anti-LDL(-) ligado à coluna, por acção da elevada concentração do Imidazol. Após eluição, procedia-se à limpeza da coluna com solução tampão de limpeza (Na₂HPO₄ 20,0 mM, NaCl 500,0 mM, EDTA 50,0 mM, pH 7,4). Para reactivação da coluna e posterior utilização era adicionado 1,0 mL de uma solução de NiSO₄ 0,1 M. A resina era armazenada a 4°C em solução de etanol 20% (v/v). As amostras recolhidas eram armazenadas a 4°C para posterior análise.

3.6. Quantificação de scFv anti-LDL(-)

A quantificação do fragmento scFv anti-LDL(-) purificado foi realizada com o *kit* de quantificação de proteínas SIGMA-ALDRICH® Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. Neste, a quantificação é realizada segundo o método de Lowry de quantificação de proteína, no qual ocorre a formação de um complexo Cobre(Cu²⁺)-Proteína em condições alcalinas, seguido de uma redução de Cu²⁺ para Cu¹⁺, sendo que a quantidade de iões Cu²⁺ reduzidos é proporcional à quantidade de proteína. A formação de uma coloração púrpura

no meio reaccional permite a quantificação de proteínas por espectrofotometria, pela leitura da Absorvância a 560nm. [72, 73]

A quantificação era realizada pela adição de 25,0 μL de amostra a 200,0 μL de solução de Reagente A (*Bicinchoninic Acid Solution*) e Reagente B (*Copper(II) Sulfate Pentahydrate 4% Solution*) na proporção 1:50 (v/v). A reacção ocorria ao longo de 45 minutos a 37°C.

A curva de calibração de proteína foi realizada com BSA (*Bovine Serum Albumine*) numa gama de concentrações entre os 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.7. Quantificação de Glicerol e Sorbitol

A quantificação do glicerol foi realizada segundo o método desenvolvido por Bok e Demain, [74] no qual ocorre a oxidação do glicerol por acção dos iões Periodato (IO_4^-), formando-se formaldeído. O formaldeído, por sua vez, reage com acetilacetona, acetato de amónio e ácido acético glacial (reacção de Hantzsch), na qual se forma 1,4-DHP (1,4-dihidropiridina dicarboxilato). A formação de 1,4-DHP dá uma coloração amarela ao meio reaccional e permite a quantificação por espectrofotometria, pela leitura de absorvância a 412nm. [75]

O meio reaccional era constituído por: 0,5 mL de sobrenadante; 0,5 mL de uma solução NaIO_4 0,1M e HCl 0,1M; 0,5 mL de uma solução Ramnose 1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 1,0 mL de uma solução Acetato de Amónio 1,0 M, Ácido acético glacial 0,05 M e Acetilacetona 0,02 M. A reacção ocorria por 1h a 60°C e a leitura realizada em placas de 96 poços. Todas as amostras necessitaram de uma diluição apropriada para quantificação, entre 1:200 (v/v) e 1:600 (v/v).

A quantificação do sorbitol foi realizada pelo mesmo método. A quantificação de sorbitol com o kit enzimático BioVision® D-Sorbitol Colorimetric Assay Kit não foi possível. O objetivo da utilização do kit enzimático era quantificar apenas o sorbitol em amostras que contivessem sorbitol e glicerol. Nestas amostras, o valor obtido pelo método colorimétrico apenas representa, em valores de absorvância, o total de polióis presentes, não permitindo determinar a concentração de cada um deles.

Foram determinadas várias curvas de calibração, variando a proporção glicerol/sorbitol (m/m) numa gama de concentração total de polióis entre 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 20,0

g.L^{-1} . Foram ainda determinadas duas curvas de calibração nas quais se manteve a concentração de glicerol constante ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) com a concentração de sorbitol a variar entre $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ e se manteve a concentração de sorbitol constante ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) com a concentração de glicerol a variar entre $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $20,0 \text{ g.L}^{-1}$. Todas as soluções preparadas na gama de concentrações indicada foram diluídas 1:600 (v/v) para quantificação.

3.8. Determinação de parâmetros de cultivo

Com os dados obtidos, foram determinados vários parâmetros de cultivo. Entre estes, a velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) (Equação 2), a concentração de scFv anti-LDL(-) (mg.L^{-1}), a produtividade específica (Prod. Esp.) (mg.g^{-1}), produtividade volumétrica (Prod. Vol.) ($\text{mg.h}^{-1}\text{L}^{-1}$) e o factor de rendimento biomassa/substrato $Y'_{X/S}$ (gX.gS^{-1}) (Equação 3).

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \text{ (Equação 2)}$$

$$Y'_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \text{ (Equação 3)}$$

X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}), X_0 é a concentração inicial de biomassa (g.L^{-1}), t o tempo (h), ΔX a variação da concentração de biomassa (g.L^{-1}), e ΔS a variação de concentração do substrato (g.L^{-1}).

4. Resultados e Discussão

4.1. Alimentação escalonada de glicerol e sorbitol na fase de indução

Num estudo inicial, foram determinadas as concentrações celulares dos cultivos das diferentes condições (**controle**, **gli**, **gli/sor** e **sor**), ao longo de 120h de tempo total de cultivo. A quantidade de scFv anti-LDL(-) produzido foi determinada pela quantificação de proteínas totais das amostras purificadas por cromatografia de afinidade IMAC. Nas 24h iniciais o meio de cultivo (BMGY) é comum a todos os cultivos, e apenas na fase de indução da expressão do scFv anti-LDL(-) as diferentes condições foram estabelecidas, pela adição das diferentes fontes de carbono.

4.1.1. Crescimento celular

As primeiras 24h correspondem à fase de crescimento exponencial das células (Figura 2). A taxa específica de crescimento máxima nesta fase foi de $\mu_{\text{máx}}=0,11\text{h}^{-1}$. Após 24h de cultivo a densidade celular era $8,4 \pm 0,7\text{ g.L}^{-1}$ (Figura 3). Pela observação do gráfico da Figura 2, verifica-se que a partir das 24h de cultivo, o crescimento celular é mais lento e, no caso dos cultivos **controle**, aos quais foi adicionado apenas metanol na fase de indução, verifica-se morte celular após as 48h, com uma taxa específica de morte celular de $0,0037\text{h}^{-1}$, pela diminuição da concentração celular no meio de cultivo (Figura 3). Isto pode ser devido ao stress causado às células pela elevada concentração de metanol no meio para indução da produção da proteína heteróloga. [1] Isto é ainda evidenciado pelo facto de o crescimento celular entre as 24h e 48h ser mais lento do que os verificados para os outros cultivos (Figura 2) e, no final do cultivo, a concentração celular ser inferior àquela que se obteve no final da fase de crescimento exponencial, $7,4 \pm 0,9\text{ g.L}^{-1}$ e $8,4 \pm 0,7\text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6).

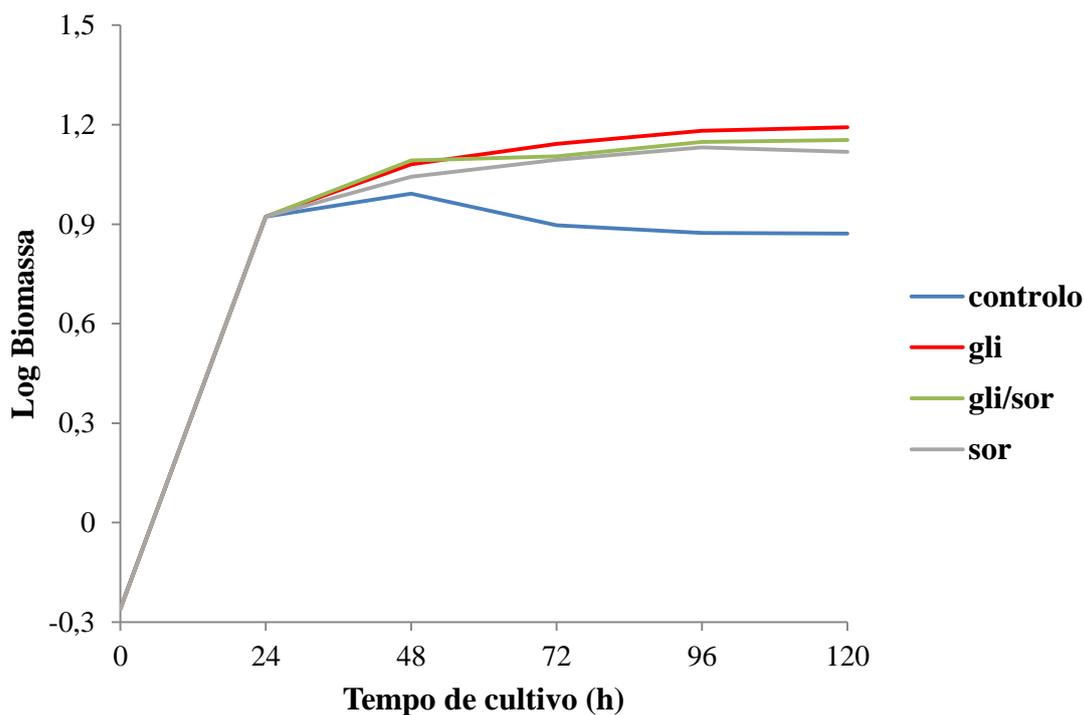


Figura 2 - Gráfico representativo do crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, nas diferentes condições testadas. Log X: Logaritmo da concentração de biomassa.

No que diz respeito aos cultivos aos quais foram adicionados glicerol e/ou sorbitol, verifica-se, pela observação do gráfico da Figura 2, crescimento entre as 24h e 48h superior áquele que é verificado após essa hora, o que pode ser justificado pela entrada na fase estacionária de crescimento por parte das células, pelo facto de o metabolismo destas estar a ser direccionado para a produção da proteína heteróloga induzida pela presença da elevada concentração de metanol no meio e ainda por, numa fase mais avançada do cultivo, a morte celular começar a ser significativa. Um máximo de concentração celular foi obtido na condição **gli**, com uma concentração total de células no final do cultivo de $15,6 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 6) As concentrações celulares apresentadas pelas condições **gli/sor** e **sor** no final do cultivo foram de $14,3 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $13,1 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6).

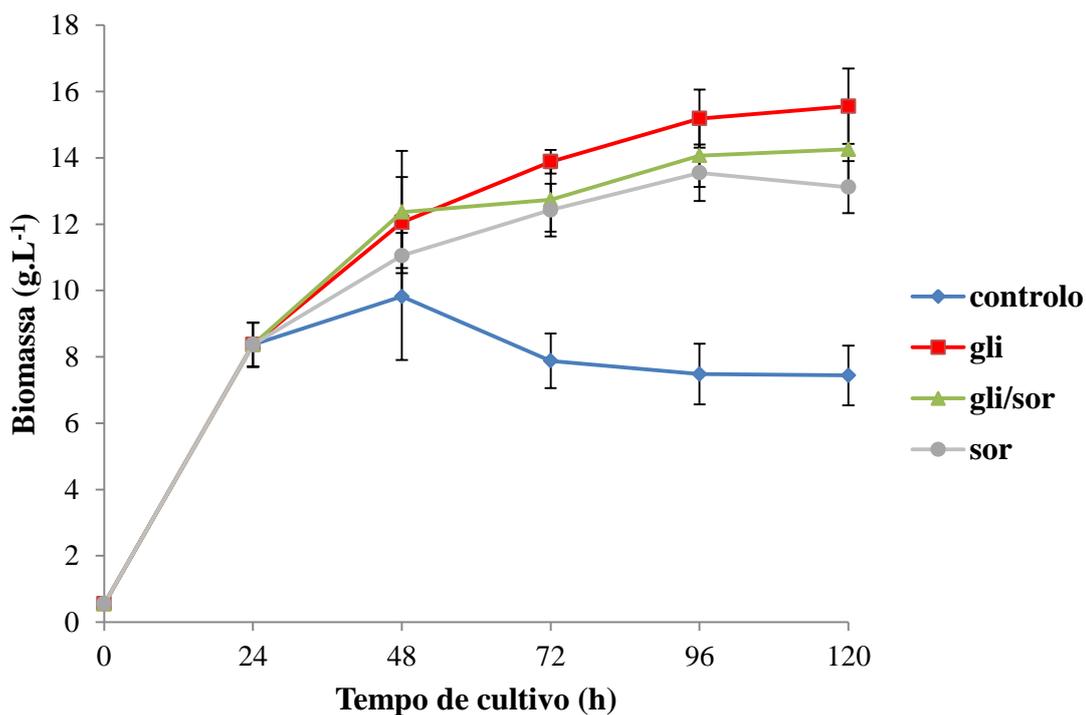


Figura 3 – Gráfico representativo do crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, nas diferentes condições testadas.

No final do processo, verificou-se a perda de cerca de 5% do volume reaccional, o que pode ser devido à evaporação do metanol, da água do meio e ainda de alguns compostos, como o etanol, produzidos por fermentação, que pode ter ocorrido devido à limitação de arejamento dos frascos.

4.1.2. Produção de scFv-anti-LDL(-)

A fase de produção de scFv anti-LDL(-) decorreu ao longo de 96h. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade IMAC e, posteriormente, foi determinada a concentração de proteínas totais nas amostras purificadas.

Como vem descrito nos resultados apresentados na Tabela 6, a operação em modo de alimentação escalonada, na fase de indução, com a adição de uma fonte de carbono adicional ao metanol resultou num aumento na produção do fragmento de anticorpo. Após 96h de indução, a concentração de scFv anti-LDL(-) de $122,8 \pm 13,8 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentada

nas condições **controle** é 15,0% a 17,0% inferior à verificada nos cultivos das condições **gli**, **gli/sor** e **sor**. No cultivos **gli** obteve-se um máximo de concentração de scFv anti-LDL(-) de $148,7 \pm 18,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 6). No entanto, as diferenças de produtividade obtidas entre as condições em estudo (**gli**, **gli/sor** e **sor**) não são significativas, tendo em conta o erro associado (Tabela 6), sendo que em termos de produtividade volumétrica, os valores obtidos para as condições em estudo se equivalem, na ordem dos $1,2 \text{ mg.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ (Tabela 6). No que diz respeito à produtividade específica, o valor mais elevado foi obtido nos cultivos **controle**, o que se justifica por estes apresentarem menor concentração celular (cerca de 50,0%), comparativamente aos outros cultivos. Neste sentido, o facto de haver menor produção por parte dos cultivos que utilizam apenas o metanol como fonte de carbono, comparativamente áqueles que utilizam o glicerol ou o sorbitol, pode ser compensado pela menor quantidade de células no meio de cultivo e pelo facto de o meio ser menos complexo. Isto é, menor concentração de células no meio de cultivo pode apresentar vantagens, nomeadamente em termos de consumo de substrato e ainda, no que diz respeito aos processos *downstream*, ou seja, nos processos de clarificação do meio e posterior purificação da proteína de interesse. Maior concentração celular pode implicar maior libertação de componentes celulares, entre os quais, proteases, resultantes da morte e consequente lise celular. No entanto, na literatura relativamente a processos que utilizam a *P. pastoris* como sistema de expressão, produtividades volumétricas em operações com densidades celulares mais elevadas são preferíveis.

Tabela 6 – Resultados obtidos no estudo de produção de scFv anti-LDL(-). μ : taxa específica de crescimento, na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo; [scFv anti-LDL(-)]: Concentração final de scFv anti-LDL(-).

	Biomassa (g.L⁻¹)	μ (h⁻¹)	[scFv anti-LDL(-)] (mg.L⁻¹)	Prod. Vol. (mg.h⁻¹L⁻¹)	Prod. Esp. (mg.g⁻¹)
controle	$7,4 \pm 0,9$	*	$122,8 \pm 13,8$	$1,0 \pm 0,1$	$16,5 \pm 1,9$
gli	$15,5 \pm 1,1$	0,0036	$148,7 \pm 18,3$	$1,2 \pm 0,2$	$9,6 \pm 1,2$
gli/sor	$14,3 \pm 1,2$	0,0025	$141,2 \pm 14,4$	$1,2 \pm 0,1$	$9,9 \pm 1,1$
sor	$13,1 \pm 0,8$	0,0025	$145,9 \pm 23,8$	$1,2 \pm 0,2$	$11,1 \pm 1,8$

*No caso dos cultivos **controle**, não se verificou crescimento celular mas antes morte celular ($0,0037\text{h}^{-1}$).

Comparativamente aos valores de produtividade descritos na literatura para a produção de fragmentos scFv, apresentados na Tabela 3, os resultados obtidos neste estudo em frasco evidenciam a capacidade de produção deste tipo de moléculas por *P. pastoris*. A produção do fragmento scFv anti-LDL(-) de cerca de 148 mg.L⁻¹ equivale-se aos resultados obtidos por Maeng *et al.* [9] (150 mg.L⁻¹) e Kogelberg *et al.* [18] (115 mg.L⁻¹) (Tabela 3). No que diz respeito aos resultados apresentados na literatura para a produção de proteínas heterólogas em operação com alimentação escalonada de fontes de carbono complementares ao metanol na fase de indução de produção, os resultados obtidos neste estudo apresentam melhores valores de produtividade quando comparados com os apresentados por Rahbarizadeh *et al.* [60], de 10-15 mg.L⁻¹ do fragmento de anticorpo anti-MUC1 VHH (Tabela 2). De referir ainda que estes resultados foram obtidos para cultivos realizados em frasco Erlenmeyer sem arejamento e que o controlo operacional neste tipo de operações é reduzido, de modo que melhores resultados são expectáveis em bio-reactor arejado.

4.2. Cultivos em Bio-reactor

As condições **gli/sor** e **sor** testadas em frasco foram reproduzidas em bio-reactor arejado de modo a verificar a viabilidade e reprodutibilidade das mesmas condições no aumento de escala do processo de produção de scFv anti-LDL(-). Foram determinadas as concentrações celulares ao longo do cultivo, assim como a quantidade de substrato consumido e de produto formado.

4.2.1. Crescimento celular

Na Figura 4 observa-se que a fase de crescimento exponencial tem a duração de aproximadamente 6h. A velocidade específica de crescimento neste período, de 0,43h⁻¹ (Tabela 7) é cerca de 4 vezes superior à apresentada pelos cultivos em frasco, nas 24h de fase de crescimento celular. Ao fim de 24h de cultivo, a densidade celular alcançada foi cerca de 16 g.L⁻¹ (Tabela 7), aproximadamente o dobro da densidade celular apresentada pelos cultivos em frasco, após crescimento durante igual período. O crescimento celular mais rápido pode ser devido ao facto de o oxigénio já se encontrar mais disponível e a agitação realizada pelas pás do bio-reactor permitir uma homogenização mais adequada do meio de cultivo.

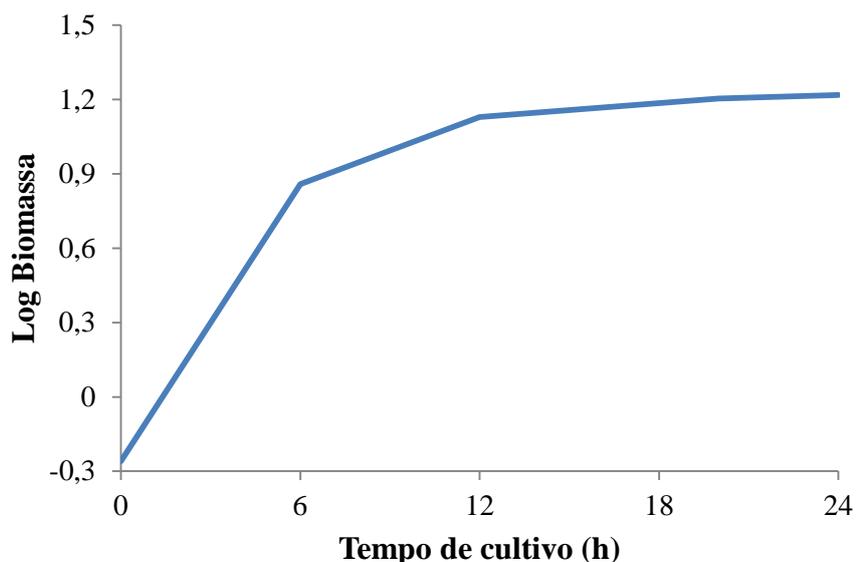


Figura 4 – Gráfico representativo do crescimento celular nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor.

De acordo com o que vem descrito na Tabela 7, a velocidade de crescimento específica nas primeiras 6h de cultivo é cerca de 4 vezes superior à verificada nas 6h seguintes. Isto pode ser devido à diminuição do glicerol disponível ou pela entrada na fase estacionária de crescimento.

Tabela 7 – Velocidade específica de crescimento (μ) e Biomassa total produzida (g) por Litro, nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor. t: intervalo de tempo de cultivo.

t (h)	μ (h^{-1})	Biomassa ($g.L^{-1}$)
0-6	0,43	$7,2 \pm 2,3$
6-12	0,10	$13,5 \pm 2,3$
12-24	0,02	$16,5 \pm 1,2$

Na fase de indução, as amostras eram recolhidas a cada 24h. Pela observação do gráfico da Figura 5, verifica-se um crescimento relativamente constante a partir das 24h para ambas as condições de cultivo. As velocidades específicas de crescimento estão descritas na Tabela 8, sendo que, para a condição **gli/sor** esta é ligeiramente superior em

relação à verificada nos cultivos **sor**. O máximo de concentração celular no final de cultivo foi obtido nos cultivos **gli/sor**, com densidades celulares na ordem das 30 g.L⁻¹ (Tabela 8).

As densidades celulares obtidas são, no entanto, mais baixas que as descritas na literatura para a estirpe SMD1168, na ordem dos 130 g.L⁻¹ [34] e 165 g.L⁻¹ [76] em estudos realizados por Jahic *et al.* [34, 76].

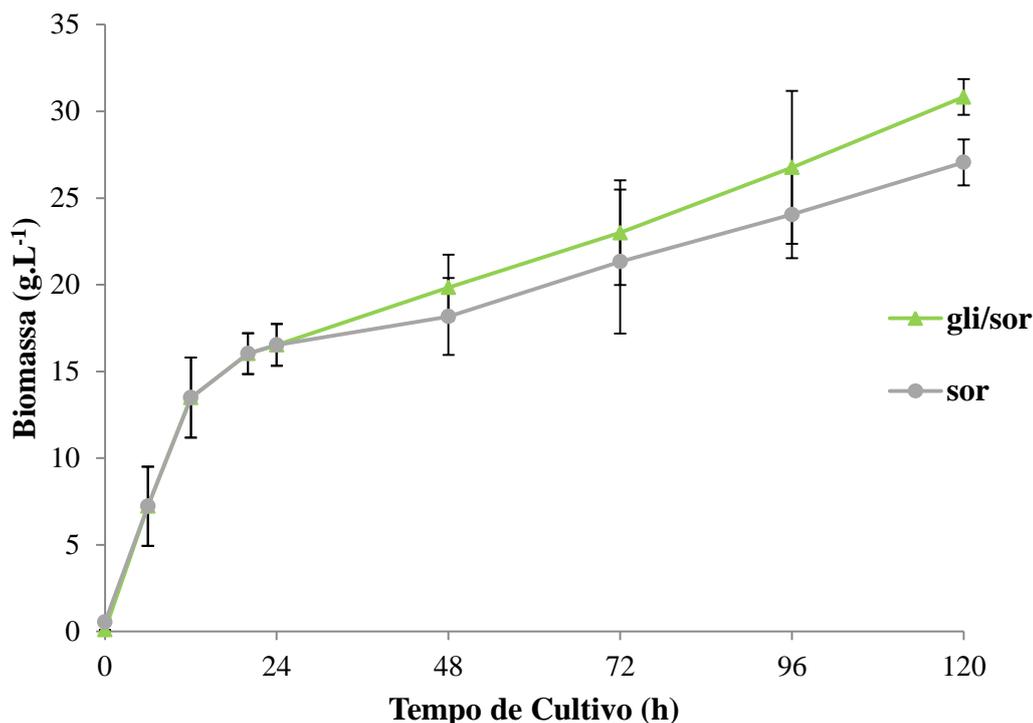


Figura 5 – Gráfico representativo das curvas de crescimento celular, ao longo de 120h de cultivo, em bio-reactor, nas diferentes condições testadas.

Pela observação do gráfico da Figura 5, nota-se que a adição, na fase de indução, de uma fonte de carbono em simultâneo com o metanol resulta num crescimento relativamente constante ao longo do tempo de cultivo, com velocidades de crescimento específicas de 0,0055h⁻¹ e 0,0061h⁻¹ apresentadas pelos cultivos das condições **sor** e **gli/sor**, respectivamente (Tabela 8). Este crescimento resulta em concentrações celulares cerca de duas vezes superior às verificadas em frasco, para as mesmas condições. O facto de se verificar um crescimento relativamente constante ao longo do tempo evidencia a possibilidade de operação ao longo de períodos de tempo superiores ao testado neste

estudo, o que pode ser vantajoso no que diz respeito à obtenção de maiores densidades celulares e, inclusive, a uma maior produção de scFv anti-LDL(-).

Tabela 8 – Velocidade específica de crescimento (μ) e Biomassa total produzida (g) por litro, na fase de indução (entre as 24h e 120h)

	μ (h^{-1})	Biomassa (g.L^{-1})
sor	0,0055	$27,1 \pm 1,3$
gli/sor	0,0061	$30,8 \pm 1,0$

4.2.2. Consumo de Substrato

4.2.2.1. Determinação das curvas de calibração

A determinação das curvas de calibração foi efectuada pelo método colorimétrico descrito no capítulo 3. Foram determinadas várias curvas de calibração, nas quais se fez variar a razão mássica glicerol/sorbitol, numa gama de concentrações totais dos polióis entre 0,50 e 20,0 g.L^{-1} . Todas as soluções foram diluídas com factor de diluição 600 para quantificação. Os valores de Absorvância 412nm foram determinados pela multiplicação do valor real de absorvância pelo factor de diluição.

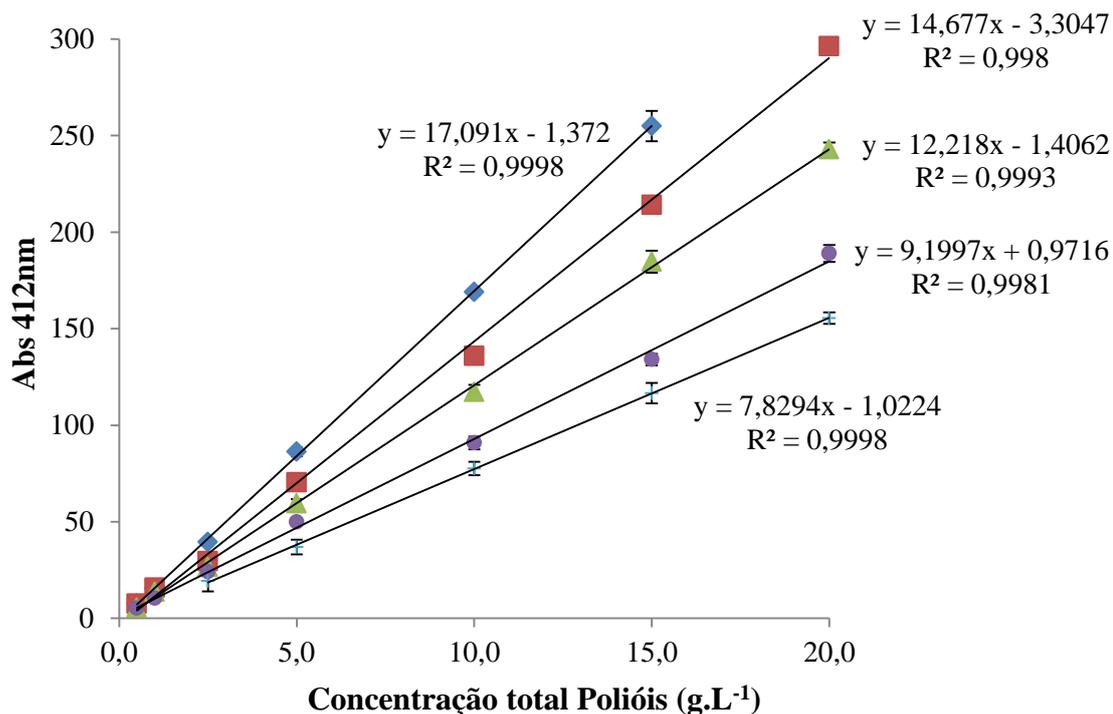


Figura 6 - Curvas de calibração das soluções com diferentes rácios glicerol:sorbitol. ◆ glicerol:sorbitol 1:0 (m/m) ; ■ glicerol:sorbitol 0,75:0,25 (m/m); ▲ glicerol:sorbitol 0,50:0,50 (m/m); ● glicerol:sorbitol 0,25:0,75 (m/m); + glicerol:sorbitol 0:1 (m/m).

Os declives das curvas de calibração decrescem de acordo com o aumento da proporção de sorbitol (Figura 6). O declive da curva de calibração correspondente a glicerol:sorbitol 1:0 (m/m) ($m_g=17,09$) é aproximadamente o dobro do declive apresentado pela curva de calibração correspondente a glicerol:sorbitol 0:1 (m/m) ($m_s=7,82$). Isto evidencia que, na reacção de formação de formaldeído, o glicerol é oxidado e formam-se duas moléculas de formaldeído enquanto que na reacção de oxidação do sorbitol só se forma uma. Desta forma, foi verificada a linearidade no decréscimo do declive da curva de calibração com o aumento da proporção de sorbitol (Figura 7).

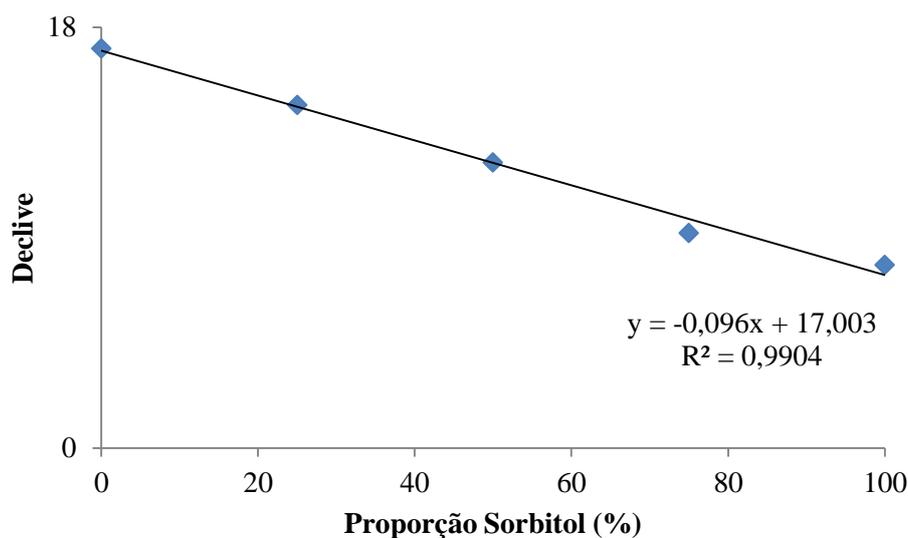


Figura 7 - Decréscimo linear do declive das curvas de calibração das soluções glicerol:sorbitol de acordo com o aumento da proporção do sorbitol

Não é possível quantificar por este método as concentrações de glicerol e sorbitol em amostras que contenham ambos. De forma a que fosse possível a quantificação destes nas amostras dos cultivos **gli/sor**, nos quais são adicionados glicerol e sorbitol em simultâneo na fase de indução, foram determinadas duas curvas de calibração: numa, manteve-se a concentração de glicerol constante em $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e variou-se a concentração de sorbitol. Noutra, manteve-se constante a concentração de sorbitol em $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e fez-se variar a concentração de glicerol. Desta forma, e com a determinação da concentração do sorbitol nas amostras utilizando o kit enzimático, seria possível a quantificação de ambos os polióis na mesma amostra, de acordo com a Equação 4:

$$Abs_{412nm} = m_1 C_G + m_2 C_S \text{ (Equação 4)}$$

Na qual, m_1 e m_2 representam os declives das curvas de calibração com variação da concentração de glicerol e sorbitol, respectivamente, C_G a concentração de Glicerol e C_S a concentração de Sorbitol (Figura 8). Determinado o valor de absorvância da amostra, e a concentração de sorbitol utilizando o kit enzimático, seria possível, então, determinar a concentração de glicerol. No entanto, o kit enzimático não se encontrava nas melhores

condições de utilização, a quantificação do sorbitol não foi possível e, conseqüentemente, a determinação das concentrações de glicerol e sorbitol nas amostras não pôde ser realizada. Assim, não foi possível determinar o comportamento de consumo destes substrato nos cultivos de *P. pastoris*.

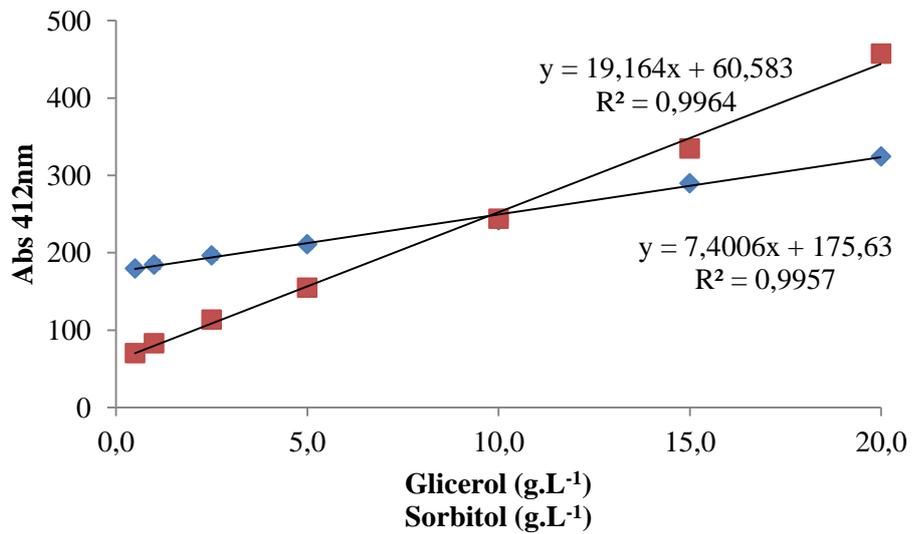


Figura 8 - Curvas de calibração das soluções: ■ concentração de sorbitol 10,0 g.L⁻¹ constante e variação da concentração de glicerol; ◆ concentração de glicerol 10,0 g.L⁻¹ constante e variação da concentração de sorbitol.

4.2.2.2. Consumo de substrato nos cultivos em bio-reactor

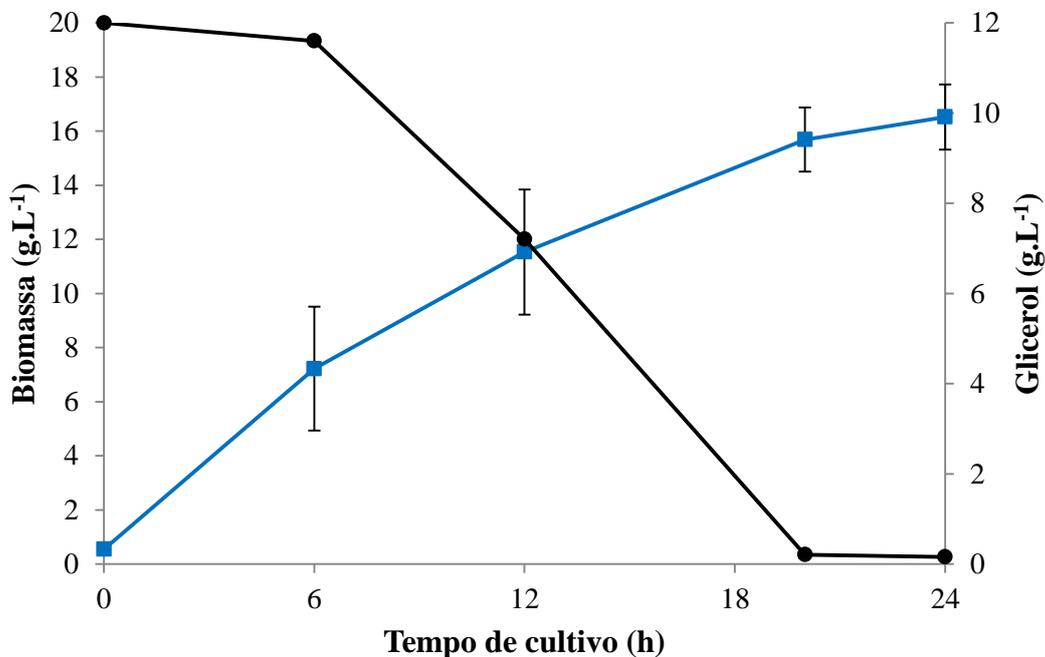


Figura 9 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a azul) e consumo de glicerol (linha a preto), nas primeiras 24h de cultivo, em bio-reactor.

O gráfico da Figura 9 ilustra o consumo de glicerol ao longo das primeiras 24h de cultivo assim como o crescimento celular. O consumo de glicerol deu-se, maioritariamente, entre as 6h e 20h de cultivo. A partir desta hora a sua concentração no meio era residual. A diminuição da velocidade de crescimento verificada entre as 20h e 24h pode dever-se ao facto de o glicerol não estar disponível neste período. Nas primeiras 6h de cultivo, o escasso consumo pode ser justificado com a necessidade das células se adaptarem ao novo meio de cultivo no início do cultivo, a fase lag de crescimento. No entanto, os dados obtidos não são conclusivos, dado que só se avaliaram as concentrações de biomassa no início e no final das primeiras 6h de cultivo, logo uma monitorização do crescimento celular ao longo do tempo seria adequada para determinar com maior rigor a curva de crescimento da levedura. O factor de rendimento biomassa/substrato ($Y'_{X/S}$), que relaciona

a biomassa formada (X) por substrato consumido (S), neste caso, glicerol, para esta fase, foi de $Y'_{X/S}=1,3 \text{ gX.gS}^{-1}$.

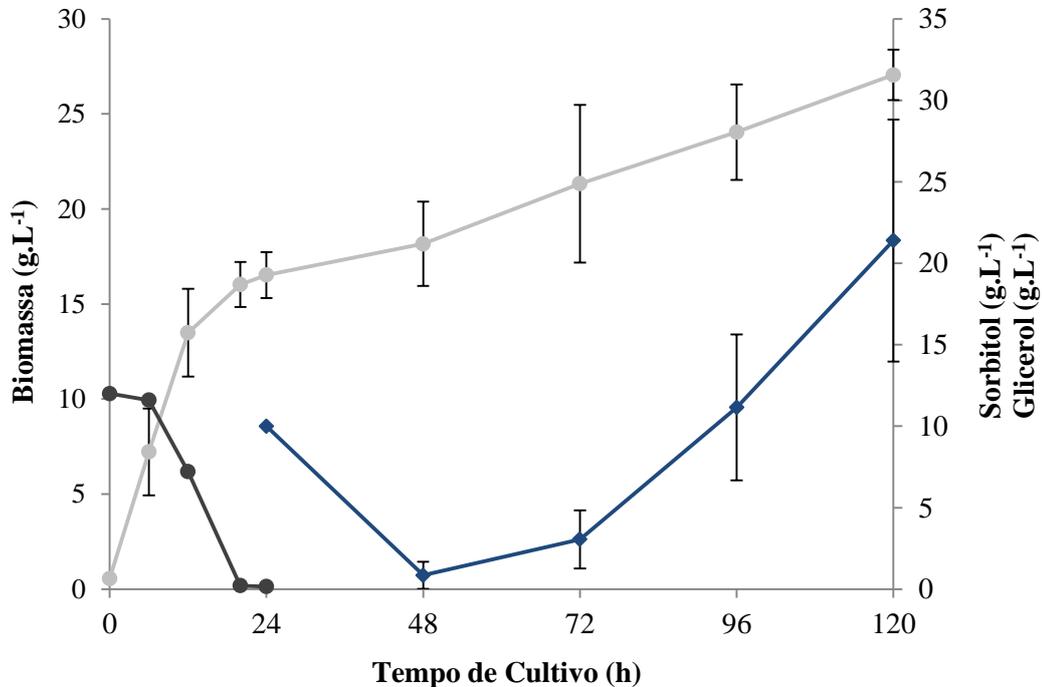


Figura 10 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a cinzento), consumo de glicerol nas primeiras 24h de cultivo (linha a preto) e da concentração de sorbitol na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo (linha a azul escuro), nos cultivos realizados em bio-reactor na condição sor.

Pela observação do gráfico da Figura 10, verifica-se um consumo quase total do sorbitol disponível entre as 24h e 48h, no entanto a partir desse período o sorbitol começou a acumular-se no meio de cultivo, sugerindo que a taxa de consumo do mesmo diminuiu significativamente ao longo do tempo. Isto pode ser explicado pelo aumento da densidade celular, o que aumenta a resistência à transferência de massa. [64] O mesmo comportamento foi verificado nos cultivos **gli/sor**, como é ilustrado no gráfico da Figura 11. Os resultados apresentados por Jungo *et al.* [58], nos estudos realizados em que testou

a adição de sorbitol e metanol na fase de indução, verificou que o sorbitol não era totalmente consumido, e acumulava no meio, ao contrário do que acontecia com o metanol.

A acumulação do sorbitol ao longo do tempo de cultivo sugere que este pode ser adicionado em menores quantidades sendo que um estudo da concentração óptima deve ser efetuado. O factor de rendimento biomassa/substrato obtido para os cultivos nas condições **sor**, na fase de produção, foi de $Y'_{X/S}=0,56 \text{ gX.gS}^{-1}$.

No que diz respeito aos cultivos realizados na condição **gli/sor**, também se verifica acumulação do substrato (Figura 11). No entanto, os valores são apresentados em unidades de absorvância a 412nm (UAbs412nm), dado que a quantificação do glicerol e sorbitol individualmente não foi possível. Estudos posteriores poderão ser realizados de modo a determinar se o consumo destes é simultâneo ou sequencial. A maior densidade celular obtida nesta condição, comparativamente aos valores obtidos em **sor**, sugere que a utilização de glicerol na fase de indução traz vantagens no que diz respeito à obtenção de elevadas densidades celulares.

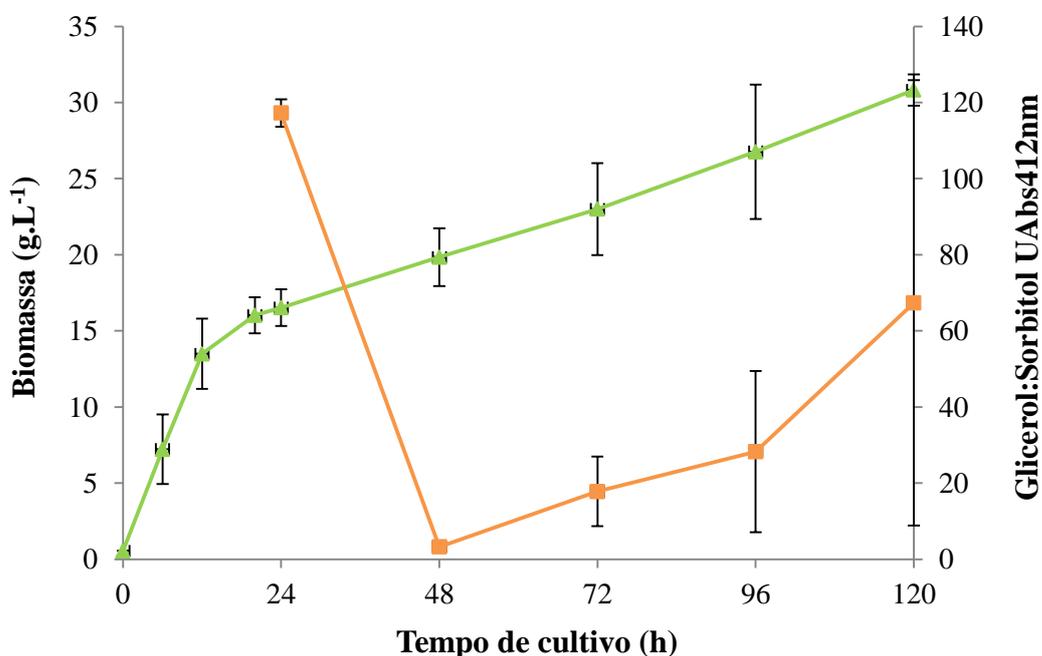


Figura 11 - Gráfico representativo do crescimento celular (linha a verde) e concentração de glicerol e sorbitol na fase de indução, entre as 24h e 120h de cultivo (linha a laranja), nos cultivos realizados em bio-reactor na condição gli/sor.

A quantificação do scFv anti-LDL(-) não foi possível, sendo que após purificação não era detectável a presença de proteína na amostra purificada. Daqui se propõe não ter ocorrido produção nas condições estabelecidas em bio-reactor. A perda de cerca de 35% do volume de cultivo ao longo das 120h de operação, evidencia a evaporação de componentes no meio, tal como se tinha verificado nos cultivos realizados em frasco. No entanto, esta perda de volume foi significativamente mais elevada, de 5% para 35%. A perda de volume por evaporação de compostos voláteis, como o metanol, pode ter influência na produção da proteína heteróloga na medida em que, no caso de ocorrer a evaporação do metanol, este já não se encontrar disponível no meio para indução da produção. A diminuição do volume reaccional implica também uma maior resistência às transferências de massa, pelo aumento da concentração de sólidos suspensos, como as próprias células. No entanto, estudos mais detalhados necessitam ser realizados de forma a confirmar estes pressupostos. De ressaltar ainda que, dada a perda de volume reaccional por evaporação, algumas condições de operação podem ser alteradas, nomeadamente a agitação menos vigorosa, o caudal de arejamento mais baixo ou ainda a operação a temperaturas mais baixas que 30°C.

4.3. Análise da influência da adição de Casaminoácidos e PMSF

Para estudar a influência da adição ao meio de cultivo de Casaminoácidos e PMSF para produção de scFv anti-LDL(-) foi realizado um planeamento factorial de 3^2 com 4 repetições do ponto central. Os ensaios efectuados e os respectivos valores de produtividade estão descritos na Tabela 9.

Os melhores resultados foram obtidos nos cultivos 3 e 4, aos quais foram adicionados casaminoácidos na maior concentração (40,0 g.L⁻¹), independentemente da concentração adicionada de PMSF. Isto sugere que a adição de casaminoácidos tem maior influência na produção de scFv anti-LDL(-) do que a adição do PMSF. Estes resultados são expectáveis na medida em que a adição de casaminoácidos é uma suplementação de azoto adicional, favorecendo desta forma a produção de proteínas e diminuindo, inclusive, a necessidade da célula em produzir proteases. [32, 34, 38]

Tabela 9 - Tabela descritiva das condições de cultivo e respectivos valores de concentração de scFv anti-LDL(-) (mg.L⁻¹) do planeamento factorial 3² com 4 repetições do ponto central para análise da influência da adição de casaminoácidos e PMSF ao meio de cultivo de *P. pastoris* para produção de scFv anti-LDL(-)

Cultivo	Variáveis		[scFv anti-LDL(-)] (mg.L ⁻¹)
	Casaminoácidos	PMSF	
1	-1	-1	30,2
2	-1	+1	45,2
3	+1	-1	57,7
4	+1	+1	53,1
5	0	-1	46,4
6	0	+1	51,1
7	-1	0	34,5
8	+1	0	45,0
9	0	0	30,7
10	0	0	33,5
11	0	0	33,9
12	0	0	31,1

No que diz respeito ao PMSF, pela análise dos resultados obtidos nos cultivos 2 e 6 (Tabela 9), aos quais foi adicionado na maior concentração, verifica-se que a sua adição resulta numa maior concentração de scFv anti-LDL(-) no final do cultivo comparativamente aos resultados obtidos nos pontos centrais (cultivos 9-12) (Tabela 9), no entanto menor que os valores obtidos para a adição de casaminoácidos nos cultivos 3 e 4 (Tabela 9). Estes resultados podem ser explicadas na medida em que o PMSF pode não ter acção efectiva pelo facto de a estirpe utilizada neste estudo, a *Pichia pastoris* SMD1168, ser uma estirpe deficiente em proteases. No entanto, estes dados não são conclusivos no que diz respeito à utilização de outros inibidores proteolíticos, por um lado porque o PMSF é, essencialmente, um inibidor de proteases serínicas [77] e, por outro, por não ter sido realizada a determinação da actividade proteolítica no meio extracelular, não se pode afirmar que ela não exista apenas pelo facto de que a adição de PMSF não se revelar significativamente influente. Outras classes de proteases podem estar presentes e a sua actividade continuar na presença de PMSF.

Tabela 10 – Parâmetros da análise de variância (ANOVA) da produção de scFv anti-LDL(-) de acordo com as variáveis Casaminoácidos e PMSF. SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática.

Variação	SQ	GL	MQ	Factor f	Valor p
Casaminoácidos	352,5	2	176,2	63,8	0,003
PMSF	280,0	2	140,0	50,7	0,005
Casaminoácidos + PMSF	176,2	4	44,0	15,9	0,023
Erro	8,3	3	2,8		
Erro total	1061,0	11			

Pela análise dos dados da Tabela 10, verifica-se que a adição de casaminoácidos é a variável com maior influência (Valor $p=0,003$) na produção de scFv anti-LDL(-). De acordo com os resultados, a influência da adição de PMSF também é significativa (Valor $p=0,005$), enquanto que a combinação de ambas as variáveis se revela menos influente do que as variáveis em separado. Isto vem de acordo com o estabelecido anteriormente, em que se verificou, pela análise dos resultados apresentados na Tabela 9, que a produção de scFv anti-LDL(-) foi superior com a adição de Casaminoácidos, independentemente da adição de PMSF. Assim, pressupõe-se que a adição de Casaminoácidos seja o aspecto mais relevante na optimização do processo de produção. A influência menos significativa do PMSF pode estar relacionada com o facto de, como referido anteriormente, a sua acção como inibidor proteolítico não ser necessária, visto a estirpe utilizada ser deficiente em proteases. Por apresentar baixa solubilidade e instabilidade em água [77, 78] e o seu tempo de meia vida ser relativamente curto (55min em solução aquosa, 25°C, pH 7,5), [78] pode não ter acção efectiva como inibidor proteolítico no meio aquoso de cultivo. A sua menor influência pode estar ainda relacionada com a sua toxicidade e a do solvente (Isopropanol) utilizado para preparar a solução de PMSF para adicionar ao meio de cultivo.

No entanto, deste estudo não é possível determinar as condições óptimas de operação no que diz respeito às variáveis em estudo, isto é, não é possível determinar as concentrações óptimas de Casaminoácidos e PMSF a adicionar ao meio de cultivo. Pelos resultados obtidos apresentados nas Tabelas 9 e 10 e pela observação do Gráfico da Figura 12, que nos mostra a superfície de resposta do planeamento factorial, pode-se apenas concluir que maior concentração de Casaminoácidos e de PMSF são favoráveis à produção de scFv anti-LDL(-). No entanto, no que diz respeito à adição de PMSF e considerando o

seu tempo de meio vida em meio aquoso, a sua utilização pode não ser necessária em maior concentração que as utilizada neste estudo (2,0 mM), mas sim um intervalo de tempo de adição ao meio de cultivo menor que o utilizado, de 24h em 24h.

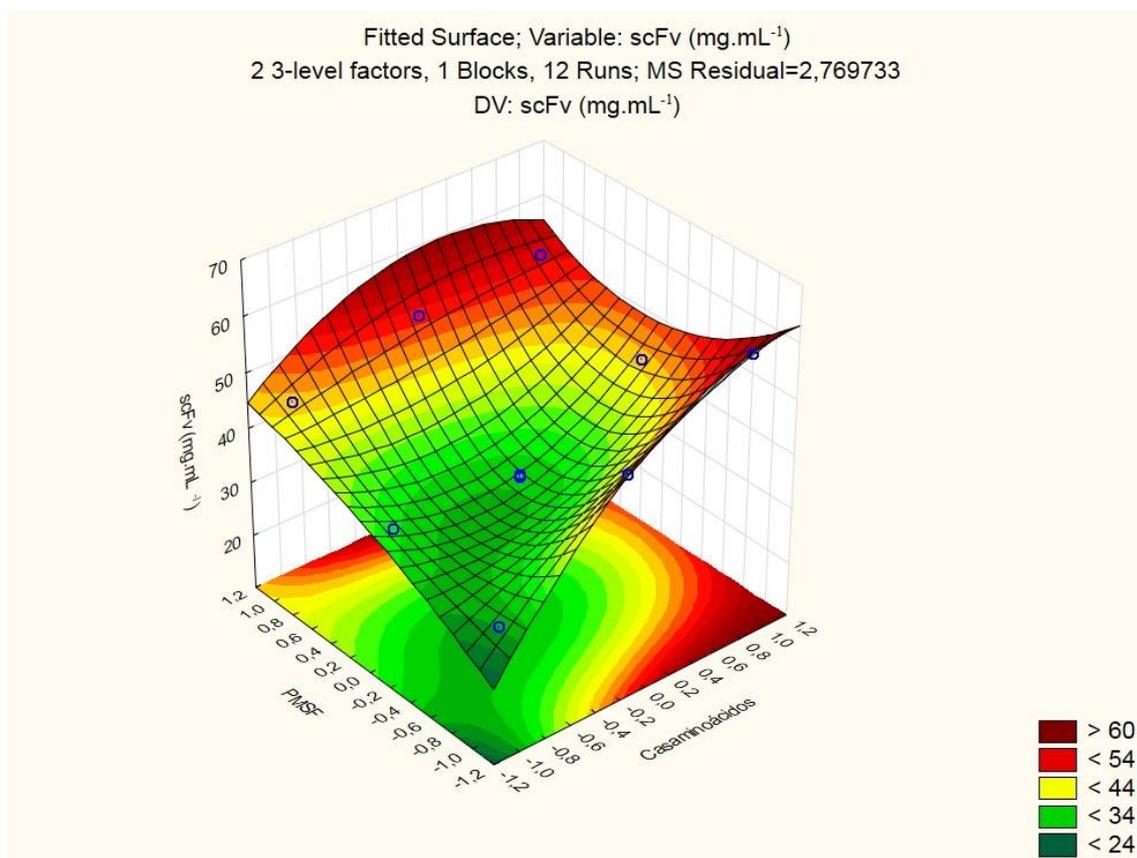


Figura 12 - Superfície de resposta do planejamento 3² com 4 repetições do ponto central da produção de scFv anti-LDL(-) de acordo com as variáveis Casaminoácidos e PMSF.

5. Conclusões

Os estudos de produção em frasco de scFv anti-LDL(-) com alimentação escalonada de sorbitol e glicerol complementares ao metanol resultaram em maior produção do fragmento de anticorpo, comparativamente aos cultivos aos quais só é adicionado metanol na fase de indução. A concentração máxima de scFv anti-LDL(-) obtida foi de $148,7 \pm 18,3 \text{ mg.L}^{-1}$ para os cultivos aos quais foi adicionado glicerol – **gli**. No entanto, as diferenças de produtividade obtidas entre as condições em estudo (**gli**, **gli/sor** e **sor**) não são significativas, tendo em conta o erro associado, sendo que para os cultivos **gli/sor** e **sor** os valores obtidos foram, respectivamente, $141,2 \pm 14,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $145,9 \pm 23,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Um máximo de concentração celular foi obtido na condição **gli**, com uma concentração total de células no final do cultivo de $15,6 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$. As concentrações celulares apresentadas pelas condições **gli/sor** e **sor** no final do cultivo foram de $14,3 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $13,1 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Assim, conclui-se que a adição de uma fonte de carbono adicional na fase de indução é um parâmetro importante no processo de produção do scFv anti-LDL(-) por *Pichia pastoris*. Mais estudos devem ser realizados de modo a determinar as concentrações óptimas de alimentação do glicerol e/ou sorbitol para produção do scFv anti-LDL(-).

Os ensaios realizados em bio-reactor para produção de scFv anti-LDL(-) não foram bem sucedidos no que diz respeito ao estudo da produção, dado que não foi observada a presença do fragmento nas amostras purificadas. No que diz respeito ao crescimento celular, foi observada uma fase exponencial de crescimento nas primeiras 6h de cultivo, com taxa específica de crescimento máxima de $\mu_{\text{máx}}=0,43\text{h}^{-1}$. O máximo de concentração celular ao fim de 120h de cultivo foi obtido nos cultivos aos quais era adicionado glicerol e sorbitol (**gli/sor**), com $30,8 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que os cultivos aos quais foi adicionado sorbitol (**sor**) apresentaram uma concentração celular final de $27,1 \pm 1,3 \text{ g.L}^{-1}$. Os valores de concentração celular no final dos cultivos em bio-reactor foram cerca de 2 vezes superiores aos resultados obtidos em frasco nas mesmas condições. O factor de rendimento biomassa/substrato obtido na fase de crescimento de biomassa, ou seja, nas primeiras 24h de tempo de cultivo, foi de $Y'_{X/S}=1,3 \text{ gX.gS}^{-1}$. Para os cultivos nas condições **sor**, na fase de produção, foi de $Y'_{X/S}=0,56 \text{ gX.gS}^{-1}$.

No estudo realizado segundo o planeamento factorial 3^2 com 4 repetições do ponto central, de modo a avaliar a influência na produção de scFv anti-LDL(-) da adição de casaminoácidos e PMSF, verifica-se que a adição de casaminoácidos é a variável com influência mais significativa e a sua presença no meio de cultivo induz uma maior produção de scFv anti-LDL(-).

Assim, correspondendo ao objectivo geral do projecto, foi verificada a capacidade de produção de proteínas heterólogas por *Pichia pastoris*. Um aumento de produção de scFv anti-LDL(-) foi alcançado com a adição de glicerol e sorbitol em modo de alimentação escalonada na fase de indução e a adição de casaminoácidos ao meio de cultivo revelou-se vantajosa no processo de produção.

6. Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras, a análise em bio-reactor das condições testadas com produção efectiva de scFv anti-LDL(-) pode ser realizada. A combinação dos efeitos da adição de glicerol e sorbitol em modo de alimentação escalonada na fase de indução e a presença de casaminoácidos no meio de cultivo pode ser também objecto de estudo com vista a uma maior produção de scFv anti-LDL(-) e obtenção de maiores densidades celulares. A operação em bio-reactor poderá ser realizada com condições de arejamento, agitação e temperatura mais baixas que as utilizadas neste estudo, com vista a uma produção de scFv anti-LDL(-) com menor perda de volume reaccional.

No que diz respeito ao fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) produzido, análises de estrutura e actividade devem ser conduzidas com o intuito de avaliar as possibilidades de utilização desta proteína recombinante para fins de diagnóstico e/ou terapêuticas, de interesse não só para a Indústria Farmacêutica como também para a população em geral, e em especial para os que sofrem da doença aterosclerose.

7. Referências Bibliográficas

1. Potvin G., Ahmad A., Zhang Z. (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal* 64:91–105. doi: 10.1016/j.bej.2010.07.017
2. Balamurugan V., Reddy G.R., Suryanarayana VVS (2007) *Pichia pastoris* : A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins — Vaccines. 6:175–186.
3. Kazuma S.M. (2010) Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas.
4. Sherer Y., Shoenfeld Y. (2006) Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nature clinical practice Rheumatology* 2:99–106. doi: 10.1038/ncprheum0092
5. Gleissner C. a, Leitinger N., Ley K. (2007) Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension* 50:276–83. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089854
6. Hansson G.K. (2001) Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21:1876–1890. doi: 10.1161/hq1201.100220
7. Schirrmann T., Al-halabi L., Dübel S., Hust M. (2010) [Frontiers in Bioscience 4576-4594, May 1, 2008] Production systems for recombinant antibodies Thomas Schirrmann, Laila Al-Halabi, Stefan Dübel, Michael Hust. 2010:4576–4594.
8. Emberson L.M., Trivett A.J., Blower P.J., Nicholls P.J. (2005) Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. *Journal of immunological methods* 305:135–51. doi: 10.1016/j.jim.2005.04.005

9. Maeng B.H., Choi J., Sa Y.S., et al. (2012) Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World journal of microbiology & biotechnology* 28:1027–34. doi: 10.1007/s11274-011-0901-5
10. Sommaruga S., Lombardi A., Salvadè A., et al. (2011) Highly efficient production of anti-HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells. *Applied microbiology and biotechnology* 91:613–21. doi: 10.1007/s00253-011-3306-3
11. Cunha a E., Clemente J.J., Gomes R., et al. (2004) Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering* 86:458–67. doi: 10.1002/bit.20051
12. Freyre F.M., Vázquez J.E., Ayala M., et al. (2000) Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology* 76:157–63.
13. Marty C., Scheidegger P., Ballmer-hofer K., et al. (2001) Production of Functionalized Single-Chain Fv Antibody Fragments Binding to the ED-B Domain of the B-isoform of Fibronectin in *Pichia pastoris*. 164:156–164. doi: 10.1006/prep.2000.1362
14. Breedveld F.C. (2000) New drug classes Therapeutic monoclonal antibodies. 355:735–740.
15. Wang W., Wang E.Q., Balthasar JP (2008) Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical pharmacology and therapeutics* 84:548–58. doi: 10.1038/clpt.2008.170
16. Edelman G.M. (1967) Antibody Structure and Molecular Immunology penetrating insight to suppose that a. 180:
17. Wörn a, Plückthun a (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology* 305:989–1010. doi: 10.1006/jmbi.2000.4265

18. Kogelberg H., Tolner B., Thomas G.J., et al. (2008) Engineering a single-chain Fv antibody to alpha v beta 6 integrin using the specificity-determining loop of a foot-and-mouth disease virus. *Journal of molecular biology* 382:385–401. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.013
19. Chang H.J., Choi S.W., Chun H.S. (2008) Expression of functional single-chain variable domain fragment antibody (scFv) against mycotoxin zearalenone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 30:1801–6. doi: 10.1007/s10529-008-9770-x
20. Wan L., Cai H., Yang H., et al. (2008) High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 81:33–41. doi: 10.1007/s00253-008-1568-1
21. Damasceno L.M., Pla I., Chang H.J., et al. (2004) An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 37:18–26. doi: 10.1016/j.pep.2004.03.019
22. Schmidt F.R. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology* 65:363–72. doi: 10.1007/s00253-004-1656-9
23. Berlec A., Strukelj B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 91:257–274. doi: 10.1007/s10295-013-1235-0
24. Daly R., Hearn M.T.W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR* 18:119–38. doi: 10.1002/jmr.687
25. Wang D., Su M., Sun Y., et al. (2012) Expression, purification and characterization of a human single-chain Fv antibody fragment fused with the Fc of an IgG1 targeting a rabies antigen in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 86:75–81. doi: 10.1016/j.pep.2012.08.015

26. Gurkan C., Ellar D.J. (2003) Expression in *Pichia pastoris* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin. *Protein Expression and Purification* 29:103–116. doi: 10.1016/S1046-5928(03)00012-3
27. Carreras-Sangrà N., Tomé-Amat J., García-Ortega L., et al. (2012) Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -sarcin. *Protein engineering, design & selection: PEDS* 25:425–35. doi: 10.1093/protein/gzs032
28. Martínez J.L., Liu L., Petranovic D., Nielsen J. (2012) Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current opinion in biotechnology* 23:965–71. doi: 10.1016/j.copbio.2012.03.011
29. Cereghino J.L., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* 24:45–66.
30. Domínguez a, Ferriñán E., Sánchez M., et al. (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1:131–42.
31. Cos O., Ramón R., Montesinos J.L., Valero F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial cell factories* 5:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17
32. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast (Chichester, England)* 22:249–70. doi: 10.1002/yea.1208
33. Damasceno L.M., Huang C.J., Batt C. a (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied microbiology and biotechnology* 93:31–9. doi: 10.1007/s00253-011-3654-z

34. Jahic M., Gustavsson M., Jansen A.K., et al. (2003) Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology* 102:45–53. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00003-8
35. Schoonooghe S., Kaigorodov V., Zawisza M., et al. (2009) Efficient production of human bivalent and trivalent anti-MUC1 Fab-scFv antibodies in *Pichia pastoris*. *BMC biotechnology* 9:70. doi: 10.1186/1472-6750-9-70
36. Gurkan C., Symeonides S.N., Ellar D.J. (2004) High-level production in *Pichia pastoris* of an anti-p185HER-2 single-chain antibody fragment using an alternative secretion expression vector. *Biotechnology and applied biochemistry* 39:115–22. doi: 10.1042/BA20030096
37. Romanos M. (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology* 6:527–533. doi: 10.1016/0958-1669(95)80087-5
38. Shi X., Karkut T., Chamankhah M., et al. (2003) Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 28:321–330. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00706-4
39. Jafari R., Sundström B.E., Holm P. (2011) Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. *Microbial cell factories* 10:34. doi: 10.1186/1475-2859-10-34
40. Sirén N., Weegar J., Dahlbacka J., et al. (2006) Production of recombinant HIV-1 Nef (negative factor) protein using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. *Biotechnology and applied biochemistry* 44:151–8. doi: 10.1042/BA20060001
41. Gurkan C., Ellar D.J. (2005) Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* 4:33. doi: 10.1186/1475-2859-4-33

42. Inan M., Meagher M.M. (2001) The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering* 92:337–41.
43. Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Ilgen C., Cregg J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. 329–332. doi: 10.1016/S0958166902003300
44. Li T., Cheng J., Hu B., et al. (2007) Construction, production, and characterization of recombinant scFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:867–874. doi: 10.1007/s11274-007-9554-9
45. Chaga G.S. (2001) Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of biochemical and biophysical methods* 49:313–34.
46. Gutiérrez R., Martín del Valle E.M., Galán M. a. (2007) Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. *Separation & Purification Reviews* 36:71–111. doi: 10.1080/15422110601166007
47. Gaberc-Porekar V., Menart V. (2001) Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods* 49:335–60.
48. Sulkowski E. (1985) Trends in Biotechnology Purification of proteins by IMAC.
49. Winzerling J.J., Berna P., J. J.P. (1992) How to Use Immobilized Affinity Chromatography Metal Ion. 4–13.
50. Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kropp K.E., et al. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190:55–62.
51. Ferreira a R., Ataíde F., Von Stosch M., et al. (2012) Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody

- fragment (scFv). *Bioprocess and biosystems engineering* 35:1603–14. doi: 10.1007/s00449-012-0751-z
52. Goodrick J.C., Xu M., Finnegan R., et al. (2001) High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology and bioengineering* 74:492–7.
53. Fonseca, M. Manuela, Teixeira J.A. (2007) *Reactores Biológicos. Fundamentos e Aplicações*. 483.
54. Hellwig S., Emde F., Raven N.P., et al. (2001) Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and bioengineering* 74:344–52.
55. Plantz B. a, Sinha J., Villarete L., et al. (2006) *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Applied microbiology and biotechnology* 72:297–305. doi: 10.1007/s00253-005-0271-8
56. Li P., Anumanthan A., Gao X.G., et al. (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142:105–124. doi: 10.1007/s12010-007-0003-x
57. Yamawaki S., Matsumoto T., Ohnishi Y., et al. (2007) Production of single-chain variable fragment antibody (scFv) in fed-batch and continuous culture of *Pichia pastoris* by two different methanol feeding methods. *Journal of bioscience and bioengineering* 104:403–7. doi: 10.1263/jbb.104.403
58. Jungo C., Schenk J., Pasquier M., et al. (2007) A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology* 131:57–66. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.019
59. Wang Z., Wang Y., Zhang D., et al. (2010) Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia*

- pastoris* fermentation. *Bioresource technology* 101:1318–23. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.025
60. Rahbarizadeh F., Rasaei M.J., Forouzandeh M., Allameh A.A. (2006) Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular immunology* 43:426–35. doi: 10.1016/j.molimm.2005.03.003
 61. Resina D., Cos O., Ferrer P., Valero F. (2005) Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 Promoter. *Biotechnology and bioengineering* 91:760–7. doi: 10.1002/bit.20545
 62. Ramón R., Ferrer P., Valero F. (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology* 130:39–46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.025
 63. Celik E., Calik P. (2009) Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. 473–484. doi: 10.1002/yea
 64. Çalik K. P., Inankur B., Soyaslan E.S., et al. (2009) Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* n/a–n/a. doi: 10.1002/jctb.2292
 65. Hélène B., Céline L., Patrick C., et al. (2001) High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 36:907–913. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00296-X
 66. Thorpe E.D., Anjou M.C., Daugulis A.J. (1999) Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. 669–672.
 67. Ren F., Li B.C., Zhang N.N., et al. (2008) Expression, purification and characterization of anti-BAFF antibody secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 30:1075–80. doi: 10.1007/s10529-008-9657-x

68. Cai H., Chen L., Wan L., et al. (2009) High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. Applied microbiology and biotechnology 82:41–8. doi: 10.1007/s00253-008-1744-3
69. Biburger M., Weth R., Wels W.S. (2005) A novel bispecific tetravalent antibody fusion protein to target costimulatory activity for T-cell activation to tumor cells overexpressing ErbB2/HER2. Journal of molecular biology 346:1299–311. doi: 10.1016/j.jmb.2004.12.052
70. Luo D., Geng M., Noujaim a a, Madiyalakan R. (1997) An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity. Journal of biochemistry 121:831–4.
71. Hu S., Li L., Qiao J., et al. (2006) Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. Protein expression and purification 47:249–57. doi: 10.1016/j.pep.2005.11.014
72. Chou S.C., Goldstein a (1960) Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. The Biochemical journal 75:109–15.
73. Peterson G.L. (1977) of the Protein Assay Method of Lowryetal . Which is More Generally Applicable. 356:346–356.
74. Bok, Song Hae, Demain A.L. (1977) An improved colorimetric assay for polyols. Analytical Biochemistry 81:18–20.
75. Nash T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. The Biochemical journal 55:416–21.
76. Jahic M., Wallberg F., Bollok M., et al. (2003) Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. Microbial cell factories 2:6. doi: 10.1186/1475-2859-2-6

77. Powers J.C., Asgian J.L., Ekici Ö.D., James K.E. (2002) Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chemical Reviews* 102:4639–4750. doi: 10.1021/cr010182v
78. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 40:D343–50. doi: 10.1093/nar/gkr987

8. Anexos

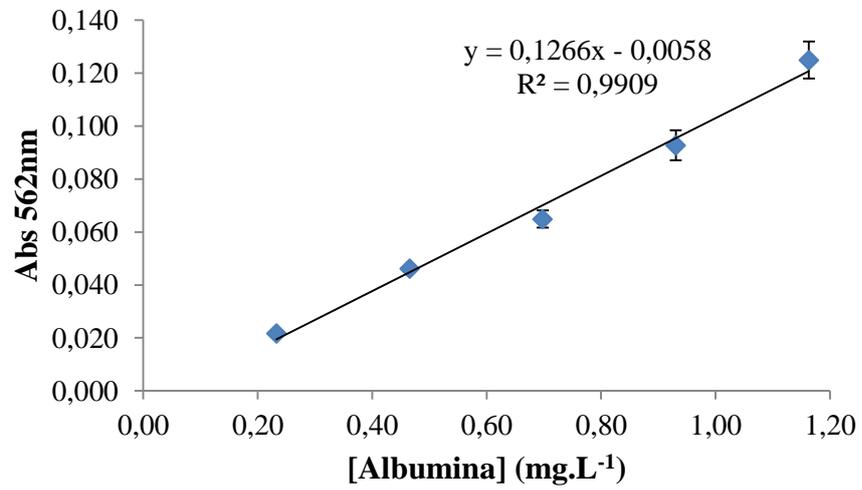


Figura 1 – Curva de calibração da quantificação de proteína