UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de fragmento recombinante de anticorpo
em *Pichia pastoris***

Valker Araujo Feitosa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr
Orientador estrangeiro: Prof. Dr. Jorge
Gonzalo Farias Avendaño

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de fragmento recombinante de anticorpo
em *Pichia pastoris***

Valker Araujo Feitosa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr
Orientador estrangeiro: Prof. Dr. Jorge
Gonzalo Farias Avendaño

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F311p Feitosa, Valker Araujo
Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris* / Valker Araujo Feitosa. -- São Paulo, 2014.
84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Jr., Adalberto

1. Biotecnologia farmacêutica 2. Leveduras I. T. II. Pessoa Jr., Adalberto, orientador

615.1 CDD

Valker Araujo Feitosa

**Produção de fragmento recombinante de anticorpo
em *Pichia pastoris***

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de 2014.

“De costas voltadas não se vê o futuro,
nem o rumo da bala, nem a falha no muro.
E alguém me gritava com voz de profeta
que o caminho se faz entre o alvo e a seta!”

Pedro Abrunhosa

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe, Francy,
ao meu pai, Valdemiro
e ao meu irmão Valkercyo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Francly e Valdemiro;

Ao meu irmão Valkercyo;

Ao meu amigo Ruan Medrano;

Às minhas amigas Sarah Eller, Marília Alcoforado e Alexandra Apolinário;

Aos meus amigos, de dentro e de fora do laboratório;

Aos colegas e funcionários do laboratório, do Semi-Industrial e do bloco 16;

Aos meus orientadores, prof. Adalberto Pessoa Jr e prof. Jorge Farias;

Aos professores e funcionários da FCF-USP;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e

Ao Banco Santander.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Pichia pastoris</i>	16
1.2 Vantagens.....	18
1.3 Desvantagens.....	22
1.4 Comparação com outros sistemas.....	23
1.5 Cepas mais utilizadas.....	26
1.6 Produção de fragmentos de anticorpos.....	28
1.7 Aterosclerose.....	35
1.8 Lipoproteínas de baixa densidade modificadas.....	35
1.9 LDL Eletronegativa.....	37
1.10 scFv Anti-LDL(-).....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Micro-organismo.....	42
3.2 Meios de cultura.....	43
3.3 Cultivos em frascos agitados.....	44
3.4 Cultivo em biorreator.....	44
3.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	45
3.6 Processamento do meio de cultivo.....	45
3.6.1 Clarificação.....	45
3.6.2 Cromatografia de afinidade ao níquel.....	45
3.6.3 Quantificação do scFv.....	47
3.6.4 Eletroforese SDS-PAGE.....	48
3.6.5 Quantificação da concentração celular.....	48
3.6.6 Viabilidade celular.....	48
3.6.7 Quantificação do glicerol.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Padronização dos cultivos.....	51
4.2 Planejamento experimental para modificação do meio.....	51
4.3 Estudo do pH inicial na fase de indução.....	58
4.4 Cultivos em biorreator de 1 L.....	63
4.5 Influência da concentração de glicerol.....	66
4.6 Cultivos em biorreator de 10 L.....	68
5. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto macroscópico e microscópico da <i>P. pastoris</i>	16
Figura 2. Evolução das publicações relacionadas ao tema <i>P. pastoris</i>	18
Figura 3. Representação esquemática do anticorpo IgG e seus fragmentos	30
Figura 4. Representação esquemática de partículas de LDL nativa e modificadas	36
Figura 5. Representação esquemática da captação de LDL modificada	37
Figura 6. Representação esquemática das aplicações do scFv anti-LDL(-)	40
Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pPIgLE(anti-LDL(-)His6)	42
Figura 8. Frasco <i>Erlenmeyer</i> “ <i>baffled</i> ” e biorreator <i>Bioflo 115</i>	44
Figura 9. Fluxograma para purificação do scFv anti-LDL(-) por IMAC-Ni.....	46
Figura 10. Análise da viabilidade celular, por citometria de fluxo	49
Figura 11. Eletroforese (SDS-PAGE) dos cultivos do planejamento experimental.....	53
Figura 12. Eletroforese (SDS-PAGE) dos experimentos C(-), 1, 3, 5 e 7.....	55
Figura 13. Curva de crescimento e viabilidade celular de <i>P. pastoris</i> em pH de 3,0 a 8,0.....	58
Figura 14. Eletroforese (SDS-PAGE) dos cultivos realizados em pH de 3,0 a 8,0.....	60
Figura 15. Curva de variação do pH dos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0).....	63
Figura 16. Curva de crescimento celular dos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0)....	64
Figura 17. Produção de scFv nos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0)	65
Figura 18. Crescimento de <i>P. pastoris</i> em BMGY-CA (pH 8,0) com glicerol.....	67
Figura 19. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator de 10 L	69
Figura 20. Curvas utilizadas para os cálculos dos parâmetros cinéticos	70
Figura 21. Produtividade do scFv em biorreator de 10 L.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos e fenótipos de linhagens de <i>P. pastoris</i> .	26
Tabela 2. Fragmentos scFv produzidos em <i>P. pastoris</i> , em agitador orbital.	32
Tabela 3. Fragmentos scFv produzidos em <i>P. pastoris</i> , em biorreator.	33
Tabela 4. Produtos comerciais produzidos em <i>P. pastoris</i> .	34
Tabela 5. Composição dos meios BMGY e BMMY.	43
Tabela 6. Variáveis e níveis do planejamento experimental fatorial <i>Box Behnker</i> .	43
Tabela 7. Experimentos do planejamento fatorial <i>Box Behnker</i> .	43
Tabela 8. Soluções utilizadas na purificação dos scFv anti-LDL(-) por IMAC-Ni.	47
Tabela 9. Concentração de casaminoácidos em meios de cultivos para <i>P. pastoris</i> .	56
Tabela 10. Valores de pH, biomassa e viabilidade de <i>P. pastoris</i> .	59
Tabela 11. Influência do pH em cultivos de <i>P. pastoris</i> .	61
Tabela 12. Comparação entre os cultivos realizados.	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOX	<i>Álcool oxidase</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex medium</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex medium</i>
BMMY-CA	<i>BMMY com casaminoácidos</i>
BGMY-CA	<i>BGMY com casaminoácidos</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FLD	<i>Formaldehyde dehydrogenase</i>
Fv	<i>Variable fragment</i>
G418	Geneticina
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HIS4	Histidinol desidrogenase
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IMAC-Ni	<i>Immobilized metal-ion affinity chromatography - nickel</i>
$k_L a$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDL(-)	LDL eletronegativa
LDLox	LDL oxidada
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
Mut-	Sem crescimento em metanol
Mut ⁺	Crescimento rápido em metanol
Mut ^s	Crescimento lento em metanol
Pep4 ⁻	Enzima vacúolo peptidase
pH	Potencial hidrogeniônico
scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
SCP	<i>Single-cell protein</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
α -MF	<i>Alpha mating factor</i>

RESUMO

FEITOSA, V.A. **Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris***. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Foram estudados a composição e o pH do meio de cultivo para a produção do fragmento de anticorpo (scFv) anti-LDL(-), expresso em *Pichia pastoris* recombinante. Os experimentos que definiram a composição e pH do meio assim como a concentração inicial de células na fase de indução foram realizados em agitador orbital a 250 rpm, com temperatura de 30 °C na fase de crescimento e 20 °C na fase de indução, durante 72 horas, com adição diária de 1% (v/v) de metanol. Para modificação do meio foi realizado um planejamento experimental empregando como variáveis independentes: extrato de soja, casaminoácidos e ureia, os quais substituíram o YNB e a biotina presentes no meio padrão (BMMY). Apesar de haver maior produção no meio com extrato de soja, o meio contendo 10 g.L⁻¹ de casaminoácidos foi selecionado, uma vez que este favoreceu a etapa de purificação. A partir da faixa de pH estudada entre 3,0 e 8,0, determinou-se que o pH 8,0 no início da fase de indução favorece a maior produção. Finalmente, o meio BMMY-CA (pH 8,0) foi utilizado para cultivo em biorreator com volume de trabalho de 10L e a partir deste cultivo foram calculados os parâmetro cinéticos (velocidades de crescimento, de consumo de substrato e de produção, bem como produtividade). Diante do conjunto de experimentos realizados, foi possível otimizar a composição do meio de cultivo e as condições operacionais, que possibilitaram um aumento do rendimento bem como aumento do volume de produção do scFv anti-LDL(-) em biorreator.

Palavras-chave: scFv, levedura metilotrófica, casaminoácidos, pH, biorreator.

ABSTRACT

FEITOSA, V.A. **Production of recombinant antibody fragment in *Pichia pastoris***. 2014. 84 p. Thesis (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Composition and pH culture medium for the production of anti- LDL(-) antibody fragment (scFv) were studied in recombinant yeast *Pichia pastoris*. The experiments that defined medium composition, pH and the initial cell concentration in the induction phase were carried out in baffled shaker flasks at 250 rpm, with temperature at 30°C for growth phase and 20°C for induction phase, during 72 hours with daily addition of 1% (v/v) methanol. A design of experiments employing for medium modification with independent variables: soy extract, casamino acids and urea, which replaced the YNB and biotin present in the standard medium (BMMY) was conducted for medium formulation. Even though, there was an increase in medium production with soy extract, the medium containing 10 g.L⁻¹ casamino acids was selected since it favors the purification step. Through a pH range study (3.0 to 8.0), it was determined that pH 8.0 during induction phase offered higher levels. Then, the best results from shaker flask cultivation (BMMY-CA with casamino acids and pH 8.0) were carried out in 1L bioreactor, showing a biomass and a scFv production increase compared to the standard, BMMY (pH 6.0). Finally, the medium BMMY-CA (pH 8,0) was submitted to a volume scale-up into a 10L bioreactor, which was also used to evaluate kinetic parameters (rates of growth, substrate consumption and production as well as productivity). In conclusion, by optimizing culture medium and operating conditions it was possible to increase yield and scale-up the production of scFv anti-LDL(-) in bioreactor.

Keywords: scFv, methylotrophic yeast, casamino acids, pH, bioreactor.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas foi possível manipular o DNA para identificar, modificar e inserir genes em uma variedade de hospedeiros, produzindo desta forma os organismos geneticamente modificados, transgênicos, bioengenheirados ou recombinantes. Uma das maiores aplicações para estes organismos é a produção de proteínas heterólogas. Uma vez que a maioria destas proteínas possui alto valor agregado e imenso potencial comercial, vários estudos têm-se concentrado no desenvolvimento de processos viáveis para produzi-las de forma eficiente e funcional (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A biotecnologia tornou-se um componente significativo do mercado farmacêutico mundial, representando cerca de 40% das vendas. A utilização de organismos como fábricas para produção de biofarmacêuticos oferece várias vantagens sobre a síntese química. Os micro-organismos podem produzir peptídeos e proteínas recombinantes, que são difíceis ou muitas vezes impossíveis de se obter por síntese química (Spadiut *et al.*, 2014).

O mercado biofarmacêutico originou-se no final dos anos 1970 com o estabelecimento de técnicas de DNA recombinante. O primeiro biofármaco aprovado pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) em 1982 foi o *Humulin*, um análogo da insulina humana. Este hormônio recombinante foi inicialmente desenvolvido em 1977 por Herbert Boyer e mais tarde adquirido pela empresa *Eli Lilly and Company*.

Em 2012, o mercado mundial de medicamentos produzidos através de processos biológicos, envolvendo DNA recombinante, referidos como biofármacos, produtos biológicos, ou proteínas recombinantes, foi avaliado em USD\$ 120 bilhões (Butler e Meneses-Acosta, 2012). Atualmente são comercializados mais de 200 biofármacos (Berlec e Strukelj, 2013). A expectativa para este ano é que o mercado biofarmacêutico alcance os USD\$ 170 bilhões, este elevado volume de negócios é devido principalmente à crescente aprovação e comercialização de anticorpos monoclonais (mAbs) e fragmentos recombinantes de anticorpos (Spadiut *et al.*, 2014).

Abastecido por um crescimento exponencial na demanda mundial por biofármacos e imunobiológicos, um progresso considerável tem sido alcançado na engenharia de bioprocessos, principalmente, em relação ao desenvolvimento de sistemas com alta produtividade que sejam economicamente viáveis (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012).

Na prática não existe um único método de cultivo ideal para produção de proteínas recombinantes, já que o processo deve ser moldado de acordo com uma multiplicidade de fatores específicos de cada produto. Dada esta variabilidade nas propriedades do produto, a comparação direta de sistemas de cultivo que produzam proteínas diferentes é difícil e de utilidade limitada.

De forma geral, o tipo e o tamanho da proteína-alvo irão determinar qual sistema é mais adequado para expressão. Proteínas maiores e complexas preferencialmente são expressas em sistemas eucariotos, enquanto que proteínas menores e mais simples são geralmente em micro-organismos (Goncalves *et al.*, 2013).

Proteínas terapêuticas normalmente são produzidas em células de mamífero ou em bactéria. Dos 62 biofarmacêuticos aprovados entre 2006 e 2012, 32 foram produzidos em células de mamíferos, 17 em *Escherichia coli*, seis em levedura, cinco em animais transgênicos e dois em células de insetos (Walsh, 2010; Vogl, Hartner e Glieder, 2013). Dentre as leveduras, quatro produtos foram expressos em *Sacharomyces cerevisiae* e dois em *Pichia pastoris*.

A utilização da levedura *P. pastoris*, como um hospedeiro celular para a expressão de proteínas recombinantes tornou-se cada vez mais popular a partir de 1980, desde então vem sendo utilizada amplamente com sucesso para produção de mais de 300 proteínas (Daly e Hearn, 2005). O sistema de expressão em *P. pastoris* apresenta vantagens como a facilidade de manipulação, inserção gênica de múltiplas cópias, forte atividade promotor AOX1 além dos altos níveis de expressão e capacidade de secreção. Este sistema é particularmente adequado para a produção de proteínas mais complexas que formam corpos de inclusão em *E. coli* assim como de proteínas

cujos rendimentos em células de mamíferos e insetos/baculovírus são muito baixos (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A *P. pastoris* já foi utilizada para a produção de diversas proteínas recombinantes assim, transformou-se na opção preferida dentre os vários sistemas de expressão em micro-organismo. Entretanto, a otimização dos processos de produção é indispensável para fazer este sistema ainda mais competitivo na produção de proteínas de interesse tanto laboratorial, como para teste pré-clínicos, clínicos e com aplicação industrial (Li *et al.*, 2007).

1.1 *Pichia pastoris*

Taxonomicamente a levedura *P. pastoris* é descrita como pertencente ao reino *Fungi*, filo *Ascomyceta*, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Sacchamomyceteceae*, gênero *Pichia* e espécie *P. pastoris* (Silva, Peres e Gattas, 2009). É uma levedura anaeróbia facultativa e metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono (Baumann *et al.*, 2011). Em meio sólido forma colônias de branco a creme (**Figura 1A**), e microscopicamente apresenta células esféricas ou ovais, após coloração de *Gram*, adquirem cor violeta (**Figura 1B**)

Figura 1. Aspecto macroscópico e microscópico da *P. pastoris*. (A) Colônias semeadas a partir da cultura-estoque, cultivadas em Agar YPD. (B) Visualização de lâmina a fresco preparada a partir da cultura-estoque, coradas pela metodologia de *Gram*, observadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Inicialmente, o fato da *P. pastoris* crescer até alta densidade celular, em meio de cultivo simples, tendo o metanol como única fonte de carbono impulsionou a empresa *Phillips Petroleum Company* a cultivá-la como fonte proteica para alimentação animal (SCP - *single-cell protein*) (Gattas, 2009). Esta empresa foi a primeira a desenvolver meios e protocolos para cultivos contínuos, entretanto, devido às crises do petróleo na década de 1970 elevou-se o preço do metano (precursor do metanol), ao mesmo tempo em que o preço da soja (fonte alternativa de alimentação animal) reduziu. Estes fatos tornaram o processo de produção de SCP economicamente inviável (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

No entanto, na década seguinte, a *Phillips Petroleum*, em conjunto com o *Salk Institute Biotechnology - Industrial Associates Inc.* (SIBIA), investiram na utilização da *P. pastoris* como um sistema para a expressão de proteínas recombinantes. O gene e o promotor da enzima álcool-oxidase foram isolados pela SIBIA, também responsável por gerar linhagens, vetores e protocolos para a manipulação gênica da levedura (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Atualmente a *Research Corporation Technologies* é detentora da patente para o sistema de expressão recombinante em *P. pastoris*, este vem sendo utilizado, desde 1984, comercialmente o *kit* de expressão é disponibilizado pela *Invitrogen Corporation* (Cereghino e Cregg, 1999).

Desde o seu desenvolvimento no início de 1970 a *P. pastoris* tornou-se uma das leveduras mais amplamente estudada, uma vez que é considerada como um dos sistemas mais eficazes para a expressão de proteínas heterólogas. O recente avanço deste sistema de expressão teve impacto não apenas nos níveis de produção alcançados, mas também sobre a bioatividade e funcionalidade das proteínas produzidas (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012).

Na **Figura 2**, pode-se observar a evolução do número de publicações relacionadas ao tema "*Pichia pastoris*", nas últimas duas décadas foi registrado um crescimento exponencial tanto de estudos fisiológicos e funcionais da levedura como sua utilização em processos para produção de proteínas recombinantes. Observa-se que em 1993 foram registrados menos 50 trabalhos enquanto que em 2013 foram publicado cerca de 650 títulos.

Figura 2. Evolução das publicações relacionadas ao tema *P. pastoris*. Os valores da figura referem-se ao resultado da busca no portal “ISI Web of Science” utilizando o descritor “*Pichia pastoris*”. Foram selecionadas as publicações referentes apenas a artigos originais, revisões e patentes entre os anos de 1993 a 2013.

1.2 Vantagens

A levedura *P. pastoris* tem características que a tornam um hospedeiro atraente para a produção de proteínas heterólogas, as vantagens desta levedura sobre outros sistemas de expressão eucarióticos e procarióticos incluem:

(1) Genética: o genoma da *P. pastoris* é relativamente simples e fácil de manipular do que as células de mamíferos e insetos (Daly e Hearn, 2005; Li *et al.*, 2007; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012); o gene alvo é integrado no genoma de *P. pastoris* para garantir a reprodutibilidade e a estabilidade do sistema de expressão (Pennell e Eldin, 1998); os vetores de expressão integrados bem caracterizado ajudam na estabilidade genética dos elementos recombinantes (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007); os plasmídeos linearizados podem ser inseridos com elevada eficiência por meio de recombinação homóloga (Daly e Hearn, 2005) ; assim como a capacidade de gerar facilmente vetores de expressão que contêm múltiplas cópias da inserção do transgene (Cereghino e Cregg, 1999; Daly e Hearn, 2005). Além disso, as sequências do

genoma de cepas selvagens e auxotrófica já estão disponíveis, assim como do modelo metabólico a nível genômico (Spadiut *et al.*, 2014).

(2) Promotor AOX1: é um dos promotores regulados mais conhecido (Cereghino e Cregg, 1999); é derivado do gene que codifica a enzima álcool oxidase 1 (AOX1); este promotor fortemente regulado e induzível pela presença do metanol é utilizado para transcrição do gene heterólogo (Daly e Hearn, 2005; Cregg *et al.*, 2009; Silva, Peres e Gattas, 2009; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012) ; vários genes de diferentes origens (bactérias , fungos, invertebrados , plantas, animais e seres humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle deste promotor (Silva, Peres e Gattas, 2009).

Os micro-organismos metilotróficos utilizam uma via específica para metabolismo do metanol, na qual várias enzimas estão envolvidas. As reações iniciais ocorrem em compartimentos especializados, os peroxissomos. Estas organelas têm papel indispensável durante o crescimento, lá estão localizadas três enzimas-chave para o metabolismo do metanol: álcool oxidase (AOX), catalase e di-hidroxiacetona sintase. As reações subsequentes são realizadas no citoplasma. A enzima AOX (codificada pelos genes AOX1 e AOX2) catalisa o primeiro passo na via de utilização de metanol, que é a oxidação do metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio, em seguida a catalase degrada o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água. O formaldeído gerado pela AOX é liberado do peroxissomo para o citoplasma e rapidamente é oxidado formiato e dióxido de carbono, através de enzimas desidrogenases. Esta reação é fonte de energia para o crescimento celular em metanol. A enzima AOX é fortemente reprimida por várias fontes de carbono, tais como glicose e glicerol, assim com pela falta de fonte de carbono. A conversão de metanol em formaldeído, pela AOX presente na célula, é um passo limitante na utilização de metanol como uma fonte de carbono (Silva, Peres e Gattas, 2009).

As enzimas AOX1 e AOX2 possuem 97% de identidade na sequência de aminoácidos e atividade enzimática equivalente, entretanto 95% da atividade álcool oxidase em *P. pastoris* é atribuída a AOX1. Durante a fase de indução a enzima AOX1 é super-expressa e pode corresponder ate 30% das proteínas endógenas totais (Pennell e Eldin, 1998).

(3) Comercial: há grande disponibilidade de cepas e plasmídeos disponibilizados na forma de *kits* pela *Invitrogen Corporation* (Cereghino e Cregg, 1999; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012)

(4) Metabolismo: a *P. pastoris* tem uma forte tendência para o crescimento aeróbico em oposição à *S. cerevisiae* que tem mais desvio para a rota fermentativa (Cregg *et al.*, 2009; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012) esta levedura tem capacidade de cultura crescer em altas densidades celulares (Cereghino e Cregg, 1999; Daly e Hearn, 2005; Li *et al.*, 2007), com acúmulo de até 160 g.L⁻¹ de biomassa seca utilizando meio simples (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012), com baixo risco de acumulação de etanol (Spadiut *et al.*, 2014).

(5) Modificações Pós-traducionais: Assim como as células animais, a leveduras também são células eucarióticas, desta forma, oferecem condições apropriadas para expressão de proteínas recombinantes complexas, corretamente enoveladas e com modificações pós-traducionais necessárias para a funcionalidade e a utilização terapêutica (Daly e Hearn, 2005; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012).

Este recurso é particularmente relevante para as proteínas-alvo que necessitam da formação de pontes dissulfeto (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012) ou que necessitam de glicosilação, fosforilação, metilação, acilação, clivagem proteolítica (Macauley-Patrick *et al.*, 2005), assim como para as proteínas que precisam ser direcionadas para compartimentos sub-celulares (Daly e Hearn, 2005; Li *et al.*, 2007).

(6) Produção: neste sistema é possível a expressão de grandes quantidades de proteínas com relativa facilidade técnica e com reduzido custo de produção quando comparado com os outros sistemas eucariotos como células de mamíferos e insetos (Pennell e Eldin, 1998; Daly e Hearn, 2005; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012); possui altos níveis de rendimento e produtividade (Daly e Hearn, 2005; Li *et al.*, 2007; Potvin, Ahmad e Zhang, 2012), mesmo quando cultivadas em processos de larga escala (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

(7) Purificação: a purificação de proteínas a partir de cultivo de *P. pastoris*, também é facilitada, pois a levedura fornece vias, através de peptídeos sinais, que direcionam as proteínas heterólogas para o meio extracelular, isto simplifica consideravelmente os processos de purificação (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012); a proteína secretada na forma solúvel pode ser capturada diretamente do sobrenadante do cultivo (Daly e Hearn, 2005). Para isto podem ser utilizadas etapas simples de clarificação (e.g. centrifugação, filtração), técnicas cromatográficas (e.g. cromatografia de afinidade a íons metálicos) e concentração (e.g. ultrafiltração) (Eldin *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007; Cregg *et al.*, 2009; Malpiedi *et al.*, 2013). Outra grande vantagem é a secreção de níveis relativamente baixos de proteínas nativas, cerca de 80-90% das proteínas totais no sobrenadante corresponde à proteína heteróloga, isto reduz a complexidade do sobrenadante do cultivo (Pennell e Eldin, 1998).

Dependendo da presença ou ausência da sequência sinal, a expressão da proteína heteróloga pode ser intracelular ou secretada (Eldin, 1998). A clonagem de um gene cujo produto é para ser secretado pode ser um pouco mais complicada. Para que a proteína seja direcionada para o meio extracelular é necessária a presença de um peptídeo sinal para secreção. Entre as sequências utilizadas, a mais usual é a “*alpha mating factor*” (α -MF) de *S. cerevisiae*. Neste caso, o gene de interesse é clonado em um vetor comercial que já possui o α -MF “*in frame*” com a porção amino-terminal da proteína desejada, esta localização é preferível para facilitar o processamento do peptídeo sinal, uma vez que este deve ser clivado antes da excreção (Cregg *et al.*, 2009).

(8) Segurança: *P. pastoris* é considerado pela FDA como um micro-organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*); não produz endotoxinas ou pirogênio, não possui oncogenes e não pode se contaminado por bacteriófagos (Li *et al.*, 2007).

Portanto, as ferramentas genéticas e biomoleculares disponíveis, juntamente com a facilidade e economia para produção e purificação de proteínas, faz da *P. pastoris* um sistema de escolha para a expressão de proteínas heterólogas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

1.3 Desvantagens

No entanto, existem limitações a este sistema. Embora o metanol seja essencial para a indução, este, por ser um líquido inflamável, se não for adequadamente manuseado pode ser é um potencial perigo para a saúde (e.g. toxicidade por inalação) e segurança (e.g. risco de incêndios e explosões), estas preocupações estão associadas principalmente ao armazenamento de grandes quantidades de produto, que se torna cada vez mais difícil com o aumento da escala de operação (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012). Além disto, a presença do metanol pode não ser adequada para a produção de produtos alimentícios (Cereghino e Cregg, 1999).

Apesar de o promotor de AOX1 de ser um dos melhores caracterizados e mais eficientes para a expressão de proteínas, a disponibilidade de protocolos adicionais utilizando outros promotores poderia contornar as desvantagens da utilização de metanol como um indutor (Goncalves *et al.*, 2013).

Outra limitação do sistema tem sido a falta de promotores moderadamente expressos (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012). O elevado nível de expressão proporcionada pelo promotor AOX1, assim como pelos promotores FLD1 e GAP, em alguns casos pode ser tóxico para a levedura e podem sobrecarregar a expressão da proteína heteróloga, prejudicando o processamento e o correto enovelamento proteico. Uma maior variedade de promotores também poderia facilitar a expressão simultânea de múltiplos genes, cada um em seu nível adequado, isto seria importante principalmente para a produção de proteínas com múltiplas subunidades (Cereghino e Cregg, 1999).

Embora as técnicas moleculares estejam bem desenvolvidas para manipulação de *P. pastoris*, existe ainda uma limitação quanto aos genes marcadores para seleção após transformação. Os marcadores existentes estão limitados aos genes da via biossintética da histidina (HIS4 – enzima histidinol desidrogenase), e da arginina (ARG4 – enzima argininosuccinato sintetase), ou então de genes bacterianos de resistência aos antibióticos: (1) canamicina (kanR) , que em *P. pastoris* confere resistência a níveis elevados de geneticina

(G418) e (2) zeocina (Sh ble) (Li *et al.*, 2007). As cepas His4⁻ e Arg4⁻ são defeituosas em genes biossintéticos e, portanto, não pode crescer a menos que o meio de cultivo seja suplementado com substratos específicos: histidina e arginina, respectivamente, ou então é necessário que célula seja transformada com um vetor que contém uma cópia selvagem do gene mutado (Cereghino e Cregg, 1999).

Durante o cultivo de *P. pastoris* podem ser encontrados altos níveis de expressão de proteases, que pode resultar na degradação da proteína recombinante (Potvin, Ahmad e Zhang, 2012). As proteases são super-expressas e secretadas quando as células estão sujeitas a condições de estresses (e.g. presença do metanol) ou ainda quando há deficiência de nutrientes no meio de cultivo, principalmente fontes nitrogenadas de fácil assimilação (Li *et al.*, 2007).

O tamanho da proteína a ser expressa também pode ser um fator limitante, de forma geral tem sido expressas proteínas com massa molar inferior a 120 kDa (Pennell e Eldin, 1998).

1.4 Comparação com outros sistemas

A *S. cerevisiae* foi a primeira levedura utilizada na produção de proteínas recombinantes, e vários produtos biofarmacêuticos produzidos nesta levedura têm sido comercializados com sucesso (Spadiut *et al.*, 2014).

Em 1978, (Hinnen, Hicks e Fink) foram os responsáveis pela primeira transformação gênica da *S. cerevisiae*, e desde então, a partir do início da década de 1980 este micro-organismo passou a ser utilizado como hospedeiro para a produção de proteínas intra e extracelulares, de origem humana, animal, vegetal e microbiana (Cereghino e Cregg, 1999). Entretanto somente em 1986 foi aprovado o primeiro biofármaco expresso em levedura, trata-se do *Engerix-B* uma vacina recombinante contra hepatite B, produzida pela *SmithKline Beecham Biologicals*, baseada no antígeno “rHBsAg” expresso em *S. cerevisiae* (Assad e Francis, 1999).

Apesar do grande conhecimento sobre a genética e biologia molecular, a *S. cerevisiae*, em muitos casos, não se mostrou muito interessante para a expressão de proteínas recombinantes. As principais limitações estão relacionadas principalmente ao seu metabolismo fermentativo (Cregg *et al.*, 2009). Em geral, o rendimento dos produtos é muito baixo (máximo de 1-5% da proteína total), com hiperglicosilação, retenção de proteínas no espaço periplasmático (Muller *et al.*, 1998), assim como apresentam instabilidade dos plasmídeos e menor capacidade de secreção em relação a outras leveduras (Cereghino e Cregg, 1999).

Por estes motivos, outras leveduras alternativas também passaram a ser utilizadas como sistemas de expressão, entre elas estão: *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adeninivorans*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia methanolica* e *Pichia pastoris* (Buckholz e Gleeson, 1991; Gellissen e Hollenberg, 1997; Hollenberg e Gellissen, 1997; Muller *et al.*, 1998; Cregg *et al.*, 2009).

As linhagens identificadas como metilotrófica pertencem apenas a quatro gêneros: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis* (Faber *et al.*, 1995) e suas aplicações biotecnológicas são excelentes na produção de proteínas recombinante (Silva, Peres e Gattas, 2009). Tal como em *P. pastoris*, as leveduras *H. polymorpha* e *P. methanolica* também são metilotrófica. Em particular, as três possuem o potente promotor AOX, e, em geral, apresentam vantagens em comum a *P. pastoris* (Gellissen, 2000). No entanto, a construção de linhagens recombinantes para expressão em *H. polymorpha* e *P. methanolica* em geral é mais laboriosa (Cregg *et al.*, 2009).

A produção de uma proteína funcional está intimamente relacionada com a maquinaria celular do organismo a produzir a proteína. A levedura *Pichia pastoris* é um sistema útil para a expressão de miligramas a gramas quantidades de proteínas para a pesquisa de laboratório de base e fabricação industrial (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Ao longo das últimas décadas, a *E. coli* tem sido amplamente utilizada como um hospedeiro procarioto para a expressão de proteínas heterólogas.

Entretanto, a aplicação desta bactéria para expressão de genes eucariotos é limitada, especialmente para proteínas mais complexas que requerem um enovelamento adequado e modificações pós-traducionais, já que este micro-organismo simples não possui maquinaria intracelular apropriada. Outro obstáculo é a incapacidade de produzir proteínas solúveis e secretadas para o sobrenadante do cultivo, normalmente as proteínas são armazenadas na forma insolúvel em corpos de inclusão (Daly e Hearn, 2005).

Desta forma, a *E. coli*, geralmente, não é adequada para expressão de proteínas que contêm um alto nível de pontes dissulfureto ou proteínas que requerem outros tipos de modificações pós-translacionais tais como glicosilação, isomerização cis/trans prolina, isomerização dissulfeto, lipidação, sulfatação ou fosforilação. Proteínas expressa em *E. coli* também tendem a manter resíduo de metionina na porção amino-terminal, isto pode afetar a estabilidade e aumentar a imunogenicidade (Daly e Hearn, 2005).

O sistema de expressão de proteína eucariótica em *P. pastoris* oferece vantagens significativas em relação a *E. coli*, uma grande variedade de proteínas que não podem ser expressas corretamente em *E. coli* foram posteriormente produzida em *P. pastoris*. Muitas proteínas, especialmente fragmentos de anticorpos, foram geradas com conformação inadequada ou em corpos de inclusão insolúveis, através da expressão em *E. coli* entretanto foram obtidas solúvel e corretamente enoveladas quando expressas em *P. pastoris* (Boado, Ji e Pardridge, 2000; Robin *et al.*, 2003; Li, A. D. *et al.*, 2006; Jafari *et al.*, 2011; Maeng *et al.*, 2012).

Em comparação com as linhagens de células de mamíferos (e.g. CHO, NS0 and BHK) e de insetos/baculovírus (e.g. Sf9, Sf21, S2 and Tn5B1–4), a *P. pastoris* não necessita de transfecção viral, não requer condições complexas de cultivo, é relativamente fácil de manipular geneticamente, e igualmente possui as rotas para síntese de proteínas eucarióticas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Entretanto quando se trata da produção de glicoproteínas, as células de mamífero são a melhor opção, uma vez que são as únicas capazes de realizar glicosilações em glicoproteínas semelhante ao padrão humano, apesar de que as células de mamíferos também adicionam ácidos siálicos, que não estão

presentes em células humanas, e que podem desencadear resposta imune (Goncalves *et al.*, 2013).

1.5 Cepas mais utilizadas

Foram produzidas várias cepas de *P. pastoris* com uma vasta gama de genótipos que agora estão disponíveis. A escolha de uma cepa específica é determinada pela aplicação desejada. As características genóticas e fenóticas das estirpes mais utilizadas encontram-se resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Genótipos e fenótipos de linhagens de *P. pastoris*.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
Wild type		
X-33	Selvagem	-
Y-11430	Selvagem	-
Auxotrófica		
GS115	his4	Mut ⁺ ,His ⁻
Protease-deficiente		
KM71	aox1Δ::SARG4 his4 arg4	Mut ^s ,His ⁻
SMD1163	his4, prb1, pep4	Mut ⁺ ,His ⁻ , prb1 ⁻ , pep4 ⁻
SMD1165	his4, prb1	Mut ⁺ ,His ⁻ , prb1 ⁻
SMD1168	his4, pep4	Mut ⁺ ,His ⁻ , pep4 ⁻
MC100-3	aox1Δ::SARG4aox2Δ::Phis4 his4 arg4	Mut ⁺ ,His ⁻

Fonte: Adaptado de (Gellissen, 2000; Daly e Hearn, 2005; Goncalves *et al.*, 2013).

A cepa X-33 é uma estirpe selvagem “*wild type*” sem alterações gênicas, entretanto todas as cepas modificadas são derivadas da linhagem NRRL Y - 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*) que também é uma linhagem selvagem. A cepa GS115 (his4, mut⁺) é o hospedeiro mais utilizado para expressão de proteínas. A maioria das cepas tem uma mutação no gene da enzima histidinol desidrogenase (HIS4), isto permite a seleção dos clones transformados (Li *et al.*, 2007).

Cepas tais como KM71, GS115 e SMD1168 são defeituosas no gene HIS4, seu uso permite a seleção dos clones baseada na capacidade do crescimento em meio sem histidina mediante restauração do fenótipo HIS4⁺ pela inserção do vetor (Daly e Hearn, 2005).

Em relação à utilização do metanol, existem três fenótipos possíveis: (1) Mut⁺, possui os genes AOX 1 e 2 funcionais, é capaz consumir e crescer em metanol semelhante as linhagens selvagens; (2) Mut^s consumo lento de metanol (*slow*), devido a ruptura do gene AOX 1, possui apenas o gene AOX 2

funcional, por isso apresenta uma reduzida taxa de utilização do metanol e crescimento; e (3) Mut⁻, possuem deleção em ambos os genes, AOX 1 e 2, não são capazes de crescer em metanol, uma das vantagens deste fenótipo é que as taxas de crescimento baixas podem ser desejáveis para a produção de certas proteínas recombinantes. Além disso, estas estirpes necessitam de menos de metanol para induzir a expressão, o que é uma vantagem, principalmente em cultivos de grande escala (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A maioria dos trabalhos utiliza o fenótipo Mut⁺ (Li *et al.*, 2007), embora alguns também utilizem o fenótipo Mut^s (Wang *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2003; Damasceno *et al.*, 2004; Gurkan, Symeonides e Ellar, 2004; Emberson *et al.*, 2005; Petrausch *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2011; Pasman, Nagy e Kaushik, 2012).

As cepas GS115 e SMD1168 contêm uma cópia funcional do gene da enzima álcool oxidase 1 (AOX1) responsável por aproximadamente 85 % da utilização de metanol pela enzima álcool oxidase. Desta forma, estas estirpes têm um fenótipo de tipo selvagem de utilização do metanol designado como Mut^{p30} (Daly e Hearn, 2005).

A cepa KM71 possui grande parte do gene AOX1 deletado e substituído pelo gene ARG4 de *S. Cerevisiae*, com isso esta cepa conta apenas com a enzima AOX2 e assim cresce em metanol a uma velocidade lenta (Mut^s) (Daly e Hearn, 2005).

A série MC100-3 não possui ambos os genes AOX1 e AOX2, desta forma não é capaz de crescer em metanol (Mut⁻). Mesmo assim, todas estas estirpes retêm a capacidade para induzir a expressão em níveis elevados a partir do promotor AOX1 (Li *et al.*, 2007).

Algumas proteínas secretadas são instáveis durante o cultivo *P. pastoris*, devido principalmente à rápida degradação por protéases vacuolares. Embora as proteínas recombinantes segregadas não passem pelo vacúolo, estas podem ser degradadas pelas protéases, presentes no meio de cultivo, que são liberadas a partir da lise de uma pequena porção das células. Devido à alta densidade celular, especialmente nos cultivos em biorreator, a concentração de

proteases do vacúolo no meio pode ser considerável e comprometer o rendimento da produção da proteína recombinante (Li *et al.*, 2007).

Uma estirpe deficiente em protease pode ser testada se os resultados iniciais sugerem degradação proteolítica. Entretanto estas cepas proteases-deficientes não são tão robustas como cepas selvagens. Em particular, estirpes deficientes, não se transformam de forma tão eficientemente, crescem mais lentamente e são mais difíceis de induzir com metanol (Cregg *et al.*, 2009).

Várias estirpes protease-deficientes, SMD1163 (pep4 prb1), SMD1165 (prb1 his4), e SMD1168 (his4 pep4), têm demonstrado ser eficazes na redução da degradação de algumas proteínas estranhas (Li *et al.*, 2007).

A cepa SMD1168 (pep4 his4) possui deleção no gene PEP4, que codifica a enzima vacúolo peptidase A também conhecida como vacúolo aspartil protease A ou proteinase A. Esta enzima é responsável pela ativação de outras proteases vacuolares, tais como carboxipeptidase Y e protease B1. Portanto esta cepa é protease-deficiente, já que sem a presença da protease A, a atividade de carboxipeptidase Y e proteinase B1 ficam substancialmente diminuídas ou eliminadas em proteases (Daly e Hearn, 2005).

Já a cepa SMD1165 (prb1 his4) possui deleção no gene PRB 1, que codifica a proteinase B, neste mutante apenas a atividade da proteinase B é eliminado, enquanto que na cepa SMD1163 (pep4 prb1) ambos o genes são deletados e atividade total de proteases é reduzida substancialmente ou eliminada (Li *et al.*, 2007).

1.6 Produção de fragmentos de anticorpos

O sistema de expressão de *P. pastoris* já foi utilizado para produção de diversos antígenos, alérgenos, enzimas, inibidores da coagulação, inibidores de proteases, hormônios, citocinas, receptores, proteínas de membranas (Cregg *et al.*, 1985; Cregg, Vedvick e Raschke, 1993; Cregg e Higgins, 1995; Cereghino e Cregg, 1999; Cereghino e Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Cregg *et al.*, 2009) e em particular tem-

se mostrado muito atraente e promissor para produção de anticorpos e fragmentos recombinantes de anticorpos (Goncalves *et al.*, 2013).

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são moléculas proteicas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e ativação de sistemas efetores celulares contra o antígeno reconhecido. Existem cinco classes diferentes de anticorpos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD), sendo a IgG a principal classe encontrada no soro humano e a de maior potencial terapêutico (Holliger e Hudson, 2005).

Anticorpos intactos também podem ser expressos em *P. pastoris* porque esta é capaz de secretar homo e heterodímeros (Pennell e Eldin, 1998). Em 1999, Ogunjimi *et al.* foram os primeiros a relatarem a produção em *P. Pastoris* de um anticorpo inteiro (IgG) totalmente funcional. Embora seja possível a produção de anticorpos inteiros em *P. Pastoris* (Schaefer e Pluckthun, 2012) nem sempre isto é alcançado, devido principalmente a necessidade de glicosilações específica, semelhantes ao padrão humano. Os N-glicanos ligados à porção Fc dos anticorpos desempenham um papel importante na manutenção da estrutura, solubilidade, conformação, e interação celular. Outro fator limitante é a massa molar (cerca de 150 kDa) e a complexidade estrutural dos vários domínios presentes nos anticorpos. Atualmente os principais avanços nesta área estão relacionados a introdução de linhagens glicoengenheiradas (Li, H. *et al.*, 2006; Potgieter *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013).

Um anticorpo IgG completo é constituído pelo domínio constante Fc (fragmento cristalizável) e pelo domínio Fab (fragmento de ligação ao antígeno). A região Fc possui glicosilações e promove a interação do anticorpo com as células imunológicas (e.g. macrófagos), com isso é responsável pela função efetora do anticorpo. O domínio Fab tem as propriedades de ligação ao antígeno, este domínio é subdividido em uma porção constante e outra variável Fv (fragmento variável) esta por sua vez é responsável pelo reconhecimento específico do antígeno. Uma vez que apenas a porção Fv é necessária para ligação do antígeno, foram desenvolvidos fragmentos que possuem a duas

cadeias (leve e pesada) da porção Fv, ligadas por um peptídeo, originando os fragmentos scFv (*single-chain fragment variable*) (Malpiedi *et al.*, 2013).

Os fragmentos scFv são as menores unidades funcionais dos anticorpos, são heterodímeros formados pela união das cadeias variáveis leves e pesadas (V_L e V_H) conectadas por um ligante polipeptídico flexível, que estabiliza a molécula reduzindo sua dissociação. Os scFv conservam a especificidade, monovalência e a afinidade de ligação ao antígeno similar ao anticorpo de origem. Podem ser expressos sozinhos, ligados entre si (dímeros, trímeros e tetrâmeros) ou ainda conjugados a radioisótopos, toxinas, enzimas, receptores de adesão e citocinas, gerando anticorpos multivalente e/ou multiespecíficos (Blazek e Celer, 2003; Kipriyanov, 2004; Ahmad *et al.*, 2012). Estes fragmentos podem se ligar e neutralizar os antígenos e por terem menor tamanho em relação aos anticorpos intactos são rapidamente removidos da circulação, apresentam rápida difusão no tecido e melhor eliminação dos imunocomplexos produzidos em comparação aos anticorpos integrais. Os fragmentos scFv são mais interessantes para aplicações clínicas porque demonstram uma melhor farmacocinética, menor citotoxicidade e são menos imunogênicos uma vez que não possuem a porção Fc responsável pelas funções efectoras citotóxicas (Holliger e Hudson, 2005).

Na **Figura 3** estão ilustradas as estruturas de um anticorpo completo (IgG) e dos fragmentos Fab e scFv, mostrando o sítio de ligação aos antígenos.

Figura 3. Representação esquemática do anticorpo IgG e seus fragmentos. IgG (Imunoglobulin G); Fc (Cristalizável Fragment); Fab (Antigen-binding fragment); Fv (Variable fragment) scFv (Single-chain fragment variable); V_H (Heavy variable); V_L (Light variable). Fonte: Adaptado de <http://www.crescendobiologics.com/rnd.html>

Estes fragmentos scFv podem ser utilizados quando se deseja apenas o reconhecimento do antígeno sem o desencadeamento da interação celular promovida pela região Fc. Em comparação aos anticorpos inteiros, os fragmentos scFv são bem menores (27-30 kDa) e permitem uma maior penetração e menor retenção nos tecidos e na circulação (Pennell e Eldin, 1998). Por isso tem crescido o interesse na produção destes fragmentos, não apenas para aplicações terapêuticas, mas também para diagnóstico *in vitro* (e.g. ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *in vivo* (e.g. radioimunodetecção), em processos de biosseparação (e.g. citometria de fluxo) e purificação (e.g. cromatografia de afinidade antígeno-anticorpo).

Devido à simplicidade estrutural, menor tamanho e ausência de glicosilações, a biossíntese do scFv é menos complexa, isto facilita sua expressão em micro-organismo, especialmente em *P. pastoris* (Spadiut *et al.*, 2014). Ridder *et al.* relataram em 1995 a expressão do primeiro fragmento recombinante de anticorpo expresso em *P. Pastoris*, trata-se de um scFv anti-LIF (fator inibidor de leucemia), obtido com rendimento acima de 100 mg.L⁻¹. A partir de então, abriu-se a possibilidade para produção de outros fragmentos scFv contra diversos antígenos (**Tabela 2 e 3**) principalmente epítomos tumorais, proteínas de superfície, peptídeos e proteínas humanas, virais, microbianas e até contra drogas (e.g. desipramina, metamidofós) e toxinas (e.g. zearalenona e neurotoxina botulínica).

De acordo com **Tabela 2**, os níveis de produção reportados para scFv em *P. pastoris*, em agitador orbital, variam de menos de uma até 250 mg.L⁻¹. Estes fragmentos são quase invariavelmente expressos como proteínas secretadas em meio complexo (BMMY). Eldin *et al.* (1997) mostraram a produção de dois scFv's em meio BMMY; (1) anti-DML com rendimento de 250 mg.L⁻¹ e (2) anti-CD7 com rendimento inferior de 60 mg.L⁻¹.

Para facilitar a purificação, alguns autores demonstraram a produção em meio salino isento de proteínas BSM (*Basal Salt Medium*) (Freyre *et al.*, 2000; Trentmann, Khatri e Hoffmann, 2004; Khatri e Hoffmann, 2006a; Ferreira *et al.*, 2012). Luo, Geng, *et al.* (1997) relataram a expressão de um fragmento "scFv-

170” com rendimento de 200 mg.L⁻¹ em meio mínimo, contendo apenas YNB como fonte de nitrogênio.

Tabela 2. Fragmentos scFv produzidos em *P. pastoris*, em agitador orbital.

scFv anti-	Rendimento (mg.L ⁻¹)	Referência
Epítipo de carcinoma escamoso	10-50	(Lui <i>et al.</i> , 1995)
Fator inibidor de leucemia (LIF)	116	(Ridder <i>et al.</i> , 1995)
CA125 (Carcinoma ovariano)	100	(Luo, Geng, <i>et al.</i> , 1997)
Desipramina (DMI)	100-250	(Eldin <i>et al.</i> , 1997)
CD7	60	(Eldin <i>et al.</i> , 1997)
n.e.*	200	(Luo, Mah, <i>et al.</i> , 1997)
CA125 (Carcinoma ovariano)	n.e.	(Luo <i>et al.</i> , 1998)
n.e.*	30-100	(Wang <i>et al.</i> , 1998)
TAG-72 (Glicoproteína de tumores)	7-10	(Goel <i>et al.</i> , 2000)
CD18	1	(Caldas <i>et al.</i> , 2000)
Receptor de transferrina murino (OX26)	0,62	(Boado, Ji e Pardridge, 2000)
Antígeno prostático específico (PSA)	15	(Wang <i>et al.</i> , 2001)
CA125 (Carcinoma ovariano)	n.e.	(Ma, Li e Luo, 2003)
Neurotoxina botulínica tipo A (BoNT/A)	n.e.	(Mah <i>et al.</i> , 2003)
Inibidor de serino-protease	25	(Shi <i>et al.</i> , 2003)
C6.5 (Câncer de mama e ovário)	70	(Gurkan, Symeonides e Ellar, 2004)
Fator de crescimento epidermal (EGF)	7.3	(Miller <i>et al.</i> , 2005)
CD33	11-48	(Emberson <i>et al.</i> , 2005)
Fosfotirosina fosfatase de <i>S. oneidensis</i>	0,42	(Miller <i>et al.</i> , 2005)
Oxidoreductase de <i>S. oneidensis</i>	5,6	(Miller <i>et al.</i> , 2005)
CA125 (Carcinoma ovariano)	35	(Li, A. D. <i>et al.</i> , 2006)
ErbB2 (Receptor tirosina kinase)	15,5	(Hu <i>et al.</i> , 2006)
CD11b	40	(Ben Tanfous <i>et al.</i> , 2006)
anti-DNA	12	(Hansen <i>et al.</i> , 2006)
A33 (Carcinoma colorectal)	n.e.	(Damasceno <i>et al.</i> , 2007)
Metamidofós	25	(Li <i>et al.</i> , 2008)
Zearalenona (Micotoxina)	n.e.	(Chang, Choi e Chun, 2008)
CD25	80	(Wan <i>et al.</i> , 2008)
Peptídeo β-amiloide	n.e.	(Cai, Li e Wang, 2008)
Norovirus-like particles (VLP)	1	(Ettayebi e Hardy, 2008)
CTLA-4 (linfócito TC-4)	16-20	(Cai <i>et al.</i> , 2009)
Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)	n.e.	(Koti <i>et al.</i> , 2010)
Queratina 8	4-5	(Jafari <i>et al.</i> , 2011)
Queratina 8	15,3	(Jafari, Sundström e Holm, 2011)
Receptor do fator de crescimento HER2	15-20	(Sommaruga <i>et al.</i> , 2011)
CD40L	16	(Hermanrud <i>et al.</i> , 2011)
MSP1-19 de <i>P. falciparum</i>	1-5	(Whyteside <i>et al.</i> , 2011)
Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)	n.e.	(Koti, Nagy e Kaushik, 2011)
Proteína gp41 do HIV-1/	n.e.	(Whyteside <i>et al.</i> , 2011)
CA125 (Carcinoma ovariano)	n.e.	(Emberson <i>et al.</i> , 2005)
Peptídeo natriurético B (BNP)	150	(Maeng <i>et al.</i> , 2012)
Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)	n.e.	(Pasman, Nagy e Kaushik, 2012)
LDL(-)	9.5	(Kazuma <i>et al.</i> , 2013)

*n.e. Não especificado.

Os fragmentos scFv produzidos em biorreator assim como o rendimento e volume inicial de trabalho estão descritos a seguir na **Tabela 3**.

Tabela 3. Fragmentos scFv produzidos em *P. pastoris*, em biorreator.

scFv anti-	Rendimento (mg.L ⁻¹)	Volume (L)	Referência
A33 (Carcinoma coloretal)	4.880	n.e.*	(Damasceno <i>et al.</i> , 2004)
n.e.	40–45	30	(Hellwig <i>et al.</i> , 2001)
Antígeno CAE	1.200	n.e.	(Freyre <i>et al.</i> , 2000)
Nitrofenol	4,3	7	(Murase, Mizutani e Satow, 2001)
Fator de necrose tumoral- α	50-100	n.e.	(Yang <i>et al.</i> , 2003)
Fibronectina B	42	n.e.	(Cunha <i>et al.</i> , 2004)
Fímbria de <i>E. coli</i> F4 (K88)	177	6	(Trentmann, Khatri e Hoffmann, 2004)
Fímbria de <i>E. coli</i> F4 (K88)	300–400	6	(Khatri e Hoffmann, 2006a)
Fímbria de <i>E. coli</i> F4 (K88)	3.500	6	(Khatri e Hoffmann, 2006b)
Bisfenol A	810	1	(Yamawaki <i>et al.</i> , 2007)
$\alpha\beta 6$ Integrin	115	n.e.	(Kogelberg <i>et al.</i> , 2008)
Fímbria de <i>E. coli</i> F4 (K88)	300	10	(Khatri <i>et al.</i> , 2011)
Fibronectina	n.e.	n.e.	(Ferreira <i>et al.</i> , 2012)

*n.e. Não especificado.

Em relação aos trabalhos em agitador orbital, observam-se poucos relatos de scFv's produzidos em biorreator. O rendimento obtido é variável desde 4,3 (anti-nitrofenol) até 4.880 mg.L⁻¹ (anti-A33), neste caso, para alcançar este rendimento elevado foi utilizada a estratégia para monitoramento e controle *on-line* da concentração de metanol (0,5%) ao longo das 72 horas da fase de indução, também foi utilizado um meio BSM, pH 3,0 (controlado), temperatura de 25 °C e oxigênio em 40% da saturação (Damasceno *et al.*, 2004).

O que começou na década de 1970, como um programa para converter metanol em uma fonte de proteína para a alimentação animal tornou-se hoje uma das mais atrativas ferramentas biológicas para produção de altos níveis de proteínas recombinantes (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). O sucesso para expressão da proteína heteróloga envolve um estudo integrado, desde a escolha da cepa, construção do vetor, composição do meio, pH e concentração do indutor durante o cultivo, assim como o controle dos parâmetros operacionais como agitação, aeração e temperatura, além da sua cinética de síntese e degradação (Silva, Peres e Gattas, 2009).

Os anticorpos monoclonais e seus fragmentos recombinantes representam a classe mais importante e valiosa de biofármacos, embora estas biomoléculas sejam preferencialmente expressas em células de mamíferos, a

tendência e que cada vez mais sejam produzidas em micro-organismos, especialmente em leveduras como a *P. pastoris* (Spadiut *et al.*, 2014).

Na **Tabela 4**, estão listados alguns dos produtos em comercialização, produzidos em *P. pastoris*, com aplicação terapêutica ou industrial.

Tabela 4. Produtos comerciais produzidos em *P. pastoris*.

Produto	Empresa (País)	Aplicação
<i>Kalbitor</i> (inibidor da caliceína)	<i>Dyax</i> (USA)	Tratamento do angioedema hereditário
<i>Insugen</i> (insulina humana)	<i>Biocon</i> (Índia)	Tratamento do diabetes
<i>Medway</i> (albumina do soro humano)	<i>Mitsubishi Pharma</i> (Japão)	Expansão do volume sanguíneo
<i>Shanvac</i> (vacina contra a hepatite B)	<i>Shantha/Sanofi</i> (Índia)	Prevenção da hepatite B
<i>Shanferon</i> (interferon- α 2b)	<i>Shantha/Sanofi</i> (Índia)	Tratamento da hepatite C e câncer
<i>Ocriplasmin</i> (microplasmina)	<i>ThromboGenics</i> (Bélgica)	Tratamento da adesão vitreomacular
<i>Nanobody ALX-0061</i> (scFv anti-receptor de IL6)	<i>Ablynx</i> (Bélgica)	Tratamento da artrite reumatoide
<i>Nanobody ALX-00171</i> (scFv anti-vírus RSV)	<i>Ablynx</i> (Bélgica)	Tratamento de infecção pelo vírus respiratório sincicial
<i>HB-EGF</i> (Fator de crescimento)	<i>Trillium</i> (Canadá)	Tratamento da cistite intersticial
<i>Purifine</i> (fosfolipase C)	<i>Verenium/DSM</i> (USA/Holanda)	Degomagem de óleos
<i>Tripsin</i> (tripsina)	<i>Roche</i> (Alemanha)	Digestão de proteínas
<i>Colagen</i> (colágeno)	<i>Fibrogen</i> (USA)	Preenchimento dérmico
<i>Aquavac-IPN</i> (vacina contra o vírus IPN)	<i>Merck/ScheringPlough</i> (USA)	Prevenção da necrose pancreática infecciosa em salmão
<i>Fitase</i> (Fitase)	<i>Phytex, LLC</i> (USA)	Aditivo na alimentação animal
<i>Superior Stock</i> (nitrito redutase)	<i>The Nitrate eliminator Co.</i> (USA)	Teste e tratamento de nitrito em águas
<i>Cistatin C</i> (cristatina c)	<i>Scipac</i> (Reino Unido)	Reagente para pesquisa

Fonte: Adaptado de <http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products/>

Entre os biofármacos destacam-se os fragmentos de anticorpos scFv “*Nanobody ALX-0061* (anti-receptor de IL6)” e “*ALX-00171* (anti-RSV vírus respiratório sincicial)”, recentemente aprovados para o tratamento da artrite reumatóide e contra infecção pelo vírus respiratório sincicial, respectivamente.

Grandes conquistas foram alcançadas na produção dos anticorpos em *P. pastoris*, principalmente no que se refere à manipulação de cepas e na otimização dos bioprocessos (Goncalves *et al.*, 2013). Deste modo surge um futuro promissor para aplicação industrial desta levedura como sistema para

produção dos anticorpos e seus fragmentos tanto na área de diagnóstico como terapêutica principalmente para doenças imune-inflamatórias como a aterosclerose.

1.7 Aterosclerose

As doenças cardiovasculares, em especial a aterosclerose, constituem uma das principais causas de morbimortalidade mundial. A aterosclerose é uma doença crônica associada a um processo imune-inflamatório decorrente do acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos no endotélio arterial. Este acúmulo provoca alterações morfofuncionais na parede das artérias que comprometem o fluxo sanguíneo devido ao estreitamento/oclusão do vaso. De acordo com instabilidade da placa aterosclerótica esta pode se romper e ocasionar complicações clínicas graves como tromboembolias, infarto cardíaco e acidente vascular cerebral (Libby, Ridker e Hansson, 2011).

A evolução da aterosclerose está associada à ativação do sistema imunológico, influenciada tanto pela resposta inata quanto pela adaptativa. Neste processo há o recrutamento, ativação e diferenciação de células imune-competentes (monócitos, macrófagos e linfócitos), as quais reconhecem auto antígenos, principalmente as lipoproteínas de baixa densidade modificadas, e culminam na formação de células espumosas (núcleo necrótico das lesões) e estrias gordurosas (Andersson, Libby e Hansson, 2010; Allahverdian, Pannu e Francis, 2012; Kawaguchi, 2012).

1.8 Lipoproteínas de baixa densidade modificadas

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *Low-Density Lipoprotein*), representadas na **Figura 4**, são as principais partículas carreadoras do colesterol no sangue e são responsáveis pelo transporte do colesterol para os tecidos periféricos. As partículas de LDL têm um diâmetro médio de 22 nm, são constituídas de triacilglicéreis, ésteres de colesterol, colesterol não esterificado, fosfolipídeos e uma apoproteínas (apoB-100). Além dos lipídeos, as partículas de LDL também podem transportar antioxidantes lipofílicos (principalmente o α -tocoferol – vitamina E). As partículas estão num estado dinâmico, a sua

estrutura e propriedades físicas são dependentes da sua composição lipídica, bem como da conformação da apoB-100 (Hevonoja *et al.*, 2000).

As partículas de LDL possuem uma estrutura complexa e podem variar de tamanho, densidade, composição química e carga elétrica a depender de modificações sofridas pelas partículas nativas. O termo LDL modificada refere-se a alterações da LDL nativa como oxidação, lipólise, acetilação, proteólise, glicação, e agregação (**Figura 4**) (Hevonoja *et al.*, 2000; Sánchez-Quesada, Benítez e Ordóñez-Llanos, 2004).

Figura 4. Representação esquemática de partículas de LDL nativa e modificadas. Fonte: Adaptado de http://healthyprotocols.com/2_idl.htm

As modificações da LDL, principalmente as modificações oxidativas, apresentam um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose. Sabe-se que a LDL oxidada (LDLox) possui várias características pró-inflamatórias e aterogênicas, são citotóxicas para vários tipos celulares incluindo as células endoteliais das artérias (causando injúria e disfunção) e são imunogênicas, uma vez que promovem o recrutamento de monócitos, a diferenciação de monócitos em macrófagos e a adesão de linfócitos (Hevonoja *et al.*, 2000; Lopes-Virella e Virella, 2010).

Ao contrário de LDL nativa, cuja absorção é bem controlado por um “*feedback*” negativo, as diferentes formas LDL modificadas são endocitadas de uma forma descontrolada, através de receptores “*scavenger*”. O acúmulo de LDL modificada em macrófagos leva à formação de células espumosas (**Figura 5**), estas se acumulam nas artérias e gradativamente formam o núcleo necrótico da placa aterosclerótica (Allahverdian, Pannu e Francis, 2012).

Figura 5. Representação esquemática da captação de LDL modificada. Partículas de LDL modificada são captadas pelos macrófagos e formam células espumosas. Fonte: Adaptado de: www.antioxidantes.com.ar

1.9 LDL Eletronegativa

As modificações sofridas pela LDL estão associadas a um aumento da sua carga eletronegativa. A LDL inicialmente é modificada em LDL minimamente oxidada (eletronegativa) até evoluir para a forma extensivamente oxidada (Gleissner, Leitinger e Ley, 2007). Uma subfração minimamente modificada de LDL eletronegativa LDL(-) foi inicialmente isolada em 1988, esta subfração corresponde de 1 a 5% da LDL presente no plasma de indivíduos saudáveis e pode chegar a 20% em pacientes com disfunções metabólicas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e diabetes (Avogaro, Bon e Cazzolato, 1988).

A LDL(-) desempenha um papel importante no desenvolvimento e na evolução da aterosclerose, pois: (1) apresenta citotoxicidade para células endoteliais e efeitos inflamatórios; (2) é uma partícula de baixa afinidade pelo receptor de LDL, isto aumenta seu tempo de residência na circulação sanguínea; (3) estimula o endotélio a produzir mais mediadores pró-inflamatórios (quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento) e (4) contribui para a modificação de outras partículas de LDL (Sánchez-Quesada, Benítez e Ordóñez-Llanos, 2004; Benítez *et al.*, 2006; De Castellarnau *et al.*, 2007; Faulin, Cavalcante e Abdalla, 2010; Estruch *et al.*, 2013).

Anticorpos LDL_{ox} tem sido detectados tanto no soro de indivíduos saudáveis como em pacientes e animais com aterosclerose e com disfunções metabólicas (Lopes-Virella e Virella, 2010). Segundos os trabalhos de (Nicoletti *et al.*, 1998) e (Yuan *et al.*, 2003) anticorpos anti-LDL_{ox} possuem propriedades anti-aterogênicas e que a administração intravenosa de anticorpos anti-LDL_{ox} em camundongos inibiram a aterosclerose.

A partir de 2006, começou-se a estudar a aplicação de anticorpos para quantificação específica da LDL(-). Anteriormente já havia trabalhos que utilizavam mAbs para quantificação da LDL_{ox}, presente tanto no plasma quanto em lesões ateroscleróticas, entretanto, estes anticorpos possuíam pouca especificidade para LDL(-), desta forma, Damasceno *et al.* (2006) produziram e caracterizaram um mAb anti-LDL(-) que permitiu o desenvolvimento de um imunoenensaio (ELISA) para detecção desta partícula de LDL minimamente modificada.

Posteriormente em 2008, Faulin *et al.* desenvolveram e validaram uma nova técnica de ELISA-sanduiche, também utilizando mAbs anti LDL(-). Mostraram que o anticorpo era capaz de reconhecer especificamente a LDL(-), e não reativo para LDL nativa, LDL_{ox} ou LDL-malondialdeído. O desenvolvimento destes imunoenaios, práticos e sensíveis, representaram um grande avanço na quantificação da LDL(-) em amostras biológicas e abriu novas possibilidade para investigação do papel da LDL(-) na aterosclerose.

Ainda em 2008, Grosso *et al.* demonstraram que a imunização passiva utilizando anticorpos monoclonais IgG ou fragmentos Fab anti-LDL(-) reduz significativamente a área de lesão aterosclerótica em camundongos nocautes

para do receptor da LDL (LDLr^{-/-}). Também observaram que o tratamento intravenoso com o anticorpo monoclonal diminui a expressão de moléculas de adesão celular (VCAM-1) no endotélio assim como o número de macrófagos na camada íntima da aorta. Este tratamento também reduz a concentração de LDL(-) no plasma, da hidroperoxidação lipídica no fígado e do colesterol oxidado no plasma e no fígado. Este estudo evidenciou a importância dos anticorpos anti-LDL(-) e mostrou que estes podem ser utilizados tanto para monitoramento como uma estratégia promissora para prevenção e tratamento da aterosclerose.

1.10 scFv Anti-LDL(-)

Os anticorpos monoclonais normalmente são produzidos por hidridomas, estas células são obtidas pelo processo de fusão celular (hibridação) de células tumorais (imortalizadas) com células produtoras de anticorpos (plasmócitos) oriundos de animais previamente imunizados com o antígeno de interesse. Os mAbs produzidos são homogêneos e capazes de reconhecer um único alvo dentro do organismo. Embora a aplicação dos mAbs tenha amplo potencial diagnóstico, sua utilização terapêutica é limitada devido a sua alta imunotoxicidade. Uma vez que as proteínas produzidas a partir de células animais, quando injetadas em humanos, podem gerar uma resposta imune indesejada (HAMA – *Human Anti-Murine Antibodies*). Esta resposta provoca a remoção dos mAbs da circulação e formação de imunocomplexos, em alguns casos pode evoluir para eventos adversos fatais (Hwang e Foote, 2005).

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, várias formas de anticorpos recombinantes podem ser geradas: (1) anticorpos quiméricos; (2) anticorpos humanizados e (3) fragmentos de anticorpos: Fab, Fv e scFv (Daly *et al.*, 2001; Kriangkum *et al.*, 2001; Pucca *et al.*, 2011).

Recentemente, Kazuma *et al.* (2013) mostraram o potencial terapêutico de fragmentos scFv anti-LDL(-) produzidos em *P. pastoris* recombinante. O scFv neutraliza os efeitos pró-aterogênicos da LDL(-), bloqueando sua captação e acúmulo em macrófagos, inibindo assim a formação de células espumosas. O tratamento com scFv também reduziu a área de lesão na aorta, inibindo o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em camundongos.

Na **Figura 6**, é proposto um modelo que mostra como o scFv anti-LDL(-) pode ser aplicado para o diagnóstico da LDL(-) assim como para prevenção e tratamento da aterosclerose.

Figura 6. Representação esquemática das aplicações do scFv anti-LDL(-). Adaptado de www.antioxidantes.com.ar

Os fragmentos recombinantes de anticorpos scFv anti-LDL(-) são de grande importância para o desenvolvimento de novas pesquisas biomédicas e se destacam como um produto biotecnológico interessante para prevenção, tratamento e diagnóstico laboratorial dos processos ateroscleróticos (Damasceno *et al.*, 2006; Faulin, Cavalcante e Abdalla, 2010).

Entretanto o scFv anti-LDL(-) foi obtido com baixos níveis de expressão ($9,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e em pequena escala (agitador orbital) (Kazuma *et al.*, 2013). Este fato limita o desenvolvimento de testes pré-clínicos e clínicos. Diante disto, o objetivo deste trabalho está relacionado com a otimização do meio de cultivo para expressão deste scFv assim como a ampliação do processo de produção em biorreator, contribuindo assim para a redução de custos operacionais e aumento do rendimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta dissertação teve como principal objetivo estudar a produção do fragmento recombinante de anticorpo (scFv) anti-LDL(-), em *P. pastoris*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de fontes alternativas de nitrogênio na produção do scFv em agitador orbital;
- Avaliar a influência do pH inicial sobre o crescimento, viabilidade celular e produção do scFv em agitador orbital;
- Comparar o crescimento celular e produção do scFv nos meios padrão e modificado em biorreator;
- Estudar a cinética de consumo de substrato, de crescimento celular e de produção do scFv em biorreator.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

Foi disponibilizada, pela Profa. Dra. Dulcinéia Abdalla (FCF/USP), uma amostra da levedura *P. pastoris* SMD1168 transformada com o plasmídeo pPIgLE[anti-LDL(-)His₆]. A transformação da levedura foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Andréa Maranhão (IB/UnB).

A linhagem SMD1168 possui genótipo $\Delta pep4::URA3 \Delta kex1::SUC2his4ura3$ e fenótipos His⁻ (marca auxotrófica), Pep4⁻ (protease-deficiente) e Mut⁺ (cópia funcional do gene AOX1).

O plasmídeo pPIgLE é derivado do pPIC9 (**Figura 7**), entre os sítios de restrição *Xma* I e *Eco*R I está inserido a sequência de DNA que codifica a proteína scFv anti-LDL(-)2C7 ligada à cauda de histidina (His₆).

Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pPIgLE(anti-LDL(-)His₆). O plasmídeo derivado do pPIC9, é composto por: (1) promotor 5'AOX1; (2) origem de replicação de *E. coli* (ori *Co1E1*); (3) gene de resistência a ampicilina (*Amp*); (4) sinal de secreção (S); (5) fragmento 3'AOX1 (terminação da transcrição) e (6) fase aberta gene *HIS4* para inserção genômica do plasmídeo por recombinação homóloga no *locus HIS4* (restaurando o fenótipo His⁺). Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2003).

A linhagem foi estocada sob a forma de cultura-estoque em meio BMGY (**Tabela 5**) suplementado com glicerol 20% (v/v) em *ultrafreezer* a -70 °C. Este estoque congelado foi empregado para gerar o pré-inóculo para os cultivos em frascos agitados e em biorreatores.

3.2 Meios de cultura

Durante os cultivos submersos, foram utilizados os meios: BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*), BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) (**Tabela 5**) e BMMY-modificado de acordo o planejamento experimental *Box Behnker* (**Tabelas 6 e 7**), para isso foi utilizado o programa *Statistica*.

Tabela 5. Composição dos meios BMGY e BMMY.

Composição	Concentração
Glicerol (BMGY) ou Metanol (BMMY) (g.L ⁻¹)	10,0
Extrato de levedura <i>Bacto</i> (g.L ⁻¹)	10,0
Peptona <i>Bacto</i> (g.L ⁻¹)	20,0
YNB – <i>Yeast Nitrogen Base</i> * (g.L ⁻¹)	13,4
Biotina (mg.L ⁻¹)	0,4
Antiespumante Y-30 (g.L ⁻¹)	0,5
Tampão fosfato de potássio, 100 mM	q.s.p.

*Com sulfato de amônio. O YNB e a biotina foram esterilizados por filtração. Os demais componentes foram autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

Tabela 6. Variáveis e níveis do planejamento experimental fatorial *Box Behnker*.

Variável (g.L ⁻¹)	Nível		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
(1) Extrato de soja (ES)	-	1,25	2,5
(2) Casaminoácidos (CA)	-	10	20
(3) Ureia (UR)	-	5	10

(-) Ausência.

Tabela 7. Experimentos do planejamento fatorial *Box Behnker*.

Experimento	Variáveis		
	X ₁ (ES)	X ₂ (CA)	X ₃ (UR)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
PC	0	0	0
C+	1	1	1
C-	-1	-1	-1

3.3 Cultivos em frascos agitados

As células da cultura-estoque foram descongeladas, inoculadas em frascos *Erlenmeyer* “*baffled*” (**Figura 8A**) de 250 mL, contendo 50 mL de meio BMGY e incubadas a 30 °C em agitador orbital a 250 rpm. Após 24 horas de cultivo era retirada uma alíquota para determinação da concentração celular por filtração em membrana de 0,45 µm e secagem em balança de infravermelho. Em seguida uma alíquota do pré-inóculo, suficiente para concentração celular inicial de 1 g.L⁻¹ era transferida para frascos de 250 mL com 50 mL do meio de indução (com metanol). Em seguida o cultivo era incubado a 20 °C em agitador orbital a 250 rpm, durante 72 horas, com adição de 1% (v/v) de metanol a cada 24 horas.

Figura 8. (A) Frasco *Erlenmeyer* “*baffled*” (Nalgene) e (B) biorreator *Bioflo 115* (New brunswick Scientific).

3.4 Cultivo em biorreator

As células da cultura-estoque foram descongeladas, inoculadas em frascos *Erlenmeyer* “*baffled*” de 500 mL, contendo 100 mL de meio BMGY e incubadas a 30 °C em agitador orbital a 250 rpm. Após 24 horas de cultivo foi retirada uma alíquota para determinação da biomassa por filtração em membrana de 0,45 µm e secagem em balança de infravermelho. Em seguida uma alíquota do pré-inóculo, suficiente para biomassa inicial de 1 g.L⁻¹, era centrifugada, ressuspenso e inoculada no biorreator (**Figura 8B**). As condições operacionais foram: k_La de 99 h⁻¹, agitação de 500 rpm, aeração de 1 vvm e 20 °C. A fase de indução durou 72 horas, com adição de 1% (v/v) de metanol a cada 24 horas.

3.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

O estudo cinético de um bioprocesso consiste inicialmente na análise de evolução dos valores das concentrações do substrato, células e produto em função do tempo de cultivo, para isso foram utilizadas as seguintes equações:

Velocidade instantânea de crescimento ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$rX = \frac{dX}{dt}$
Velocidade específica de crescimento (h^{-1})	$\mu X = \frac{rX}{X}$
Velocidade máxima de crescimento (h^{-1})	$\mu_{\max}$ = coeficiente angular da reta $\ln X$ versus tempo
Tempo de duplicação (h)	$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$
Velocidade instantânea de consumo do substrato ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$rS = \frac{dS}{dt}$
Velocidade específica de consumo do substrato (h^{-1})	$\mu S = \frac{rS}{X}$
Conversão de substrato em células (g.g^{-1})	$Y_{X/S} = \frac{X_o - X_f}{S_o - S_f}$
Produtividade volumétrica do produto ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$P_p = \frac{P_f - P_o}{t_f}$

em que:

- rX = velocidade de crescimento celular
- X = concentração de células
- t = tempo
- μX = velocidade específica de crescimento
- $\mu_{\max}$ = velocidade máxima de crescimento na fase exponencial
- t_d = tempo de duplicação
- rS = velocidade de consumo de substrato
- S = concentração de substrato
- μS = velocidade específica de consumo de substrato
- PP = Produtividade do produto
- P_f = Concentração final de produto
- P_o = Concentração inicial produto
- t_f = tempo final de cultivo

3.6 Processamento do meio de cultivo

3.6.1 Clarificação

Ao final do cultivo, o meio foi clarificado por centrifugação a 5.000 g por 15 min, separando o sobrenadante (meio) da biomassa (precipitado).

3.6.2 Cromatografia de afinidade ao níquel

Uma vez que o fragmento de anticorpo anti-LDL(-) está conectado a uma cauda de hex-histidina (His_6), foi utilizada a cromatografia de afinidade a íon metálico - níquel (IMAC-Ni – *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography* -

Nickel) como estratégia para purificação da proteína recombinante a partir do meio de cultivo e posterior quantificação pelo método BCA. O fluxograma do processo de purificação está representado na **Figura 9** e as soluções utilizadas estão listadas da **Tabela 8**.

Figura 9. Fluxograma para purificação do scFv anti-LDL(-) por IMAC-Ni

Tabela 8. Soluções utilizadas na purificação dos scFv anti-LDL(-) por IMAC-Ni.

Solução*	Componentes [#]	Concentração
Tampão de Ligação ⁺	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	30 mM
Tampão de Eluição ⁺	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
Tampão de Limpeza ⁺	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	EDTA	50mM
Sulfato de Níquel	NiSO ₄	100mM

3.6.3 Quantificação do scFv

A concentração do scFv foi obtido considerando a quantidade de proteínas totais após purificação. Para isso utilizou-se método colorimétrico de BCA - *Bicinchoninic Acid* (Sigma) com modificação do tempo de incubação de 30 para 45 min. Este método baseia-se na reação das ligações peptídicas e cadeias laterais dos aminoácidos cistina, cisteína, triptofano e tirosina com o cobre (Cu²⁺) em solução alcalina, reduzindo-o a Cu⁺, este por sua vez, forma um complexo solúvel em água com duas moléculas de BCA, de cor púrpura, que absorve fortemente a 562 nm.

Foi feita uma curva de calibração, tendo como padrão albumina diluída em tampão de eluição da IMAC-Ni (imidazol 500 mM). A partir da regressão linear da curva foram extraídos os coeficientes angular e linear, os quais foram utilizados para o cálculo da concentração de proteínas totais nas amostras.

Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentração de proteínas totais a partir da regressão linear da curva de calibração empregando a equação:

$$C_{\text{Proteínas}} = \left(\frac{Abs_{\text{Amostra}} - b}{a} \right) \cdot D$$

em que $C_{\text{Proteínas}}$ = Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$);
 a = Coeficiente angular da curva padrão de calibração;
 Abs_{Amostra} = Absorbância (562 nm) da amostra;
 b = Coeficiente linear da curva padrão de calibração;
 D = Fator de diluição da amostra.

3.6.4 Eletroforese SDS-PAGE

Para análise do scFv purificado foram realizadas corridas de eletroforese em gel de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), desnaturante e não redutor. Para isso foram utilizados geis com gradiente de 4-20% (*TGX Precast Gel, Biorad*) e equipamento *Mini-Protean (Biorad)* operado a 90-110 V. Após corrida, os geis foram corados com nitrato de prata (*Kit GE*).

3.6.5 Quantificação da biomassa

Para o cálculo da biomassa ($X_{g/L}$), um determinado volume (V) dos cultivos era retirado e filtrado a vácuo, com membranas de nitrocelulose (0,45 μ m) previamente pesadas. As membranas, ainda acopladas ao sistema, eram lavadas com água deionizada e secas em balança com infravermelho. A massa de células foi determinada empregando a seguinte equação:

$$X_{g/L} = \frac{m_2 - m_1}{V} \cdot 1000$$

em que: $X_{g/L}$ = Biomassa ($g \cdot L^{-1}$);
 m_1 = Massa da membrana seca (g);
 m_2 = Massa da membrana seca após filtração (g);
 V = Volume da amostra em (mL);
 1000 = Transformação de mL para (L).

3.6.6 Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular da levedura *P. pastoris* durante os cultivos foi padronizado um método por citometria de fluxo. Baseia-se na contagem do número de células que captaram o fluoróforo iodeto de propídio (PI), esse marcador fluorescente é capaz de ligar-se ao DNA de células que estão com as membranas celulares comprometidas, que é um indicativo de morte celular (Deere *et al.*, 1998; Hohenblum, Borth e Mattanovich, 2003; Hyka *et al.*, 2010).

A intensidade da fluorescência das células que absorveram o PI foi quantificada pela leitura de 10.000 eventos no citômetro de fluxo *FACS-Canto (BD)* utilizando os canais: SSC (complexidade/granulosidade), FSC (tamanho)

e FLH/PE (fluorescência), Para determinar a fluorescência basal, no início de cada análise era lida uma amostra sem marcação com o PI.

A padronização da análise da viabilidade foi realizada a partir de tratamento químico e térmico. Para isso, células obtidas após 48 horas de cultivo em meio BMGY foram centrifugadas e submetidas aos tratamentos: (1) Controle (ressuspendidas em PBS); (2) Químico (ressuspendidas em etanol 70% / durante 20 min) ou (3) Térmico (ressuspendidas em PBS / aquecimento a 60 °C durante 20 min). Finalmente foram marcadas com PI, visualizadas por microscopia e analisadas por citometria de fluxo.

De acordo com a **Figura 10**, observa-se que há uma correlação positiva entre a morte celular das leveduras por tratamento químico (2) e térmico (3) e a intensidade de fluorescência tanto por microscopia (FLUOR) quanto por citometria de fluxo (FACS).

Figura 10. Análise da viabilidade celular, por citometria de fluxo. A - Visualização de microscopia por contraste de interferência diferencial (DIC), B – Visualização de microscopia de fluorescência (FLUOR), C – Distribuição das células por citometria de fluxo (FACS).

3.6.7 Quantificação do glicerol

Para quantificação do consumo de glicerol, principal fonte de carbono durante a fase de crescimento, foi utilizado o kit colorimétrico *Triglicerides Labtest*, no qual o glicerol é convertido enzimaticamente a glicerol-3-fosfato, oxidado a dihidroxiaceto e peróxido de hidrogênio, finalmente ocorre um acoplamento entre o peróxido de hidrogênio com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo uma quinoneimina com absorbância em 505 nm. Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentração de glicerol a partir da regressão linear da curva de calibração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização dos cultivos

Antes de iniciar os experimentos do planejamento fatorial foram realizados cultivos em frascos agitados utilizando os meios-padrão BMGY e BMMY. Para isto, as células da cultura-estoque foram descongeladas, inoculadas em frascos *Erlenmeyer* “*baffled*” de 250 mL, contendo 50 mL de meio BMGY e incubadas a 30 °C em agitador orbital a 250 rpm. Após 24 horas de cultivo foi retirada uma alíquota para determinação da biomassa por filtração em membrana de 0,45 µm e secagem em balança de infravermelho. Em seguida uma alíquota do pré-inóculo, suficiente para biomassa inicial de 1 g.L⁻¹ foi transferida para frascos de 250 mL com 50 mL do meio BMMY. Em seguida o cultivo foi incubado a 20 °C, 250 rpm, durante 72 horas, com adição de 1% (v/v) de metanol a cada 24 horas. Após as 72 horas de indução, o cultivo foi centrifugado, as células descartadas e o sobrenadante submetido à purificação por afinidade (IMAC-Ni).

Nestes ensaios obteve-se rendimento de 10,3 ± 1 mg.L⁻¹ de scFv purificado, este valor de scFv produzido está bem próximo a 9,5 mg.L⁻¹ obtido por (Kazuma *et al.*, 2013) e foi utilizado como referência da produção em frascos agitados.

4.2 Planejamento experimental para modificação do meio

Inicialmente, para substituição do meio de cultivo padrão, trabalhou-se com o extrato aquoso liofilizado produzido a partir do extrato de soja integral. Foi realizado um primeiro planejamento experimental com os seguintes componentes: extrato de soja liofilizado, ureia e sulfato de amônio em substituição ao YNB e casaminoácidos (dados não mostrados). Após quantificação de biomassa e de proteínas totais, depois da purificação, a análise do planejamento mostrou que a adição do extrato de soja liofilizado influenciava positivamente o crescimento celular e produção de scFv. Os valores elevados de produção de até 97,5 mg.L⁻¹ chamaram atenção e decidiu-

se quantificar novamente o scFv purificado. Porém observou-se que apenas as amostras dos experimentos com soja estavam turvas e com precipitado.

A partir dessa observação cogitou-se a hipótese de que componentes do extrato de soja poderiam precipitar durante o cultivo e interferir na quantificação da biomassa, assim como os componentes mais solúveis poderiam estar interagindo com a resina de cromatografia de afinidade e contaminar o scFv purificado, fornecendo assim valores falso-positivos de produção. Portanto, buscou-se trabalhar com um novo extrato de soja (*Provesol*, *Olvebra*), obtido pela extração aquosa dos componentes solúveis da farinha de soja desengordurada, submetida a tratamento térmico e secagem por *spray drying*.

Substituiu-se a o extrato de soja liofilizado pelo extrato obtido a partir da fração aquosa desengordurada. Este extrato, juntamente com casaminoácidos e ureia, foi utilizado para a formulação do meio de cultivo modificado a partir de um planejamento experimental. Este novo meio foi proposto para substituição da fonte de nitrogênio YNB e do aminoácido biotina presentes no meio padrão, BMMY. Tentou-se substituir estes dois componentes, pois são compostos que oneram o meio, além de serem termossensíveis e necessitarem de esterilização por filtração.

Os meios foram preparados baseando-se em um planejamento do tipo *Box-Behnken*. Além das variáveis: extrato de soja (X_1), casaminoácidos (X_2) e ureia (X_3), foram fixados os componentes: peptona *Bacto* 2% (m/v), extrato de levedura 1% (m/v), metanol 1% (v/v), todos dissolvidos em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0.

O planejamento *Box-Behnken* foi composto por 12 experimentos mais 06 pontos centrais. Também foram adicionados 02 ensaios extras: C(-), no qual as variáveis estavam no nível inferior e C(+), no qual as variáveis estavam no nível superior.

Após purificação, as amostras foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE). Nota-se a partir da **Figura 11** que em todas as amostras havia a presença de bandas de proteína em torno de 30 kDa. De acordo com Kazuma *et al.*, (2013), estas bandas estão relacionadas ao scFv glicosilado (~31 kDa) e

ao não glicosilado (~27 kDa). Observa-se que as amostras com as bandas mais pronunciadas de scFv são correspondentes aos experimentos com a presença do extrato de soja, especialmente o ensaio n° 11 composto de 1,25 g.L⁻¹ de extrato de soja e 10 g.L⁻¹ de ureia.

Entretanto observa-se que apenas nos ensaios com presença de extrato de soja existem bandas de proteínas acima e abaixo de 30 kDa que não correspondem ao scFv (**Figura 10**). Isto confirma a hipótese de que o extrato de soja possui proteína que também tem afinidade pela resina cromatográfica e são eluídas com o scFv, reduzindo assim a pureza do scFv.

Figura 11. Eletroforese (SDS-PAGE) dos cultivos do planejamento experimental. ES – extrato de soja; CA – casaminoácidos; UR – ureia. Valores expressos em (g.L⁻¹) de cada componente adicionado ao meio. C- (controle negativo); C+ (Controle positivo); PC (ponto central). Coloração com nitrato de prata. A linha preta indica o local esperado para o scFv (entre 27 e 31 kDa).

Embora os meios com extrato de soja tenham proporcionado maior produção, decidiu-se, no momento, não seguir trabalhando com eles já que a

presença de proteínas contaminantes no eluído iriam requerer etapas adicionais de purificação. Tais etapas onerariam a produção uma vez que os processos de purificação, especialmente as cromatografias, correspondem a mais de 70% do custo para obtenção de biomoléculas (Przybycien, Pujar e Steele, 2004; Thömmes e Etzel, 2007).

Até o momento não foi encontrada nenhuma publicação que tenha utilizado especificamente o extrato aquoso de soja para produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*. Neste tema foi localizado apenas um trabalho, que utilizou um meio alternativo contendo 50 g.L⁻¹ de farelo de soja para expressão da enzima quimosina B, porém não fornece detalhes a respeito do processamento deste farelo nem a forma como foi adicionado ao meio de cultivo (Araujo, 2008).

Em *S. cerevisiae*, foi expresso o antígeno de superfície da hepatite B (PreS2+S) em recombinante, utilizando a peptona como fonte de nitrogênio (Schulman, Ellis e Maigetter, 1991). Também foi produzida glutationa utilizando proteína de soja (Hara *et al.*, 2012). Mostrou-se também maior crescimento celular e maior expressão do receptor (hTAS2Rs) com a adição de peptídeos da soja (Ito *et al.*, 2012).

Já havia sido relatado o efeito fisiológico de peptídeos de soja sobre o crescimento de leveduras e fermentação de carboidratos (Kitagawa *et al.*, 2008). Assim como na tolerância ao estresse do congelamento e descongelamento (Izawa *et al.*, 2007).

Foi verificado que as proteínas da soja têm peptídeos funcionais que regulam o metabolismo de leveduras. Também foi observado que as leveduras cultivadas em meios com peptona e peptídeos de soja apresentaram maior acúmulo de biomassa (18,1 g.L⁻¹) quando comparados ao YNB (6,9 g.L⁻¹) à peptona de caseína (9,8 g.L⁻¹) (Ikeda *et al.*, 2011).

Embora existam relatos sobre algumas funções metabólicas e fisiológicas das proteínas e dos peptídeos de soja sobre as leveduras, dados relativos à sua utilização para produção de proteínas recombinantes em micro-organismos, especialmente em *P. pastoris*, ainda são limitados. Como perspectiva tem-se interesse de futuramente continuar os estudos e explorar a utilização de subprodutos da soja como fonte alternativa de nutrientes.

Como os experimentos sem extrato de soja (C-, 1, 3, 5 e 7), apresentaram uma banda mais fraca, em torno de 30 kDa, no entanto com pureza aparente acima de 90%, decidiu-se analisar estas amostras separadas do restante do planejamento. Para isso foi feita nova eletroforese carregada com maior quantidade das amostras: controle C(-) e com os experimentos (1, 3, 5 e 7) (**Figura 12**).

Visualmente observa-se que os experimentos 1, 3, 5 e 7 apresentam produção discretamente mais elevada que o controle C(-) apenas com peptona e extrato de levedura. Como não houve diferença expressiva entre os experimentos optou-se por trabalhar com o meio de cultivo nº 5, no qual foi adicionada a menor quantidade de casaminoácidos, 10 g.L⁻¹.

Figura 12. Eletroforese (SDS-PAGE) dos experimentos C(-), 1, 3, 5 e 7. ES – extrato de soja; CA – casaminoácidos; UR – ureia. Valores expressos em (g.L⁻¹) de cada componente adicionado ao meio. C- (Controle negativo); MM (Padrão de massa molar). Coloração com nitrato de prata. A linha preta contínua indica o local esperado para o scFv (entre 27 e 31 kDa).

Dentre as combinações de ureia e casaminoácidos, foi escolhido para cultivo em biorreator o meio nº 5, com concentração de casaminoácidos no nível inferior (10 g.L^{-1}). Este meio com casaminoácidos foi selecionado porque já é conhecida que a adição deste componente aumenta o nível da expressão e diminui a degradação de proteínas recombinantes produzidas em *P. pastoris*.

Na **Tabela 9** podem-se observar trabalhos que utilizaram desde 5 até 30 g.L^{-1} de casaminoácidos na composição inicial do meio de cultura para o crescimento e/ou indução de *P. pastoris*.

Tabela 9. Concentração de casaminoácidos em meios de cultivos para *P. pastoris*.

Concentração de Casaminoácidos (g.L^{-1})	Referência
5	(Luo, Mah, <i>et al.</i> , 1997; Boze <i>et al.</i> , 2001; Toonkool <i>et al.</i> , 2006)
6,3	(Tian, Chen e Ding, 2012)
10	(Clare <i>et al.</i> , 1991; Tsujikawa <i>et al.</i> , 1996; Werten <i>et al.</i> , 1999; Woo <i>et al.</i> , 2002; Li <i>et al.</i> , 2003; Wu <i>et al.</i> , 2003; Cha, Dalal e Bentley, 2005; Emberson <i>et al.</i> , 2005; Ettayebi e Hardy, 2008; Hermanrud <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2011)
20	(Brankamp <i>et al.</i> , 1995; Shi <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2005; Choi e Park, 2006; Hu <i>et al.</i> , 2006; Rahbarizadeh <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2006; Riedstra <i>et al.</i> , 2007)
30	(Okabayashi <i>et al.</i> , 1996; Ben Tanfous <i>et al.</i> , 2006)

Existem diversos fatores que podem influenciar a expressão de proteínas em *P. pastoris*, tal como o pH, temperatura, concentração de metanol, a densidade celular, a composição do meio e adição de compostos como sorbitol, EDTA e casaminoácidos (Pennell e Eldin, 1998; Jafari, Sundström e Holm, 2011; Goncalves *et al.*, 2013).

Tem sido relatado que a adição de casaminoácidos no meio de cultura pode minimizar a atividade de protease extracelular e aumentar o rendimento de proteína expressa (Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Ayed *et al.*, 2008). Casaminoácidos é uma peptona obtida a partir da hidrólise ácida da caseína. A suplementação de meio de cultivo com casaminoácidos aumentou a produção de diferentes proteínas em *P. pastoris* (Werten *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003;

Wang *et al.*, 2005), especialmente na expressão de fragmentos scFv (Luo, Mah, *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Rahbarizadeh *et al.*, 2006; Riedstra *et al.*, 2007).

A presença de casaminoácidos reduz a degradação das proteínas inibindo a proteólise enzimática (Clare *et al.*, 1991; Tsujikawa *et al.*, 1996; Werten *et al.*, 1999). Os casaminoácidos se comportam como substrato competitivo para as proteases extracelulares, sendo hidrolisados em detrimento das proteínas heterólogas (Zhang *et al.*, 2006).

A adição de 20 g.L⁻¹ de casaminoácidos no meio BMMY aumentou a expressão do scFv anti-ErbB2 de ~10 para 15 mg.L⁻¹ (Hu *et al.*, 2006). Enquanto que a adição de 10 g.L⁻¹ de casaminoácidos no meio YPD, aumentou a concentração da citocina recombinante (rGM-CSF) de ~70 para 90 mg.L⁻¹ (Wu *et al.*, 2003). A adição de casaminoácidos também favoreceu o correto processamento do scFv derivado do “mAb 107”, impedindo a clivagem do peptídeo “myc-tag” (Ben Tanfous *et al.*, 2006).

A adição de 10 g.L⁻¹ de casaminoácidos ao meio mínimo basal também aumentou expressão de uma proteína de fusão (IL2-GFP) assim como a adição de 5 g.L⁻¹ incrementou 3 a 5 vezes a atividade da enzima β -glucosidase. Este efeito pode estar associado tanto com a inibição da proteólise como com a estabilização do pH, já que os casaminoácidos auxiliam no tamponando do meio, impedindo que o pH reduza ao longo do cultivo (Cha, Dalal e Bentley, 2005; Toonkool *et al.*, 2006).

Outra estratégia promissora também utilizada é a condução de cultivo descontínuo alimentado, com adição diária de 1 g.L⁻¹ exclusivamente durante a fase de indução, com isto há uma redução significativa da proteólise com incremento no rendimento (Chauhan, Arora e Khanna, 1999; Aayed *et al.*, 2008). Uma solução de casaminoácidos (100 g.L⁻¹) também foi adicionada continuamente, a uma taxa de 10 mL.h⁻¹, durante a fase de indução para a imunotoxina A-dmDT390-bisFv (Woo *et al.*, 2004).

A adição diária de quantidades limitadas (1 g.L⁻¹) de casaminoácidos não teve efeito sobre o crescimento de *P. pastoris*, mas sim sobre a expressão do antígeno HBsAg de 233 para 500 mg.L⁻¹. Entretanto, a adição de quantidades maiores de 5 e 10 g.L⁻¹ reduziram a expressão. Isto sugere que o

fornecimento de quantidades limitadas de casaminoácidos a cada 24 h não reprime a atividade do promotor de AOX1 enquanto que em concentrações maiores a célula utiliza este nutriente como fonte de carbono em alternativa ao metanol. Assim, a alimentação de maiores quantidades deste nutriente durante a indução de metanol foi prejudicial para a expressão do HBsAg (Chauhan, Arora e Khanna, 1999).

4.3 Estudo do pH inicial na fase de indução

Para fase de indução foi estudada a faixa de pH entre 3,0 e 8,0. Para alcançar esta faixa utilizou-se o tampão *Mcllvaine* (fosfato de sódio/ácido cítrico). Nestes experimentos o pré-inóculo foi feito em meio BMGY (pH 6,0) e o inóculo em BMMY. A fase indução durou 72 horas com adição de 1% (v/v) de metanol a cada 24 horas. Os cultivos foram avaliados quanto ao crescimento da biomassa, viabilidade celular e produção de scFv (**Figura 13 e Tabela 10**).

Figura 13. Curva de crescimento e viabilidade celular de *P. pastoris* em pH de 3,0 a 8,0. Crescimento celular (linha contínua); viabilidade celular (linha tracejada). Cultivos realizados em agitador orbital, meio BMMY, temperatura de 20 °C, durante 72 horas. Média $\pm$ desvio padrão de experimentos em triplicata. As letras diferentes na mesma coluna indicam que existe significância estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA "one way", seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 10. Valores de pH, biomassa e viabilidade de *P. pastoris*.

pH inicial (t_{0h})	pH final (t_{96h})	Biomassa ($g.L^{-1}$)	Viabilidade (%)
3,0	$3,8 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,3^c$	$94,7 \pm 0,6^c$
4,0	$4,5 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,7^{abc}$	$97,4 \pm 0,5^b$
5,0	$5,2 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,7^{abc}$	$99,1 \pm 0,1^a$
6,0	$5,6 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,2^{ab}$	$99,3 \pm 0,1^a$
7,0	$6,6 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,4^a$	$99,1 \pm 0,1^a$
8,0	$7,2 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,5^{bc}$	$98,8 \pm 0,0^a$

Cultivos realizados em agitador orbital, meio BMMY, a 20 °C, durante 72 horas. Média $\pm$ desvio padrão de experimentos em triplicata. As letras diferentes indicam que existe significância estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA “one way”, seguida pelo teste de Tukey.

De acordo com a **Figura 12** e **Tabela 10**, a faixa de pH estudada não teve influência sobre a viabilidade celular já que ao decorrer de todos os cultivos a viabilidade manteve-se próximo a 100%, apenas no cultivo a pH 3,0 ocorreu uma pequena variação na viabilidade. Neste cultivo, a partir das 40 horas de indução a viabilidade reduziu para 90% entretanto às 62 horas de indução as células recuperaram viabilidade para 95%.

Esta manutenção da viabilidade acima de 90%, observada em todos os experimentos é importante, principalmente, para manter a célula em atividade para produção da proteína heteróloga, assim como para evitar o rompimento celular e extravasamento das proteases vacuolares.

Em relação ao crescimento celular (**Figura 13 e Tabela 10**), a faixa de pH que proporcionou maior acúmulo de biomassa foi entre 4,0 e 7,0 (8,4 a 9,5 $g.L^{-1}$), enquanto que o menor crescimento foi observado nos extremos de pH 3,0 e 8,0 (7,6 e 8,3 $g.L^{-1}$, respectivamente).

Esta variação mínima entre o cultivo com maior crescimento, pH neutro 7,0 (9,5 $g.L^{-1}$), e os cultivos de menor crescimento, pH 3,0 (7,6 $g.L^{-1}$) e pH 8,0 (8,3 $g.L^{-1}$), pode estar relacionado a um pequeno estresse ácido (pH 3,0) ou alcalino (pH 8,0) que a levedura sofreu para adaptar a variação do pH, uma vez que o cultivo do pré-inóculo foi conduzido em pH 6,0.

A *P. pastoris* é uma célula eucariota robusta e assim como outras leveduras pode ser cultivada em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0 sem grandes efeitos sobre a viabilidade e o crescimento celular (Chiruvolu *et al.*, 1998; Cereghino e Cregg, 2000).

No entanto, tem-se demonstrado um efeito significativo sobre as proteínas recombinantes secretadas (Inan *et al.*, 1999; Calik *et al.*, 2010). Desta avaliou-se a influência do pH durante a fase de indução sobre a produção do scFv anti-LDL(-) (**Figura 14**).

Figura 14. Eletroforese (SDS-PAGE) dos cultivos realizados em pH de 3,0 a 8,0. Cultivos realizados em agitador orbital, meio BMMY, temperatura de 20 °C, durante 72 horas. Coloração com nitrato de prata. A linha preta contínua indica o local esperado para o scFv (entre 27 e 31 kDa). A linha preta pontilhada indica possíveis produtos de degradação. Imagem representativa de experimentos em triplicata.

Visualmente, através do gel de eletroforese, observa-se na linha contínua que os cultivos em pH 6,0 7,0 e 8,0 favoreceram a expressão do scFv. Enquanto que nos outros valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0, as bandas estão menos pronunciadas.

Em pH 7,0 e 8,0 a expressão do scFv foi tão superior que uma parte deste scFv provavelmente sofreu degradação e é visualizado, na linha pontilhada, como bandas mais fracas e como massa molar e torno de 10 kDa.

Esta maior expressão em pH 7,0 e 8,0 ocorre provavelmente porque esta a faixa de pH que confere as melhores condições metabólicas para expressão e excreção do scFv, assim como pode proporcionar maior estabilidade da proteína no meio de cultivo.

Alguns trabalhos demonstram que um dos meios de minimizar a degradação proteolítica é alterar o pH da fase de crescimento de 5,0-6,0 para valores próximo a 3,0 durante a fase de indução (Scorer *et al.*, 1993; Chiruvolu

et al., 1998). Entretanto para expressão do scFv anti-LDL(-) quanto mais ácido o pH, menor foi a expressão.

Na **Tabela 11** estão relacionados os trabalhos sobre o efeito do pH durante o cultivo de *P. pastoris* para produção de proteínas recombinantes.

Tabela 11. Influência do pH em cultivos de *P. pastoris*.

Faixa de pH estudada	pH com maior produção	Referência
4,0 e 6,0	6,0	(Thiruvengadam <i>et al.</i> , 2011)
3,0 a 7,2	7,2	(Lin <i>et al.</i> , 2007)
3,0 a 7,0	6,8 a 7,0	(Inan <i>et al.</i> , 1999)
3,0 a 8,0	6,0 a 7,0	(Boado, Ji e Pardridge, 2000)
6,0 e 7,0	7,0	(Woo <i>et al.</i> , 2002)
4,0 e 6,0	6,0	(Larentis <i>et al.</i> , 2004)
5,0 a 8,0	5,0-8,0	(Cai <i>et al.</i> , 2009)
6,0 a 8,0	7,6	(Holmes <i>et al.</i> , 2009)
4,2 a 6,0	6,0	(Wan <i>et al.</i> , 2008)
5,5 a 6,5	6,0	(Aizemberg <i>et al.</i> , 2011)
4,0 a 6,0	4,5	(Soyaslan e Calik, 2011)
2,0 a 10,0	5,0 a 7,0	(Maeng <i>et al.</i> , 2012)
5,0 a 8,0	6,5 a 7,0	(Hu <i>et al.</i> , 2006)
3,0 a 8,0	6,5 a 8,0	(Shi <i>et al.</i> , 2003)
6,0 a 8,0	7,1	(Jafari, Sundström e Holm, 2011)
4,2 a 6,0	5,0	(Calik <i>et al.</i> , 2010)
3,0 a 6,0	3,0	(Damasceno <i>et al.</i> , 2004)

De acordo com a **Tabela 11**, os valores de pH para meio de cultivo estudados variaram desde 2,0 até 10,0 e que a faixa de pH que favorece o rendimento das proteínas heterólogas está entre 6,0 e 7,0. Entretanto alguns trabalhos corroboram com nosso, apresentando melhor produção em pH mais alcalino, próximo a 8,0 (Shi *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2009; Holmes *et al.*, 2009).

Nas condições mais ácidas de pH 3,0-4,0, pode ocorrer inativação de enzimas importantes para as rotas de transcrição, processamentos pós-traducionais, clivagem do peptídeo sinal e excreção do scFv pela *P. pastoris*.

O pH do meio de cultivo desempenha um papel importante na produção de proteínas recombinantes em leveduras geneticamente modificadas. A eficiência de expressão e secreção destas proteínas estão altamente relacionadas ao pH do meio (Soyaslan e Calik, 2011).

Na **Figura 14**, também se observa que em pH mais ácidos (3,0 e 4,0), há uma menor glicosilação do scFv, ou seja a banda inferior não glicosilada (~27 kDa) está mais intensa que a banda superior glicosilada (~31 kDa),

enquanto que nos outros valores de pH a banda superior é mais pronunciada. Isto pode ter ocorrido porque em pH mais ácido as enzimas responsáveis pelas vias de glicosilação (glicosilases e glicotransfereases) podem estar inativas.

Cai *et al.* (2009) estudaram a influência do pH entre 5,0 e 8,0 sobre o crescimento celular e expressão do scFv anti-CTLA4. Os níveis mais elevados de biomassa após indução foram observados a pH 6,0 e 7,0, enquanto que não houve diferença significativa sobre expressão de scFv.

Wan *et al.* (2008) também avaliaram a variação do pH entre 5,0 e 8,0 e verificaram maior crescimento de *P. pastoris* em pH 7,0 e maior produção de scFv (derivado do daclizumab) em pH 6,0 e 6,5.

Maeng *et al.* (2011) estudaram a influência do pH entre 2,0 e 10,0, sobre o crescimento celular de *P. pastoris*, concentração e atividade de scFv anti-BNP. Semelhante aos nossos resultados verificaram que o pH não afetou consideravelmente o crescimento celular, no entanto em relação a expressão do scFv, obtiveram melhores rendimentos utilizando pH entre 5,0 e 7,0.

Shi *et al.* (2003) avaliaram a atividade de proteases presentes no sobrenadante do cultivo de *P. pastoris*, foram identificadas enzimas proteolíticas do tipo asparato (pH 3,5-4,5), cisteíno (5,5-7,0) e serino-proteases (pH 10,0). Corroborando com nosso trabalho, obtiveram maior crescimento em pH 6,0 e 7,0, menor nível de expressão do scFv anti-serpim em pH 3,0 e 5,0, e maior produção em pH 7,5-8,0.

Observa-se que não há uma condição de pH ótimo para a expressão de diferentes proteínas recombinantes, uma vez que há grande variação do melhor pH para fase de crescimento e durante a indução. Desta forma, a escolha do pH do meio deve ser avaliada individualmente levando em consideração a cepa utilizada e a estabilidade da proteína produzida.

Para os estudos subsequentes em biorreator escolheu-se trabalhar com o pH inicial 8,0 utilizando o meio BMMY-CA (com casaminoácidos), esta condição foi comparada com o meio padrão BMMY com pH inicial 6,0.

4.4 Cultivos em biorreator de 1 L

Foram testadas duas condições em biorreator: (1) controle: meio padrão BMMY (pH inicial 6,0) e (2) meio modificado BMMY-CA (sem YNB e biotina, suplementado com 1% (m/v) de casaminoácidos, pH inicial 8,0), este meio foi definido de acordo com melhores resultados apresentados nos **Itens 4.2 e 4.3**.

Nos cultivos em biorreator foram acompanhados o crescimento da biomassa, a variação do pH e a produção de scFv. Nestes experimentos, o pré-inóculo foi cultivado em frasco agitado a 250 rpm e 30 °C. Após atingir a quantidade de células necessária (1 g.L^{-1}), o meio foi centrifugado, as células foram ressuspensas no meio de indução e inoculadas no biorreator, com dorna de 3 L e volume de trabalho de 1 L, programado para operar na temperatura de 20 °C, agitação mecânica de 500 rpm e aeração de 1 vvm, esta relação entre agitação e aeração proporcionou uma transferência volumétrica de oxigênio (k_{La}) de 99 h^{-1} . Os cultivos duraram 72 horas com adição de 1% (v/v) de metanol a cada 24 horas.

Nas **Figuras 15 e 16**, estão representadas respectivamente as curvas de variação do pH e da biomassa ao longo do cultivo.

Figura 15. Curva de variação do pH dos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0). Cultivos realizados em biorreator com volume de trabalho de 1 L, a 20 °C, durante 72 horas. Cada ponto representa a média de três cultivos independentes $\pm$ desvio padrão.

Figura 16. Curva de crescimento celular dos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0). Cultivos realizados em biorreator com volume de trabalho de 1 L, temperatura de 20 °C, durante 72 horas. Cada ponto representa a média de três cultivos independentes $\pm$ desvio padrão. *Diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste *T-student*.

Em ambas as condições houve pequena variação do pH (**Figura 15**). O cultivo BMMY (pH 6,0) encerrou com pH de 5,3 e o cultivo BMMY (pH 8,0) encerrou com pH 8,5. Esta manutenção do pH ao longo do cultivo deve-se principalmente a presença do tampão fosfato de potássio no meio. Há estudos que mostram que a presença de casaminoácidos também auxilia o tamponamento do meio (Cha, Dalal e Bentley, 2005; Toonkool *et al.*, 2006).

Em relação à biomassa, o crescimento acumulado em 72 horas de cultivo foi de 9,3 g.L⁻¹ para o meio BMMY (pH 6,0) e de 11,1 g.L⁻¹ para o meio BMMY-CA (pH 8,0) (**Figura 16**). Este maior crescimento no meio BMMY-CA (pH 8,0) deve-se presença dos casaminoácidos, já que no estudo do pH verificou-se que o crescimento em pH 6,0 é superior ao pH 8,0 (**Figura 13 e Tabela 10**). Desta forma, os casaminoácidos podem ter sido utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para a formação de biomassa, por isso o crescimento em meio BMMY-CA (pH 8,0) foi superior ao meio BMMY (pH 6,0).

Na **Figura 17**, estão representadas as curvas de produção do scFv e os géis de eletroforese do scFv purificado.

Figura 17. Produção de scFv nos cultivos BMMY (pH 6,0) e BMMY-CA (pH 8,0). Cultivos realizados em biorreator com volume de trabalho de 1 L, temperatura de 20 °C, durante 72 horas. (A) Curva de produção, cada ponto da curva representa a média de três cultivos independentes $\pm$ desvio padrão. (B) Eletroforese (SDS-PAGE) de amostras purificadas ao longo do cultivo no meio BMMY-CA (pH 8,0). (C) Eletroforese (SDS-PAGE) de amostras purificadas ao longo do cultivo no meio BMMY (pH 6,0). Coloração com nitrato de prata. Imagens representativas de três experimentos independentes. *Diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste *T-student*.

Observa-se maior produção no meio BMMY-CA (pH 8,0) acumulando 32,3mg.L⁻¹ em 72 horas, comparado com 9,3 mg.L⁻¹ no meio BMMY (pH 6,0). No cultivo BMMY-CA (pH 8,0) o scFv foi quantificado já com 24 horas de indução (**Figura 17A e B**). Entretanto no cultivo BMMY (pH 6,0) o scFv foi detectado no gel de eletroforese em 24 horas, porém só pode ser quantificado após 48 horas de indução (**Figura 17A e C**). Esta diferença na quantificação do scFv purificado e a visualização no gel de eletroforese deve-se ao fato de que o imidazol utilizado no tampão de eluição da cromatografia também absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para leitura do método de dosagem de proteína totais por BCA. A absorbância do imidazol deve ser descontada da absorbância da amostra, este desconto diminui o limite de detecção do método e desta forma o scFv produzido pode ter sido sub-quantificado.

Holmes *et al.* (2009) estudaram as variáveis de temperatura (19-29 °C), concentração de oxigênio dissolvido (30-90%) e pH (6,0-8,0) na expressão de rGFP em *P. pastoris* em biorreator. Observaram que o pH teve influência sobre

o crescimento celular, com maior biomassa em pH 6,0 e menor em pH 8,0, entretanto a maior produção de rGFP foi obtida em pH 7,0 e 8,0. Obtiveram um modelo otimizado no qual as melhores condições de cultivo foram: temperatura de indução 21,5 °C, 90% DO e pH 7,6.

Estes valores corroboram com os nossos resultados em biorreator, já que trabalhamos com pH 8,0, temperatura de indução de 20 °C e k_{La} 99 h⁻¹. Este valor de k_{La} foi considerado apropriado uma vez que todos os cultivos foram analisados por cromatografia gasosa e não foi detectada a presença de etanol (dados não mostrados). Isto indica que o suprimento de oxigênio foi adequado e não houve desvio do metabolismo para rota fermentativa.

Os efeitos do pH (5,0 a 8,0) e da presença de 20 g.L⁻¹ casaminoácidos também foram investigados sobre o crescimento de *P. pastoris* e expressão do scFv anti-ErbB2. Verificou-se que a acumulação do scFv está correlacionada com o crescimento celular e alcançou níveis mais altos em pH 6,5 e 7,0. Entretanto a pH 8,0 houve redução de 30% na biomassa e 40% na scFv. Já a adição de casaminoácidos aumentou a produção em 50% (Hu *et al.*, 2006).

Algumas proteínas são sensíveis a variação do pH, por exemplo a imunotoxina (A-dmDT390-bisFv) a baixos valores de pH muda sua conformação e que somente em pH acima de 6,0 mantinha o enovelamento correto. Desta forma Woo *et al.* (2002) verificavam que o nível de expressão desta imunotoxina foi duas vezes maior com o aumento do pH de 6,0 para 7,0 assim como com a adição de 10 g.L⁻¹ de casaminoácidos.

4.5 Influência da concentração de glicerol

Antes de iniciar o cultivo em biorreator com 10 L de volume de trabalho, foram realizados cultivos em frascos agitados para avaliar a influência da concentração de glicerol, sob a acumulação de biomassa, em uma fase de crescimento anterior à indução. Para isto células (1 g.L⁻¹) provenientes do pré-inóculo foram inoculadas em meio BMGY com casaminoácidos (pH 8,0), acrescido de 1, 2 ou 3% (v/v) de glicerol. Após 24 horas de crescimento a 30 °C o meio foi centrifugado e a biomassa quantificada (**Figura 18**).

Figura 18. Crescimento de *P. pastoris* em BMGY-CA (pH 8,0) com glicerol. Cultivos realizados em agitador orbital, em meio BMGY-CA com diferentes concentrações de glicerol: 1, 2 e 3 % (v/v), temperatura de 30 °C, durante 24 horas. Os cultivos foram realizados em triplicata. As letras diferentes indicam que existe significância estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA “one way”, seguida pelo teste de Tukey.

As células cultivadas em 2 e 3% (v/v) de glicerol por 24 horas apresentaram maior concentração de biomassa, $\sim 18 \text{ g.L}^{-1}$, em relação ao crescimento em 1% de glicerol, $\sim 10 \text{ g.L}^{-1}$. Observa-se que não há diferença estatística entre o cultivo com 2 ou 3% de glicerol, isto indica que dentro das 24 horas de cultivo a levedura não consumiu mais que os 2% de glicerol. Provavelmente se a fase crescimento fosse estendida por mais tempo o crescimento em 3% de glicerol seria maior.

Existe discordância em relação à concentração celular ideal da para a expressão em *P. Pastoris*. Alguns autores acreditam que em cultivos com alta densidade celular há um maior nível de expressão (Eldin *et al.*, 1997). Entretanto sabe-se que densidades celulares elevadas aumentam a concentração de proteases extracelulares e podem ter efeitos prejudiciais sobre a fisiologia da célula, que por sua vez limita a quantidade do produto desejado (Shi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008).

Shi *et al.* (2003) estudaram a influência da concentração de células (DO_{600} de 10 a 100) durante a fase de indução. Observou-se que densidade acima de 40 g.L^{-1} de fato proporcionaram maior crescimento e acumulação de biomassa, entretanto houve redução da viabilidade celular e não houve

incremento da produção do scFv anti-serpin, indicando que altas concentrações celulares desviam o metabolismo para o crescimento celular e não para a produção.

Desta forma, para o cultivo subsequente em biorreator de 10 L, utilizou-se o meio BMGY-CA (pH 8,0) com adição de 2% (v/v) de glicerol, que proporcionou um acúmulo de biomassa de cerca de 20 g.L⁻¹, concentração celular considerável para iniciar a fase de indução.

4.6 Cultivos em biorreator de 10 L

Finalmente foi realizado um ensaio em biorreator de 14 L com 10 L de volume de trabalho, neste cultivo foram utilizadas as melhores condições obtidas ao longo do trabalho, as quais foram: pré-inóculo em frasco agitado com meio BMGY, pH 8,0, inóculo em biorreator na concentração inicial de células de 1g.L⁻¹ em 10 L de meio modificado BMGY-CA, pH 8,0. As células foram crescidas a 30 °C, até o final da fase logarítmica, neste ponto o cultivo estava com uma concentração de biomassa de 19 g.L⁻¹. Após esta fase inicial de crescimento, a temperatura foi reduzida para 20 °C e adicionou-se 1% (v/v) de metanol, o qual foi repostado diariamente até 72 horas de indução. Durante todo o cultivo foram mantidas as condições de 500 rpm e 1 vvm.

O modelo de trabalho para o cultivo em biorreator com dorna de 14 L e volume de trabalho de 10 L seguiu o fluxo normalmente aplicado para o cultivo de *P. Pastoris* que é constituído por um processo em duas fases: (1) cultivo descontínuo (batch) para crescimento da levedura, nesta fase no meio contem uma fonte de carbono repressora ao promotor AOX1; (2) descontínuo alimentado (*feed-batch*), após a fase de crescimento, quando todo o glicerol foi consumido, inicia-se a indução da expressão da proteína heteróloga, com adição de metanol (Goncalves *et al.*, 2013). No presente trabalho utilizou-se o glicerol como fonte de carbono durante a fase de crescimento, e o metanol foi adicionado na concentração de 1% (v/v) a cada 24 horas de cultivo.

Na **Figura 19** estão representadas as curvas de consumo do glicerol, crescimento da biomassa e produção do scFv.

Figura 19. Cultivo de *P. pastoris* em biorreator de 10 L. S - Curvas de consumo de substrato (glicerol), crescimento celular (biomassa) e produção (scFv). Cultivo realizado em biorreator com volume de trabalho de 10 L, meio BMGY-CA (pH 8,0) com 25 g.L⁻¹ de glicerol, temperatura de 30 °C na fase de crescimento e 20 °C na fase de indução. Tempo total de cultivo de 108 horas.

Observou-se o crescimento celular até 24 horas de cultivo, tempo em que foi consumido todo o glicerol. A fase de indução iniciou com 36 horas de cultivo com adição de 1% (v/v) de metanol e durou até 108 horas de cultivo (72 horas de indução), com adição de metanol a cada 24 horas.

A biomassa atingiu um pico de cerca de 20 g.L⁻¹ e então se iniciou a fase estacionária. A produção de scFv já foi detectada desde 6 horas de indução (t_{42h}) e atingiu um pico em 75 horas de cultivo (32,8 mg.L⁻¹). Após este ponto a concentração decaiu, encerrando o cultivo com 22,6 mg.L⁻¹.

As curvas dos parâmetros cinéticos estão representadas na **Figura 20**.

Figura 20. Curvas utilizadas para os cálculos dos parâmetros cinéticos. (A) Curva de crescimento (Ln) versus tempo; (B) Linearização da fase exponencial (Ln); (C) Velocidade instantânea de crescimento; (D). Velocidade específica de crescimento; (E) Velocidade instantânea de crescimento; (F). Velocidade específica de consumo.

Neste cultivo, as células apresentaram uma fase de adaptação (lag) até cerca de 8 horas, depois fase de crescimento exponencial (log) até cerca de 24 horas depois entraram na fase estacionária (**Figura 20A**). Calculando os parâmetros cinéticos de consumo de substrato e crescimento (**Figura 20C, D, E e F**) tem-se que neste cultivo a velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\max}$) foi em torno de $0,25 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 2,7 horas. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) durante a fase de crescimento foi de $0,72 \text{ g.g}^{-1}$, isto indica que 72% glicerol foi convertido em células.

Comparando os cultivos realizados em biorreatores de 1 e 10 L tem-se a diferença que nos cultivos de 1 L o inóculo foi de 1 g.L^{-1} . Com início imediato da fase de indução, a biomassa cresceu ao longo do cultivo que se encerrou com $11,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e 32 mg.L^{-1} de scFv. Já no cultivo em 10 L, o inóculo também foi de 1 g.L^{-1} , porém no meio havia 25 g.L^{-1} de glicerol, desta forma as células entraram na fase de crescimento. Após o consumo total do glicerol ($t_{36\text{h}}$) iniciou-se a fase de indução, porém as células já estavam na fase estacionária e não houve mais crescimento, apenas expressão do scFv (**Figura 20A**).

Na **Figura 21**, está representado o scFv purificado ao longo de cultivo, assim como sua produtividade volumétrica em biorreator de 10 L.

Figura 21. Produtividade do scFv em biorreator de 10 L. (A) Eletroforese (SDS-PAGE) de amostras retiradas ao longo do cultivo. Coloração com nitrato de prata. A linha preta contínua indica o local esperado para o scFv (entre 27 e 31 kDa). A linha preta pontilhada indica possíveis produtos de degradação. (B) Curva da produtividade volumétrica do scFv.

Após 6 horas de indução ($t_{42\text{h}}$) foi possível detectar em gel (**Figura 21A**) e quantificar (**Figura 19**) a produção do scFv. O cultivo apresentou maior produtividade em torno de 36 horas de indução ($t_{75\text{h}}$) com $0,44 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Figura 21B**). Após este período houve redução no rendimento, provavelmente devido à degradação, agregação ou até mesmo ao consumo da proteína produzida. A partir das 75 horas de cultivo já se observa a formação de bandas de degradação (**Figura 21A**). Normalmente, a expressão e a atividade de scFv

é o mais alto em até 72 horas após a primeira indução, em alguns casos este pico de produção pode ser estendido em 96 horas. A diminuição da concentração de scFv é provavelmente devido à presença de proteases no meio (Goncalves *et al.*, 2013).

Na **Tabela 12**, é apresentada resumidamente uma comparação entre os principais cultivos realizados em agitador orbital e biorreatores.

Tabela 12. Comparação entre os cultivos realizados.

Tipo de cultivo	Meio (pH)	Rendimento (mg.L ⁻¹)	Volume de produção (L)	scFv obtido (mg)
Agitador orbital	BMMY (6,0)	10,3*	0,05	0,5
Biorreator	BMMY (6,0)	9,3*	1,00	9,3
Biorreator	BMMY-CA (8,0)	32,3*	1,00	32,3
Biorreator	BMMY-CA (8,0)	32,8 [#]	10,00	328,0

*Média de experimentos em triplicata, rendimento em 72 horas de indução. [#]Rendimento após 75 horas de cultivo (39 horas de indução).

Observa-se que, a partir do conjunto de experimentos realizados, foi possível aumentar a concentração de scFv no sobrenadante de 10,3 para 32,8 mg.L⁻¹. Com o aumento do volume de produção de 1 para 10 L pode-se obter a cada cultivo até 328 mg do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-).

5. CONCLUSÃO

De acordo com resultados obtidos, dentro das condições experimentais, conclui-se que o pH e a composição do meio de cultivo influenciam a expressão do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) em *P. pastoris*. O meio de cultivo BMMY, sem YNB e biotina, acrescido de casaminoácidos, com pH inicial 8,0 favorece a produção do scFv anti-LDL(-) em comparação ao meio BMMY padrão com pH inicial 6,0. A partir deste meio, BMMY-CA (pH 8,0), foi possível aumentar o rendimento, assim como ampliar a escala de produção do scFv anti-LDL(-) em biorreator.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Z. et al. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical & Developmental Immunology**, 2012.

ALLAHVERDIAN, S.; PANNU, P. S.; FRANCIS, G. A. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. **Cardiovasc Res**, v. 95, n. 2, p. 165-72, Jul 2012.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v. 134, n. 1, p. 33-46, JAN 2010.

ARAUJO, J. D. A. **Produção de quimosina B de Bos taurus em Pichia pastoris**. 2008. (Mestrado). Universidade de Brasília

ASSAD, S.; FRANCIS, A. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. **Vaccine**, v. 18, n. 1-2, p. 57-67, AUG 20 1999.

AVOGARO, P.; BON, G. B.; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 1, p. 79-87, 1988 Jan-Feb 1988.

AYED, A. et al. High level production and purification of human interferon alpha-2b in high cell density culture of Pichia pastoris. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 2, p. 173-180, JAN 2008.

BAUMANN, K. et al. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant S. cerevisiae and P. pastoris - a comparative analysis. **Bmc Genomics**, v. 12, MAY 9 2011.

BEN TANFOUS, N. et al. Expression in Pichia pastoris of a recombinant scFv form of MAbs 107, an anti human CD11b integrin antibody. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 636-642, MAR 2 2006.

BENÍTEZ, S. et al. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 9, p. 1014-21, Sep 2006.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 257-274, APR 2013.

BLAZEK, D.; CELER, V. The production and application of single-chain antibody fragments. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 5, p. 687-698, 2003.

BOADO, R.; JI, A.; PARDRIDGE, W. Cloning and expression in pichia pastoris of a genetically engineered single chain antibody against the rat transferrin receptor. **Journal of Drug Targeting**, v. 8, n. 6, p. 403-412, 2000.

BOZE, H. et al. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by Pichia pastoris. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 907-913, MAR 2001.

BRANKAMP, R. et al. Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 6, n. 6, p. 813-820, DEC 1995.

BUCKHOLZ, R.; GLEESON, M. YEAST SYSTEMS FOR THE COMMERCIAL PRODUCTION OF HETEROLOGOUS PROTEINS. **Bio-Technology**, v. 9, n. 11, p. 1067-1072, NOV 1991.

BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 885-894, NOV 2012.

CAI, H. et al. High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, n. 1, p. 41-8, Feb 2009.

CAI, J.; LI, F.; WANG, S. Expression of secreted human single-chain fragment variable antibody against human amyloid beta peptide in *Pichia pastoris*. **Neural Regeneration Research**, v. 3, n. 8, p. 910-913, AUG 2008.

CALDAS, C. et al. Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. **Protein Engineering**, v. 13, n. 5, p. 353-360, MAY 2000.

CALIK, P. et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1628-1635, DEC 2010.

CEREGHINO, G. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329-332, AUG 2002.

CEREGHINO, G.; CREGG, J. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 422-427, OCT 1999.

CEREGHINO, J.; CREGG, J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, JAN 2000.

CHA, H.; DALAL, N.; BENTLEY, W. Secretion of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in recombinant *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, n. 1, p. 1-11, JUL 2005.

CHANG, H.; CHOI, S.; CHUN, H. Expression of functional single-chain variable domain fragment antibody (scFv) against mycotoxin zearalenone in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 10, p. 1801-1806, OCT 2008.

CHAUHAN, A.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 139-145, FEB 1999.

CHIRUVOLU, V. et al. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 163-173, NOV-DEC 1998.

CHOI, D.; PARK, E. Enhanced production of mouse alpha-amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 390-397, FEB 2006.

CLARE, J. et al. PRODUCTION OF MOUSE EPIDERMAL GROWTH-FACTOR IN YEAST - HIGH-LEVEL SECRETION USING PICHIA-PASTORIS STRAINS CONTAINING MULTIPLE GENE COPIES. **Gene**, v. 105, n. 2, p. 205-212, SEP 15 1991.

CREGG, J. et al. PICHIA-PASTORIS AS A HOST SYSTEM FOR TRANSFORMATIONS. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376-3385, 1985.

_____. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, SEP 2000.

CREGG, J.; HIGGINS, D. PRODUCTION OF FOREIGN PROTEINS IN THE YEAST PICHIA-PASTORIS. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, v. 73, p. S891-S897, 1995.

CREGG, J. et al. EXPRESSION IN THE YEAST PICHIA PASTORIS. **Guide To Protein Purification, Second Edition**, v. 463, p. 169-189, 2009.

CREGG, J.; VEDVICK, T.; RASCHKE, W. RECENT ADVANCES IN THE EXPRESSION OF FOREIGN GENES IN PICHIA-PASTORIS. **Bio-Technology**, v. 11, n. 8, p. 905-910, AUG 1993.

CUNHA, A. et al. Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 4, p. 458-467, MAY 20 2004.

DALY, R.; HEARN, M. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, MAR-APR 2005.

DALY, S. et al. Production and analytical applications of scFv antibody fragments. **Analytical Letters**, v. 34, n. 11, p. 1799-1827, 2001.

DAMASCENO, L. et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 381-389, FEB 2007.

DAMASCENO, L. M. et al. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 37, n. 1, p. 18-26, Sep 2004.

DAMASCENO, N. R. et al. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clin Biochem**, v. 39, n. 1, p. 28-38, Jan 2006.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, n. 1-2, p. 233-236, FEB 1 2007.

DEERE, D. et al. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 147-160, JAN 30 1998.

ELDIN, P. et al. High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. **Journal of Immunological Methods**, v. 201, n. 1, p. 67-75, FEB 14 1997.

EMBERSON, L. et al. Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. **Journal of Immunological Methods**, v. 305, n. 2, p. 135-151, OCT 30 2005.

ESTRUCH, M. et al. Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 181324, 2013.

ETTAYEBI, K.; HARDY, M. Recombinant norovirus-specific scFv inhibit virus-like particle binding to cellular ligands. **Virology Journal**, v. 5, JAN 31 2008.

FABER, K. et al. REVIEW - METHYLOTROPHIC YEASTS AS FACTORIES FOR THE PRODUCTION OF FOREIGN PROTEINS. **Yeast**, v. 11, n. 14, p. 1331-1344, NOV 1995.

FAULIN, T.; CAVALCANTE, M.; ABDALLA, D. Role of electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 5, p. 719-729, OCT 2010.

FAULIN, T. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1769-1775, DEC 2008.

FERREIRA, A. et al. Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 9, p. 1603-1614, NOV 2012.

FREYRE, F. et al. Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 157-163, JAN 21 2000.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741-750, DEC 2000.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C. Application of yeasts in gene expression studies: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 87-97, APR 29 1997.

GLEISSNER, C.; LEITINGER, N.; LEY, K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. **Hypertension**, v. 50, n. 2, p. 276-283, AUG 2007.

GOEL, A. et al. Divalent forms of CC49 single-chain antibody constructs in *Pichia pastoris*: Expression, purification, and characterization. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 5, p. 829-836, MAY 2000.

GONCALVES, A. et al. *Pichia pastoris*: A Recombinant Microfactory for Antibodies and Human Membrane Proteins. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 587-601, MAY 2013.

GROSSO, D. M. et al. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 12, p. 1086-92, Dec 2008.

GURKAN, C.; SYMEONIDES, S.; ELLAR, D. High-level production in *Pichia pastoris* of an anti-p185(HER-2) single-chain antibody fragment using an alternative secretion expression vector. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p. 115-122, FEB 2004.

HANSEN, J. et al. Antibody-mediated Hsp70 protein therapy. **Brain Research**, v. 1088, p. 187-196, MAY 9 2006.

HARA, K. et al. Development of a glutathione production process from proteinaceous biomass resources using protease-displaying *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1495-1502, FEB 2012.

HELLWIG, S. et al. Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 4, p. 344-352, AUG 20 2001.

HERMANRUD, C. et al. Expression and purification of soluble murine CD40L monomers and polymers in yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 76, n. 1, p. 115-120, MAR 2011.

HEVONOJA, T. et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 189-210, NOV 15 2000.

HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 4, p. 1929-33, Apr 1978.

HOHENBLUM, H.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. **J Biotechnol**, v. 102, n. 3, p. 281-90, May 2003.

HOLLENBERG, C.; GELLISSEN, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 554-560, OCT 1997.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 9, p. 1126-36, Sep 2005.

HOLMES, W. J. et al. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 35, 2009.

HU, S. et al. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 47, n. 1, p. 249-57, May 2006.

HWANG, W.; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**, v. 36, n. 1, p. 3-10, MAY 2005.

HYKA, P. et al. Combined Use of Fluorescent Dyes and Flow Cytometry To Quantify the Physiological State of *Pichia pastoris* during the Production of Heterologous Proteins in High-Cell-Density Fed-Batch Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4486-4496, JUL 2010.

IKEDA, K. et al. Modification of yeast characteristics by soy peptides: cultivation with soy peptides represses the formation of lipid bodies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1971-1977, MAR 2011.

INAN, M. et al. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 7, p. 438-445, MAY 15 1999.

ITO, K. et al. Soy Peptides Enhance Heterologous Membrane Protein Productivity during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 628-631, MAR 2012 2012.

IZAWA, S. et al. Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 3, p. 533-537, JUN 2007.

JAFARI, R. et al. Construction of divalent anti-keratin 8 single-chain antibodies (sc(Fv)(2)), expression in *Pichia pastoris* and their reactivity with multicellular tumor spheroids. **Journal of Immunological Methods**, v. 364, n. 1-2, p. 65-76, FEB 1 2011.

JAFARI, R.; SUNDSTRÖM, B. E.; HOLM, P. Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. **Microb Cell Fact**, v. 10, p. 34, 2011.

JIANG, Y. et al. A high-throughput purification of monoclonal antibodies from glycoengineered *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 74, n. 1, p. 9-15, Nov 2010.

_____. Purification process development of a recombinant monoclonal antibody expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 76, n. 1, p. 7-14, Mar 2011.

KAWAGUCHI, R. Low-density lipoprotein cholesterol lowering therapy and established atherosclerosis. **Circ J**, v. 76, n. 1, p. 49-50, 2012.

KAZUMA, S. M. et al. Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. **MAbs**, v. 5, n. 5, p. 763-75, 2013 Sep-Oct 2013.

KHATRI, N. et al. Single-chain antibody fragment production in *Pichia pastoris*: Benefits of prolonged pre-induction glycerol feeding. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 4, p. 452-462, APR 2011.

KHATRI, N.; HOFFMANN, F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 871-879, APR 5 2006a.

_____. Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 492-498, SEP 2006b.

KIM, S. et al. Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. **J Biotechnol**, v. 166, n. 4, p. 174-81, Jul 2013.

KIPRIYANOV, S. Recombinant antibodies in infectious disease. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, n. 2, p. 135-140, FEB 2004.

KITAGAWA, S. et al. Effect of soy peptide on brewing beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 360-366, APR 2008.

KOGELBERG, H. et al. Engineering a single-chain Fv antibody to alpha v beta 6 integrin using the specificity-determining loop of a foot-and-mouth disease virus. **J Mol Biol**, v. 382, n. 2, p. 385-401, Oct 2008.

KOTI, M. et al. Construction of single-chain Fv with two possible CDR3H conformations but similar inter-molecular forces that neutralize bovine herpesvirus 1. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 5, p. 953-960, FEB 2010.

KOTI, M.; NAGY, E.; KAUSHIK, A. A single point mutation in framework region 3 of heavy chain affects viral neutralization dynamics of single-chain Fv against bovine herpes virus type 1. **Vaccine**, v. 29, n. 45, p. 7905-7912, OCT 19 2011.

KRIANGKUM, J. et al. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 2, p. 31-40, SEP 2001.

LI, A. et al. Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n. 2, p. 197-206, OCT 2003.

LI, A. D. et al. Construction and expression of a single chain antibody mimicking human ovarian cancer antigen CA125. **Cell Mol Immunol**, v. 3, n. 1, p. 59-62, Feb 2006.

LI, H. et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 2, p. 210-5, Feb 2006.

LI, P. et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105-124, AUG 2007.

LI, T. et al. Construction, production, and characterization of recombinant scFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 867-874, JUN 2008.

LIBBY, P.; RIDKER, P.; HANSSON, G. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317-325, MAY 19 2011.

LIU, J. et al. pPIC9-Fc: A vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris* as detection reagents in vitro. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 6, p. 911-917, DEC 2003.

LIU, L. et al. Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials. **Biologicals**, v. 39, n. 4, p. 205-10, Jul 2011.

LOPES-VIRELLA, M.; VIRELLA, G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. **Clinical Immunology**, v. 134, n. 1, p. 55-65, JAN 2010.

LUI, D. et al. V1-LINKER-VH ORIENTATION-DEPENDENT EXPRESSION OF SINGLE-CHAIN FV CONTAINING AN ENGINEERED DISULFIDE-STABILIZED BOND IN THE FRAMEWORK REGIONS. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 4, p. 825-831, OCT 1995.

LUO, D. et al. An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity. **Journal of Biochemistry**, v. 121, n. 5, p. 831-834, MAY 1997.

_____. Expression of a fusion protein of scFv-biotin mimetic peptide for immunoassay. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 225-228, OCT 27 1998.

_____. High level secretion of single-chain antibody in Pichia expression system. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 10, p. 759-761, OCT 1997.

MA, J.; LI, Z.; LUO, D. Single chain antibody vaccination in mice against human ovarian cancer enhanced by microspheres and cytokines. **J Drug Target**, v. 11, n. 3, p. 169-76, Apr 2003.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, MAR 2005.

MAENG, B. et al. 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**, v. 28, n. 3, p. 1027-1034, MAR 2012.

MAH, D. et al. Recombinant anti-botulinum neurotoxin A single-chain variable fragment antibody generated using a phage display system. **Hybridoma and Hybridomics**, v. 22, n. 5, p. 277-283, OCT 2003.

MALPIEDI, L. et al. Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1242-1251, AUG 2013.

MILLER, K. et al. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, and Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 2, p. 255-267, AUG 2005.

MULLER, S. et al. Comparison of expression systems in the yeasts Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha, Klyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe and Yarrowia lipolytica. Cloning of two novel promoters from Yarrowia lipolytica. **Yeast**, v. 14, n. 14, p. 1267-1283, OCT 1998.

MURASE, K.; MIZUTANI, R.; SATOW, Y. Expression, characterization and crystallization of the Fv fragment of mouse antibody 3B62 from the secondary immune response. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 57, p. 1703-1705, NOV 2001.

NICOLETTI, A. et al. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. **J Clin Invest**, v. 102, n. 5, p. 910-8, Sep 1998.

OGUNJIMI, A. et al. High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast Pichia pastoris. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 6, p. 561-567, JUN 1999.

OKABAYASHI, K. et al. Secretory production of recombinant urokinase-type plasminogen activator-annexin V chimeras in *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 177, n. 1-2, p. 69-76, OCT 24 1996.

PASMAN, Y.; NAGY, E.; KAUSHIK, A. Enhanced Bovine Herpesvirus Type 1 Neutralization by Multimerized Single-Chain Variable Antibody Fragments Regardless of Differential Glycosylation. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 8, p. 1150-1157, AUG 2012.

PENNELL, C.; ELDIN, P. In vitro production of recombinant antibody fragments in *Pichia pastoris*. **Research in Immunology**, v. 149, n. 6, p. 599-603, JUL-AUG 1998.

PETRAUSCH, U. et al. A33scFv-green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 20, n. 12, p. 583-590, DEC 2007.

POTGIETER, T. I. et al. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. **J Biotechnol**, v. 139, n. 4, p. 318-25, Feb 2009.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, MAY 15 2012.

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Curr Opin Biotechnol**, v. 15, n. 5, p. 469-78, Oct 2004.

PUCCA, M. B. et al. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. v. 47, 2011.

RAHBARIZADEH, F. et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 5, p. 426-435, FEB 2006.

RIDDER, R. et al. GENERATION OF RABBIT MONOCLONAL-ANTIBODY FRAGMENTS FROM A COMBINATORIAL PHAGE DISPLAY LIBRARY AND THEIR PRODUCTION IN THE YEAST *PICHIA-PASTORIS*. **Bio-Technology**, v. 13, n. 3, p. 255-260, MAR 1995.

RIEDSTRA, S. et al. Optimization of the conditions for the expression of an anti-transferrin scFv in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S179-S180, SEP 2007.

ROBIN, S. et al. Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 12, p. 729-738, JAN 2003.

SCHAEFER, J.; PLUCKTHUN, A. Transfer of engineered biophysical properties between different antibody formats and expression systems. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 25, n. 10, p. 485-505, OCT 2012.

SCHULMAN, C.; ELLIS, R.; MAIGETTER, R. PRODUCTION OF HEPATITIS-B SURFACE-ANTIGEN (PRES2+S) BY HIGH-CELL DENSITY CULTIVATIONS OF A RECOMBINANT YEAST. **Journal of Biotechnology**, v. 21, n. 1-2, p. 109-126, NOV 1991.

SCORER, C. et al. THE INTRACELLULAR PRODUCTION AND SECRETION OF HIV-1 ENVELOPE PROTEIN IN THE METHYLOTROPHIC YEAST PICHIA-PASTORIS. **Gene**, v. 136, n. 1-2, p. 111-119, DEC 22 1993.

SHI, X. et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 28, n. 2, p. 321-30, Apr 2003.

SILVA, V.; PERES, M.; GATTAS, E. Application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in the field of food industry - A review. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 7, n. 2, p. 268-273, APR 2009.

SOMMARUGA, S. et al. Highly efficient production of anti-HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 613-621, AUG 2011.

SOYASLAN, E.; CALIK, P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris* in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 59-65, JUN 15 2011.

SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 54-60, JAN 2014.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v. 15, n. 3, p. 329-35, Jun 2004.

THÖMMES, J.; ETZEL, M. Alternatives to chromatographic separations. **Biotechnol Prog**, v. 23, n. 1, p. 42-5, 2007 Jan-Feb 2007.

TIAN, B.; CHEN, Y.; DING, S. A combined approach for improving alkaline acetyl xylan esterase production in *Pichia pastoris*, and effects of glycosylation on enzyme secretion, activity and stability. **Protein Expression and Purification**, v. 85, n. 1, p. 44-50, SEP 2012.

TOONKOOL, P. et al. Expression and purification of dalcocinase, a beta-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 2, p. 195-204, AUG 2006.

TRENTMANN, O.; KHATRI, N.; HOFFMANN, F. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1766-1775, NOV-DEC 2004.

TSUJIKAWA, M. et al. Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an N-glycosylation site in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of the secreted product. **Yeast**, v. 12, n. 6, p. 541-553, MAY 1996.

VOGL, T.; HARTNER, F.; GLIEDER, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1094-1101, DEC 2013.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917-924, SEP 2010.

WAN, L. et al. High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, n. 1, p. 33-41, Nov 2008.

WANG, J. et al. Improved yield of recombinant merozoite surface protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* using chemically defined media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 7, p. 838-847, JUN 30 2005.

WANG, M. et al. Single-chain Fv with manifold N-glycans as bifunctional scaffolds for immunomolecules. **Protein Engineering**, v. 11, n. 12, p. 1277-1283, DEC 1998.

WANG, Y. et al. Production of an anti-prostate-specific antigen single-chain antibody fragment from *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, n. 3, p. 419-425, DEC 2001.

WANG, Z. et al. Development of a Diphtheria Toxin Based Antiporcine CD3 Recombinant Immunotoxin. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2014-2020, OCT 2011.

WERTEN, M. et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, n. 11, p. 1087-1096, AUG 1999.

WHYTESIDE, G. et al. Native-State Stability Determines the Extent of Degradation Relative to Secretion of Protein Variants from *Pichia pastoris*. **Plos One**, v. 6, n. 7, JUL 27 2011.

WOO, J. H. et al. Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 25, n. 2, p. 270-82, Jul 2002.

_____. Increasing secretion of a bivalent anti-T-cell immunotoxin by *Pichia pastoris*. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 6, p. 3370-6, Jun 2004.

WU, J. et al. Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 4, p. 453-459, SEP 10 2003.

YAMAWAKI, S. et al. 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**, v. 104, n. 5, p. 403-407, NOV 2007.

YANG, K. et al. Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. **Protein Engineering**, v. 16, n. 10, p. 761-770, OCT 2003.

YE, J. et al. Optimization of a glycoengineered *Pichia pastoris* cultivation process for commercial antibody production. **Biotechnol Prog**, v. 27, n. 6, p. 1744-50, 2011 Nov-Dec 2011.

YUAN, Z. et al. Immunoglobulin treatment suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via the Fc portion. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. H899-H906, AUG 2003.

ZHANG, J. et al. Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 251-256, FEB 2006.