

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PEDRO HENRIQUE DAIBERT GARCIA

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos

Ribeirão Preto

2021

PEDRO HENRIQUE DAIBERT GARCIA

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção da graduação de bacharel em
Farmácia-Bioquímica

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria de
Sousa Russo

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. A indicação do trabalho para a Biblioteca Digital foi autorizada pela Comissão de Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

APRESENTAÇÃO ORAL E DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome e número USP do estudante:

Pedro Henrique Daibert Garcia, N°. USP: 10291384.

Título do TCC:

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos.

Composição da Banca Examinadora:**Membro Convidado da Comissão de Graduação (Presidente da Mesa):**

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Orientador:

Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo

Membro Convidado do Orientador:

Profa. Dra. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini

Data da apresentação oral e defesa pública do TCC: 01º/10 /2021.

1. Avaliação do Trabalho de Conclusão de Curso: Serão atribuídas notas de 0 (zero) a 10 (dez).

AVALIADOR	TCC VERSÃO DIGITA L(PESO 5)	APRESENTAÇÃO ORAL (PESO 2)	DEFESA DO ESTUDANTE (PESO 3)	NOTA FINA L
Membro Convidado da Comissão de Graduação	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)
Orientador	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)
Membro Convidado do Orientador	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)	10 (dez)

2. Parecer Geral (em caso de reprova o parecer é obrigatório):

PARECER

Mediante a qualidade do conteúdo bibliográfico da monografia, a banca examinadora
recomenda a sua inclusão na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.

6. Resultado Final:

☒ **Aprovado**

☐ **Reprovado**

7. Encaminhe-se a(o) Coordenador(a) do módulo de Atividades Integradas e TCC IV.



Presidente da Banca
Examinadora Profa. Dra. Cleni Mara
Marzocchi Machado

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, especialmente aos membros do grupo dos Absurdos, Alberto, Gabriel e Igor, em cujos laços resisti para manter a sanidade mental e proceder para a conclusão deste trabalho em um período histórico tão adverso.

À Prof. Dra. Elisa, pela atenção, compreensão e confiança durante a orientação.

A todos do Centro de Proteínas Recombinantes e Laboratório de Imunologia e Citologia de Fluidos Biológicos pelo aprendizado durante a iniciação científica, os quais foram de importante contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

À psicóloga Juliana, pelos preciosos anos de acompanhamento e direcionamento para que eu conseguisse enfrentar um desafio como este em minha vida.

Aos professores que estimularam meus estudos e vontade de aprendizado, desde o ensino básico até o ensino superior.

RESUMO

GARCIA, P. H. D. **Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos**. 2021. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A aplicação de proteínas para tratamento de doenças ou outras finalidades na área da saúde é uma necessidade contemporânea, visto a ascensão das doenças crônico-degenerativas na sociedade. Uma das maneiras de obter essas proteínas é a partir do uso da tecnologia do DNA recombinante, ou seja, o gene codificante para uma determinada proteína de um organismo é ligado a um vetor para ser expresso em outro organismo, processo cujo resultado é uma proteína recombinante. Se uma proteína recombinante é usada com finalidade farmacêutica equivalente ao seu análogo endógeno, é possível considerá-la um biofármaco. As propriedades da biomolécula proteica devem ser avaliadas para sua produção recombinante, de tal forma que um sistema de expressão adequado seja selecionado para preservar ao máximo elementos como o enovelamento correto e modificações pós-traducionais, a fim de garantir a qualidade do produto. Cada sistema de expressão possui vantagens e desvantagens para produção de uma proteína recombinante. Esta monografia discute as características dos principais sistemas, com direcionamento para a importância para a produção de biofármacos de uso humano.

Palavras-chave: Proteínas recombinantes. Biofármacos. Sistemas de expressão. Vetor de expressão. Modificações pós-traducionais. Glicosilação.

ABSTRACT

GARCIA, P. H. D. **Recombinant protein expression systems - biopharmaceuticals**. 2021. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The application of proteins for the treatment of diseases or other purposes in the health area is a contemporary need, given the rise of chronic-degenerative diseases in society. One of the ways to obtain these proteins is using the recombinant DNA technology, in other words, the coding gene for a certain protein in an organism is linked to a vector to be expressed in another organism, a process whose result is a recombinant protein. If a recombinant protein is used for pharmaceutical purposes equivalent to its endogenous analogue, it is possible to consider it as a biopharmaceutical. The properties of the protein biomolecule must be evaluated for its recombinant production, in such a way that an adequate expression system is selected to preserve as much as possible elements such as correct folding and post-translational modifications, in order to guarantee the quality of the product. Each expression system has advantages and disadvantages for producing a recombinant protein. This monograph discusses the characteristics of the main systems, focusing on their importance for the production of biopharmaceuticals for human use.

Keywords: Recombinant proteins. Biopharmaceuticals. Expression systems. Expression vector. Post-translational modifications. Glycosylation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	20
2.1 Sistemas de expressão bacterianos.....	20
2.1.1 <i>Escherichia coli como um sistema de expressão</i>	<i>21</i>
2.1.2 <i>Outros sistemas de expressão bacterianos</i>	<i>23</i>
2.1.3 <i>Aperfeiçoamento da expressão e desafios do sistema bacteriano</i>	<i>24</i>
2.1.4 <i>Biofármacos e o sistema de expressão bacteriano</i>	<i>26</i>
2.2 Sistemas de expressão de leveduras	27
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>28</i>
2.2.2 <i>Pichia pastoris ou Komagataella phaffii.....</i>	<i>31</i>
2.3 Sistemas de expressão com células de insetos	33
2.3.1 <i>Biologia dos baculovírus</i>	<i>33</i>
2.3.2 <i>Desenvolvimento de baculovírus recombinantes.....</i>	<i>35</i>
2.3.3 <i>Avanços em engenharia genética em baculovírus e nas células hospedeiras</i>	<i>38</i>
2.3.4 <i>Principais tipos de células de insetos e biofármacos comerciais</i>	<i>40</i>
2.4 Sistemas de expressão de células de mamíferos.....	41
2.4.1 <i>Expressão transiente e estável em células de mamíferos</i>	<i>42</i>
2.4.2 <i>Linhagens celulares e otimização da expressão proteica.....</i>	<i>44</i>
2.5 Organismos transgênicos superiores	46
2.5.1 <i>Animais transgênicos</i>	<i>46</i>
2.5.1.1 <i>Métodos para criação de animais transgênicos.....</i>	<i>47</i>
2.5.1.2 <i>Plataformas de expressão e biofármacos comerciais</i>	<i>49</i>
2.5.2 <i>Plantas transgênicas</i>	<i>51</i>
2.5.2.1 <i>Expressão transiente e expressão estável.....</i>	<i>52</i>
2.5.2.2 <i>Plataformas de expressão e biofármacos comerciais</i>	<i>54</i>
3 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Neste mundo, o destino da humanidade sempre esteve relacionado à natureza que a envolve e aos seres vivos que nela habitam. Por esse motivo, é possível afirmar que a Biotecnologia é imprescindível para a existência humana. De acordo com a UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura), o uso de seres vivos em benefício do avanço da sociedade, seja ele na medicina, indústria ou agricultura é uma das formas de definir Biotecnologia (UNESCO, 1992). Uma vez que, por exemplo, a fermentação para produção de vinho, pães, queijos e outros alimentos é conhecida há milhares de anos, infere-se que os processos biotecnológicos acompanharam o desenvolvimento humano e impactaram sobre sua qualidade de vida.

O impacto atual da Biotecnologia, segundo Organização de Inovação em Biotecnologia (BIO), está inserido no fornecimento de tecnologias para tratamento de doenças, na amenização do consumo de recursos naturais, no combate à fome, no uso de fontes de energia renováveis e na otimização de processos industriais (BIO, 2007). No setor agrícola, no qual o uso de produtos transgênicos ultrapassa o período de duas décadas, a Biotecnologia tem uma estimativa de ter proporcionado um lucro adicional superior a 35,8 bilhões de reais ao agronegócio até 2018 no Brasil e continua em crescimento entre as monoculturas (CIB, 2018), sem considerar o mercado de biopesticidas, o qual também é significativo. Para a indústria alimentícia, a projeção é de que em 2025, o valor de mercado global atinja US\$ 45 bilhões (aproximadamente 225 bilhões de reais na conversão atual), a partir de informações da *Global Market Insights* (GMINSIGHTS, 2019).

Na área da saúde, por fim, uma das aplicações biotecnológicas mais importantes é a de produção de biofármacos, ou seja, moléculas complexas de origem biotecnológica (a maioria de natureza proteica), produzidas fora do organismo humano, mas com finalidade farmacêutica comum ao seu equivalente endógeno (IPEA, 2018). Por exemplo, uma insulina recombinante obtida de uma levedura, ao ser administrada em um ser humano, cumprirá o mesmo papel do hormônio naturalmente sintetizado no pâncreas.

Os biofármacos, ou medicamentos biológicos, geraram uma movimentação financeira de aproximadamente R\$ 1,3 trilhões somente em 2019 (BIOSIMILAR DEVELOPMENT, 2019). No Brasil, representaram 41% do orçamento do Ministério da Saúde para compra total de medicamentos em 2016, enquanto numericamente, o total represente apenas 2% das aquisições, restando os 98% a medicamentos de síntese química (FERNANDES *et al.*, 2018).

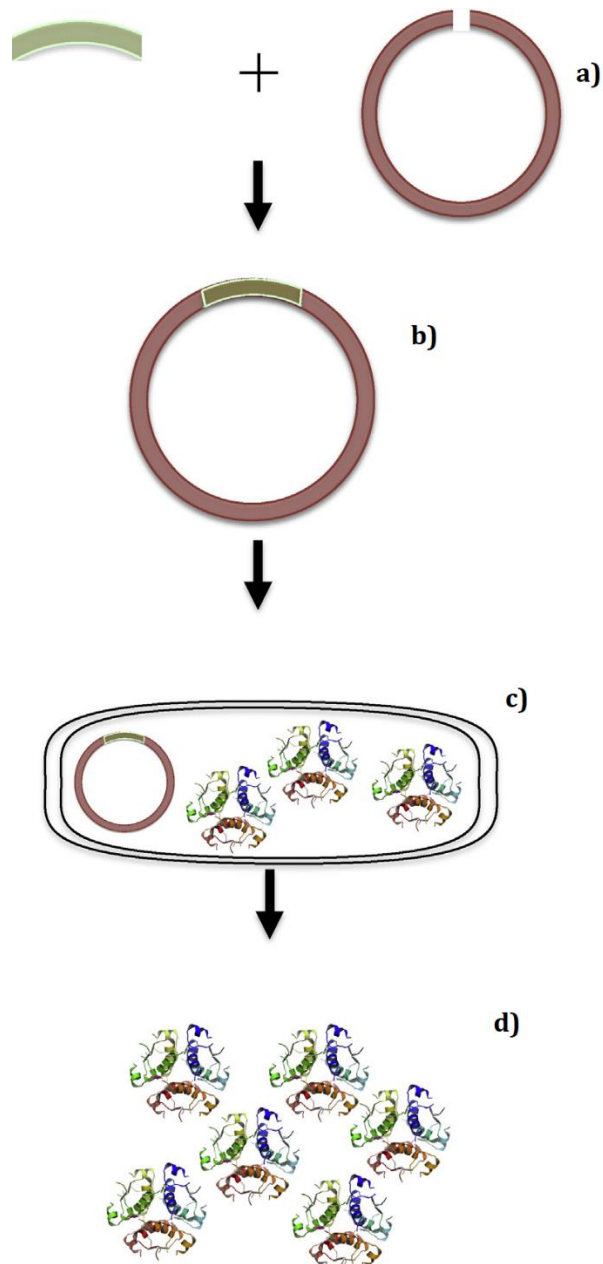
Todo esse investimento revela a importância dos biofármacos no território nacional, no âmbito de seu corrente processo de transição epidemiológica e demográfica.

O alto custo desses produtos, associado ao longo período de desenvolvimento, inovação e regulamentação, portanto, é refletido em gastos públicos, visto que muitos dos biofármacos são fornecidos pelo Sistema Único de Saúde através do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF), como estratégia de ampliação do acesso e de integralidade do tratamento farmacoterapêutico (BRASIL, 2014). O acesso também foi otimizado com a regulamentação dos biossimilares (ou produtos biológicos não novos), os quais são comparáveis à biomolécula inovadora já registrada em segurança e eficácia terapêuticas e podem ser utilizados para suas finalidades específicas com menores custos em saúde (BRASIL, 2010).

Nesse contexto da saúde humana, as inovações em biologia celular e molecular, na engenharia genética e, principalmente, o advento da técnica do DNA (ácido desoxirribonucleico) recombinante foram fundamentais para desenvolvimento de biofármacos. Para este trabalho, é de interesse a discussão sobre sistemas de expressão de proteínas recombinantes e suas características essenciais para a produção de biofármacos. Anticorpos monoclonais são biofármacos obtidos pela tecnologia de hibridomas e, apesar de constarem como o tipo de produto biológico com o maior número de aprovações entre 2014 e 2018 (WALSH, 2018), essa metodologia não será apresentada no desenvolvimento do texto.

Uma proteína recombinante é obtida quando um gene de um determinado organismo é clonado em um vetor de expressão, usualmente um DNA plasmidial, o qual é inserido em uma célula hospedeira de outro organismo para que sua maquinaria transcreva o material genético e promova a tradução proteica em alta quantidade e com manutenção das qualidades da biomolécula de interesse. O gene heterólogo ou exógeno, o vetor de expressão e a célula em que a proteína será produzida integram um sistema de expressão (HARTLEY, 2006). A figura 1 ilustra a expressão de uma proteína recombinante, partindo da ligação de um DNA de interesse a um vetor de expressão (a) para formar um vetor recombinante (b), o qual é inserido em uma célula para a expressão heteróloga (c) e posterior obtenção da proteína na forma pura (d).

Figura 1- Expressão de uma proteína recombinante



Fonte: adaptado de Jozala *et al.* (2016). Material de acesso aberto sob licença CC BY-NC-ND disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

O vetor de expressão possui um cassete, o qual contém os elementos sequenciais de DNA necessários para que a expressão do gene de interesse ocorra. O cassete é formado por uma região promotora regulável, que indica o início da transcrição do DNA em mRNA (ácido ribonucleico mensageiro); um sítio de múltipla clonagem (MCS) para adição da mensagem genética alvo; e uma região terminadora da transcrição, a qual impede a continuidade da síntese de mRNA pela enzima RNA polimerase (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2018). As proteínas recombinantes resultantes do processo de expressão *in vitro* e que apresentem objetivo

terapêutico, diagnóstico, profilático ou outros propósitos em saúde, são consideradas biofármacos.

Para cada tipo de célula em que se dá a expressão de proteínas recombinantes, há vetores específicos que favorecem esse processo. As células que contêm DNA recombinante, ou seja, um transgene são, portanto, transgênicas ou geneticamente modificadas. A Tabela 1 traz um comparativo entre algumas características notáveis entre os principais sistemas de expressão: bactérias, leveduras, células de insetos, células de mamíferos, plantas e animais transgênicos superiores.

Tabela 1 – Comparação de características dos principais sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Característica	Bactérias	Leveduras	Células de insetos	Células de mamíferos	Animais transgênicos	Plantas transgênicas
Custos totais	*	**	***	****	*****	***
Tempo de produção	*	**	**	***	****	**
Capacidade de escalonamento	****	*****	***	*	**	*****
Capacidade produtiva de proteína	***	***	*	*	*****	**
Risco de contaminação	***	**	**	*****	*****	**
Estabilidade da proteína produzida	*****	*****	***	***	****	***
Flexibilidade da produção	*****	*****	**	*	****	*****
Modificações pós-traducionais	*	**	***	****	****	***
Glicosilação	*	**	***	****	****	**

Fonte: construção da tabela baseada em Houdebine (2009) e Owczarek, Gerszberg e Hnatuszko-Konka (2019).

As marcações dos asteriscos na tabela correspondem a comparações subjetivas. Por exemplo, os custos totais na produção de proteínas recombinantes em bactérias são menores do que em leveduras, enquanto as células de mamíferos são capazes de realizar mais modificações pós-traducionais do que os procariotos.

Um ponto importante para a produção de biofármacos de uso humano é justamente a capacidade de um sistema em realizar modificações pós-traducionais. Após a tradução do mRNA em proteína, não significa que a biomolécula está pronta para exercer sua atividade biológica. Essas modificações após a tradução, usualmente relacionadas a processamento enzimático, consistem no enovelamento correto da proteína, reações de proteólise ou na adição de carboidratos, fosfato ou outros ligantes às cadeias terminais (*N*- ou *O*- terminal) de

aminoácidos e são de utilidade para a função biológica proteica (SEO; LEE, 2004). Vale destacar a ligação de carboidratos, conhecida por glicosilação, cuja estrutura correta confere o controle de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de uma proteína terapêutica (TEJWANI *et al.*, 2018). Tanto a *N*- quanto a *O*-glicosilação são muito diversas entre os organismos eucariotos, enquanto os procariotos não estão envolvidos com esses processos (RENDIC; WILSON; PASCHINGER, 2008). A alteração da glicosilação ou a glicosilação incorreta tende a mudar a meia-vida de circulação da proteína no plasma, aumenta o *clearance* renal, muda sua bioatividade e compromete a qualidade do biofármaco. Cada tipo de proteína tem uma necessidade de modificações pós-traducionais distinta, o que influencia na escolha do sistema de expressão (HEFFNER *et al.*, 2018).

Ao longo do desenvolvimento do texto, serão apresentadas as características de cada sistema de expressão. Convém enfatizar que não existe um sistema de expressão ideal ou perfeito para todas as proteínas. Bactérias são vantajosas pelo baixo custo, mas a qualidade do produto final é prejudicada pelas suas limitações biológicas. Leveduras também não são capazes de entregar a proteína com todas as modificações pós-traducionais, porém, enquanto microrganismos eucariotos, são atrativos a produção de biofármacos. As células de inseto adaptadas ao sistema de expressão baculoviral têm cultivo mais complexo, enquanto já representam um outro patamar de qualidade de modificações pós-traducionais. As plantas transgênicas, por sua vez, oferecem uma capacidade de escalonamento produtivo muito alta a um custo menor se comparado a uma célula de mamífero, a qual dispõe dos padrões de glicosilação mais próximos aos humanos e mais importantes para um biofármaco. Por fim, os animais transgênicos podem gerar uma quantidade grande de proteína, todavia, o debate ético e regulatório é um entrave notável (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Tais atributos de cada plataforma de expressão podem favorecer ou desfavorecer a produção de um biofármaco e, por conseguinte, reflete na disponibilidade comercial desses medicamentos biológicos para emprego em seres humanos.

2 DESENVOLVIMENTO

Um dos questionamentos mais importantes para a produção de proteínas recombinantes é sobre qual organismo servirá como plataforma de expressão. A escolha deve ser pensada inicialmente com base nas características da proteína de interesse, as quais direcionam para opções de tecnologia a serem empregadas, reagentes, ferramentas moleculares como plasmídeos de expressão, equipamentos (ROSANO; CECCARELLI, 2014), entre outros, além da complexidade da purificação *downstream* e o objetivo da produção da biomolécula. Por exemplo, quando há o interesse em obter um biofármaco para uso humano, as células de mamífero oferecem um sistema mais seguro e potencialmente menos imunogênico. Por outro lado, um sistema bacteriano pode ser conveniente para rápida produção de proteínas de menor complexidade estrutural.

Neste trabalho, são realizadas considerações acerca da temática dos sistemas de expressão e seu direcionamento para a produção de biofármacos. As ponderações têm como suporte à consulta de bases bibliográficas e publicações relacionadas ao assunto disponíveis na rede mundial de computadores e trazem as informações principais sobre cada tipo de sistema de expressão e sua contribuição para a concepção de medicamentos biológicos de origem recombinante para uso humano.

2.1 Sistemas de expressão bacterianos

A tecnologia do DNA recombinante teve seu início na construção de um plasmídeo com fragmentos de material genético de origens diferentes, preparados a partir de reações com endonucleases de restrição. O constructo foi introduzido em uma bactéria, *Escherichia coli*, para expressão do gene de interesse, e então a técnica revolucionária foi confirmada com a possibilidade de expressão de um gene oriundo outro organismo (COHEN *et al.*, 1973).

Hoje, com os avanços em biologia molecular e de processos biotecnológicos, a produção de biofármacos é viável tanto em bactérias quanto em outros sistemas de expressão. As bactérias foram inicialmente escolhidas para a expressão de proteínas recombinantes visto o rápido crescimento das colônias, baixo custo de materiais e meios de cultura e ampla disponibilidade de vetores de expressão e linhagens celulares mutantes (ROSANO; CECCARELLI, 2014). No entanto, também existem barreiras no sistema bacteriano. Há a limitação da produção de proteínas complexas, uma vez que as bactérias como *E. coli* não realizam modificações pós-traducionais, o que impede a atividade biológica desse tipo de proteína. Há também a possibilidade da formação de corpos de inclusão (CI) da proteína

heteróloga (GUPTA; SHUKLA, 2016), agregados insolúveis de proteína na forma inativa, e a contaminação do produto por endotoxinas bacterianas.

O sistema de *E. coli* é o sistema bacteriano mais utilizado e por esse caminho será iniciada a discussão dos sistemas de expressão e sua importância na produção de biofármacos.

2.1.1 Escherichia coli como um sistema de expressão

A expressão recombinante iniciou-se em *E. coli*, com a obtenção de insulina humana no final da década de 1970 (GOEDDEL *et al.*, 1979); produto biofarmacêutico que foi o primeiro de origem de tecnologia do DNA recombinante a ser comercializado para uso humano, em 1982. Desde então, essa bactéria mantém-se amplamente empregada como plataforma para produção de proteínas heterólogas.

As vantagens e desvantagens do uso de *E. coli*, no geral, foram descritas no item acima. Em relação a outros organismos procariotos, *E. coli* dispõe de boa descrição da biologia celular na literatura, tem manipulação e processo fermentativo simples, com uma alta quantidade de proteína produzida a um baixo custo (GUPTA; SHUKLA, 2016). Vale destacar, também, outras características e discutir algumas já citadas.

A transformação de *E. coli* por um DNA exógeno é simples e há diferentes estratégias de clonagem para posterior incorporação do novo material genético (CELIE; PARRET; PERRAKIS, 2016). Em contrapartida, a expressão de algumas proteínas pode ser dificultada em *E. coli* pela presença de códons raros à bactéria no gene exógeno. Diferentes organismos apresentam diferentes usos dos RNA transportadores (tRNA) disponíveis para um mesmo aminoácido. Essa diferença na preferência do tRNA a ser utilizado entre o organismo de onde veio o gene heterólogo quando comparado aos tRNA presentes na bactéria pode dificultar e até impossibilitar a tradução da proteína recombinante (TERPE, 2006). Essa questão pode ser solucionada com a otimização da sequência gênica a ser clonada ou com o uso de linhagens mutantes, como *Rosetta*, que melhora a expressão de proteínas que apresentam códons raros para *E. coli* por possuir os tRNA capazes de reconhecer os códons raros (GOPAL; KUMAR, 2013).

Uma vez que os processos de transcrição e tradução estão estritamente acoplados em *E. coli* e tanto o citoplasma quanto o espaço periplasmático são ricos em macromoléculas, o que torna o correto enovelamento proteico custoso (BANEYX; MUJACIC, 2004) e, caso não seja dobrada de forma correta, a proteína pode ser degradada ou podem ser formados corpos de inclusão (CI) insolúveis por acúmulo e agregação da proteína recombinante, os quais sempre

devem ser considerados nessa bactéria. Para sua recuperação, são exigidos reagentes desnaturantes, o que não é proveitoso devido à baixa eficiência de renaturação e a onerosidade dos passos adicionais necessários para purificação. Portanto, em uma escala industrial, essas estruturas são inconvenientes se não utilizados protocolos de recuperação eficientes. Em outra abordagem, esses corpos de inclusão podem ser explorados na expressão de proteínas tóxicas à *E. coli* ou para recuperação precoce do produto não enovelado (JEVSEVAR *et al.*, 2005). Os CI, por serem produzidos em grandes quantidades na célula bacteriana, são atraentes a alguns tipos de proteínas terapêuticas, como interferons e interleucinas, protegendo-os de degradação proteolítica pela estabilidade do agregado e promovendo flexibilidade de produção no processo *downstream*, pois podem ser isolados da célula e armazenados em congelamento por muitos meses (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Há linhagens de *E. coli* desenvolvidas diretamente para a produção de proteínas terapêuticas. As linhagens derivadas de *E. coli* K12, como DH5 α , DH1, MG1655 são amplamente utilizadas na indústria biotecnológica, contudo, sua fermentação anaeróbia resulta em grandes quantidades de acetato, o que pode ser prejudicial ao crescimento celular. Por conseguinte, a produção de proteínas recombinantes também decresce. Alternativamente, estão disponíveis as células BL21 e B834, que permitem o uso de glicose em grande quantidade como fonte de carbono, com a baixa tendência de acúmulo de acetato no meio. BL21 e suas derivadas são atualmente as linhagens mais utilizadas na expressão recombinante, com aproveitamento de promotores induzíveis que regulam a atividade da RNA polimerase T7 para expressão associada a plasmídeos recombinantes (SELAS CASTIÑEIRAS *et al.*, 2018).

A região promotora regula o processo de transcrição, o qual apresenta a maior importância em sistemas bacterianos na expressão recombinante, visto que designa o início da transcrição. Uma vez que a superexpressão de genes heterólogos é comum em *E. coli*, é imprescindível que os fortes promotores presentes nos vetores de expressão sejam finamente regulados, de modo a prevenir danos à célula causados pelo acúmulo de proteína. O promotor *lac* do operon é amplamente empregado nos vetores de expressão, cuja regulação é feita tanto pela repressão ou indução do *lacI* quanto o sistema da proteína ativadora de catabolismo (CAP). O promotor *lac*, induzível por análogos de lactose (como IPTG, isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo), foi utilizado na construção dos plasmídeos de clonagem pUC, muito proveitosos em *E. coli* pelo seu alto índice de cópia. Há outros tipos de promotores que podem ser aproveitados: *araBAD*, regulado pelo operon da arabinose, é um promotor mais eficiente do que o *lac*, e compõe os vetores plasmidiais da série pBAD; os promotores pR e pL do

bacteriófago λ permitem alta expressão heteróloga em *E. coli* sob indução térmica, com emprego significativo na indústria de biofármacos; promotor do fago T7 deu origem aos vetores pET, os quais são muito difundidos e com grande oferta comercial. Nos vetores da classe pET, o promotor é específico para RNA polimerase do fago T7, logo, são eficientes em linhagens de *E. coli* DE3, que foram geneticamente modificadas para expressar essa RNA polimerase sob controle de *lacUV5*. Com o sistema pET e *E. coli*, é possível a clonagem de um gene com alta eficiência de cópias e ao associá-los à indução com IPTG, a expressão não regulada ou basal é evitada (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2018).

No uso de linhagens de *E. coli* que expressam a polimerase do fago T7, após a replicação das células em cultura, entre três a cinco gerações consecutivas, há a redução da capacidade de expressão heteróloga. Para solucionar esse problema surgiram plasmídeos com o promotor T7C p/p, o qual mantém bons níveis de expressão e oferece benefícios na purificação *downstream*. Outra opção são os plasmídeos pNEW, os quais também têm como resultado um alto nível de expressão se comparado aos pETs (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

A bactéria *Escherichia coli* é, notavelmente, a mais empregada na produção de proteínas recombinantes e biofármacos. No entanto, cabe também a este trabalho comentar sobre alguns exemplos de sistemas de expressão procariotos além da *E. coli*.

2.1.2 Outros sistemas de expressão bacterianos

Algumas espécies de bactérias podem ser utilizadas para contornar algumas das limitações impostas pelo uso de *E. coli*. Entre elas, os *Bacillus* gram-positivos evitam o problema de códons raros em *E. coli*, além de não expressarem endotoxinas (lipopolissacarídeos) na membrana externa, o que simplifica a purificação e reduz o risco de reação pirogênica do produto recombinante. Para a clonagem do gene exógeno, é possível o emprego de plasmídeos de autorreplicação ou de integração. É um sistema atrativo também por secretar proteínas no meio extracelular com eficiência, o que é o maior conveniente do ponto de vista do custo-benefício. Essa alternativa é pouco explorada em virtude de outras limitações, como a baixa produtividade em gramas de proteína (POHL; HARWOOD, 2010). O uso de algumas espécies (*B. megaterium*, *B. brevis*, *B. subtilis*) já permitiu a expressão de proteínas de interesse terapêutico e industrial (TERPE, 2006).

O sistema de *Lactococcus lactis*, também uma bactéria gram-positiva, apresenta as mesmas vantagens quanto à secreção das proteínas em altas concentrações no meio de cultura e a evitar o risco das endotoxinas de gram-negativos. É um sistema aplicado de forma mais

generalizada à expressão gênica controlada por nisina induzível (da sigla NICE, em língua inglesa), a qual permite um controle rigoroso da expressão proteica em bons níveis, mas inferiores em mais de uma ordem de grandeza aos de *E. coli*, com destaque para as proteínas de membrana. As espécies de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*), gram-negativas, por sua vez, dispõem de níveis de expressão semelhantes a *E. coli*, mas ainda são pouco utilizadas com o propósito de produção de biofármacos (CHEN, 2012).

Há mais organismos procariotos que poderiam ser citados, no entanto, a discussão será ampliada nas tecnologias que mantêm *E. coli* como a bactéria de preferência para expressão recombinante.

2.1.3 Aperfeiçoamento da expressão e desafios do sistema bacteriano

Posto que as limitações do primeiro sistema de expressão recombinante, o procarioto, são determinantes para a produção de muitos biofármacos, houve a busca por outras plataformas com maior capacidade de modificações pós-traducionais. Por outro lado, organizaram-se esforços para modificação de bactérias para melhoria da expressão recombinante e para mantê-la em altos níveis. Esse planejamento é direcionado em grande parte à *E. coli*, o principal microrganismo procarioto de interesse comercial. É profícuo, pois, esclarecer alguns desses avanços e expor as barreiras que ainda existem no sistema de expressão bacteriano.

A expressão de proteínas eucarióticas, inclusive biofármacos, em bactérias encontra fatores que interferem na obtenção de resultados ideais. Além da presença de códons raros, existe a limitação do compartimento de liberação da proteína (citoplasma, periplasma ou meio de cultura) que afeta o enovelamento proteico, especialmente no citoplasma, em que os corpos de inclusão, mesmo que recuperados após purificação, o rendimento é baixo e não há bioatividade assegurada de um biofármaco. Essa atividade biológica pode também estar relacionada com a adição de glicanos e outros ligantes à proteína alvo como modificações pós-traducionais, o que não acontece naturalmente em bactérias. A estabilidade do mRNA (mensageiro) e a potência do promotor são determinantes para o aumento dos níveis de expressão proteica (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012).

Em relação aos códons raros, as linhagens mutantes mostraram-se uma alternativa viável (item 2.1.3), assim como a otimização sintética dos genes para a expressão em sistema bacteriano (GUPTA; SHUKLA, 2016). As condições de cultura bacteriana também são fundamentais para a expressão proteica. A depender da densidade celular final, fatores de crescimento e taxa específica de crescimento de *E. coli*, o acúmulo de produto recombinante

dentro da célula bacteriana pode mudar. Isso afeta condições ambientais como pH, concentração de oxigênio dissolvida, atividade proteolítica da bactéria e pode acarretar toxicidade para o hospedeiro, entre outras consequências, o que, em um modo produtivo em batelada, também interfere na solubilidade e enovelamento proteico. O meio de cultura, portanto, deve ser estudado de forma a conter os componentes necessários de acordo com o tipo de proteína e o tipo de linhagem empregada, a fim de aumentar os níveis de expressão e manter a proteína na forma solúvel (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). O parâmetro de temperatura é mais um fator ajustável, uma vez que valores inferiores a 37 °C na indução da expressão reduzem a velocidade de tradução e podem permitir um enovelamento correto e solubilidade da proteína. Em contrapartida, um valor ótimo de temperatura deve ser atingido para cada bioprocessamento, pois a menor temperatura tende a decrescer a biomassa produtiva (CORREA; OPPEZZO, 2015).

Quanto à formação dos corpos de inclusão, é um processo que, no citoplasma bacteriano, dificilmente é evitável na produção de proteínas recombinantes. A fim de contornar a baixa taxa de recuperação proteica, uso de agentes desnaturantes e o risco do não reenovelamento adequado, aplicam-se a experimentação de condições ambientais de expressão para manutenção da proteína solúvel, a coexpressão de chaperonas para indução do enovelamento e formação de ligações dissulfídicas corretas e o uso de proteínas fusionadas à molécula de interesse para aumento da solubilidade. (DE GROOT *et al.*, 2008). Existem também linhagens de *E. coli*, como a SHuffle®, com um citoplasma mais oxidativo, desenvolvidas com o intuito de garantir a formação das ligações dissulfídicas essenciais para proteína heteróloga ser obtida com atividade biológica (LOBSTEIN *et al.*, 2012). Uma outra saída para diminuir a incidência de corpos de inclusão é o uso de peptídeos-sinal ligados à proteína, que a direcionam ao espaço periplasmático, no qual as condições menos redutoras e um sistema próprio formador de ligações dissulfídicas facilitam o enovelamento proteico satisfatório, porém, em uma produção que pode ser quantitativamente inferior à citoplasmática (KARYOLAIMOS *et al.*, 2019).

Além do enovelamento proteico correto, muitos biofármacos para terapia farmacológica humana exigem reações pós-traducionais, como glicosilações e fosforilações, as quais bactérias são incapazes de realizar, mas são fundamentais para a bioatividade da proteína. Criaram-se linhagens glicoengenheiradas de *E. coli*, uma área de pesquisa promissora, na tentativa de produção de vacinas glicoconjugadas e biofármacos (HARDING; FELDMAN, 2019), contudo, o campo é incipiente de resultados robustos, portanto, a preferência é o uso de outros sistemas

de expressão capazes de suprir a demanda de modificações pós-traducionais da molécula de uso farmacêutico.

Nos dias atuais, a linhagem de *E. coli* empregada de forma mais extensa é a BL21 (DE3), a qual supera muitas das limitações apresentadas. Seu crescimento em meio de cultura mínimo é mais acelerado quando comparado a outras linhagens, o que é relacionado à ausência de flagelos por deleção gênica, poupando energia para a síntese proteica e divisão celular. A produção reduzida de acetato mantém a célula viável por um tempo prolongado, enquanto a deficiência de proteases ameniza uma potencial degradação do produto biológico, os quais são efeitos benéficos aos resultados de expressão aliados a uma maior capacidade de secreção da proteína recombinante (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). Um empecilho dessa linhagem é a necessidade de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) como indutor de expressão, o que não é interessante a biofármacos de uso humano devido a sua potencial toxicidade. Alternativamente, é possível utilizar meios de cultura autoinduzíveis para a expressão proteica ou outros indutores não tóxicos, como o cumato, o qual oferece junto a plasmídeos de expressão pNEW um mecanismo de expressão similar ao vetor pET induzido por IPTG e com níveis de expressão próximos e custos de produção mais baixos (GUPTA; SHUKLA, 2016).

2.1.4 Biofármacos e o sistema de expressão bacteriano

A presença de *E. coli* na tecnologia do DNA recombinante desde o seu princípio tem impacto direto sobre a produção comercial de biofármacos. No levantamento de Walsh (2018), os produtos com origem na bactéria gram-negativa só não superam em número os biofármacos produzidos em células de mamífero, os quais se tornaram mais populares nos últimos anos, com desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais. No sistema bacteriano, destaca-se a produção de hormônios humanos (insulina, somatotrofina, paratormônio, entre outros), interferons, fatores de crescimento celular, interleucinas, fragmentos de anticorpos e enzimas.

Apesar de não haver produção de biofármacos complexos em *E. coli*, é notável a sua importância ao mercado biofarmacêutico com uma gama variada de proteínas de uso médico. Com todas as facilidades oferecidas por *E. coli* como um sistema de expressão e progressos no sentido de distanciar-se dos atuais inconvenientes, inclusive no que se refere às modificações pós-traducionais, a tendência é a permanência da bactéria como um dos principais sistemas de expressão de biofármacos (BAESHEN *et al.*, 2015).

2.2 Sistemas de expressão de leveduras

Após as experiências com resultados positivos na produção de proteínas heterólogas em sistema procarioto, outros sistemas foram buscados a fim de almejar a expressão de proteínas de maior complexidade, visto as limitações encontradas nas bactérias. Um dos sistemas testados foi o de fungos leveduriformes, os quais são utilizados há séculos na fermentação alimentícia, têm o metabolismo e o rápido padrão de crescimento (organismo unicelular) bem conhecidos e manejo da cultura facilitado. Por serem organismos eucariotos, as leveduras são capazes de realizar algumas modificações pós-traducionais essenciais às proteínas de uso humano, em uma via de secreção que envolve muitas etapas até a terminação das modificações por *N*- ou *O*-glicosilação (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991).

Por conseguinte, as leveduras se revelam como um sistema de expressão recombinante com bom custo-benefício e com meio de cultura de composição nutricional simples, além de serem viáveis modificações no genoma quando conveniente para o processo produtivo. Entre as leveduras para a produção de biofármacos, destacam-se duas: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (que teve uma realocação filogenética para o gênero *Komagataella*, mas ainda tem o antigo nome corrente na literatura), sendo que a primeira é consolidada para expressão de proteínas de uso em seres humanos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Para o início da expressão de uma proteína recombinante em leveduras, deve ser escolhido a espécie adequada ao produto de interesse e, além disso, o tipo de vetor de expressão a ser empregado. Os tipos de vetores aplicados com esse intuito são os vetores integrativos e os vetores episomais (ou de replicação autônoma), com ampla oferta de opções comerciais. Os plasmídeos episomais de levedura (YE_p) se replicam independentemente dos cromossomos da levedura escolhida. Há exemplos que contêm uma sequência de replicação autônoma (ARS), a qual se assemelha a uma origem de replicação dos plasmídeos bacterianos. Os vetores ARS podem estar presentes em alto número de cópias na célula da levedura, porém são instáveis, o que dificulta a sua transmissão para as células-filhas. Os vetores baseados nos plasmídeos de transporte do tipo 2 μ m, por sua vez, são mais populares, construídos com base na origem de replicação de *E. coli* (ORI) e o plasmídeo 2 μ m de *S. cerevisiae*, e apresentam alto índice de cópia e maior estabilidade. A expressão de um gene heterólogo pode ainda ser regulada, caso o vetor 2 μ m contenha centrômeros passíveis de regulação ou genes da enzima flipase (FLP) induzíveis para recombinação FLP-FRT com seu alvo de reconhecimento (FRT). Já os plasmídeos de integração de levedura (YI_p) são aqueles que integram o gene heterólogo diretamente ao cromossomo da célula, mantendo esse inserto estável na geração de células

filhas e acarretando em maior produtividade proteica. Esses vetores contêm fragmentos de DNA da levedura para direcionar o sítio de integração e são inseridos no cromossomo por recombinação homóloga (simples ou translocação) (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992). Quanto ao uso de promotores de expressão, aqueles do tipo constitutivo são mais confiáveis, pois ao trazer elementos da própria espécie de levedura empregada, mantêm melhores níveis de expressão em relação a promotores de outras espécies ou organismos. São promotores que exigem técnicas de fermentação e reagentes menos complexos do que os promotores de expressão induzíveis, os quais, no entanto, oferecem minimização de clones não recombinantes na fase de crescimento da cultura (MATTANOVICH *et al.*, 2012).

Para seleção dos clones recombinantes, há três opções de marcadores: auxotróficos (por complementação de nutrientes essenciais a vias biossintéticas da levedura), químicos (genes que conferem resistência a antibióticos presentes no plasmídeo) ou um sistema de autoseleção (expressão de genes vitais à célula hospedeira presentes no plasmídeo). Tanto os marcadores auxotróficos quanto químicos são amplamente utilizados em vetores de expressão para *S. cerevisiae* e *P. pastoris*.

Ademais, outras espécies de leveduras encontram aplicação como hospedeiras para expressão de proteínas recombinantes (VIEIRA GOMES *et al.*, 2018). Todavia, o conteúdo desse trabalho se aterá às duas espécies principais de leveduras para a produção de biofármacos.

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

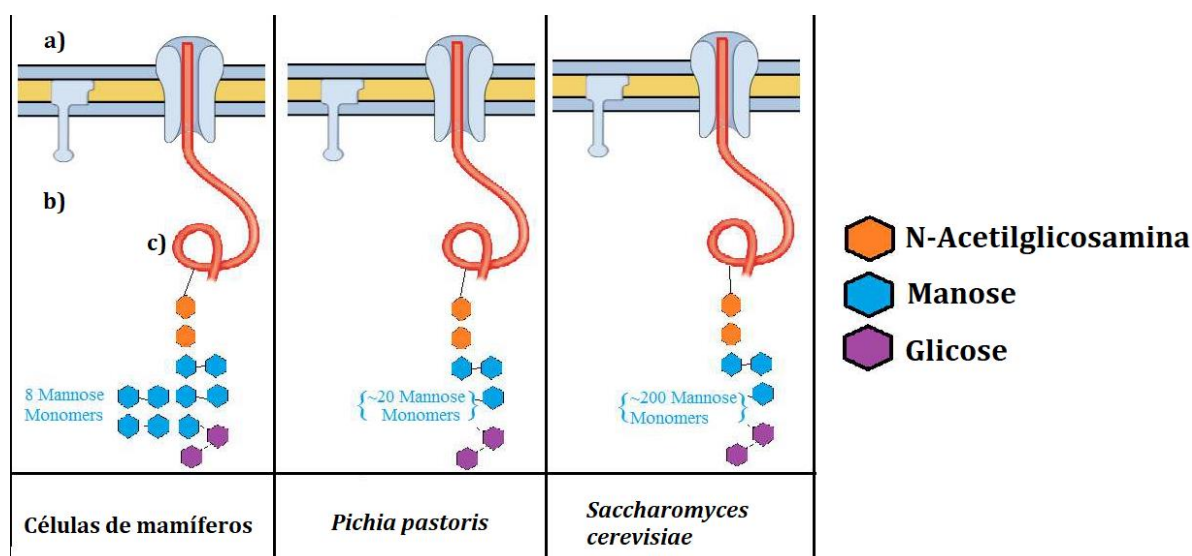
Poucos anos após a inauguração da tecnologia do DNA recombinante (HITZEMAN *et al.*, 1981), a inovação foi implementada em células de *S. cerevisiae*, nas quais foram inseridos, por transformação, vetores plasmidiais capazes de fazer replicação autônoma. Os plasmídeos possuíam o promotor da enzima álcool desidrogenase (ADH1) da levedura que levava à expressão de um tipo de interferon. Desde então, muitas proteínas recombinantes e biofármacos já foram obtidos dessa célula e continuam disponíveis no mercado.

A escolha de uma levedura também traz aspectos importantes em comparação a outros sistemas de expressão, como a ausência de endotoxinas ou uso de DNA viral ou oncogênico para a expressão de um gene heterólogo. *S. cerevisiae*, assim como outras leveduras não metilotróficas, é avaliado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, agência regulatória dos Estados Unidos da América) como um organismo seguro, o que indicou seu pronto uso na produção de proteínas recombinantes. Essa classe de leveduras é usualmente escolhida para produção recombinante devido à proximidade de diversas áreas das ciências com esse tipo de

fungo e amplo conhecimento de sua biologia celular. Por outro lado, o sistema de expressão de *S. cerevisiae* resulta em baixa quantidade de produto recombinante se comparado a um sistema procarioto como *E. coli*. Na levedura, pode ocorrer acúmulo da proteína no espaço periplasmático, o que pode induzir a sua degradação e posterior dificuldade de purificação, com menor secreção do produto para o meio de cultura (MATTANOVICH *et al.*, 2012).

Em outros processos industriais, como a produção de etanol, *S. cerevisiae* é o organismo de preferência, visto a elevada resistência à pressão osmótica, à concentração de etanol ou açúcar no meio de cultura e à variação de pH em relação aos demais hospedeiros, como bactérias, fungos filamentosos e outras leveduras.

Figura 2 – Padrão de glicosilação em células de mamíferos e leveduras



Fonte: adaptado de Vieira Gomes *et al.* (2018). Material de acesso aberto sob licença CC BY-NC-ND disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Quanto à produção de proteínas recombinantes, esse fungo apresenta a característica de hiperglicosilação, cujas consequências para um biofármaco são o aumento de imunogenicidade e redução da atividade biológica. Essa limitação, somada à baixa produtividade de proteínas recombinantes e instabilidade dos plasmídeos levaram à busca por outros sistemas, tal qual a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (BAGHBAN *et al.*, 2019).

A figura 2 exemplifica o padrão de glicosilação de células de mamíferos comparado ao das leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris*. O mRNA é traduzido a proteína do citosol (a) para o lúmen do retículo endoplasmático (b) da célula eucariota, em que a cadeia polipeptídica (c)

aumenta de tamanho. Em ambas as leveduras, há hipermanosilação da proteína recombinante, mas em *S. cerevisiae* o número de monômeros adicionados é muito superior ao de *P. pastoris*.

A fim de minimizar esses problemas, existem alternativas em engenharia genética disponíveis para as linhagens de *S. cerevisiae* direcionadas à expressão de proteínas recombinantes. A mitigação da hiperglicosilação tem como ferramenta o silenciamento dos genes codificantes para enzimas manosiltransferases (GUPTA; SHUKLA, 2017b), as quais estão relacionadas a esse processo ao adicionar resíduos de α -1,3-manose às proteínas recombinantes. Tais carboidratos são potencialmente alergênicos e o silenciamento dos genes também previne esse inconveniente (CELIK; CALIK, 2012). Quanto à otimização da expressão do produto recombinante, é possível utilizar diferentes estratégias de forma isolada ou em combinação. Essas modificações usualmente encontram sucesso para algumas proteínas e não há uma linhagem mutante ideal para a expressão recombinante, o que pode estar associado à complexidade de secreção e processamento proteico em *S. cerevisiae*. Esse fato revela a importância de estudos em engenharia genética para otimização da expressão de proteínas recombinantes para esse sistema, no qual as vias de secreção de proteínas revelam-se como importantes alvos a serem trabalhados, tal qual a técnica de fermentação da cultura (HOU *et al.*, 2012). Ferramentas moleculares também são bem vindas na melhoria da expressão recombinante, e envolvem o uso de novos promotores sintéticos que aumentam a capacidade de transcrição do gene heterólogo de forma regulada, seleção de terminadores de transcrição, fusão de caudas peptídicas para modificar o *turnover* proteico e evitar degradação de produto, modificação de expressão com uso de técnicas modificadas com Crispr-Cas9, otimização de vias metabólicas, entre outras alterações viáveis (BESADA-LOMBANA; MCTAGGART; DA SILVA, 2018).

Ainda que a expressão de proteínas recombinantes tenha sido abordada em outras plataformas após o início da exploração comercial de *S. cerevisiae*, esse é o hospedeiro para a produção da maioria dos biofármacos disponíveis a partir de leveduras. Entre 2014 e 2018, os únicos produtos comerciais novos de origem em leveduras foram feitos em linhagens dessa espécie. Como exemplos de biofármacos, existem fatores de coagulação, análogos de insulina humana, análogos do hormônio GLP-1 humano, glucagon humano recombinante, antígenos de superfície recombinantes do vírus da hepatite B para vacinas, e outras proteínas recombinantes terapêuticas (WALSH, 2018). Outros biofármacos são produzidos principalmente em linhagens de *P. pastoris*.

2.2.2 *Pichia pastoris* ou *Komagataella phaffii*

A procura por uma célula eucariota alternativa a *S. cerevisiae* resultou no desenvolvimento de células de *Pichia pastoris* (ou *Komagataella phaffii*) para expressão de proteínas heterólogas em 1986, assim como a construção de vetores, linhagens mutantes e protocolos como ferramentas para a modificação genética da levedura. A fonte de energia dessas células é o metanol, para o qual a resposta de expressão de algumas enzimas do seu metabolismo é notável quando esse álcool está presente no meio de cultura. Todavia, para o uso do metanol por essas enzimas, é requerido uma via metabólica dependente de álcool oxidase (AOX). O isolamento do gene e promotor da enzima AOX permitiu a compreensão de que a regulação do gene *AOX1* funciona a partir de repressão/não repressão somados a indução dependente de metanol, a qual permite uma alta obtenção de transcritos. O promotor *AOX1* (P_{AOX1}), com alta força de expressão e capacidade de regulação, foi usado com sucesso na expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris* (CEREGHINO; CREGG, 2000). Apesar de P_{AOX1} ser o promotor mais utilizado, a indução com metanol é perigosa em larga escala por se tratar de um reagente muito inflamável, portanto, outros promotores induzíveis ou variações do promotor *AOX1* não dependentes da presença de metanol são desejáveis, contanto que o alto nível de expressão seja mantido. O promotor constitutivo do gliceraldeído-3-fosfato (*GAP*) é um dos mais utilizados e, quando glicose é a fonte de energia no meio, mantém níveis de expressão próximos aos do promotor *AOX1* (AHMAD *et al.*, 2014).

Desde o final dos anos 1980, com o sucesso do sistema de expressão, houve a difusão do uso de *P. pastoris* para a produção de proteínas recombinantes. Além do baixo custo e complexidade na cultura, a qual apresenta rápido crescimento celular, a levedura oferece, assim como *S. cerevisiae*, modificações pós-traducionais similares às encontradas em células de mamíferos (exceto pela hipermanosilação de *N*-glicanos) e enovelamento proteico adequado, apesar de a tendência de códons raros ser uma limitação desse sistema (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). Por outro lado, quando comparada a *Saccharomyces*, as vantagens da levedura metilotrófica são a maior densidade celular em cultura e a presença de um sistema de secreção de proteínas, o qual permite a sua obtenção tanto dentro da célula quanto no meio extracelular. A secreção depende de sequências-sinal engenheiradas que direcionem a proteína para o retículo endoplasmático, organela na qual a via secretória tem início. Essas sequências são posteriormente clivadas por enzimas do lúmen do retículo endoplasmático. Para que a proteína recombinante não fique retida pela parede celular, as linhagens de *P. pastoris* também foram modificadas para que o gene da glicoproteína de membrana Gas1p fosse

corrompido, o que se mostrou profícuo para a secreção do produto recombinante (JUTURU; WU, 2018).

A otimização da produção de proteínas recombinantes também pode ser melhorada em *Pichia* através de algumas condutas, de forma a torná-la um sistema mais atrativo para a produção de biofármacos. Quando se trata principalmente de proteínas humanas multiméricas, há sua superprodução pela levedura, o que acarreta em enovelamento incorreto, estresse intracelular e baixa produtividade por degradação do produto. Ao equipar *P. pastoris* com chaperonas, isomerases dissulfídricas e outras enzimas que auxiliam na garantia do enovelamento correto, a agregação e degradação proteica são reduzidas (PUXBAUM; MATTANOVICH; GASSER, 2015). Quanto ao padrão de glicosilação da levedura, que difere de células de mamíferos principalmente na adição de resíduos extra de manose e manossilfosfato aos *N*-glicanos, existe a ferramenta GlycoSwitch® aplicada em algumas linhagens de *P. pastoris* para eliminar esse tipo de glicosilação característica de fungo, por meio da perturbação do locus do gene *OCH1* (do inglês, alongamento da cadeia externa) e pela introdução de glicotransferases e glicosidases em vetores para sua expressão heteróloga. As proteínas terapêuticas produzidas pelas linhagens modificadas, dessa forma, têm menor *clearance* e imunogenicidade quando no organismo humano pela maior semelhança a proteínas de mamíferos (LAUKENS; DE WACHTER; CALLEWAERT, 2015).

Uma das linhagens usadas é a SuperMan₅ (e suas variações), na qual antígenos de vacinas, citocinas, glicoproteínas humanizadas e anticorpos são produzidos. Tanto as linhagens glicoengenheiradas quanto as que passaram por outras modificações ou até as auxotróficas são viáveis para a produção de biofármacos (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). No entanto, há poucos biofármacos comerciais aprovados para uso humano a partir de *Pichia pastoris* (WALSH, 2018), principalmente porque os níveis de expressão de muitas proteínas não são satisfatórios em uma larga escala. Estão regulamentados a ocriplasmina (plasmina truncada humana recombinante), a ecalantida (inibidor de calicreína plasmática) e uma insulina glargina humana recombinante. Os outros resultados são positivos em escala de laboratório.

A transformação de células de *P. pastoris* com os vetores de expressão é trabalhosa, visto que há um mecanismo celular de reparo que dificulta a recombinação homóloga (NHEJ, do inglês, junção de extremidade não homóloga), tornando esse processo menos eficiente que em *S. cerevisiae*. A descrição do funcionamento genético de *Pichia* também é incipiente se comparada à levedura não metilotrófica. Portanto, há um potencial não explorado nessa levedura, o qual tende a ser aproveitado com a inovação em ferramentas moleculares e genéticas

para melhoria da expressão de proteínas recombinantes nesse hospedeiro e da flexibilidade da plataforma para diferentes produtos (FISCHER; GLIEDER, 2019).

2.3 Sistemas de expressão com células de insetos

As células de inseto são outro sistema de expressão eucarioto para a produção de proteínas recombinantes. Sua aplicação está relacionada a um vetor baculoviral, a fim de aumentar a produtividade e escapar de dificuldades na expressão recombinante em células de mamíferos. O vetor tem origem em baculovírus, os quais talvez não sejam tão familiares por não serem patogênicos a seres humanos. Portanto, procura-se entender a relação entre esses vírus e as células de inseto na produção de proteínas recombinantes antes de alcançar a expressão propriamente dita.

2.3.1 Biologia dos baculovírus

Os baculovírus (BV), da família Baculoviridae, apresentam DNA fita dupla (dsDNA) e são aptos a infectar células de artrópodes, tais quais insetos, por ciclo lítico. Seu tamanho avantajado de material genético e presença de promotores fortes favorecem a produção de grandes títulos de proteínas de interesse, concomitante ao bloqueio da síntese proteica celular por fatores virais. São vírus envelopados, com formato de bastão e para os quais foram descritos 31 genes conservados entre todas as espécies, codificando para proteínas das funções virais críticas de transcrição e replicação de seu material genético, além daquelas responsáveis pela montagem da partícula viral, infecção das células do intestino médio do inseto e suspensão do ciclo celular (CONTRERAS-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Naturalmente, os baculovírus infectam apenas células de artrópodes, a não ser que sejam preparadas condições específicas que permitam a entrada em células de vertebrados, o que tem sido explorado para expressão proteica em células de mamíferos (tópico 2.4). Em outros tipos de células e microrganismos, não há infecção. Os isolados virais, que usualmente se limitam a poucas espécies, têm origem de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. *Autographa californica* nucleopoliedrovírus múltiplo (AcMNPV) é o baculovírus melhor conhecido e com amplo uso (RYCHLOWSKA *et al.*, 2011). No seu genoma, estão contidas cinco regiões de repetição homóloga nas quais existem sequências de imperfeições palindrômicas, cuja função está relacionada à replicação viral e ao realce da expressão gênica. Dois tipos de partículas virais podem ser formados de acordo com o ciclo de replicação, os vírions de brotamento (BV, do inglês *budded virion*) e os vírus derivados de oclusão (ODV, *occlusion derived virus*) (VAN OERS, 2011).

Segundo Kelly, King e Possee (2016), a replicação dos baculovírus se dá com a liberação de ODVs a partir de corpos de oclusão para infectar as células epiteliais colunares da parede intestinal de larvas de inseto. Infere-se que a entrada na célula ocorre por interação entre proteínas virais de superfície e proteínas de membrana das células, induzindo a fusão da partícula viral diretamente à membrana. O envelope é removido no citoplasma, o que libera o capsídeo protetor do material genético. O DNA, quando atinge o núcleo, inicia a replicação viral. Nesse primeiro ciclo de replicação, que raramente ocorre também em células regenerativas do intestino médio, há uma saída de BV direcionada para a membrana basal das células epiteliais, encerrando a infecção primária. Com isso, os BVs atingem a hemolinfa e podem infectar outros tecidos, com destaque para o sistema traqueal, a partir do qual há a difusão dos BVs.

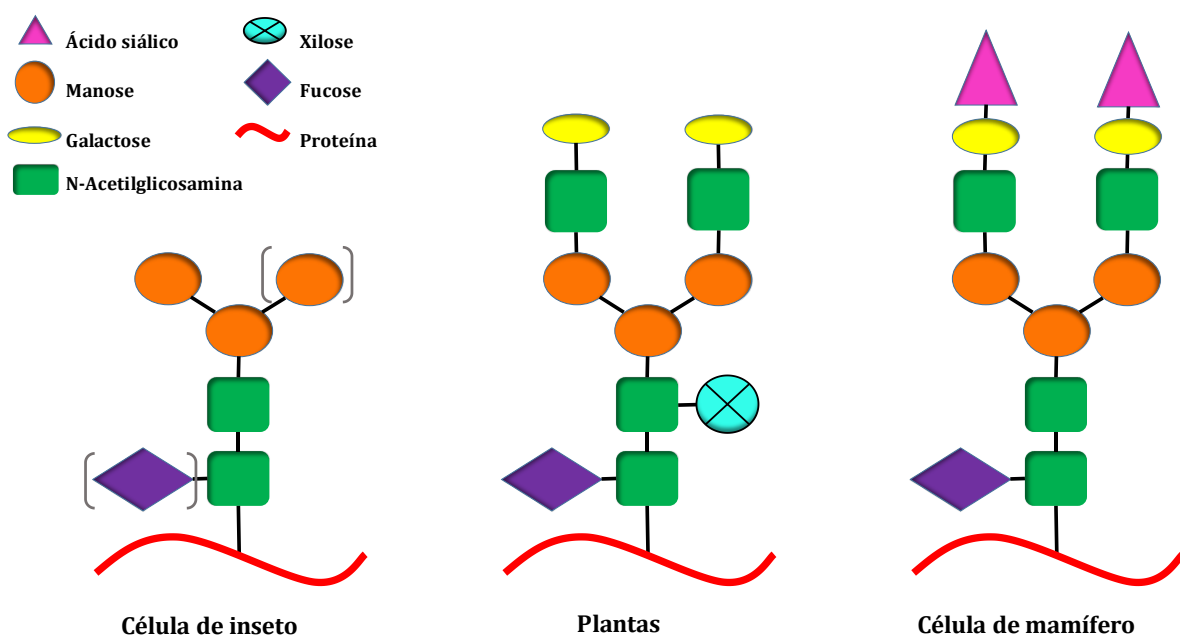
Na infecção secundária, os BVs invadem diretamente as células, que têm sua morfologia alterada por esse processo: o núcleo aumenta de tamanho e há reorganização do citoesqueleto, induzindo um formato arredondado a envolver o citoplasma. Ainda no núcleo, uma estrutura filamentosa semelhante à cromatina se desenvolve entre oito a 48 horas após infecção. Supõe-se que essa estrutura ocorra a replicação viral e formação do nucleocapsídeo. Nos estágios iniciais de infecção, os nucleocapsídeos formados são liberados no citoplasma, ganham envelope na membrana plasmática e deixam a célula por lise ou brotamento, originando os BVs. Após 24h, a produção de BVs diminui e há formação de envelopes, de origem não confirmada, dentro do núcleo, cujo produto são os corpos de oclusão, que se acumulam até estágios terminais de infecção. O inseto se liquefaz e morre, enquanto os corpos de oclusão protegem os ODVs na dispersão no ambiente e também de degradação proteolítica na morte da larva de inseto.

Neste ciclo de replicação, há a expressão de genes virais em quatro fases sequenciais: inicial e imediata, inicial atrasada, tardia e, por último, muito tardia. Os produtos das fases iniciais ativam os promotores para dar continuidade às demais. Os genes expressos de forma imediata não dependem de fatores de transcrição do baculovírus, visto a capacidade dos promotores em iniciar a transcrição nas células de inseto recentemente infectadas. Em seguida, os genes da fase inicial atrasada são transcritos, uma vez que dependem de fatores virais já existentes. Após a fase inicial, há replicação do dsDNA, a qual está diretamente associada a expressão de genes da fase tardia. Na última fase, são hiperexpressos os genes para formação dos corpos de oclusão (LIN; JARVIS, 2013).

2.3.2 Desenvolvimento de baculovírus recombinantes

O emprego de células de inseto transformadas por sistema de expressão de vetor baculoviral – BEVS, passou a se difundir numa tentativa de obter expressão proteica recombinante de alto rendimento, visto que esse sistema tende a mostrar maior resistência a estresse mecânico do que células de mamíferos, assim como exibem mais simples e barato manuseio e maior potencial produtivo (SCHMIDT, 2004). A maquinaria proteica e as modificações pós-traducionais possíveis também são semelhantes aos processos em células de mamífero, o que torna o sistema favorável para produção engenheirada de proteínas humanas. A figura 3 traz um comparativo entre o padrão de glicosilação oferecido por células de inseto, plantas e mamíferos. A ausência de hipermanosilação é uma vantagem quanto à produção de proteínas recombinantes em fungos. A propagação da técnica também ocorreu pela facilidade da construção de vetores baculovirais recombinantes, viável através de sistemas comerciais como o Bac-to-Bac®, tecnologia baseada em transposição, e FlashBac®, baseado em recombinação homóloga (ASSENBERG *et al.*, 2013). O sistema de expressão é bem aceito e consolidado no mercado, sobretudo pela produção comercial de vacinas humanas e de uso veterinário aliado à grande oferta de *kits* de expressão a conter vetores, meios de cultura, células mutantes, entre outros recursos para execução do processo de produção proteica (STOLT-BERGNER *et al.*, 2018).

Figura 3 – Comparativo entre a glicosilação de proteínas recombinantes em células de insetos, plantas e mamíferos



Fonte: construção da imagem baseada em Houdebine (2009).

Os BEVS também apresentam a vantagem de comportar insertos de grande extensão, os quais são expressos em complexos proteicos, visto o tamanho generoso do genoma de que dispõem. O meio de cultura sem soro descomplica as etapas de purificação de proteínas secretadas. Todavia, o processo produtivo é longo, com algumas semanas entre clonagem e expressão. Além disso, quando há necessidade de muitas modificações pós-traducionais não é viável para as células de insetos, o que invoca as técnicas de glicoengenharia (LEMAITRE *et al.*, 2019).

Quando se iniciou a exploração das células de insetos como opção na expressão de proteínas recombinantes, visto o conhecimento sobre a biologia desse sistema na produção de proteínas, notou-se que a infecção viral dessas células provocava alterações inconvenientes: alteração da via secretória e da integridade da membrana plasmática, com redução da produção proteica intracelular. A solução que surgiu foi a proposta de um sistema de expressão baseado em plasmídeos, inicialmente estabelecido em células de *Spodoptera frugiperda* (MCCARROLL; KING, 1997). Seguiu-se a evolução das técnicas e melhorias indicadas ao BEVS, tal qual o modo de geração dos atuais vetores baculovirais.

Os primeiros sistemas nasceram na década de 1980, pelos estudos de Smith e colaboradores (1983), ao explorar a recombinação homóloga entre o genoma viral e um vetor doador do inserto de interesse. Neles, um AcMNPV recombinante foi utilizado na expressão de interferon- β (IFN- β) humano, aproveitando-se do conhecimento sobre o ciclo de replicação em duas fases do vírus e de sua maquinaria de replicação. Os corpos de oclusão virais são recobertos por uma matriz proteica de poliedrina, a qual tende a se acumular em títulos elevados no citoplasma de *S. frugiperda*. Porém, o gene codificante dessa proteína não é essencial para dar existência a vírus infecciosos. Dessa forma, quando esse gene é inativado por inserção, um clone mutante incapaz de produzir o corpo de oclusão é criado. A enorme vantagem do gene da poliedrina é ter um promotor de expressão forte, o qual é capaz de induzir a transcrição após a inativação de grande parte dos genes da célula do inseto e do vírus. Com isso, é possível inserir um gene exógeno e obter altos níveis de expressão de proteína. O gene da poliedrina também oferece um marcador de seleção para os vírus recombinantes, pois as células não infectadas com vírus recombinantes dispõem morfologia visivelmente distinta das placas formadas. O sucesso da investigação foi confirmado com a obtenção de IFN- β humano recombinante biologicamente ativo, com glicosilação completa e remoção do peptídeo-sinal da extremidade amino-terminal. O promotor do gene p10 também é amplamente utilizado, visto seu alto nível de expressão na fase mais tardia da infecção celular.

Conquanto a produtividade proteica de um biofármaco de interesse humano fosse elevada, a taxa de formação de baculovírus recombinantes era muito baixa, o que tornava o isolamento muito laborioso pela repetição do processo de purificação das placas contendo os clones recombinantes. Melhorias foram realizadas, com a linearização do DNA viral no sítio de inserção do gene exógeno e o emprego de um vetor que inativa um gene essencial viral, o que aumentou as taxas de recombinação dos vírus a quase 100% (KITTS; POSSEE, 1993). O vetor baculoviral foi originalmente nomeado BacPAK6TM, mas há outros tipos de vetor de recombinação homóloga no mercado (MARTÍNEZ-SOLÍS; HERRERO; TARGOVNIK, 2019).

Uma grande ferramenta facilitadora do processo de desenvolvimento de vetores baculovírus recombinantes foram os bacmídeos (LUCKOW *et al.*, 1993). Esses bacmídeos, ou vetores de transporte alvos do processo, contêm um replicon de baixa cópia que permite a replicação autônoma e segregada de plasmídeos, um marcador de seleção por canamicina e um sítio de reconhecimento *attTn7* (para o transposon bacteriano de alta frequência de inserção) alocados no *locus* do gene da poliedrina. Usando um plasmídeo artificial carregando o sítio *attTn7* e marcadores de seleção, é possível inserir um gene heterólogo no bacmídeo explorando o mecanismo da recombinase Tn7. A expressão é regida pelo promotor baculoviral após a introdução do bacmídeo na célula de inseto escolhida. Uma vez que os bacmídeos já transportam todo o genoma do AcMNPV, o processo simplifica tanto a produção e seleção dos bacmídeos recombinantes quanto seu isolamento, por ser realizado em sistema bacteriano, ao mesmo tempo que propaga e otimiza a geração dos vetores baculovírus recombinantes após a transferência. O bacmídeo foi inicialmente comercializado pela Invitrogen (Bac-to-Bac®) e posteriormente foram criados bacmídeos oriundos de outras espécies de baculovírus (MARTÍNEZ-SOLÍS; HERRERO; TARGOVNIK, 2019).

As vantagens dessa abordagem são a boa definição genética dos vetores baculovírus recombinantes gerados, garantida pela transposição sítio específica e a simplicidade de realizar alterações no bacmídeo por métodos baseados em bactéria. Por outro lado, esse tipo de estratégia de bacmídeos é limitada a uso pré-clínico ou laboratorial pela instabilidade considerável dos vetores em células de inseto e por conter genes bacterianos e marcadores de seleção por antibiótico no genoma viral (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

Com isso, alternativas foram criadas ao longo dos anos. O sistema FlashBAC® (HITCHMAN; POSSEE; KING, 2009) permite a construção do vetor baculovírus recombinante diretamente na célula de inseto. O processo consiste na inserção do vetor

BacPAK6™ linearizado por restrição em um bacmídeo de baixíssima cópia. Ao recuperar o constructo, o DNA bacmídial não induz replicação de vírus infectante na célula de inseto. Para isso ser viável, deve ser preparada uma transfecção conjunta a um plasmídeo de transferência contendo o gene heterólogo e, dessa forma, ocorre a recombinação homóloga na célula de inseto. Todos os vírus gerados são recombinantes e não contêm os fatores bacterianos anteriormente citados, além de ser um processo que poupa tempo de trabalho.

O sistema MultiBac (BERGER *et al.*, 2013) tem sido usado na co-expressão de mais de uma proteína ou de complexos proteicos em células de insetos a partir de um único BEVS. Atualizações quanto a esse sistema e novos usos foram publicadas recentemente por Gupta *et al.* (2019). O MultiBac pode ser combinado ao OmniBac (THIMIRI GOVINDA RAJ; VIJAYACHANDRAN; BERGER, 2014), sistema no qual a construção de vetores baculovírus recombinantes usa os mesmos elementos de DNA a partir tanto de recombinação homóloga quanto bacmídeos (MARTÍNEZ-SOLÍS; HERRERO; TARGOVNIK, 2019). Outra abordagem é a do sistema Bac-2-the-Future (MEHALKO; ESPOSITO, 2016), o qual otimizou a tecnologia baseada em recombinase Tn7 do Bac-to-Bac® desde os vetores de expressão até os protocolos de trabalho, cuja consequência foi o aumento da eficiência global do processo de obtenção dos vetores baculovirais recombinantes. O tempo de trabalho foi reduzido e reduz custos, principalmente os gastos com meios de cultura seletivos, concomitantemente à manutenção da qualidade do produto recombinante alcançado.

Desde descoberta e do aumento da eficiência de recombinação, outros progressos foram realizados para o BEVS, especialmente quanto à glicosilação das proteínas, o que será debatido a seguir.

2.3.3 Avanços em engenharia genética em baculovírus e nas células hospedeiras

Bem como houve avanços tecnológicos na engenharia do genoma de baculovírus, houve investigação sobre os tipos de células empregados para aumento de produtividade em proteínas recombinantes. Um dos principais objetivos buscados é a melhoria no padrão de glicosilação das proteínas, entre outras modificações pós-traducionais.

Os sistemas de expressão de vetores baculovirais não são inicialmente aptos a realizar um volume extenso de modificações pós-traducionais em proteínas secretadas. Uma dessas modificações é a clivagem proteolítica para maturação final da proteína alvo, o que por vezes não é obtido em BEVS. A partir dessa desvantagem surgiu o FlexiBAC (LEMAITRE *et al.*, 2019), sistema no qual os vetores são modificados com ferramentas para aumento da

produtividade de proteínas recombinantes secretadas, inclusive para a clivagem proteolítica. É um sistema simples e confiável, especialmente para proteínas processadas por enzimas furino-convertase residentes no complexo de Golgi.

Outro fator importante na expressão de genes em vetores baculovirais são os promotores virais. É fato que muitos promotores, até mesmo os responsáveis pela expressão de genes iniciais, e combinações com potenciadores de DNA foram testados na tentativa de aumentar os níveis de expressão (MARTÍNEZ-SOLÍS *et al.*, 2016), mas os promotores da poliedrina e p10 ainda são os preferidos na produção de proteínas heterólogas (KOST; KEMP, 2016).

Para a produção das proteínas recombinantes, há duas limitações críticas: N-glicosilações menos complexas do que as presentes em proteínas humanas, o que culmina em menor estabilidade estrutural e perda de bioatividade; e morte celular por infecção baculoviral, um processo natural que pode causar degradação proteolítica do produto de interesse ou impedir sua maturação completa (MARTÍNEZ-SOLÍS; HERRERO; TARGOVNIK, 2019).

A N-glicosilação de proteínas em células de insetos é semelhante à de células de mamíferos, mas de menor complexidade. As estruturas predominantes são de paucimanose ou oligomanose, incomuns em mamíferos. Na maioria das células de lepidópteros e dípteros, não há a capacidade de transferência de alguns glicanos como galactose e o ácido siálico, o que pode comprometer a bioatividade do biofármaco, aumentar o seu *clearance* no organismo humano e induzir potenciais reações alergênicas. Acredita-se que muitas das glucotransferases essenciais restrinjam-se a alguns tecidos ou fases de desenvolvimento do inseto, já que genes inativos para essas enzimas foram detectados. Na expressão recombinante em BEVS, a progressão da infecção celular por baculovírus aumenta o número de transcritos, o que pode afetar funções de enzimas de glicosilação. Além disso, o volume aumentado de produtos recombinantes, especialmente os obtidos com o promotor poliedrina, tendem a afetar a capacidade de glicosilação de proteínas (HARRISON; JARVIS, 2006). As soluções para as limitações da glicosilação foram propostas por glicoengenharia e são sugeridas por Palomares *et al.* (2018). Para citar algumas dessas ideias, há a possibilidade de expressão de glicotransferases cujos genes foram vinculados a promotores no genoma baculoviral, linhagens mutantes de Sf9 capazes de expressar glicotransferases, silenciamento de expressão de N-acetilglicosaminidase (GlcNAcase, responsável por remover um resíduo de N-acetilglicosamina do terminal proteico e formar a estrutura paucimanose), inibição da via de síntese *de novo* de α -1,3-fucose em células High-FiveTM, entre outras. As mudanças efetuadas,

no entanto, não garantem que a totalidade de proteínas recombinantes não contenha estruturas em paucimanose.

Quanto à morte celular, é possível manipular o genoma do baculovírus a fim de minimizar efeitos desfavoráveis à expressão de proteínas recombinantes, como a remoção de genes codificantes para enzimas proteolíticas e de liquefação da larva do inseto. Por outro lado, outros genes podem ser inseridos para trazer efeitos positivos para a expressão recombinante, como o atraso da lise celular ou inibição da apoptose, o que resulta em mais tempo para produção da proteína heteróloga (MARTÍNEZ-SOLÍS; HERRERO; TARGOVNIK, 2019).

2.3.4 Principais tipos de células de insetos e biofármacos comerciais

Das células de inseto empregadas na expressão de proteínas recombinantes, algumas são destinadas à produção de biofármacos. As células de mariposas e borboletas (ordem Lepidoptera) e as moscas (ordem Diptera) são utilizadas com maior frequência. No primeiro tipo, é possível a expressão com baculovírus recombinantes contendo o gene da proteína alvo ou o uso de plasmídeos específico para a espécie de inseto explorada. As principais espécies utilizadas são *Spodoptera frugiperda* (Sf21, Sf9, Sf900+), *Trichoplusia ni* (TN-368, High-Five™) e *Bombyx mori* (Bm-N). Quanto aos dípteros, não há tendência à infecção por baculovírus, portanto os métodos para expressão recombinante têm origem em plasmídeos específicos ou transdução com bacmídeos. As células mais rotineiramente usadas são da mosca *Drosophila melanogaster* (S2, S2R+) (GEISLER; JARVIS, 2018).

As três principais células e mais vantajosas são Sf9, Sf21 e High-Five™. Apresentam bom crescimento tanto em cultura fixa quanto em suspensão, além de capacidade de adaptação para outros tipos de meio. As células Sf9 e Sf21 são mais produtivas pois são capazes de maior multiplicação e densidades celulares altas são obtidas nas mesmas condições que High-Five™, ainda que nesta última as concentrações de proteínas recombinantes relativas sejam superiores (CONTRERAS-GÓMEZ *et al.*, 2014). No geral, células Sf9 são mais convenientes para biofármacos, pois as células High-Five™ produzem *N*-glicosilações com α -1,3-fucose, ausente em mamíferos e, por conseguinte, há maior potencial alergênico na ausência de propostas de glicoengenharia (PALOMARES; SRIVASTAVA; RAMÍREZ; COX, 2018)

Na indústria de biofármacos, encontram-se dois produtos de origem de BEVS comercialmente disponíveis para uso humano, enquanto há outros apontados para a medicina veterinária (YEE *et al.*, 2018). Vale destacar o Cervarix®, uma vacina baseada em VLP (*virus like particle*) para a prevenção de câncer cervical, construída a partir da proteína L1 do HPV

(papilomavírus humano) purificada de células High-Five™. O BEVS é vantajoso e deve ser explorado para um maior número de vacinas de VLPs, uma vez que a manipulação dos promotores virais permite o direcionamento temporal da expressão das proteínas do VLP (KOST; KEMP, 2016). Há ainda uma vacina quadrivalente de subunidade para prevenção contra Influenza produzida em células Sf9, a Flublok®, para a qual a proteína hemaglutinina viral é expressa.

Outros dois produtos biofarmacêuticos foram desenvolvidos em células de inseto e vendidos comercialmente, mas retirados de circulação em algumas regiões visto o alto custo ou demanda limitada (WALSH, 2018). Provenge® é uma terapia celular contra câncer de próstata, também usualmente chamada de “vacina terapêutica” na qual a enzima fosfatase ácida prostática é purificada de células Sf21, mas saiu de linha na União Europeia em 2015. O último biofármaco é o Glybera®, uma terapia gênica na qual um vetor adenoviral, desenvolvido em células Sf9, entrega o gene para expressão de lipase lipoproteica (LPL) para pacientes com deficiência dessa enzima. Foi descontinuado na União Europeia em 2017.

Por último, no contexto da pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2), existe o desenvolvimento de uma vacina de nanopartículas, chamada NVX-CoV2373 (Novavax, Inc), na qual a proteína S (*Spike*) do vírus foi otimizada para expressão em sistema vetor baculovírus-células Sf9 (KEECH *et al.*, 2020). O estudo clínico, atualmente em fase III no Reino Unido, se bem-sucedido, pode reforçar a importância do BEVS na produção de biofármacos e expandir esse mercado.

2.4 Sistemas de expressão de células de mamíferos

As células de mamíferos constituem o principal sistema de expressão de biofármacos. Enquanto inicialmente apenas vacinas contra vírus e algumas outras proteínas terapêuticas foram produzidas nesse sistema, a diversificação dos produtos disponíveis ocorreu como consequência dos avanços em tecnologias moleculares e genéticas (BIRCH; FROUD, 1994) e desde então, as células de mamíferos predominam na produção de proteínas recombinantes, principalmente proteínas de maior complexidade (GOH; NG, 2018).

O grande benefício das células de mamíferos são as vias metabólicas de modificações pós-traducionais, as quais permitem a expressão das proteínas na forma nativa ou muito mais próximas aos padrões humanos do que qualquer outro sistema, e também permitem a montagem de complexos proteicos multiméricos. A capacidade de secreção das proteínas expressas também é outra vantagem notável. É evidente que sistemas microbianos como *E. coli* e

leveduras são vantajosas em muitos aspectos em relação aos sistemas de células de mamíferos (baixo custo na definição de uma linhagem para a expressão, ampla disponibilidade de ferramentas moleculares, ciclo produtivo rápido e facilmente controlável, maior produtividade em gramas por litro de cultura), mas a ausência de glicosilação e outras modificações corretas é um fator limitador para a qualidade na expressão correta de muitas proteínas de interesse terapêutico. Por isso, as células de mamíferos são as mais exploradas na produção de proteínas recombinantes com objetivo terapêutico, tal qual as células de ovário de hamster chinês (CHO), células do tipo linfoblastoide do mieloma murino (NS0 e Sp2/0-Ag14), células embrionárias 293 de rim humano (HEK-293) e células de rim de hamster bebê (BHK-21) (ZHU, 2012). A linhagem CHO é a mais notável e de maior uso na produção de biofármacos.

O alto custo para expressar proteínas recombinantes em uma célula de mamífero somado às dificuldades de manter um sistema operacional com recursos humanos qualificados para monitoramento do processo traziam baixas expectativas para o rendimento produtivo. Para consolidação da plataforma, os resultados positivos de bom rendimento de obtenção de proteínas recombinantes envolvem uma combinação de alguns elementos, a saber: o estabelecimento de uma linhagem celular de expressão, o protocolo de transfecção, as características do vetor de expressão e as condições de cultura, sendo que estas últimas são extremamente sensíveis para o sucesso na produção proteica nesse tipo celular (DYSON, 2016). A definição das condições de cultura é complexa, exige muitos nutrientes e a variação de pH e oxigenação do meio (por exemplo, por acúmulo de lactato), são críticas para manter viáveis as células para o processo de produção de proteínas, que deve ser acompanhada de forma mais rigorosa do que outros sistemas de expressão. A contaminação da cultura por vírus animais também é um aspecto negativo das células de mamíferos no contexto de produção de biofármacos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

A expressão proteica nessas células pode ocorrer de forma transiente ou estável, as quais apresentam suas particularidades.

2.4.1 Expressão transiente e estável em células de mamíferos

Tanto na expressão genética transiente quanto na estável, há inserção (ou transfecção) de um ou mais genes heterólogos em uma célula. No caso da expressão transiente, esse processo ocorre de forma temporária. O DNA plasmidial não se integra ao genoma do hospedeiro e após divisões celulares, as várias cópias desse material genético se diluem e o gene não é mais expresso. A viabilidade da produção da proteína recombinante é de uma a duas semanas após

a transfecção, com a duração total do processo esperada para até um mês. A técnica promove a obtenção de proteínas até na grandeza de gramas por litro (g/L) em laboratórios, sem necessidade de recursos específicos. A flexibilidade na escolha de plasmídeos para a expressão de um gene de interesse também é uma vantagem da expressão transiente. Esse tipo de expressão é uma abordagem para a produção de proteínas tóxicas à célula de escolha, as quais se tornariam inviáveis como plataforma caso o gene fosse expresso de forma estável (constitutiva). Na expressão genética estável, o gene heterólogo é inserido no genoma da célula de mamífero. A seleção dos clones recombinantes é laboriosa, requer equipamentos complexos e pode consumir muitos meses até a consolidação da produção da proteína. Por outro lado, a estabilidade genômica do inserto garante maior produtividade, o que é um atrativo para um aumento de escala. (GUTIÉRREZ-GRANADOS *et al.*, 2018). Uma aplicação da expressão transiente é a avaliação de biofármacos para estudos clínicos, uma vez que a qualidade do produto é suficiente e sua obtenção é mais rápida do que na expressão estável, apesar de os títulos gerados serem pequenos (HUNTER *et al.*, 2019).

A fim de aumentar a eficiência da expressão transiente, é interessante aumentar a eficiência de DNA transfectado. A transfecção é usualmente feita por eletroporação ou por uso de um reagente complexante de DNA adequado, como polietilenoimina (PEI), lipídios catiônicos e fosfato de cálcio (CaPi). Essas moléculas podem auxiliar o plasmídeo a se translocar do citoplasma ao núcleo para que a expressão ocorra. Ao se pensar nessa necessidade de transporte para o núcleo, também são usados vetores virais capazes de infectar células de mamíferos com ou sem integração aos cromossomos do hospedeiro. Vírus como o adenovírus, lentivírus e vírus vaccínia foram modificados para a entrega do gene de interesse e suportar a expressão proteica recombinante. Uma vez que a eficiência de transdução desses vírus é alta, o aproveitamento de seu ciclo de replicação é uma segunda via quanto ao uso de plasmídeos (HARTLEY, 2012).

No entanto, o uso de vírus que infectam células de mamíferos está relacionado a problemas de segurança dos biofármacos produzidos, visto o risco à saúde. Quanto a essa limitação, os vetores virais podem ser editados para eliminar sua patogenicidade em humanos ou vetores de outros vírus podem ser buscados, tal qual os vetores de expressão baculovirais, os quais são construídos com sequências regulatórias de mamíferos para a entrega de genes heterólogos para a expressão. Os chamados vírus BacMam têm baixíssima toxicidade para a célula de mamífero utilizada, baixo risco biológico e reprodutibilidade em diversos tipos celulares. A expressão transiente é a técnica acoplada aos BacMams, com uso de promotores

virais ou não virais e tem um excelente potencial de produção de proteínas recombinantes. Em células HEK-293, por exemplo, os BacMams não se replicam, o que mantém a célula viável, uma vantagem em relação aos BEVS em células de inseto (KOST; KEMP, 2016).

Em relação à construção de vetores de expressão para células de mamíferos, além de possuírem os elementos básicos (promotor, sítio de múltipla clonagem, região não traduzível na extremidade 3' contendo uma sequência de poliadenilação), podem ser modelados com elementos potenciadores, marcadores de seleção, origens de replicação, íntrons, entre outros componentes que sejam coerentes com o propósito do *design* do vetor e com o sistema alvo, além de garantir níveis elevados e estáveis de transcrição a RNA mensageiro. Entre os promotores, aqueles de origem viral são comuns e de alta força de expressão, tal qual o do vírus símio (SV40) e do citomegalovírus (CMV). Os promotores não virais, como o EF1 α (do inglês, fator de alongamento humano) e o CAG (híbrido) também são empregados na expressão de proteínas recombinantes (HUNTER *et al.*, 2019).

2.4.2 Linhagens celulares e otimização da expressão proteica

As células de ovário de hamster chinês (CHO) são as mais importantes na produção de biofármacos de uso humano. As proteínas produzidas apresentam padrões de glicosilação muito similares aos humanos, o que garante a bioatividade e compatibilidade necessárias para o uso terapêutico. Dessa forma, as células CHO destacam-se na produção de anticorpos, proteínas envolvidas no equilíbrio da coagulação sanguínea, hormônios e outras glicoproteínas. Um entrave dessas células é a ausência de poucos tipos de glicosilação de células humanas (como a α -2,6-sialização) e geração em baixas concentrações de glicanos também incomuns aos humanos (terminações em α -galactose ou ácido N-gliconeuramínico), cuja consequência é uma possível resposta imunogênica contra o biofármaco. Outra limitação é o processamento proteolítico, o qual não é feito de forma completa e pode ser imprescindível para maturação e atividade biológica da proteína recombinante (LALONDE; DUROCHER, 2017).

Por outro lado, são células menos suscetíveis a contaminação por vírus humanos, portanto, as preocupações relativas à biossegurança são mitigadas em uma larga escala de produção, para a qual a cultura celular em suspensão livre de soro tem alta densidade e produtividade aceitável para comercialização dos produtos e pode ser adaptada a diferentes composições de meio de cultura, o que são atributos muito positivos e ainda não alcançados por outros tipos de células de mamíferos. O grande inconveniente da cultura CHO e de outras células de mamíferos é o tempo de seleção dos clones recombinantes positivos com as

características de expressão desejadas, contra as quais o desvio pleiotrópico é uma adversidade comum. Logo, uma área de interesse para otimização da expressão de proteínas recombinantes é a estabilidade dos clones recombinantes positivos, junto a avanços no preparo de meios de cultura, modos de produção e processamento *downstream* (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014). A glicosilação de células CHO também é alvo de melhorias, com aplicação de técnicas moleculares para aumentar ou diminuir a ligação de um determinado glicano à proteína recombinante. Isso pode ser feito pela supressão ou indução de genes, superexpressão de enzimas como sialotransferases ou inibição de sialidases, o que preserva a ligação de ácido siálico ao sítio terminal da proteína e reduz seu *clearance* no organismo, visto que não haverá reconhecimento de galactose terminal pelos hepatócitos. O impedimento da adição de alguns tipos de glicanos, tal qual a fucose, também pode reduzir a incidência de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e, conseqüentemente, a imunogenicidade do biofármaco (HEFFNER *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços para amenizar os empecilhos das células CHO, a produção de proteínas recombinantes também se vale de células de origem humana, com boas perspectivas futuras. Outras células não humanas como BHK, NS0 e Sp2/0-Ag14 também são importantes na produção de biofármacos, mas não tanto quanto as células CHO devido a maiores dificuldades relacionadas a modificações pós-traducionais. Portanto, há um potencial a ser aproveitado das células humanas, tais quais as células embrionárias de rim humano (HEK-293). Essas células apresentam o benefício de altas taxas de transfecção sem necessidade de reagentes complexos (uso de PEI é viável), produtividade alta de proteínas para uma célula de mamífero, facilidade escalonamento da cultura em suspensão com alta densidade celular e metabolismo flexível passível de manipulação genética. Além disso, o mais importante é que todas as modificações pós-traducionais humanas são possíveis, logo, as proteínas recombinantes obtidas, tanto as secretadas quanto as de membrana, são muito próximas às naturalmente produzidas no organismo humano. (HU *et al.*, 2018). Os fatores de coagulação são os principais biofármacos de origem de HEK-293 (WALSH, 2018), mas são células também favoráveis para produção de vetores adenovirais recombinantes para vacinas.

Devido à facilidade de cultura e tempo menor para obter quantidades significativas de proteína recombinante se comparado às células CHO (entre cinco a sete dias de cultura para HEK-293 contra dez a quatorze dias para CHO), as células HEK-293 são bem difundidas em pesquisas em laboratório para a expressão gênica transiente (ARENA; HARMS; WONG, 2018). Linhagens derivadas de HEK-293 foram geradas para aumentar a estabilidade do

plasmídeo episomal na expressão transiente, o que, por conseguinte, tende a aumentar a produção de proteínas recombinantes (HEK-293T, por exemplo). A adaptação ao meio de cultura também é possível em linhagens HEK-293F FreeStyle™, as quais conseguem crescer em suspensão em alta densidade, sem necessidade de substituição do meio de cultura após a transfecção (NETTLESHIP *et al.*, 2015).

A produção de anticorpos, *virus-like particles* (VLPs) e outras proteínas recombinantes foi alcançada em escala laboratorial utilizando-se HEK-293 (DYSON, 2016). Deste modo, há uma grande expectativa pela origem de novos biofármacos comerciais a partir dessas células e outras de origem humana, embora a maioria dos produtos ainda sejam oriundos de células CHO.

2.5 Organismos transgênicos superiores

O último sistema para produção de biofármacos disponível a ser citado neste trabalho é o dos organismos transgênicos superiores, dentre os quais se destacam os animais e plantas. Em síntese, são seres vivos que apresentam integrado ao seu genoma por ação humana um *transgene* (WALL *et al.*, 1997), ou seja, um material genético oriundo de outro organismo. O transgene para a proteína recombinante pode ser passado aos descendentes da espécie animal. A implantação desse gene pode se dar tanto no estágio embrionário quanto por terapia gênica. No caso de plantas, a transformação genética pode ser executada por métodos físicos ou biológicos, para os quais o transgene tem destinação final integrada ao DNA cromossomal (expressão estável) ou é expresso de forma transiente em um plasmídeo independente do genoma vegetal.

2.5.1 Animais transgênicos

O uso de animais transgênicos para geração de produtos recombinantes teve início seis anos após a aprovação da insulina recombinante para uso terapêutico (RUDOLPH, 1999). O interesse por esse sistema de expressão está relacionado com as limitações ao uso de bactérias para produção recombinante, as quais foram rapidamente evidenciadas (HOUDEBINE, 2009). Em relação aos outros sistemas, os animais transgênicos dispõem de alta qualidade de proteínas produzidas em baixo custo, ainda que a purificação tenha complexidade considerável. É um processo trabalhoso, principalmente em consequência da baixa eficiência em produzir o organismo transgênico iniciador, mas torna viável a produção de biofármacos.

Inicialmente, os animais transgênicos foram utilizados como modelo de estudo para doenças e alterações genéticas, distúrbios da homeostase e de melhoramento genético na agropecuária, entre outras aplicações (WALL *et al.*, 1997). Todavia, há também a aplicação de

diferentes espécies de animais como biorreatores para produção de biofármacos, com destaque para o leite como a plataforma mais adequada em termos de produtividade. Essa percepção se dá uma vez que sua produção abundante e purificação são mais acessíveis, além de as glândulas mamárias serem células especializadas na síntese de proteínas, com ainda mais uma vantagem da proximidade evolutiva de outros mamíferos com humanos, o que torna a estrutura proteica mais semelhante à humana quando comparada a outros sistemas de expressão (BERTOLINI *et al.*, 2016).

Além do sistema de expressão em células de mamíferos, os animais transgênicos são uma escolha viável para produção de proteínas com modificações pós-traducionais complexas, as quais os demais sistemas não dispõem da maquinaria celular ou elementos suficientes para prover o biofármaco de interesse na forma ativa (BÖSZE; BARANYI; WHITELAW, 2008). Após a expressão do primeiro produto recombinante, a antitrombina, foi possível expressar anticorpos, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, enzimas e um amplo espectro de biofármacos (OWCZAREK; GERSZBERG; HNATUSZKO-KONKA, 2019).

A indústria biofarmacêutica esperava que mais produtos atingissem o mercado, e ainda são aguardados resultados robustos com emprego da edição gênica com o mecanismo de Crispr-Cas9, porém não houve obtenção viável em larga escala nesses sistemas de expressão e os investimentos financeiros foram reduzidos. Posto que os problemas técnicos de controle do número de cópias do transgene e da integração aos cromossomos do hospedeiro são recorrentes, poucas propostas atingiram saldo positivo para comercialização (WALSH, 2018). Soma-se ao malogro desse sistema o debate ético do uso de animais para atender a uma necessidade humana que pode ser suprida nos demais sistemas (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Há algumas plataformas nos animais transgênicos para produção de proteínas terapêuticas. Antes de evidenciá-las, convém conhecer os métodos de geração de animais recombinantes. Logo, também será possível estabelecer uma relação dessas plataformas com os principais biofármacos presentes no mercado.

2.5.1.1 Métodos para criação de animais transgênicos

A geração de um animal transgênico tem início com o desenvolvimento de uma estrutura de DNA para o direcionamento para a expressão no tecido alvo, a fim de evitar efeito adversos danosos em outros tecidos do animal. A especificidade pode ser obtida pelo uso de promotores de genes específicos do tecido em que a proteína será traduzida, com a presença opcional de outros elementos de regulação quando adequado. Em seguida, ocorre a escolha da espécie

animal que servirá como biorreator. O DNA idealizado anteriormente será aplicado em uma espécie animal viável, com base na análise da capacidade produtiva da espécie ao longo do tempo, assim como seus custos de manutenção (BÖSZE; BARANYI; WHITELAW, 2008).

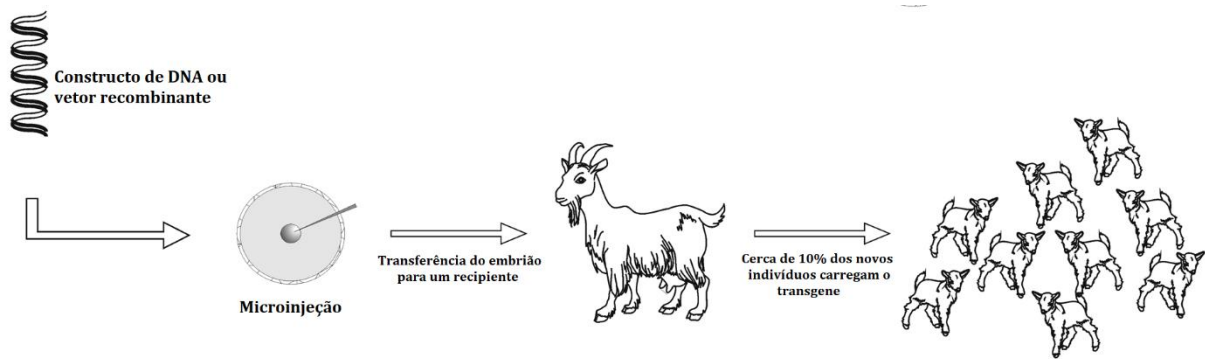
Para a construção de um vetor de expressão recombinante para animais transgênicos, é necessária uma extremidade 5'- com um promotor separado de seu potenciador (específico ao tecido em que se dará a expressão) por éxons e íntrons não codificantes. Há também uma região terminal 3'- não traduzível para conter os últimos éxons e íntrons, além de elementos como sítios de poliadenilação e terminação da transcrição (MAKSIMENKO *et al.*, 2013). Enquanto a região regulatória coordena o momento e a quantidade de gene a ser expresso, além de promover também a especificidade ao tecido de interesse, a região estrutural apresenta o código para o produto buscado, cuja transcrição é regida pela região reguladora. O promotor de expressão pode ser utilizado de acordo com a plataforma e espécies em que a proteína será produzida, mas também tem eficiência definida junto ao número de pares de bases do inserto. Em bovinos, por exemplo, promotores derivados de caseína são recomendados para genes entre 3,1 e 14,2 kb (MONZANI *et al.*, 2016). O emprego de vetores com esse tipo de promotor também foi bem sucedido para considerável expressão de biofármacos em leite de cabras (MAKSIMENKO *et al.*, 2013), mas outros promotores como lactoglobulina em ovelhas e proteína ácida em roedores são também possíveis.

Associado ao promotor, uma longa cadeia estrutural de DNA genômico contendo o promotor beneficia a expressão de cDNA exógeno. Portanto, para a maior eficiência de um constructo, a presença de íntrons pode potencializar a expressão e elementos de isolamento para posicionar os promotores (HOUEBINE, 2009), mas sua presença não é obrigatória. O principal vetor de expressão para animais transgênicos é o pBC1 da Invitrogen (MAKSIMENKO *et al.*, 2013).

De acordo com Houbedine (2009), há basicamente seis métodos para se criar um animal transgênico, os quais serão explicados de forma sucinta a fim de não fugir ao escopo do trabalho. O primeiro é a microinjeção do DNA nos pró-núcleos do embrião da espécie de interesse diretamente, como exemplifica a figura 4. É uma metodologia pouco frutífera para algumas espécies como as de ruminantes, visto que uma baixa porcentagem dos novos indivíduos gerados contém o transgene, mas são alcançados bons resultados em outras espécies de mamíferos como camundongos e coelhos e também em peixes. A adição de genes exógenos é possível em vetores lentivirais e transpósons para aumento da frequência de integração do DNA. No primeiro, o gene exógeno é envolvido pelo vetor lentiviral para posterior inserção no

embrião ou ovócito, numa região entre sua membrana e a zona pelúcida. Foram obtidos resultados positivos em porcos e ruminantes. Os transpósons carregando o gene de interesse, por sua vez, são adicionados por microinjeção a um pró-núcleo.

Figura 4 – Esquema para a produção de animais transgênicos a partir do método de microinjeção de DNA em pró-núcleos de embrião.



Fonte: adaptado e traduzido de Maksimenko *et al.* (2013). Material de acesso aberto sob licença CC BY-NC-ND disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Há ainda a transferência de DNA através de esperma, método no qual este material biológico tem sua membrana rompida, seguido de incubação junto ao DNA recombinante para posterior utilização da técnica de injeção intracitoplasmática para fertilização de ovócitos. Há aplicação do método usualmente em camundongos e porcos. O quinto método consiste na transferência de DNA com uso de células pluripotentes. Com a inserção do DNA contendo o transgene em linhagens dessas células, é possível a formação de animais quiméricos com a aplicação das células pluripotentes em embriões prematuros de camundongos. Emprego de outras espécies está em estudo, mas essa limitação e a dificuldade de trabalho com a técnica restringem o uso para apenas experimentação e direcionamento/*knockout* de genes. O último método trata da clonagem, na qual a recombinação homóloga promove tanto a adição de genes quanto o direcionamento para sítios de maior tendência de expressão do fragmento exógeno, além de viabilizar o *knockout* de outros genes. É empregado em ruminantes e porcos. Há outros métodos de produção de animais transgênicos, porém a discussão será mantida aos que foram mencionados.

2.5.1.2 Plataformas de expressão e biofármacos comerciais

Ainda que o leite seja a plataforma mais desejável para a expressão de biofármacos em animais transgênicos, como já foi observado, laboratórios e indústrias empenham-se no sentido de diversificação de plataformas e espécies animais para tornar viável a produção de mais

proteínas terapêuticas (WANG *et al.*, 2013). As plataformas serão destacadas a seguir, com suas vantagens e desvantagens.

Leite – é o meio mais adequado em virtude do vasto volume obtido em curtos períodos de tempo. A produção de proteína terapêutica pode atingir com certa tranquilidade a unidade de algumas gramas por litro em animais como vacas, bodes, ovelhas, coelhos e porcos. O insucesso dessa plataforma é comum em função do conhecimento limitado sobre a secreção e maturação das proteínas terapêuticas e de possíveis efeitos adversos ao animal como consequência da absorção e distribuição do biofármaco ativo (WANG *et al.*, 2013). As glândulas mamárias das espécies empregadas proveem à proteína modificações pós-traducionais com um padrão bem próximo ao humano (BERTOLINI *et al.*, 2016). Nessa plataforma, há dois produtos comerciais disponíveis (WALSH, 2018): antitrombina humana recombinante (ATryn®) produzida em leite de cabra, cujo emprego se dá no tratamento de deficiência hereditária de antitrombina, e inibidor de C1-esterase humano recombinante produzido em leite de coelhos (Ruconest®), o qual é usado por pacientes com acometimentos agudos de angioedema hereditário. O curto tempo para formação de uma nova prole de coelhos e elevada produção de leite também são vantagens na entrega do Ruconest® (DALRYMPLE; GARNER, 1998).

Sangue – não é uma plataforma ideal. Os efeitos adversos para o animal pela produção de biofármacos são mais acentuados (HOUDEBINE, 2009) e não há ampla capacidade de armazenamento do produto de forma estável e a purificação é complexa. O processo de coleta do sangue é desagradável ao animal e pode colocar sua vida em risco junto aos efeitos deletérios da droga produzida (WANG *et al.*, 2013). Porém, esse fluido é considerado para a produção por causa de sua capacidade em coletar e transportar secreções de inúmeros tecidos animais. Até o momento da conclusão deste trabalho, não houve conhecimento produtos biofarmacêuticos de origem do sangue de animais transgênicos disponíveis no mercado para uso humano.

Ovos – é uma plataforma de interesse, uma vez que cada galinha é capaz de prover numerosos ovos, com elevada concentração de proteína recombinante, a qual pode atingir 4 g por ovo (WANG *et al.*, 2013). Em relação a produtos comerciais, existe a lipase ácida lisossomal humana recombinante ou alfassebelipase (Kanuma®) para reposição em pacientes com deficiência dessa enzima (WALSH, 2018). A vacina contra Influenza H5N1, a qual contém fragmentos proteicos virais, também é um produto gerado em ovos embrionados.

Urina – é uma alternativa ao sangue para redução dos efeitos nocivos à saúde do animal. A produção de biofármacos no urotélio também pode promover a maturação proteica mais aceitável quando comparado ao leite, além de a urina passar a ser secretada com maior antecedência do que leite na vida de mamíferos (WANG *et al.*, 2013). No entanto, a eficiência de secreção proteica na urina é baixa (BERTOLINI *et al.*, 2016) e não são encontrados produtos comerciais disponíveis a partir desta origem.

Líquido seminal – em espécies de suínos, em que esse fluido é farto, a fácil coleta torna a plataforma como uma alternativa a se considerar para obtenção de biofármacos (WANG *et al.*, 2013). Outra característica é a secreção proteica que atende apenas a via exócrina, num tecido que favorece a estabilidade e purificação da proteína terapêutica, mas também não afeta a integridade fisiológica do animal. É desconhecido, porém, o desfecho à fertilidade do animal na presença de biofármacos no sêmen, tal qual as consequências de secretar proteínas de alta complexidade no sêmen (BERTOLINI *et al.*, 2016). Produtos comerciais também estão indisponíveis.

Outras plataformas estão em estudo, como o casulo do bicho-da-seda e muco produzido por espécies de peixes (WANG *et al.*, 2013). Visto a baixa quantidade de proteínas terapêuticas aprovadas derivadas de animais transgênicos, o estabelecimento de uma plataforma confiável, reprodutível e de razoável custo benefício pode proporcionar uma nova oportunidade para animais transgênicos no mercado biofarmacêutico, superando as adversidades técnicas comuns a esse sistema (WALSH, 2018).

2.5.2 Plantas transgênicas

As plantas são o outro grupo de organismos transgênicos com viabilidade para produção de biofármacos, as quais foram exploradas a fim de superar as deficiências existentes nos sistemas procariotos. É um sistema bastante vantajoso, que oferece alto potencial para expressão de proteínas (ainda que não seja completamente viável) a um baixo custo operacional e logístico e baixo risco de contaminação por patógenos (FAHAD *et al.*, 2015), além de proporcionar alta capacidade de escalonamento, ainda que existam diferenças no padrão de glicosilação das proteínas e outras limitações (LOH; GREEN; YUSIBOV, 2017) relacionadas à purificação e tempo de produção.

Ao contrário dos animais transgênicos, a expressão recombinante em plantas pode ocorrer em todos os seus tecidos. Por outro lado, pode também ser direcionada apenas a partes específicas, como folhas, raízes e sementes, ou em uma cultura celular. (DIRISALA *et al.*,

2017). Esse direcionamento é consequência do uso das plantas transgênicas para objetivos específicos em pesquisa envolvendo DNA recombinante, o que impediu a determinação de uma espécie padrão para uso comercial (SCHILLBERG *et al.*, 2019) e, consequentemente, dispersou os estudos e suporte financeiro para a otimização da produção de produtos biofarmacêuticos na indústria.

O armazenamento das proteínas no citoplasma da célula vegetal é um aspecto negativo do uso de plantas transgênicas por elevar o risco de degradação devido à atividade aumentada de proteases (DIRISALA *et al.*, 2017). Uma alternativa viável é o uso do cloroplasto como maquinaria proteica e armazenamento do produto, principalmente em plantas superiores, em que essa organela permite alto nível de expressão, integração sítio-específica do inserto e herança materna desse DNA recombinante a partir da transformação genética (LIN *et al.*, 2018).

O tabaco, *Nicotiana tabacum* L., foi o primeiro vegetal superior a apresentar resultados positivos de expressão proteica após transformação em cloroplasto, ainda na década de 1990 (SCOTTI; CARDI, 2014). Há um número limitado de espécies em que esta técnica foi proveitosa, e também há dificuldade em executar as modificações pós-traducionais necessárias (LOH; GREEN; YUSIBOV, 2017). Para examinar essas dificuldades expostas, a seguir serão discutidas as estratégias para expressão recombinante em plantas e opções de contornar os contratempos.

2.5.2.1 Expressão transiente e expressão estável

Para que a expressão de uma DNA exógeno em plantas obtenha êxito, uma série de fatores deve ser observada. Os componentes da modificação gênica, como a sequência codificante e promotores, o pH da célula vegetal, o engenho dos mecanismos de transcrição e tradução da planta utilizada, disponibilidade de aminoácidos, interação entre o produto recombinante e as proteínas da célula são notáveis para alcançar a expressão esperada, ainda que agentes desconhecidos tenham influência nos resultados (FAHAD *et al.*, 2015).

A expressão pode se dar de duas formas, tal qual de células de mamíferos, mas com algumas diferenças: transiente ou estável. Na expressão gênica transiente, o inserto faz parte de um plasmídeo contendo DNA de transferência (T-DNA), que é transcrito de forma independente do genoma. Apesar de não ser executável em uma suspensão celular vegetal, apresenta as vantagens de um curto período de tempo de processo de produção da proteína em poucos dias e de também ser um método que não é afetado pelo efeito de posição de uma transposição cromossomal (ROZOV; DEINEKO, 2019). O vetor recombinante não é herdado

pelas células-filhas, o que exige uma otimização da síntese proteica para tornar o processo globalmente viável (LOMONOSSOFF; D'AOUST, 2016), porém ameniza um potencial problema de biossegurança que é a dispersão de pólen e sementes transgênicos, os quais podem gerar um desequilíbrio ambiental (DONINI; MARUSIC, 2019) e expor não intencionalmente espécies de animais e microrganismos aos genes e permitir sua transmissão horizontal (OBEMBE *et al.*, 2011).

A expressão transiente pode usar vírus de vegetais de RNA fita simples, tais quais *cowpea mosaic virus* (CPMV), vírus X da batata e vírus do mosaico do tabaco, a partir da exploração de sua função de infectar esse tipo de organismo. Esse enfoque não prosperou pois não havia estabilidade viral ao comportar insertos genéticos de grande número de pares de bases (LOH; GREEN; YUSIBOV, 2017). Uma segunda geração de vetores virais foi estudada, os “vírus desconstruídos”, os quais dispõem apenas de elementos essenciais para contornar as limitações anteriores. Essa nova proposta alavancou a técnica de magnificação, a qual obteve sucesso na expressão de biofármacos em elevadas taxas (DONINI; MARUSIC, 2019).

A abordagem mais consistente utiliza a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* para infiltração do constructo genético que carrega no tecido vegetal. Os plasmídeos utilizados contêm sítios de múltipla clonagem, região para um promotor forte, genes marcadores de seleção celular e elementos de replicação para armazenamento e transformação em *E. coli* e *A. tumefaciens*. A infiltração se dá com a permeação da bactéria em solução entre os espaços intercelulares das células vegetais, pela injeção a vácuo (DONINI; MARUSIC, 2019). Lomonossoff e D'Aoust (2016) destacam a espécie de tabaco selvagem *Nicotiana benthamiana* como um exemplar usual para expressão transiente, sendo observadas suas características de suscetibilidade a infiltração, rápido crescimento da planta e baixa tendência a silenciamento de RNA.

O outro método de expressão, estável, consiste na incorporação da sequência de interesse ao DNA cromossomal da célula vegetal, transferindo-o entre as gerações, tal qual nos animais transgênicos. O T-DNA é direcionado ao núcleo ao utilizar da técnica com *A. tumefaciens* ou do bombardeamento de microprojéteis contendo o constructo. No entanto, o direcionamento para transformação nuclear tem os riscos de silenciamento do gene de interesse e integração aleatória, a qual pode influenciar em efeitos de posição no inserto (GORANTALA *et al.*, 2011) e deixá-lo sobre a influência de uma sequência reguladora não prevista ou ter sua expressão afetada por novos genes.

Uma alternativa já discutida é o direcionamento da expressão para o cloroplasto. A recombinação das sequências de flanqueamento do plasmídeo com as sequência homólogas no genoma do cloroplasto permite sua integração (SCOTTI; CARDI, 2014). Uma vez que o arranjo genético dos cloroplastos se dá em *operons*, é possível a expressão de vários genes a partir de um promotor único, cujo produto de expressão é um RNA mensageiro policistrônico. Há maiores níveis de expressão proteica comparado à expressão nuclear e a organela contém o produto recombinante, o qual pode ser potencialmente tóxico tanto à planta quanto ao contato com o citoplasma. O cloroplasto, como compartimento, também protege o ambiente da contaminação ambiental dos transgenes por dispersão por pólen visto a herança materna dos genes da organela (QUESADA-VARGAS; RUIZ; DANIELL, 2005).

Essas são vantagens frente à transformação nuclear e, apesar das limitações, foi possível obter produtos de interesse farmacêutico a partir de cloroplastos (LIN *et al.*, 2018), tal qual estão disponíveis outros biofármacos de origem de plantas transgênicas comercialmente viáveis.

2.5.2.2 Plataformas de expressão e biofármacos comerciais

Entre os produtos biofarmacêuticos oriundos de plantas, vale destacar os anticorpos, enzimas terapêuticas, vacinas de subunidade e VLPs (*virus like particles*) (LOMONOSSOFF; D'AOUST, 2016), os quais são direcionados principalmente a doenças infecciosas e tratamento de alguns tipos de câncer. Dessa forma, as plantas são consideradas plataformas interessantes para produção de biofármacos para suprir a demanda de países em desenvolvimento, como o Brasil, nos quais os tipos de doenças citadas são prevalentes (HEFFERON, 2017).

A adoção das plantas transgênicas é, no geral, bem aceita pela população em geral, uma vez que são parte de um sistema de expressão considerado mais sustentável quando comparado ao uso de microrganismos, animais transgênicos e células animais. O uso de tecnologia que não dependa de animais é uma tendência e também agradável a grupos minoritários (SCHILLBERG *et al.*, 2019).

Essa tecnologia pode ser explorada em diferentes plataformas de expressão. A figura 5 a seguir, revela os pontos fortes e entraves de cada uma dessas plataformas. A agroinfiltração é a plataforma mais empregada na expressão de proteínas devido a sua rápida e rentável produção, cujo interesse tem crescido na pesquisa de soluções para doenças infecciosas (LOH; GREEN; YUSIBOV, 2017).

Figura 5 – Esquema apresentando as vantagens e as desvantagens das plataformas de expressão vegetais transgênicos.

	Planta inteira		Cultura celular/tecidual	Cultura de musgo e microalgas
	<i>Plantas Transgênicas</i>	<i>Agroinfiltração</i>		
Vantagens	Produção em larga escala; Custo competitivo; Possibilidade de preservar a proteína em sementes.	Produção rápida e flexível; Alto rendimento; Escalonamento semiautomatizado em estufas; Evita problemas de biossegurança; Plantas glicoengenheiradas.	Biofármacos comerciais; Obedece normas regulatórias; Processamento <i>downstream</i> simples Ausência de contaminação em biorreator fechado; Células glicoengenheiradas.	Processamento <i>downstream</i> simples; Obedece normas regulatórias; Ausência de contaminação em biorreator fechado; Musgos glicoengenheirados.
Desvantagens	Baixo rendimento; Adversidades regulatórias; Processamento <i>downstream</i> complexo; Complicação de biossegurança no cultivo ao ar livre.	Alto custo de escalonamento Prováveis adversidades regulatórias; Processamento <i>downstream</i> complexo; Retirada de toxinas de <i>Agrobacterium</i> .	Alto custo de investimento inicial; Baixo rendimento; Dificuldade de escalonamento.	Alto custo de investimento inicial; Baixo rendimento; Dificuldade de escalonamento; Complexa glicoengenharia de microalgas.

Fonte: construção da imagem baseada em DONINI; MARUSIC (2019).

No futuro, a exploração do potencial de produção de biofármacos em sistemas de expressão baseados em plantas tenderá a ser aproveitada (LOMONOSSOFF; D'AOUST, 2016). Para a agroinfiltração, a habilidade de produzir uma boa quantidade de proteínas por célula é um atrativo, porém, a capacidade produtiva total do processo biotecnológico é pouco interessante devido ao tamanho da célula vegetal quando comparado ao de microrganismos e células de mamífero, o que se torna um empecilho de ampliação de escala e sua implantação, diretamente relacionadas com a complexidade do processamento *downstream* em uma escala industrial (SCHILLBERG *et al.*, 2019). A fim de minimizar essa desvantagem, são buscadas alternativas, tal qual a otimização do cassete de expressão, mas as consequências não estão devidamente elucidadas para garantir um produto final ativo (ROZOV; DEINEKO, 2019).

Ainda que cada plataforma tenha sua particularidade e as plantas, de forma ampla, são consideradas um sistema de expressão promissor, ainda devem ser superadas barreiras

regulatórias e os reveses na purificação de produtos (DIRISALA, V.R. *et al.*, 2017). O debate regulatório envolve, além da biossegurança da dispersão dos genes exógenos pelo pólen e da transmissão horizontal, a preocupação social do uso de culturas de plantas alimentícias para expressão recombinante, as quais podem trazer prejuízos econômicos à agricultura familiar e à indústria alimentícia pela mistura e contaminação da cadeia de alimentos (OBEMBE *et al.*, 2011). Até a finalização dessa monografia, eram conhecidos dois biofármacos de origem em vegetais geneticamente modificados aprovados por agências regulatórias para uso humano.

O primeiro é a taliglucerase alfa (ELELYSO®), que é uma glicocerobrosidase humana recombinante produzida em cultura de células engenheiradas (ProCellEx™) da raiz de cenoura (WALSH, 2018). É um produto vendido para tratamento da doença de Gaucher pela Pfizer, Inc, aprovado pelo FDA. O padrão glicosilação dessa proteína obtido na planta é notável, com uma qualidade acima da apresentada em outros sistemas de expressão (DONINI; MARUSIC, 2019). O outro produto, o qual foi descontinuado em 2016, é um anticorpo IgA (CaroRx™) que reconhece o antígeno de superfície I/II de *Streptococcus mutans*, expresso em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L.). Sua aplicação se dá na prevenção da cárie dentária (OWCZAREK; GERSZBERG; HNATUSZKO-KONKA, 2019). Estes últimos autores ainda destacam os biofármacos em estágios de ensaio clínico de fase II e III, entre os quais são muito aguardadas as vacinas de VLP e anticorpos monoclonais.

Entre as tão esperadas vacinas, uma delas é tetravalente contra Influenza, produzida em *N. benthamiana* por expressão transiente, está em finalização de estudos de fase III, com avaliação da consistência lote a lote (WARD *et al.*, 2021b). Uma vacina contra SARS-CoV-2 está em processamento com testes em humanos, cujos estudos de fase I são animadores (WARD *et al.*, 2021a).

3 CONCLUSÃO

Cada sistema de expressão possui particularidades que impactam na produção de uma proteína recombinante terapêutica. Com a maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis na população humana, conhecer melhor os tipos de células e ferramentas que as apoiam para a produção de biofármacos é uma necessidade para as terapias em saúde do presente e para o futuro.

Proteínas são moléculas complexas, portanto, sua obtenção na forma pura, em grandes quantidades, a um baixo custo e no menor período de tempo possível é um enorme desafio. Nesse sentido, um sistema de expressão ideal ou *padrão ouro* permanece como uma meta distante a ser alcançada e os esforços para inovação e melhoria dos atuais sistemas não devem ser poupados.

As células de mamíferos proporcionam a maior qualidade das proteínas recombinantes, com característica mais humanizada, porém, a manutenção e propagação das células é difícil e encarece demasiadamente os custos do processo produtivo. Bactérias e leveduras são microrganismos e dispõem de muitas ferramentas para flexibilizar a expressão proteica recombinante, mas a origem procariota das bactérias é um grande limitador para muitas proteínas, enquanto as leveduras carecem de algumas modificações pós-traducionais almejadas por proteínas humanizadas. A produção de proteínas recombinantes em animais transgênicos não foi uma estratégia bem-sucedida e traz consigo uma grande controvérsia pela saúde desses seres vivos, debate válido pela existência de plataformas alternativas para o propósito a se alcançar. Existe uma grande expectativa pelo uso de células de inseto associadas ao sistema baculoviral e pelas plantas transgênicas, os quais mesmo não contendo completamente as glicosilações proteicas para proteínas humanas, são promissoras pelo menor custo e tempo de produção que células de mamíferos, além da segurança quanto a contaminantes durante a produção. A atenção dada às vacinas de VLP contra SARS-CoV-2 em estudos nesses dois últimos grupos pode dar novo fôlego à maior inserção comercial de proteínas recombinantes com essa origem.

Num olhar para o futuro, a difusão de ferramentas de edição genética pode ganhar mais importância na produção de proteínas recombinantes. O sistema Crispr/Cas9 pode ser utilizado em qualquer organismo vivo para observar funções do genoma, nocaute e *knock-in* genéticos e para modular a expressão de genes, cujo sucesso é superior a outras técnicas de edição genética. Dessa forma, é um aparato muito utilizado na indústria de biofármacos principalmente em sistemas de leveduras e células CHO. Para as primeiras, o Crispr-Cas9 almeja, por exemplo, a

integração de múltiplos insertos via um RNA guia (gRNA) ao genoma da levedura para a expressão heteróloga (GUPTA; SHUKLA, 2017a). Para as últimas, uma aplicação possível é o nocaute de genes que prejudiquem a expressão de uma proteína recombinante para propagação de células capazes de gerar um produto de maior qualidade, tal qual a prevenção da degradação proteolítica mediada por um tipo de enzima (LI *et al.*, 2019) ou até marcar microRNA para modular a função de tipos de RNA mensageiro (KELLNER *et al.*, 2018).

Quanto às bactérias, há empecilhos para o uso do método Crispr/Cas9. Os avanços junto a procariotos são lentos, uma vez que pode levar à toxicidade celular da bactéria e pode haver o escape de colônias quanto à edição genética predita pelo protocolo. Acredita-se que muitos aspectos desconhecidos referentes ao Crispr/Cas9, quando esclarecidos, podem ser de muita contribuição para o sistema bacteriano e também para outros sistemas de expressão de proteínas recombinantes (VENTO; CROOK; BEISEL, 2019).

As inovações genéticas, moleculares e celulares em Biotecnologia são muito rápidas e requerem constante atualização do leitor interessado. De tal forma, as novidades para os sistemas de expressão certamente serão benéficas para melhorar progressivamente os tipos de biofármacos recombinantes, os quais fazem parte das tecnologias para o futuro da saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 98, n. 12, p. 5301-5317, Jun 2014.
- ARENA, T. A.; HARMS, P. D.; WONG, A. W. High Throughput Transfection of HEK293 Cells for Transient Protein Production. **Methods Mol Biol**, 1850, p. 179-187, 2018.
- ASSENBERG, R.; WAN, P. T.; GEISSE, S.; MAYR, L. M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Curr Opin Struct Biol**, 23, n. 3, p. 393-402, Jun 2013.
- ASTOLFI-FILHO, S. et al. Uma breve história de promotores bacterianos: da sequência e mecanismo regulatório à aplicação biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v.7, n.3, p. 17-37, 2018.
- BAESHEN, M. N.; AL-HEJIN, A. M.; BORA, R. S.; AHMED, M. M. *et al.* Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **J Microbiol Biotechnol**, 25, n. 7, p. 953-962, Jul 2015.
- BAGHBAN, R.; FARAJNIA, S.; RAJABIBAZL, M.; GHASEMI, Y. *et al.* Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Mol Biotechnol**, 61, n. 5, p. 365-384, May 2019.
- BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Lett**, 588, n. 2, p. 253-260, Jan 2014.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat Biotechnol**, 22, n. 11, p. 1399-1408, Nov 2004.
- BERGER, I.; GARZONI, F.; CHAILLET, M.; HAFFKE, M. *et al.* The multiBac protein complex production platform at the EMBL. **J Vis Exp**, n. 77, p. e50159, Jul 2013.
- BERTOLINI, L. R.; MEADE, H.; LAZZAROTTO, C. R.; MARTINS, L. T. *et al.* The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. **Transgenic Res**, 25, n. 3, p. 329-343, 06 2016.
- BESADA-LOMBANA, P. B.; MCTAGGART, T. L.; DA SILVA, N. A. Molecular tools for pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Opin Biotechnol**, 53, p. 39-49, 10 2018.
- BIRCH, J. R.; FROUD, S. J. Mammalian cell culture systems for recombinant protein production. **Biologicals**, 22, n. 2, p. 127-133, Jun 1994.
- BIOSIMILAR DEVELOPMENT. **A Biopharma Year in Review – And a Look Ahead to 2020**. 2019. Disponível em: <https://www.biosimilardevelopment.com/doc/a-biopharma-year-in-review-and-a-look-ahead-to-0001>. Acesso em: 03 jul. 2021.

BIOTECHNOLOGY INNOVATION ORGANIZATION. **What is Biotechnology?** 2021. Disponível em: <https://www.bio.org/what-biotechnology>. Acesso em: 03 jul. 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 55 de 16 de dezembro de 2010 - estabelece os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Componente Especializado da Assistência Farmacêutica: Inovação para a garantia de acesso a medicamentos no SUS**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/06/Livro-2-completo-para-site-com-ISBN.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2021.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology (N Y)**, 9, n. 11, p. 1067-1072, Nov 1991.

BÖSZE, Z.; BARANYI, M.; WHITELAW, C. B. Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. **Adv Exp Med Biol**, 606, p. 357-393, 2008.

CELIE, P. H.; PARRET, A. H.; PERRAKIS, A. Recombinant cloning strategies for protein expression. **Curr Opin Struct Biol**, 38, p. 145-154, 06 2016.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnol Adv**, 30, n. 5, p. 1108-1118, 2012 Sep-Oct 2012.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, 24, n. 1, p. 45-66, Jan 2000.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnol Adv**, 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012 Sep-Oct 2012.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 70, n. 11, p. 3240-3244, Nov 1973.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **20 years of GMOs: environmental, economic and social benefits in Brazil**. 2018. Disponível em: <https://croplife.storage.googleapis.com/1/2019/10/Anos-Transgenicos-ING.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2021.

CONTRERAS-GÓMEZ, A.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; MOLINA-GRIMA, E. *et al.* Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. **Biotechnol Prog**, 30, n. 1, p. 1-18, 2014 Jan-Feb 2014.

CORREA, A.; OPPEZZO, P. Overcoming the solubility problem in *E. coli*: available approaches for recombinant protein production. **Methods Mol Biol**, 1258, p. 27-44, 2015.

DALRYMPLE, M. A.; GARNER, I. Genetically modified livestock for the production of human proteins in milk. **Biotechnol Genet Eng Rev**, 15, p. 33-49, 1998.

DE GROOT, N. S.; ESPARGARÓ, A.; MORELL, M.; VENTURA, S. Studies on bacterial inclusion bodies. **Future Microbiol**, 3, n. 4, p. 423-435, Aug 2008.

DIRISALA, V.R. *et al.* Recombinant pharmaceutical production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. **Acta Physiol Plant**, 39, n. 18, p. 1-9, 2017.

DONINI, M.; MARUSIC, C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems. **Biotechnol Lett**, 41, n. 3, p. 335-346, Mar 2019.

DYSON, M. R. Fundamentals of Expression in Mammalian Cells. **Adv Exp Med Biol**, 896, p. 217-224, 2016.

FAHAD, S.; KHAN, F. A.; PANDUPUSPITASARI, N. S.; AHMED, M. M. *et al.* Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants. **Biotechnol Lett**, 37, n. 2, p. 265-279, Feb 2015.

FERNANDES, G. S.; STERNBERG, C.; LOPES, G.; CHAMMAS, R. *et al.* The use of biosimilar medicines in oncology - position statement of the Brazilian Society of Clinical Oncology (SBOC). **Braz J Med Biol Res**, 51, n. 3, p. e7214, Jan 2018.

FISCHER, J. E.; GLIEDER, A. Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, 59, p. 175-181, 10 2019.

GEISLER, C.; JARVIS, D. L. Adventitious viruses in insect cell lines used for recombinant protein expression. **Protein Expr Purif**, 144, p. 25-32, 04 2018.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Food Biotechnology Market Size** | Global 2019-2025 Industry Forecasts. 2019. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/food-biotechnology-market>. Acesso em: 03 jul. 2021.

GOEDDEL, D. V.; KLEID, D. G.; BOLIVAR, F.; HEYNEKER, H. L. *et al.* Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 1, p. 106-110, Jan 1979.

GOH, J. B.; NG, S. K. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Crit Rev Biotechnol**, 38, n. 6, p. 851-867, Sep 2018.

GOMES, E. B. P. et al. Desenvolvimento de biossimilares no Brasil. **Fronteiras - Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v.5, n.1, p. 31-42, jan.-jun. 2016. Disponível em: <http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/323908/1/2-s2.0-84976493226.pdf>. Acesso em: jul. 2021.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 32, n. 6, p. 419-425, Aug 2013.

GORANTALA, J.; GROVER, S.; GOEL, D.; RAHI, A. *et al.* A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax. **Vaccine**, 29, n. 27, p. 4521-4533, Jun 2011.

GUPTA, K.; TÖLZER, C.; SARI-AK, D.; FITZGERALD, D. J. *et al.* MultiBac: Baculovirus-Mediated Multigene DNA Cargo Delivery in Insect and Mammalian Cells. **Viruses**, 11, n. 3, 02 2019.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Crit Rev Biotechnol**, 36, n. 6, p. 1089-1098, Dec 2016.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Gene editing for cell engineering: trends and applications. **Crit Rev Biotechnol**, 37, n. 5, p. 672-684, Aug 2017a.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review. **Front Pharmacol**, 8, p. 419, 2017b.

GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; CERVERA, L.; KAMEN, A. A.; GÒDIA, F. Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. **Crit Rev Biotechnol**, 38, n. 6, p. 918-940, Sep 2018.

HARDING, C. M.; FELDMAN, M. F. Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. **Glycobiology**, 29, n. 7, p. 519-529, 07 2019.

HARRISON, R. L.; JARVIS, D. L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. **Adv Virus Res**, 68, p. 159-191, 2006.

HARTLEY, J. L. Cloning technologies for protein expression and purification. **Curr Opin Biotechnol**, 17, n. 4, p. 359-366, Aug 2006.

HARTLEY, J. L. Why proteins in mammalian cells? **Methods Mol Biol**, 801, p. 1-12, 2012.

HEFFERON, K. Reconceptualizing cancer immunotherapy based on plant production systems. **Future Sci OA**, 3, n. 3, p. FSO217, Aug 2017.

HEFFNER, K. M.; WANG, Q.; HIZAL, D. B.; CAN, Ö. *et al.* Glycoengineering of Mammalian Expression Systems on a Cellular Level. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, Mar 2018.

HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. **Recent Pat Biotechnol**, 3, n. 1, p. 46-54, 2009.

HITZEMAN, R. A.; HAGIE, F. E.; LEVINE, H. L.; GOEDDEL, D. V. *et al.* Expression of a human gene for interferon in yeast. **Nature**, 293, n. 5835, p. 717-722, Oct 1981.

HOU, J.; TYO, K. E.; LIU, Z.; PETRANOVIC, D. *et al.* Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, 12, n. 5, p. 491-510, Aug 2012.

HOUDEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 32, n. 2, p. 107-121, Mar 2009.

HU, J.; HAN, J.; LI, H.; ZHANG, X. *et al.* Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. **Cells Tissues Organs**, 205, n. 1, p. 1-8, 2018.

HUANG, C. J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 39, n. 3, p. 383-399, Mar 2012.

HUNTER, M.; YUAN, P.; VAVILALA, D.; FOX, M. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. **Curr Protoc Protein Sci**, 95, n. 1, p. e77, 02 2019.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. 2018. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8522/1/TD_2398.pdf. Acesso em: 03 jul. 2021.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; PODOBNIK, B. *et al.* Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnol Prog**, 21, n. 2, p. 632-639, 2005 Mar-Apr 2005.

JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L.; FEITOSA, V. A. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Braz J Microbiol**, 47 Suppl 1, p. 51-63, Dec 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **Chembiochem**, 19, n. 1, p. 7-21, 01 2018.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **J Cell Physiol**, 235, n. 9, p. 5867-5881, 09 2020.

KARYOLAIMOS, A.; AMPAH-KORSAH, H.; HILLENAAR, T.; MESTRE BORRAS, A. *et al.* Enhancing Recombinant Protein Yields in the. **Front Microbiol**, 10, p. 1511, 2019.

KEECH, C.; ALBERT, G.; CHO, I.; ROBERTSON, A. *et al.* Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. **N Engl J Med**, 383, n. 24, p. 2320-2332, 12 2020.

KELLNER, K.; SOLANKI, A.; AMANN, T.; LAO, N. *et al.* Targeting miRNAs with CRISPR/Cas9 to Improve Recombinant Protein Production of CHO Cells. **Methods Mol Biol**, 1850, p. 221-235, 2018.

KELLY, B. J.; KING, L. A.; POSSEE, R. D. Introduction to Baculovirus Molecular Biology. **Methods Mol Biol**, 1350, p. 25-50, 2016.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pac J Trop Biomed**, 2, n. 2, p. 159-162, Feb 2012.

KITTS, P. A.; POSSEE, R. D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. **Biotechniques**, 14, n. 5, p. 810-817, May 1993.

KOST, T. A.; KEMP, C. W. Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. **Adv Exp Med Biol**, 896, p. 187-197, 2016.

LALONDE, M. E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **J Biotechnol**, 251, p. 128-140, Jun 2017.

LAUKENS, B.; DE WACHTER, C.; CALLEWAERT, N. Engineering the *Pichia pastoris* N-Glycosylation Pathway Using the GlycoSwitch Technology. **Methods Mol Biol**, 1321, p. 103-122, 2015.

LEMAITRE, R. P.; BOGDANOVA, A.; BORGONOVO, B.; WOODRUFF, J. B. *et al.* FlexiBAC: a versatile, open-source baculovirus vector system for protein expression, secretion, and proteolytic processing. **BMC Biotechnol**, 19, n. 1, p. 20, 03 2019.

LI, S. W.; YU, B.; BYRNE, G.; WRIGHT, M. *et al.* Identification and CRISPR/Cas9 Inactivation of the C1s Protease Responsible for Proteolysis of Recombinant Proteins Produced in CHO Cells. **Biotechnol Bioeng**, 116, n. 9, p. 2130-2145, 09 2019.

LIN, C. H.; JARVIS, D. L. Utility of temporally distinct baculovirus promoters for constitutive and baculovirus-inducible transgene expression in transformed insect cells. **J Biotechnol**, 165, n. 1, p. 11-17, May 2013.

LIN, Y.; CHENG, X.; YANG, D.; LIANG, Z. *et al.* [Advances in chloroplast expression of recombinant proteins in higher plants]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 34, n. 5, p. 631-643, May 2018.

LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; FAULKNER, M. *et al.* SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microb Cell Fact**, 11, p. 56, May 2012.

LOH, H. S.; GREEN, B. J.; YUSIBOV, V. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. **Curr Opin Virol**, 26, p. 81-89, 10 2017.

LOMONOSSOFF, G. P.; D'AOUST, M. A. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. **Science**, 353, n. 6305, p. 1237-1240, 09 2016.

LUCKOW, V. A.; LEE, S. C.; BARRY, G. F.; OLINS, P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J Virol**, 67, n. 8, p. 4566-4579, Aug 1993.

MAKSIMENKO, O. G.; DEYKIN, A. V.; KHODAROVICH, Y. M.; GEORGIEV, P. G. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. **Acta Naturae**, 5, n. 1, p. 33-46, Jan 2013.

MARTÍNEZ-SOLÍS, M.; GÓMEZ-SEBASTIÁN, S.; ESCRIBANO, J. M.; JAKUBOWSKA, A. K. *et al.* A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. **PeerJ**, 4, p. e2183, 2016.

MARTÍNEZ-SOLÍS, M.; HERRERO, S.; TARGOVNIK, A. M. Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 103, n. 1, p. 113-123, Jan 2019.

MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B. *et al.* Recombinant protein production in yeasts. **Methods Mol Biol**, 824, p. 329-358, 2012.

MCCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Curr Opin Biotechnol**, 8, n. 5, p. 590-594, Oct 1997.

MEHALKO, J. L.; ESPOSITO, D. Engineering the transposition-based baculovirus expression vector system for higher efficiency protein production from insect cells. **J Biotechnol**, 238, p. 1-8, Nov 2016.

MONZANI, P. S.; ADONA, P. R.; OHASHI, O. M.; MEIRELLES, F. V. *et al.* Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives. **Bioengineered**, 7, n. 3, p. 123-131, Apr 2016.

NETTLESHIP, J. E.; WATSON, P. J.; RAHMAN-HUQ, N.; FAIRALL, L. *et al.* Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to *E. coli* for the production of secreted and intracellular mammalian proteins. **Methods Mol Biol**, 1258, p. 209-222, 2015.

OBEMBE, O. O.; POPOOLA, J. O.; LEELAVATHI, S.; REDDY, S. V. Advances in plant molecular farming. **Biotechnol Adv**, 29, n. 2, p. 210-222, 2011 Mar-Apr 2011.

OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. **Biomed Res Int**, 2019, p. 4216060, 2019.

PALOMARES, L. A.; SRIVASTAVA, I. K.; RAMÍREZ, O. T.; COX, M. M. J. Glycobiotechnology of the Insect Cell-Baculovirus Expression System Technology. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, Jun 2018.

POHL, S.; HARWOOD, C. R. Heterologous protein secretion by bacillus species from the cradle to the grave. **Adv Appl Microbiol**, 73, p. 1-25, 2010.

PUXBAUM, V.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 99, n. 7, p. 2925-2938, Apr 2015.

QUESADA-VARGAS, T.; RUIZ, O. N.; DANIELL, H. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation. **Plant Physiol**, 138, n. 3, p. 1746-1762, Jul 2005.

RENDIC, D; WILSON, I. B. H.; PASCHINGER, K. The Glycosilation Capacity of Insect Cells. **Croat. Chem. Acta**, v.81, n. 1, p. 7–21, 2008.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8, n. 6, p. 423-488, Jun 1992.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol**, 5, p. 172, 2014.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Sci**, 28, n. 8, p. 1412-1422, 08 2019.

ROZOV, S. M.; DEINEKO, E. V. [Strategies for Optimizing Recombinant Protein Synthesis in Plant Cells: Classical Approaches and New Directions]. **Mol Biol (Mosk)**, 53, n. 2, p. 179-199, 2019 Mar-Apr 2019.

RUDOLPH, N. S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. **Trends Biotechnol**, 17, n. 9, p. 367-374, Sep 1999.

RYCHLOWSKA, M.; GROMADZKA, B.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; SZEWCZYK, B. Application of baculovirus-insect cell expression system for human therapy. **Curr Pharm Biotechnol**, 12, n. 11, p. 1840-1849, Nov 2011.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, 307, n. 1-2, p. 249-264, Jan 2008.

SCHILLBERG, S.; RAVEN, N.; SPIEGEL, H.; RASCHE, S. *et al.* Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. **Front Plant Sci**, 10, p. 720, 2019.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl Microbiol Biotechnol**, 65, n. 4, p. 363-372, Sep 2004.

SCOTTI, N.; CARDI, T. Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants. **Biotechnol Lett**, 36, n. 2, p. 229-239, Feb 2014.

SELAS CASTIÑEIRAS, T.; WILLIAMS, S. G.; HITCHCOCK, A. G.; SMITH, D. C. E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. **FEMS Microbiol Lett**, 365, n. 15, 08 2018.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **J Biochem Mol Biol**, 37, n. 1, p. 35-44, Jan 2004.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Mol Cell Biol**, 3, n. 12, p. 2156-2165, Dec 1983.

STOLT-BERGNER, P.; BENDA, C.; BERGBREDE, T.; BESIR, H. *et al.* Baculovirus-driven protein expression in insect cells: A benchmarking study. **J Struct Biol**, 203, n. 2, p. 71-80, 08 2018.

TEJWANI, V.; ANDERSEN, M. R.; NAM, J. H.; SHARFSTEIN, S. T. Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. **Biotechnol J**, 13, n. 3, p. e1700234, Mar 2018.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72, n. 2, p. 211-222, Sep 2006.

THIMIRI GOVINDA RAJ, D. B.; VIJAYACHANDRAN, L. S.; BERGER, I. OmniBac: universal multigene transfer plasmids for baculovirus expression vector systems. **Methods Mol Biol**, 1091, p. 123-130, 2014.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Front Bioeng Biotechnol**, 7, p. 420, 2019.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION. **Basic Sciences – Biotechnology**. 1992. Disponível em: <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/science-technology/basic-sciences/life-sciences/biotechnology/>. Acesso em: 03 jul. 2021.

VAN OERS, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. **J Invertebr Pathol**, 107 Suppl, p. S3-15, Jul 2011.

VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **J Gen Virol**, 96, n. Pt 1, p. 6-23, Jan 2015.

VENTO, J. M.; CROOK, N.; BEISEL, C. L. Barriers to genome editing with CRISPR in bacteria. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 46, n. 9-10, p. 1327-1341, Oct 2019.

VIEIRA GOMES, A. M.; SOUZA CARMO, T.; SILVA CARVALHO, L.; MENDONÇA BAHIA, F. *et al.* Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. **Microorganisms**, 6, n. 2, Apr 2018.

WALL, R. J.; HYMAN, P.; KERR, D.; PINTADO, B. *et al.* Transgenic animal technology. **J Androl**, 18, n. 3, p. 236-239, 1997 May-Jun 1997.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nat Biotechnol**, 36, n. 12, p. 1136-1145, 12 2018.

WANG, Y.; ZHAO, S.; BAI, L.; FAN, J. *et al.* Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. **Biomed Res Int**, 2013, p. 580463, 2013.

WARD, B. J.; GOBEIL, P.; SÉGUIN, A.; ATKINS, J. *et al.* Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. **Nat Med**, 27, n. 6, p. 1071-1078, 06 2021.

WARD, B. J.; SÉGUIN, A.; COUILLARD, J.; TRÉPANIÉ, S. *et al.* Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18-49 years of age. **Vaccine**, 39, n. 10, p. 1528-1533, 03 2021.

YEE, C. M.; ZAK, A. J.; HILL, B. D.; WEN, F. The Coming Age of Insect Cells for Manufacturing and Development of Protein Therapeutics. **Ind Eng Chem Res**, 57, n. 31, p. 10061-10070, Aug 2018.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnol Adv**, 30, n. 5, p. 1158-1170, 2012 Sep-Oct 2012.