



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE
ANTICORPOS E PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS**

NAYARA FERNANDA BARROS DOS SANTOS

CURITIBA/PR
Janeiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Nayara Fernanda Barros dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE
ANTICORPOS E PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, do Instituto Carlos Chagas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

CURITIBA/PR
Janeiro de 2016

Palavras-chave: Anticorpo. hRSV. Vetores para Expressão. VLP.

Santos, Nayara Fernanda Barros dos

Lombada

DISSERTAÇÃO M -ICC*

N.F.B. SANTOS

2016

Orientador: Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Aos meus pais, Neiva e Marcos e ao meu noivo Zaqueu
pelo amor, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas pelos bons momentos compartilhados.

Ao apoio e o auxílio cedido gratuitamente pela Dra. Fernanda Luisa Basei no desenvolvimento e estabelecimento do cultivo de células de mamíferos pelo nosso grupo.

Ao meu orientador, Nilson Zanchin, pelos ensinamentos e à estrutura oferecida pela Plataforma de Purificação e Caracterização de Proteínas.

À Plataforma de Citometria e à Tecnologista Priscila Mazzocchi Hiraiwa pelo auxílio e disponibilidade para execução dos experimentos desenvolvidos nesse trabalho.

Ao Laboratório de Cultivo de Células Tronco, especialmente a Anny Robert, Ana Paula Ressetti Abud, Crisciele Kuligovski e Beth Moraes pela disponibilização da sala de cultivo celular.

Ao pessoal do setor de preparo de materiais do ICC, especialmente ao Silvio Kanarek e Sibelli Tanjoni, pela disponibilização de reagentes e vidrarias necessários aos experimentos e pelas conversas de intervalo.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) pelas amostras clínicas cedidas para desenvolvimento dos ensaios funcionais do anticorpo anti-hRSV recombinante.

À Fiocruz, pelo suporte financeiro.

À minha família e amigos pela compreensão, mesmo que duvidosa...

E por fim, gostaria de agradecer especialmente aos meu pais, Neiva e Marcos e ao meu noivo, Zaqueu, que tanto me apoiaram nos momentos difíceis e mais penosos de toda essa caminhada. Peço desculpas pelos estresses causados e aproveito para deixar claro que graças a vocês eu tive força para lutar. Amo vocês!

“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje. ”

Franklin Roosevelt



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS E PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS

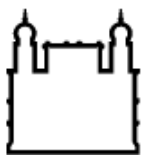
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nayara Fernanda Barros dos Santos

Sistemas convencionais para expressão de anticorpos diméricos consistem em geral na co-transfecção de dois plasmídeos, cada um codificando uma das duas cadeias do anticorpo. Este trabalho teve por objetivo construir novos vetores para expressão simultânea das duas cadeias do anticorpo e outras proteínas oligoméricas a partir de um único plasmídeo, buscando melhorar o nível de expressão de proteínas heterodiméricas. A eficiência desses vetores foi testada para expressão do anticorpo dimérico constituído pelo Fab do anticorpo MEDI-493 fusionado à fração cristalizável de uma IgG1 humana selecionada devido à sua maior estabilidade. A escolha deste anticorpo foi baseada no seu potencial para o tratamento e diagnóstico rápido de infecções pelo Vírus Sincial Respiratório Humano (hRSV). Os sistemas de expressão desenvolvidos neste projeto foram usados também para expressar partículas tipo-vírus (VLPs) de hRSV. As VLPs foram reconstituídas utilizando a combinação das proteínas G e M, ou F0 e M de hRSV. Sequências de aminoácidos do anticorpo e das VLPs foram usadas para gerar genes sintéticos que foram subclonados nos vetores de expressão. A expressão do anticorpo foi conduzida em células HEK293/HEK293T. Os melhores resultados foram obtidos com o plasmídeo baseado em dois cassetes de expressão. O anticorpo recombinante foi purificado a partir dos sobrenadantes da cultura celular por cromatografia de afinidade utilizando proteína A/G imobilizada em uma fase sólida e a expressão foi confirmada por *Western Blot*. O reconhecimento da F1, que é a proteína do hRSV que contém o epítipo alvo deste anticorpo, foi demonstrado inicialmente por *Western Blot* contra a proteína F1 recombinante. A atividade do anticorpo recombinante foi subsequentemente testada utilizando amostras de paciente infectados com o vírus hRSV por *Western Blot* em também por ensaios de ELISA. O anticorpo recombinante foi capaz de reconhecer as amostras clínicas com especificidade equivalente a do anticorpo comercial MEDI-493, confirmando seu potencial para aplicação em diagnóstico de infecções causadas pelo hRSV.

Palavras-chave: Anticorpo. hRSV. Vetores para Expressão. VLP.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

DEVELOPMENT OF NEW VECTORS FOR EXPRESSION OF ANTIBODY AND OLIGOMERIC PROTEINS

ABSTRACT

DISSERTATION OF MASTER

Nayara Fernanda Barros dos Santos

Conventional systems for expression of dimeric antibodies rely usually on co-transfection of two plasmids, each one coding one of the two antibody chains. The aim of this work was to construct new vectors for simultaneous expression of both antibodies chains and of other oligomeric proteins from a single plasmid, aiming to improve the level of expression of heterodimeric proteins. The efficiency of these vectors was tested for expression of a dimeric antibody constructed by using the Fab fragment of the antibody MEDI-493 with the crystallizable fraction of a human IgG1 selected based on its higher stability. This antibody was chosen based on its potential for treatment and rapid diagnostic of Respiratory Syncytial Virus (hRSV) infections. The expression system developed in this project was also used to express virus-like particles (VLPs) of hRSV. The hRSV VLPs were reconstituted using G and M, or F0 and M protein combinations. The amino acid sequences of this antibody and VLPs were used to generate nucleotide sequences. The respective genes were acquired from a gene synthesis company and subcloned into the new expression vectors. Expression of the recombinant antibody was conducted in HEK293/HEK293T cells in parallel experiments to compare the performance of the three different genetic constructs. Best results were obtained with a plasmid containing two expression cassettes, one for each antibody chain. The recombinant antibody was purified from cell culture supernatants by affinity chromatography using protein A/G immobilized on a solid phase and its presence was confirmed by Western Blot. Interaction of the recombinant antibody with its target on the hRSV F1 protein was determined by Western Blot. The activity of the recombinant antibody was tested using clinical specimens from patients infected with hRSV by Western Blotting and ELISA assays. The recombinant antibody was able to detect the F1 protein the clinical specimens with efficiency similar to the commercial antibody MEDI-493. This result indicates the recombinant antibody can be used for diagnosis of infections caused by hRSV.

Key-words: Antibody. hRSV. Expression Vectors. VLP.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA QUADROS	xix
LISTA ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RECOMBINANTES	1
1.2. NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES.....	3
1.2.1. Sítio de Entrada Interno de Ribossomo – IRES.....	5
1.2.2. Inteína.....	6
1.2.3. Peptídeos de autoclivagem.....	7
1.2.4. Plasmídeos baseados em dois cassetes de expressão.....	8
1.3. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS PARA O hRSV	9
1.3.1. Infecções por Vírus Respiratórios.....	9
1.3.2. Infecções por hRSV.....	10
1.3.3. Diagnóstico e Tratamento de Infecções por hRSV.....	11
1.4. RECONSTITUIÇÃO DE VLPs DE hRSV	14
1.5. SISTEMAS DE EXPRESSÃO PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES	15
1.6. JUSTIFICATIVA PARA A PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. METODOLOGIA	20
3.1. DESENHO E OBTENÇÃO DE GENES SINTÉTICOS	20
3.1.1. Pesquisa de sequências de anticorpos.....	20
3.1.2. Desenho das sequências do anticorpo anti-hRSV.....	21
3.1.3. Planejamento dos clones para VLPs de hRSV.....	22
3.2. RECUPERAÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS GENES SINTÉTICOS	23
3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR E LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA	24
3.3.1.Reconstituição das VLPs de hRSV.....	26
3.4. DEFINIÇÃO DA ESTRUTURA DOS VETORES DE EXPRESSÃO	29
3.4.1. Co-transfecção de vetores.....	29
3.4.2. Vetor baseado em peptídeo de autoclivagem P2A.....	29
3.4.3. Vetor baseado em dois cassetes de expressão.....	31
3.5. EXPERIMENTOS DE MANIPULAÇÃO DE DNA	33
3.5.1. Propagação dos vetores de expressão.....	33
3.5.2. Preparação de DNA dos vetores e dos insertos.....	34

3.5.3. Subclonagem das sequências codificadoras nos vetores de expressão.....	34
3.5.4. Análise de DNA de plasmídeos.....	35
3.6. ENSAIOS DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	36
3.6.1. Descongelamento de linhagens celulares.....	36
3.6.2. Padronização da transfecção.....	36
3.6.3. Comparação entre os diferentes sistemas de expressão.....	38
3.6.4. Curva de seleção com antibióticos.....	39
3.6.5. Seleção de clones por citometria de fluxo.....	39
3.7. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	40
3.7.1. Purificação do anti-hRSV por cromatografia de afinidade a proteína A.....	40
3.7.2. Purificação de VLPs de hRSV.....	41
3.7.3. Western Blot.....	42
3.8. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A.....	43
3.8.1. Indução da expressão de proteína A recombinante.....	43
3.8.2. Purificação por cromatografia de afinidade por gravidade.....	44
3.8.3. Cromatografia de afinidade em sistema semi-automatizado.....	44
3.9. TESTES FUNCIONAIS.....	45
3.9.1. Seleção de clones por ensaio de ELISA.....	45
3.9.2. Reconhecimento da proteína F1 por Western Blot.....	46
3.9.3. Reconhecimento do vírus hRSV por Western Blot e ELISA.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO.....	49
4.1.1. Subclonagem anticorpo anti-hRSV em pcDNA3.1.....	49
4.1.2. Construção do vetor pcDNA3.1mod e subclonagem.....	50
4.1.3. Construção do vetor baseado em peptídeo de autoclivagem.....	53
4.1.4. Clonagens para construção das VLPs de hRSV.....	54
4.2. ENSAIOS DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS HEK293T.....	56
4.2.1. Padronização da transfecção.....	56
4.2.2. Teste de expressão do anticorpo anti-hRSV.....	57
4.2.3. Teste do vetor de expressão pcDNAmo.....	59
4.2.4. Comparação entre os sistemas de expressão.....	60
4.3. ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS.....	61
4.3.1. Expressão de proteína A recombinante.....	61
4.3.2. Padronização de ELISA com proteína A recombinante.....	62
4.4. SELEÇÃO DE LINHAGENS ESTÁVEIS.....	63
4.4.1. Linhagem estável expressando o anti-hRSV – seleção por antibiótico.....	63
4.4.2. Linhagem estável expressando as VLPs de hRSV – seleção por antibiótico.....	67
4.4.3. Linhagem estável expressando o anti-hRSV - Seleção por citometria de fluxo.....	69
4.5. PURIFICAÇÃO ANTI-hRSV.....	73
4.5.1. Purificação por cromatografia de afinidade a proteína A.....	73
4.6. ENSAIOS FUNCIONAIS.....	75
4.6.1. Western Blot direcionado contra a proteínas F1 recombinante.....	75

5. DISCUSSÃO	81
5.1. ESCOLHA DO ANTICORPO E SISTEMA DE EXPRESSÃO	81
5.2. NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE PROTEINAS DIMÉRICAS.....	82
5.3. RECONSTITUIÇÃO DAS VLPs DE hRSV E POSSÍVEIS APLICAÇÕES.....	84
5.4. TESTES FUNCIONAIS	85
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS	99
ANEXO I	99
Produção Intelectual.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esquemas representativos de construções utilizando diferentes elementos para expressão estequiométrica de proteínas a partir de um único plasmídeo. A. Vetor baseado em IRES (LI et al., 2007); B. Vetor baseado do uso de inteína (GION et al., 2013); C. P2A intercalando duas sequências codificadoras (KIM et al., 2011).....	4
Figura 1.2 - Plasmídeo baseado em dois cassetes de expressão. Estratégia doador-receptor baseada em fusão Cre/LoxP (KRIZ et al., 2010).....	9
Figura 3.1 - Comparação entre as sequências aminoacídicas da cadeia leve de anticorpos direcionados contra a proteína F1 do hRSV.	20
Figura 3.2 - Comparação entre as sequências aminoacídicas da cadeia pesada de anticorpos direcionados contra a F1 do hRSV.	21
Figura 3.3 - Aumento de expressão de proteínas secretadas em células Sf9 com alteração do sítio de furina. A. <i>Western Blot</i> apresentando a expressão da proteína F1 entre os clones submetidos a deleções de aminoácidos, onde Δ representa o número deleções. B. Nível de expressão da proteína F em células Sf9 entre os melhores clones mutados testados. Fonte: Smith et al., 2012.....	23
Figura 3.4 - Construção da VLP de hRSV. Esquema representando os produtos de PCR das sequências codificadoras para as proteínas F1, F2 e para a proteína vermelha fluorescente (RFP).....	27
Figura 3.5 - Esquema para construção da VLP de hRSV. Esquema representando os produtos de PCR das sequências codificadoras para as proteínas G de hRSV e EGFP.....	28
Figura 3.6 - Esquema das construções plasmideais para expressão das VLPs de hRSV. A. Co-expressão das proteínas G de hRSV e M (de influenza ou hRSV). B. Co-expressão das proteínas F0 de hRSV e M (de influenza ou hRSV). P2A – peptídeo de autoclivagem, pA1 e pA2 – sinal de poliadenilação BGHpA, P1 e P2 – promotor PCMV, Amp – Ori – origem de replicação pUC e resistência a ampicilina, <i>Selection Marker</i> – gene de resistência a Hygromicina.....	28
Figura 3.7 - Representação das alterações inseridas nas cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hRSV para expressão utilizando o peptídeo P2A. A. Em azul estão representados os sítios de clivagem para furina e P2A, consecutivamente; em vermelho a etiqueta de seis histidinas fusionada à cadeia pesada do anticorpo e em alaranjado a etiqueta FLAG fusionada à cadeia leve do anticorpo. B. Esquema do plasmídeo baseado no peptídeo de autoclivagem P2A. Em roxo está representado o peptídeo P2A fusionado entre as cadeias leve e pesada do anticorpo (representadas em verde). Toda a construção foi clonada sob um único promotor (PCMV, em vermelho).	30
Figura 3.8 - Esquema apresentando a construção do vetor baseado em dois cassetes de expressão - pcDNAmo. Os passos indicam as consecutivas etapas de digestão e ligação de	

fragmentos de DNA para construção do vetor final. I1 e I2 – vetores intermediários obtidos por ligação dos fragmentos.....	32
Figura 3.9 - Esquema de construção do vetor contendo dois cassetes de expressão – pcDNAModCH-CL – para expressão do anticorpo anti-hRSV. A. Esquema de pcDNAMod contendo a cadeia polipeptídica codificadora para a cadeia pesada do anticorpo no vetor modificado; B. Esquema de pcDNAMod contendo a cadeia polipeptídica codificadora para a cadeia leve do anticorpo no vetor modificado; C. Fragmentos dos plasmídeos modificados contendo as cadeias do anticorpo usados na ligação e D. Esquema do vetor final baseado em dois cassetes de expressão em um único plasmídeo – pcDNAModCH-CL.....	33
Figura 3.10 - Esquema do teste de transfecção de células HEK293T com o plasmídeo pcDNA-FLAG-eGFP e com o plasmídeo pcDNA3.1 vazio. Os três poços superiores foram adicionados de 200.000 células 24 horas antes das transfecção, enquanto os três poços inferiores foram adicionados de 400.000 células.....	37
Figura 3.11 - Esquema de transfecção de células HEK293T com diferentes construções plasmideais para expressão do anticorpo anti-hRSV. AB. Vetor baseado em dois cassetes de expressão contendo as sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hRS, GFP – vetor pcDNA-FLAG-eGFP, CH – pcDNA3.1/Hygro com a sequência codificadora para a cadeia pesada do anticorpo, CL - pcDNA3.1/Hygro com a sequência codificadora para a cadeia leve do anticorpo, VAZIO – pcDNA3.1 sem inserto.	38
Figura 3.12 - Esquema de transfecção para seleção por <i>sorting</i> . A. Transfecção comparando diferentes concentrações dos plasmídeos para expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV. AB – pcDNAModCH-CL, GFP – plasmídeo pcDNA-FLAG-eGFP, CL - cadeia leve clonada em pcDNA3.1, CH - cadeia pesada clonada em pcDNA3.1, e VAZIO - pcDNA3.1 sem inserto. B. Transfecção das construções para expressão das VLPs de hRSV. F0 hRSV – pcDNAMod contendo a construção F0+RFP, M1 INF - pcDNAMod contendo a sequência codificadora para a proteína M1 de Influenza, e G hRSV - pcDNAMod contendo a construção G+GFP.	40
Figura 4.1 - Digestão dos Clones Sintetizados pela GenScript. M – marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder, 653 – clone pNZ653 - cadeia pesada completa do anticorpo (1427 pb), 654 – clone pNZ654 - cadeia leve completa do anticorpo (821 pb), 655 – clone pNZ655 – fragmento com parte da CDR da cadeia pesada do anticorpo MEDI-524 (205 pb) e 656 – clone pNZ656 - fragmento com parte da CDR da cadeia leve do anticorpo MEDI-524 (205 pb). ..	49
Figura 4.2 - Géis de agarose a 1% corados com brometo de etídeo confirmando a subclonagem das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hRSV em vetor de expressão pcDNA3.1/(+)Hygro. A. M – marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder, 1 a 12 – digestão com HindIII e NotI dos clones transformados com pcDNA3.1 ligado com a cadeia pesada. B. M – marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder, 1 a 5 – digestão com HindIII e NotI dos clones transformados com pcDNA3.1 ligado com a cadeia pesada.	50

Figura 4.3 - Géis de agarose a 1% corado com GelRed para análise dos produtos de PCR necessários para construção do vetor de expressão pcDNAmod. A. M – marcador de massa molecular, Pcmv - 721 pares de base, NeoR - 1.710 pares de base, AmpR - 2.204 pares de base. B. M – marcador de peso molecular, BGHpA - 785 pares de base. CN – controles negativos das amplificações.	50
Figura 4.4 - Esquema apresentando o plasmídeo pcDNAmod, base para montagem do vetor final baseado em dois cassetes de expressão. Em negrito estão destacados os sítios únicos de restrição, sendo os sítios HindIII e NotI usados para inserir as sequências codificadoras, enquanto os sítios BglII e XbaI são usados para inserir o segundo cassete de expressão, previamente digerido com SpeI e XbaI (todos destacados com asteriscos). Esquema do plasmídeo construído utilizando o software <i>SnapGene</i>	52
Figura 4.5 - Géis de agarose a 1% corado com brometo de etídeo para análise de digestão de plasmídeos pcDNAmodCH-CL obtido a partir da ligação com as cadeias leve e pesada do anticorpo. A. Digestão enzimática de plasmídeos com as enzimas HindIII e NotI, gerando os fragmentos de 5325, 1427, 1420 e 814 pares de base. B. Digestão enzimática de plasmídeos com as enzimas HindIII e BglII, gerando os fragmentos de 4555, 2847 e 1584 pares de base.	52
Figura 4.6 - Esquema apresentando o vetor pcDNAmodCH-CL, utilizado para expressão do anticorpo anti-hRSV a partir de um único plasmídeo. Em negrito estão destacados os sítios únicos de restrição. Esquema do plasmídeo construído utilizando o software <i>SnapGene</i> . ..	53
Figura 4.7 - Gel de agarose a 1% corado com GelRed para análise dos produtos de PCR necessários para construção do vetor de expressão baseado em peptídeo de autoclivagem – pcDNAmodCHP2ACL. M – Marcador de massa molecular, CH+6xHis – cadeia pesada adicionada da sequência codificadora para a cauda de seis histidinas com 1.416 pares de base, CL+FLAG – amplificação da cadeia leve adicionada da sequência codificadora para o P2A e etiqueta FLAG, com 755 pares de base, CN – controles negativos das amplificações.	54
Figura 4.8 - Gel de agarose a 1% corado com <i>GelRed</i> para análise dos produtos de PCR necessários para construção das VLPs de hRSV. A. F1 – 1.285 pares de base; F2 – 348 pares de base, RFP - 678 pares de base. B. EGFP - 720 pares de base. C. G-RSV – 991 pares de base. A, B, C. M – marcador de massa molecular <i>1 kb Plus DNA Ladder</i> e CN - controle negativo de cada amplificação.	55
Figura 4.9 - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo apresentando a digestão do plasmídeo pUC57 contendo as sequências codificadoras para M de hRSV (pNZ678), com 827 pares de base e M1 de Influenza (pNZ679) 815 pares de base, com as enzimas HindIII e NotI. Marcador de massa molecular <i>1 Kb Plus DNA Ladder</i>	56
Figura 4.10 - Microscopia de fluorescência de células HEK293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA-FLAG-eGFP coradas com Hoechst 33342. Análise em microscópio	

EVOS® FLoid® Cell Imaging Station **A.** Campo claro de células HEK293T transfectadas com pcDNA-FLAG-eGFP. **B.** Sobreposição das imagens obtidas através de análise pelos filtros azul (marcação com Hoechst 33342) e verde (fluorescência GFP)..... 57

Figura 4.11 - *Western Blot* para análise da expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV por co-transfecção de plasmídeos. Anti-HBV – soro humano utilizado como controle positivo, EGFP/CL/CH – amostras transfectadas com os plasmídeos pcDNA-FLAG-EGFP, mais cadeia leve e cadeia pesada em pcDNA3.1/Hygro(+), CL/CH – co-transfecção da cadeia leve e cadeia pesada em pcDNA3.1/Hygro(+), CL – apenas cadeia leve, NT - não transfectado. 1 e 2 µg - concentração total de DNA utilizada na transfecção e 48 horas e 5 dias ao período de coleta das amostras de sobrenadantes..... 57

Figura 4.12 - *Western Blot* para confirmação da expressão do anticorpo anti-hRSV por co-transfecção de plasmídeos. M – Marcador de massa molecular Benchmark pré-corado, α-hRSV – amostra purificada a partir do sobrenadante de cultura transfectada com as cadeias leve e pesada do anticorpo em pcDNA3.1/Hygro(+), Controle – controle negativo purificado do sobrenadante de cultura transfectada com pcDNA3.1 vazio. 58

Figura 4.13 - *Western Blot* para avaliação da retenção do anticorpo recombinante anti-hRSV. Marcador - Marcador de massa molecular BioRad pré-corado; Lisado anti-hRSV – lisado de células transfectadas com pcDNAmoCH-CL; Sobrenadante anti-hRSV – sobrenadante purificado com microesferas magnéticas conjugadas a proteína G; Lisado vetor vazio – lisado de células transfectadas com pcDNA3.1 vazio; Sobrenadante vetor vazio – sobrenadante de células transfectadas com pcDNA3.1 vazio purificado com microesferas magnéticas conjugadas à proteína G..... 59

Figura 4.14 - *Western Blot* para avaliação da funcionalidade do novo vetor para expressão de proteínas diméricas baseado em dois cassetes de expressão. **A.** Transfecção com vetor pcDNAmoCH-CL (AB1). **B.** Co-transfecção de vetores (codificando as cadeias leve (CL) e pesada (CH) do anticorpo). **C.** Transfecção apenas da cadeia pesada do anticorpo em pcDNA3.1 (controle negativo - CH). INP – sobrenadante de cultura transfectada sem purificação (*input*), EL – amostra eluída após purificação com microesferas magnéticas, NL – não-ligado às microesferas, CTL LIPO EL – controle negativo, células transfectadas com pcDNA3.1 vazio, MARCADOR – Marcador de massa molecular *Benchmark* pré-corado. ... 60

Figura 4.15 - *Western Blot* para comparação entre os diferentes sistemas de expressão de proteínas diméricas. M. Marcador de massa molecular BioRad pré-corado, MEDI-493 – controle positivo - anticorpo MEDI-493, pcDNAmo CH-CL – vetor baseado em dois cassetes de expressão, pcDNAmo CHP2ACL – vetor de expressão baseado em peptídeo de autoclivagem P2A, pcDNAmo Vazio – controle negativo, plasmídeo sem inserto. CH – cadeia pesada do anti-hRSV (49,5 kDa), detectada com anticorpo anti-histidina, com exceção da amostra MEDI-493 que foi detectada com o anticorpo anti-IgG humana; CL – cadeia leve do anti-hRSV (26,5 kDa), detectada com anticorpo anti-flag..... 61

Figura 4.16 - Análise da purificação da proteína A recombinante. A. Cromatograma da purificação de proteína A recombinante em coluna HisTrap HP de 5 mL em sistema semi-automatizado. B. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13%. M – marcador de massa molecular Benchmark Pré-Corado, ET – extrato total, IB – corpos de inclusão, S+E – fração solúvel após precipitação com sulfato de estreptomicina, P+E – precipitado após adição de estreptomicina, 2-6-8- frações não-ligado, 13-18-22- frações lavado, 28-30-33-34-35-39-40- frações de eluição da proteína, 46-54-60-64- término da eluição.....	62
Figura 4.17 - Padronização de ensaio de ELISA utilizando proteína A como ligante e a curva de diluição do anticorpo MEDI-493. A. Dados de análise de dispersão entre a concentração do anticorpo MEDI-493 e a absorbância obtida a 405 nanômetros. B. Curva de concentração do anticorpo após exclusão do ponto de saturação de 150 ng/mL para verificar a linearidade do ensaio.....	63
Figura 4.18 - <i>Western Blot</i> para comparação dos níveis de expressão de anticorpo recombinante entre os diferentes sistemas de expressão. A. Células HEK283T transfectadas com o novo vetor pcDNAmoDCH-CL (AB). B. Células HEK293T co-transfectadas com plasmídeos pcDNA3.1(+) <i>Hygro</i> -CL e pcDNA3.1(+) <i>Hygro</i> -CH.....	64
Figura 4.19 - Ensaio de ELISA para comparação dos níveis de expressão do anticorpo anti-hRSV. Comparação entre o nível de expressão do anticorpo recombinante pelas células HEK293T transfectadas com o plasmídeo pcDNAmoDCH-CL (em azul) ou co-transfectadas com os vetores pcDNA3.1 contendo as cadeias leve e pesada codificadoras para o anticorpo anti-hRSV (em vermelho).	65
Figura 4.20 - Ensaio de ELISA para comparação dos níveis de expressão do anticorpo anti-hRSV entre todas as construções genéticas. CH/CL – co-transfecção de plasmídeos contendo as sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada do anticorpo; pcDNAmoD 1 e pcDNAmoD 2 – clones transfectados com o novo vetor baseado em dois cassetes de expressão a partir de um único plasmídeo; CHP2ACL 1 e CHP2ACL 2 – vetor baseado em peptídeo de autoclivagem P2A. Coleta de amostras após 2 dias de cultivo (verde) e após 5 dias de cultivo (azul).	66
Figura 4.21 - Curva padrão ensaio de ELISA para quantificação dos níveis de expressão do anticorpo recombinante a partir das diferentes construções genéticas.	67
Figura 4.22 - Microscopia de fluorescência de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos codificadores para as VLPs de hRSV. A e D. Células transfectados com pcDNA3.1, B. Células co-transfectadas com pcDNAmoD G hRSV e pcDNAmoD M1 Influenza, C. Células transfectadas com pcDNA-FLAG-eGFP, E. Células co-transfectadas com pcDNAmoD F0 hRSV e pcDNAmoD M1 Influenza, F. Células transfectadas com pcDNA-SUMO-RFP.	67
Figura 4.23 - <i>Western Blot</i> para avaliação da expressão da VLP baseada na expressão das proteínas F1 e M de hRSV. Marcador - Marcador de massa molecular Benchmark pré-corado;	

F1 recombinante – controle positivo com 51 kDa; Clones 1 a 8 - pcDNAMod contendo a sequência codificadora para F1 e F2; Vazio – pcDNAMod sem inserto.	68
Figura 4.24 - Padronização do bico ejetor para seleção de células HEK293T por <i>sorting</i> em equipamento FACSAria II. A. <i>nozzle</i> de 85 µm e B. <i>nozzle</i> de 100 µm. Gates indicam a população selecionada para <i>sorting</i> , P1 – população homogênea, P2 – remoção de agregados celulares dentro da população P1; P5, P4 e P3 – fragmentos celulares.	70
Figura 4.25 - Seleção por FACS de células HEK293 expressando o anticorpo anti-hRSV. A. Não transfectado, B. pcDNA-FLAG-eGFP, C. Co-transfecção das cadeias leve e pesada clonadas em pcDNA3.1/Hygro (+), D. pcDNAMod 500 ng e pcDNA-FLAG-eGFP 500 ng, E. pcDNAMod 750 ng e pcDNA-FLAG-eGFP 500 ng, F. pcDNAMod 1000 ng e pcDNA-FLAG-eGFP 500 ng. P1 – população mais homogênea, P2 e P3 – remoção de agregados, P4 – sinal de fluorescência.....	72
Figura 4.26 - Purificação de anticorpos a partir de sobrenadante de cultura contendo soro fetal bovino. A. Cromatograma da purificação de anticorpos a partir do sobrenadante de cultura purificado com coluna <i>HiTrap HP Protein A</i> ; B. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13% corado com <i>Coomassie Blue</i> , Fração 11, 12 e 13 - pico de eluição das amostras. C. <i>Western Blot</i> , Frações 11, 12 e 13 - pico de eluição das amostras.	73
Figura 4.27 - Anticorpos purificados do sobrenadante de cultura sem adição de soro fetal bovino. A. Cromatograma da purificação de anticorpos a partir do sobrenadante de cultura purificado com coluna <i>HiTrap HP Protein A</i> . B. <i>Western Blot</i> , frações 7 e 8 - pico de eluição da amostra.....	74
Figura 4.28 - Gel de poliacrilamida a 13% corado com nitrato de prata para comparação entre as amostras de anticorpo purificadas com meio de cultura adicionado ou não de soro fetal bovino (SFB). 7 a 10 – frações de eluição de anticorpos purificados a partir de sobrenadante de cultura sem adição de SFB; 12 a 15 – frações de eluição de anticorpos purificados a partir de sobrenadante de cultura adicionado de SFB.....	75
Figura 4.29 - <i>Western Blot</i> para avaliação da função do anticorpo recombinante anti-hRSV. Anti-F1 policlonal – 1:3.000, anticorpo obtido a partir de camundongos imunizados com a proteína F1 recombinante – controle positivo; α-hRSV recombinante – obtido a partir da co-transfecção de plasmídeos pcDNA3.1 codificando para as cadeias leve e pesada do anticorpo; Soro negativo – 1:3.000, obtido a partir da imunização de camundongos com PBS, α-Histidina – 1:3.000 - etiqueta fusionada à proteína F1 recombinante. Anticorpos secundários – anti-IgG humana para α-hRSV e <i>anti-mouse</i> para os demais (1:30.000).....	76
Figura 4.30 - <i>Western Blot</i> para avaliação da função do anticorpo recombinante anti-hRSV. ANTI-F1 POLICLONAL – 1:3.000, anticorpo obtido a partir de camundongos imunizados com a proteína F1 recombinante; PALIVIZUMAB – anticorpo comercial MEDI-493 (Synagis) utilizado nas concentrações de 5 e 2 µg/mL; α-hRSV RECOMBINANTE – obtido a partir da transfecção do plasmídeo pcDNAModCH-CL; CONTROLE NEGATIVO - Soro negativo –	

1:3000, obtido a partir da imunização de camundongos com PBS, Anticorpos secundários – anti-IgG humana para α -hRSV e MEDI-493 e *anti-mouse* para os demais (1:30.000). 77

Figura 4.31 - Western Blot contra amostras de lavado nasal de pacientes infectados com hRSV. **A.** reconhecimento das amostras clínicas pelo anticorpo comercial MEDI-493 (3 μ g/mL). **B.** reconhecimento das amostras clínicas pelo anticorpo recombinante anti-hRSV. Amostras de baixo Ct - 4223, 4275, 4414, 4451, 4587; Amostras com alto Ct - 4236, 4383, 4194, 4420, 4562; Amostras negativas – 4580, 4588, 4592, 4593, 4665..... 78

Figura 4.32 - Reconhecimento de amostras clínicas infectadas com hRSV por ensaio de ELISA. Em vermelho, reconhecimento por anti-hRSV recombinante. Em azul, reconhecimento por MEDI-493. 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Genes sintéticos utilizados para desenvolvimento das construções genéticas.	24
Quadro 3.2 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificação dos fragmentos ou genes para construção das VLPs de hRSV e dos novos vetores de expressão.	25
Quadro 3.3 - Reagentes e respectivas concentrações para preparo das reações de amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.....	26
Quadro 3.4 - Padronização da curva de diluição do anticorpo MEDI-493. Todas as concentrações foram testadas em duplicata.	46
Quadro 3.5 - Amostras de lavado nasal para ensaios funcionais do anticorpo recombinante anti-hRSV.	47
Quadro 5.1 - Alinhamento da sequência nucleotídica do sítio antigênico II da proteína F1 entre variantes do vírus hRSV. Em amarelo estão destacados os nucleotídeos divergentes em relação à variante A do vírus. % ID – porcentagem de identidade.	87
Quadro 5.2 - Alinhamento da sequência aminoacídica do sítio antigênico II da proteína F1 entre variantes do vírus hRSV. Em amarelo estão destacados os aminoácidos divergentes em relação à variante A do vírus. % ID – porcentagem de identidade.	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AAP	Academia Americana de Pediatria
ADAs	Anticorpos Anti-Droga, do inglês, <i>Anti-Drug Antibodies</i>
ALRI	Infecção Aguda do Trato Respiratório Inferior, do inglês, <i>Acute Lower Respiratory Infection</i>
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
ELISA Assay	Ensaio Imunoenzimático, do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HRSV	Vírus Sincicial Respiratório Humano
IFI	Imunofluorescência
ITR	Infecções do Trato Respiratório
L	Litro
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NBT	Nitrozul de Tetrazólio, do inglês, <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
pmol	Picomol
PBS	Tampão Fosfato Salino
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa
SUS	Sistema Único de Saúde
VR	Vírus Respiratórios

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RECOMBINANTES

Uma técnica empregada há décadas para a produção de anticorpos idênticos em uma quantidade infinita é a produção de anticorpos monoclonais por linhagens celulares de hibridomas. Descrita em 1975 (KÖHLER & MILSTEIN, 1975), consiste na tecnologia da célula híbrida, onde um clone derivado de um linfócito B, secretor do anticorpo de interesse, isolado de camundongo, é fusionado a uma célula de linhagem tumoral (mieloma), dando origem a um *hibridoma*. Os hibridomas por sua vez, passam a ser uma fonte permanente e estável de um único tipo de anticorpo monoclonal (ALBERTS, 2010).

No entanto, o uso desses anticorpos contendo sequências murinas gera uma resposta imune em humanos. Com o objetivo de minimizar este potencial imunogênico iniciaram-se estudos para obtenção de anticorpos quiméricos através da fusão das regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada do anticorpo de camundongo com as cadeias constantes de imunoglobulinas humanas. No entanto, essas moléculas ainda apresentavam potencial imunogênico (SCHROFF et al., 1985).

De modo geral, a imunogenicidade se refere à habilidade de um anticorpo terapêutico induzir a formação de anticorpos anti-droga (*anti-drug antibodies* - ADAs) quando administrados em humanos. Os ADAs são anticorpos do sistema imunológico gerados contra a molécula terapêutica que tem a capacidade de reduzir a eficácia do medicamento, e principalmente causar efeitos adversos que vão desde uma erupção cutânea no local da injeção até reação inflamatória sistêmica, que pode ser fatal (HANSEL et al., 2010). Para minimização do potencial imunogênico, surgiu a tecnologia de produção de anticorpos humanizados. Métodos de humanização de anticorpos foram concebidos para produzir moléculas com imunogenicidade mínima quando utilizadas em humanos, mas mantendo a especificidade e afinidade do anticorpo não humano parental.

A engenharia de anticorpos é o processo utilizado para alterar a estrutura e as propriedades funcionais de anticorpos por meio de técnicas do DNA recombinante. Métodos de mutagênese *in vitro* podem ser aplicados para inserir, eliminar ou alterar um ou vários aminoácidos, ou mesmo para trocar domínios variáveis inteiros. Muitos

grupos de pesquisa passaram a utilizar essas técnicas para produzir anticorpos que seriam dificilmente, ou impossíveis de serem obtidos a partir de animais.

Anticorpos podem ser obtidos a partir de bibliotecas sintéticas, ou mesmo a partir de genes sintéticos. Atualmente, construções genéticas para expressão de proteínas têm utilizado DNA sintético. Esse fator se deve especialmente ao aumento exponencial na última década de projetos de sequenciamento, que contribuíram para o aumento de informação de sequências de genoma e metagenoma (VENTER et al., 2004). O aumento da velocidade e a diminuição do custo de síntese de DNA sintético proporciona uma via conveniente para se obter genes que codificam proteínas de interesse sem a necessidade de cloná-lo a partir de material genético do organismo original (NEWCOMB et al., 2007). Estratégias para design de um gene sintético buscam mimetizar as características do gene natural que sejam relevantes para o aumento da sua expressão. Além disso, são avaliados os códons mais comumente utilizados pelo organismo do hospedeiro para alta expressão de seus próprios genes (FUGLSANG, 2003).

Embora a descoberta do método para produção de anticorpos monoclonais através da imunização de animais e posterior geração de hibridomas (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) tenha contribuído de forma fundamental para o avanço da Imunologia e da Medicina, o avanço meteórico das tecnologias de Biologia Celular e Molecular nas últimas décadas produziram alternativas mais rápidas e eficazes de se produzir anticorpos equivalentes aos monoclonais para fins de diagnóstico e terapia.

Estas novas tecnologias tem duas vantagens principais, evitam o uso de animais para obtenção das células produtoras dos anticorpos e, sendo que é possível gerar anticorpos com sequência original de imunoglobulinas humanas, também evitam a etapa de “humanização” dos anticorpos, isto é, eliminam a etapa de substituição dos amino-ácidos da sequência do anticorpo de origem animal são diferentes da sequencias dos anticorpos humanos, em locais que não correspondam às regiões determinantes de complementaridade dos anticorpos.

Ao longo das últimas décadas, várias tecnologias voltadas para a geração de anticorpos monoclonais (mAbs) derivados de sequências de genes de imunoglobulinas humanos tem surgido. Dentre essas tecnologias, destacam-se o *phage display*, o uso de camundongos transgênicos, obtenção diretamente de células

B humanas por Hibridoma Humano-Humano, Hibridoma híbrido, imortalização de células B e clonagem ou *Single-cell RT-PCR* (NI et al., 2008).

O interesse em gerar novos anticorpos monoclonais se deve ao fato de que anticorpos recombinantes têm surgido com uma das ferramentas mais eficientes para o tratamento de doenças complexas, mais especificamente para o câncer. A partir de aplicações do conhecimento da sua estrutura e propriedades biofísicas, proteínas de interesse podem ser modificadas de modo que sejam obtidas moléculas com mais afinidade ao alvo, mais estáveis, com menor propensão à agregação e menor caráter imunogênico para tratamento de doenças (FERRAZ, 2007). A relevância de anticorpos recombinantes pode ser demonstrada pelo fato de que anticorpos monoclonais representam cerca de 60–70% desse total de todas as proteínas recombinantes farmacêuticas produzidas em células de mamíferos (WURM, 2004).

A produção de anticorpos recombinantes envolve a clonagem das sequências codificadoras dos anticorpos em vetores de expressão apropriados, de acordo com o sistema escolhido e, a introdução do vetor em um hospedeiro para sua expressão e subsequente purificação. Os sistemas convencionais para expressão de anticorpos diméricos em células de mamíferos consistem na co-transfecção de dois plasmídeos, cada plasmídeo codificando para uma das duas cadeias do anticorpo. Porém, essa abordagem possui desvantagens que interferem no nível de expressão das moléculas do anticorpo (KAUFMAN, 2000).

1.2. NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Muitos estudos têm abordado o impacto da expressão das cadeias leve (LC) e pesada (HC) na dobragem e montagem da imunoglobulina G (IgG) em células de mamíferos que foram obtidas por co-transfecção de dois plasmídeos monocistrônicos para a sua expressão (LI et al., 2007). Cadeias pesadas de anticorpos só são exportadas do retículo endoplasmático quando combinadas com cadeias leves, de modo que seja formada uma molécula de anticorpo completa (LEITZGEN et al., 1997). Dessa forma, a expressão altamente regulada de ambas as cadeias do anticorpo é essencial para otimizar a sua produção heteróloga em células de mamíferos.

Para anticorpos do tipo IgG1, formados por um tetrâmero contendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, a expressão equimolar de ambas as cadeias

é essencial para a produção estequiométrica das subunidades das IgG recombinantes em células de mamíferos. Portanto, a transfecção de células com duas construções independentes é um procedimento que pode não resultar na expressão equilibrada de ambas as cadeias (WURM, 2004), reduzindo o rendimento final em processos biotecnológicos. Isso se deve ao fato de que cadeias pesadas livres de anticorpos não serem exportadas eficientemente, a menos que estejam montadas com cadeias leves formando moléculas de imunoglobulina G (IgG) completas (MORRISON & SCHARFF, 1975; LEITZGEN et al., 1997). Assim, a quantidade de cadeias leve e pesada no retículo endoplasmático são fatores que influenciam na taxa de enovelamento e montagem de anticorpos (GONZALEZ et al., 2002).

Na busca pela expressão estequiométrica das duas cadeias polipeptídicas, várias abordagens têm sido empregadas. A descoberta dos sítios internos de entrada do ribossomo (IRESs – figura 1.1-A) (HOUDEBINE & ATTAL, 1999) forneceu uma nova ferramenta para o co-expressão de múltiplas cadeias polipeptídicas ou subunidades oligoméricas. Proteínas oligoméricas, por definição, são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica, possuindo uma estrutura quaternária, com alto nível de organização estrutural. Construções baseadas em inteínas (figura 1.1-B) também têm sido testadas para a co-expressão de proteínas. Uma terceira abordagem envolve o uso de peptídeos de autoclivagem (figura 1.1-C) como uma ferramenta para ser utilizada na expressão estequiométrica de cadeias polipeptídicas. Esses peptídeos permitem que múltiplas proteínas sejam codificadas como poliproteínas, as quais se dissociam em componentes proteicos na tradução (DONNELLY, et al., 2001a).

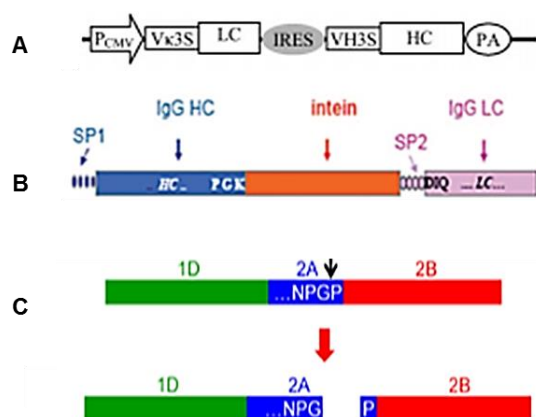


FIGURA 1.1 - ESQUEMAS REPRESENTATIVOS DE CONSTRUÇÕES UTILIZANDO DIFERENTES ELEMENTOS PARA EXPRESSÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE UM ÚNICO PLASMÍDEO. A. VETOR BASEADO EM IRES (LI ET AL., 2007); B. VETOR BASEADO DO USO DE INTEÍNA (GION ET AL., 2013); C. P2A INTERCALANDO DUAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS (KIM ET AL., 2011).

Além dessas possibilidades, a construção de vetores contendo dois cassetes de expressão em um único plasmídeo também surge como uma abordagem para otimizar a expressão de mais de uma cadeia polipeptídica (KRIZ et al., 2010). Dessa forma, todas essas construções podem ser testadas para comparação quanto à eficiência para expressão de proteínas diméricas como anticorpos monoclonais recombinantes. A seguir serão descritos com mais detalhe cada uma das abordagens citadas anteriormente em busca da obtenção da expressão estequiométrica de proteínas oligoméricas.

1.2.1. Sítio de Entrada Interno de Ribossomo - IRES

A via predominante de iniciação da tradução do RNA mensageiro (mRNA) é dependente de “cap”, de modo que o reconhecimento da estrutura cap 5’ por proteína ligadoras de cap 5’, desencadeia o recrutamento e a interação do mRNA com fatores que formam o complexo de iniciação da tradução e leva ao recrutamento do ribossomo (JACKSON et al., 2010). No entanto, alguns mRNA virais e celulares contêm sítios internos de entrada no ribossomo (IRES) (do inglês *internal ribosomal entry sites*) na região 5’ não-traduzida (UTR). Os IRES permitem o recrutamento do ribossomo de uma maneira independente de “cap” (SPRIGGS et al., 2008). Os elementos IRES são sequências de RNA altamente estruturadas encontradas em 59 regiões não traduzidas (UTR) de genomas virais e em um conjunto de mRNAs celulares, cuja função é recrutar os ribossomos para a iniciação da tradução (FITZGERALD et al., 2006).

Vetores bicistrônicos utilizando elementos IRES permitem a tradução de dois ou mais cístrons a partir de um único transcrito (LI et al., 2007). A primeira ORF (fase aberta de leitura) é traduzida pelo mecanismo dependente de cap 5’, enquanto que a segunda é traduzida independentemente de cap 5’, através do IRES (HELLEN & SARNOW, 2001). O RNA mensageiro expresso a partir de uma construção contendo IRES é uma mensagem bicistrônica, de modo que ambos os genes estão presentes na mesma molécula de RNA (LONZA, 2012). Elementos IRES têm sido usados para co-expressão de proteínas de interesse com proteínas marcadoras. Nesses plasmídeos, o promotor dirige a expressão de dois genes, o gene de interesse, geralmente o gene à montante (*upstream*) e um gene repórter, geralmente à jusante

(*downtream*), frequentemente codificando uma proteína fluorescente, como a proteína GFP. Com isso é possível obter informações diretas sobre a eficiência de expressão.

Com o uso dos elementos IRES, a abordagem de co-expressão de múltiplas cadeias polipeptídicas pode ser alcançada. Dessa forma, a transfecção de células com dois construtos independentes deixou de ser a melhor opção para obtenção de uma expressão balanceada das duas cadeias do anticorpo, permitindo uma taxa definida de codificação dos genes das cadeias H e L (HOUDEBINE & ATTAL, 1999). O uso do elemento IRES para mediar a expressão bicistrônica de construtos pode render níveis de expressão de IgG na mesma ordem que a expressão monocistrônica em células submetidas a transfecção transiente (LI et al., 2007).

Além de otimizar a expressão de proteínas diméricas, vetores bicistrônicos baseados em IRES também se caracterizam uma poderosa ferramenta para a seleção eficiente de transformantes estáveis em células de mamíferos (GURTU et al., 1996). No entanto, as desvantagens desse sistema então relacionadas ao grande tamanho das sequências IRES, fator que interfere no nível de expressão do inserto clonado à jusante desse elemento, que em geral leva a uma expressão em menores níveis dessa proteína em comparação com o inserto clonado a 5' do IRES de modo que múltiplas proteínas frequentemente não expressas no mesmo nível (KIM, 2011; SZYMCZAK et al., 2004).

1.2.2. Inteína

O *splicing* proteico é uma edição pós-traducional que leva à remoção de um fragmento interno da proteína (*inteína*) a partir de um precursor e a ligação dos fragmentos externos da proteína (*exteínas*) para formar a proteína madura (PERLER, 1998). As inteínas são, portanto, elementos de *splicing* que empregam estratégias enzimáticas para catalisar sua própria excisão dos polipeptídeos precursores que o flanqueiam (*exteínas*) (TOPILINA & MILLS, 2014). Através de autocatálise, a inteína é excisada do polipeptídeo com concomitante ligação das *exteínas* (PERLER, 2005), através de uma via composta por quatro deslocamentos nucleofílicos dirigidos pela inteína contra o primeiro resíduo de carbono das *exteínas* (PAULUS, 2000).

Gion e colaboradores (2013), construíram um plasmídeo através da inclusão das sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada de um anticorpo em uma única fase aberta de leitura (ORF), separadas por um gene de inteína. No entanto, em

alguns casos, anticorpos expressos utilizando vetores baseados em inteína não resultaram no *splicing* normal, não havendo ligação das exteínas referentes às cadeias leve e pesada do anticorpo (KUNES et al., 2009).

1.2.3. Peptídeos de autoclivagem

Vários vírus utilizam peptídeos 2A, ou sequências tipo 2A, para mediar a clivagem de proteínas (PALMENBERG et al., 1992). Sequências 2A são peptídeos relativamente pequenos, com cerca de 20 aminoácidos, dependendo do vírus de origem. Os vírus que contem esses peptídeos incluem membros da família Picornaviridae, como o vírus febre aftosa (FMDV) e vírus da rinite equina A (ERAV), e outros vírus como Teschovirus suíno tipo 1 e o Thosa Asigna vírus (TaV) (DONNELLY et al., 2001a).

O motivo consenso de peptídeos 2A (2A, Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn- Pro-Gly; 2B, Pro) é extremamente raro e está sempre associado com a atividade de clivagem entre a glicina 2A e a prolina 2B. Através de um mecanismo de salto ribossomal, o peptídeo 2A prejudica a formação normal da ligação peptídica entre a glicina 2A e a prolina 2B, sem afetar a tradução de 2B (DONNELLY et al., 2001b).

Modelos recentes têm adicionado uma sequência de clivagem de furina à montante do motivo 2A para eliminar os aminoácidos adicionais, que de outra forma permaneceriam ligados à proteína à montante após clivagem (FANG et al., 2005). Assim, a tecnologia 2A/furina permite a expressão de ambas as cadeias de anticorpo tipo IgG como um único gene devido à auto clivagem pós-traducional da protease viral 2A, codificada por um *linker* e subsequentemente processada pela protease furina presente no complexo de Golgi (NEHLSSEN et al., 2009).

Fang e colaboradores (2005), desenvolveram um sistema de expressão de anticorpo que utiliza o uma sequência de auto processamento 2A derivada do vírus da aftosa para expressar o anticorpo completo a partir de uma única fase aberta de leitura. Com o uso da sequência 2A do FMDV, adjacente ao sitio de clivagem de furina, para ligar as sequências das cadeias leve e pesada do anticorpo, o grupo construiu um cassete de expressão para o mAb que resultou em altos níveis de expressão do anticorpo completo e funcional *in vitro* e *in vivo*.

Como vantagem, peptídeos de autoclivagem, como o peptídeo 2A derivado do vírus Teschovirus suíno tipo 1, apresentam uma curta sequência de aminoácidos, que

pode facilitar a expressão estequiométrica de proteínas intercaladas por essa sequência (KIM et al., 2011). Regiões de peptídeo 2A dos vírus FMDV (F2A), ERAV (E2A) e TaV (T2A) já foram utilizadas com o objetivo de gerar cassetes multicistronicos ligando cadeias de proteínas para obter um único fragmento codificando duas, três ou quatro proteínas (SZYMCZAK et al., 2014). Assim, o uso de vetores baseados em peptídeo 2A podem melhorar a produção eficiente de proteínas oligoméricas/heteromultiméricas, como imunoglobulinas, receptores de superfície e citocinas (VIGNALI & VIGNALI, 1999).

1.2.4. Plasmídeos baseados em dois cassetes de expressão

A engenharia genética de células de mamíferos com vários transgenes é essencial na biologia celular contemporânea. Para atingir esse objetivo, as células são transfectadas sequencialmente com os plasmídeos de interesse, co-transfectadas com vários plasmídeos ou transfectadas com construções policistronicas baseadas em elementos IRES, 2A ou inteínas ou co-infectadas com vetores virais (FITZGERALD et al., 2006). Portanto, para otimizar esse processo, tem-se buscado o uso de um único plasmídeo multigene, que contenha todos os genes de interesse para a transformação

Para facilitar a geração de cassetes multigênicos para expressão de proteínas, alguns trabalhos utilizaram uma estratégia de doador-receptor baseado em fusão Cre/LoxP para expressão de proteínas (FITZGERALD et al., 2006; BIENIOSSEK et al., 2009; KRIZ et al., 2010).

Bacteriófagos P1 contém uma enzima recombinase denominadas cre, que utiliza sua atividade de endonuclease para catalisar sua recombinação entre dois sítios idênticos, denominadas sítios loxP. Assim, os sítios P flanqueiam o segmento de DNA chamado DNA alvo; a enzima cre se liga aos locais loxP, cliva os locais lox ao meio e então religa as duas metades após o DNA alvo ser removida (THYAGARAJAN et al., 2000). Com essa abordagem, verifica-se que é possível construir, de forma modular, cassetes para expressão de várias proteínas em um único plasmídeo (figura 1.2), gerando linhagens celulares estáveis expressando vários transgenes a partir de um único passo (KRIZ et al., 2010).

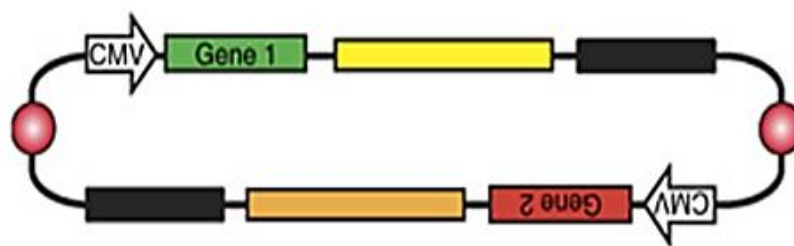


FIGURA 1.2 - PLASMÍDEO BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO. ESTRATÉGIA DOADOR-RECEPTOR BASEADA EM FUSÃO CRE/LOXP (KRIZ ET AL., 2010).

Diante das informações apresentadas, observa-se que outras abordagens podem ser empregadas para construção de vetores baseados em dois cassetes de expressão. Dessa forma, proteínas diméricas, como anticorpos recombinantes, podem ser expressas de forma otimizada, visando maior rendimento de produção da molécula alvo.

1.3. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS PARA O hRSV

1.3.1. Infecções por Vírus Respiratórios

Nos últimos anos, as infecções do trato respiratório (ITR) têm sido globalmente associadas com doenças agudas que afetam todas as faixas etárias, contribuindo para uma alta taxa de morbidade e mortalidade, especialmente entre os indivíduos com faixas etárias mais extremas e em pacientes imunocomprometidos (COYLE et al., 2004). Estas infecções são causadas por uma variedade de microrganismos, mas principalmente patógenos virais.

Infecção do trato respiratório de etiologia viral é a primeira causa de mortalidade e morbidade em crianças no mundo. Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, estas infecções são responsáveis por 70.000 a 120.000 internações anuais, principalmente em crianças menores de um ano de idade (COLLINS, 2007). Os vírus mais frequentemente detectados nas ITR, como bronquiolites e pneumonias em crianças menores de 5 anos de idade, são o Vírus Sincicial Respiratório (40%), Adenovírus (8,9%) Parainfluenza 1 e 3 (6,9%), Influenza A e B (4,6%) (CARBALLAL et al., 2001) e Metapneumovírus Humano (7%) (BASTIEN et al., 2003).

Os vírus respiratórios (VR) têm um papel importante na etiologia da pneumonia adquirida na comunidade em adultos, sendo também os principais agentes envolvidos na exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e na asma, que são

responsáveis por um número significativo de consultas e hospitalizações (DAUBIN et al., 2003). Em pacientes pediátricos, as infecções por VR são as principais causas de morbidade, resultando em altos gastos para a família e a sociedade. Estas infecções são responsáveis por 1 a 3% da mortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade em países industrializados e de 10 a 15% em países em desenvolvimento (QUAN et al., 2007).

1.3.2. Infecções por hRSV

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV ou RSV) pertence à família Paramyxoviridae e ao gênero Pneumovirus (BRATS, 2011). É um vírus envelopado com um genoma de RNA de fita simples, linear, de polaridade negativa, não segmentado e de aproximadamente 15 Kbp (15.222 nucleotídeos) (NASCIMENTO et al., 2006) que codifica 11 proteínas. Destas, 2 são proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) que estão presentes nas partículas virais imaturas, e 9 são proteínas estruturais, incluindo três proteínas que formam o nucleocapsídeo (N, P e L) e três glicoproteínas transmembrana (F, G e SH) (BRATS, 2011). Duas das quais, (F e G) são as mais antigênicas, normalmente escolhidas para os ensaios de vacinas e/ou desenvolvimento de novas drogas antivirais (ELANGO et al., 1986).

Com base nas reações do vírus com anticorpos monoclonais e devido às características genéticas da proteína G, o RSV foi dividido nos subgrupos A e B (MUFSON et al., 1985). No entanto, já há uma variedade de sequências no *Genbank*, chegando a 19 variantes ou subtipos do vírus hRSV. Durante as epidemias, um subtipo pode predominar, ou ambos podem circular simultaneamente, sendo a variabilidade entre os genótipos do RSV uma das características da infecção que contribuem para a capacidade do vírus de infectar as pessoas repetidamente e causar surtos anuais (PARVEEN et al., 2006).

Este vírus causa infecção aguda do trato respiratório em todos os grupos etários, atingindo principalmente idosos, pacientes imunodeprimidos e crianças em seu primeiro ano de vida, configurando a principal causa de infecções respiratórias agudas em crianças em todo o mundo (ROBINSON, 2008). Infecções com HRSR são um problema de saúde pública significativo em todo o mundo. Apenas nos Estados Unidos este vírus causa aproximadamente 90.000 internações hospitalares e 4.500

mortes por infecções das vias aéreas inferiores principalmente em crianças com doenças cardíacas, pulmonares e imunológicas.

Estimativas feitas através meta-análises de dados publicados indicam que, no ano de 2005, podem ter acontecido no mundo 33,8 milhões de novos casos de infecções agudas de vias aéreas inferiores (*acute lower respiratory infection, ALRI*) em crianças menores de cinco anos (NAIR et al., 2010). Dentre estes, são estimados 3,4 milhões de casos severos de infecções agudas de vias aéreas inferiores associadas ao hVSR que necessitaram de internação hospitalar.

Embora a incidência e mortalidade possam variar de ano para ano de acordo com a região, seguindo a mesma metodologia, para o ano de 2005, são estimadas entre 66.000 e 199.000 mortes de crianças menores de cinco anos causadas por infecções agudas de vias aéreas inferiores associadas ao VSR (NAIR et al., 2010). O dado mais trágico é que 99% das mortes ocorreram nos países em desenvolvimento. Estima-se que são responsáveis por um terço das mortes entre crianças menores de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento (CANE, 2001).

No estado do Paraná no ano de 2012, 2117 crianças com idade de 0-4 anos foram internadas com diagnóstico de Bronquiolite Viral Aguda, das quais 607 (28,7%) eram de Curitiba-PR e região metropolitana (fonte TABWIN/DATASUS em 26.07.13, Secretaria Municipal de Curitiba, órgão gestor do SUS em Curitiba-PR). Dados de 2001 indicaram que infecções pelo vírus sincicial respiratório foi a principal causa de mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade no Brasil, especialmente entre os bebês com menos de 11 meses (CALEGARI et al., 2005).

1.3.3. Diagnóstico e Tratamento de Infecções por hRSV

O diagnóstico precoce da infecção por RSV permite intervenções pontuais para controle da disseminação da doença. Dada a semelhança na apresentação clínica com a gripe e com o metapneumovírus humano, apenas a confirmação laboratorial fornece um diagnóstico definitivo da infecção por RSV. Ensaio de detecção de antígenos virais e de isolamento viral que utilizam anticorpos monoclonais, como o ensaio de imunofluorescência (IFI), são os métodos mais comuns de laboratório utilizados para a detecção de vírus respiratórios (COYLE et al., 2004). A cultura viral é considerada o padrão-ouro para a detecção de vírus respiratórios, mas a sua principal limitação é a demora na obtenção do resultado (2 a 10 dias, em média),

sendo também dependente de condições rigorosas de transporte e armazenamento do material clínico, indispensável para a preservação da viabilidade viral.

O diagnóstico da infecção pode ser feito clinicamente, no entanto, devido à gravidade e às sequelas da doença, o diagnóstico precisa ser necessariamente confirmado de forma precisa através de métodos laboratoriais. Em serviços públicos de saúde, métodos de diagnóstico atuais incluem testes baseados na detecção de antígenos virais por imunofluorescência direta secreção de nasofaringe, ou swab de nasofaringe (sensibilidade de 95%), RT-PCR (sensibilidade de aproximadamente 100%) e testes imunocromatográficos (sensibilidade de 85%) (FALSEY et al., 2002; HENRICKSON, 2004).

A falta de diagnóstico correto desencadeia altas frequências de prescrição de antibióticos (55%), broncodilatadores (80%) e corticosteróides (52%) para o tratamento inicial de crianças com bronquiolite. No entanto, o uso de terapias ineficazes ou controversas expõe os pacientes a efeitos adversos. Segundo Doan e colaboradores (2009), dentre cerca de 17.000 crianças menores de um ano de idade que foram hospitalizadas com bronquiolite, 45% foram submetidas ao uso de antibióticos, broncodilatadores e corticosteróides e associadas com maior tempo de internação.

Até os dias de hoje não existem vacinas disponíveis ou drogas aprovadas para o tratamento terapêutico do RSV (WELLIVER, 2010). Nesse cenário, a Ribavirina, que caracteriza-se como um agente virustático que inibe a replicação viral durante a fase de replicação ativa, já foi aprovado para o tratamento do vírus respiratório apresentando um largo espectro de atividade in vitro (DE VINCENZO, 1998). No entanto, estudos posteriores não confirmaram um benefício geral, onde a falta de esclarecimento quanto à sua significância no tratamento de RSV não foi capaz de justificar o uso de um agente relativamente caro e difícil de gerir (GUERGUERIAN et al., 1999; DE VINCENZO, 2000).

O RSV-IG é uma globulina policlonal hiperimune preparada de doadores com altos níveis séricos de anticorpos neutralizadores do vírus. Em ensaios controlados, a globulina foi responsável pela redução de 41 a 63% das hospitalizações associadas ao RSV em crianças de alto risco. No entanto, seu uso foi associado ao aumento da morbidade e da mortalidade em crianças com doenças cardíacas congênitas e uma potencial alteração na resposta imunológica a certas vacinas de vírus vivo atenuado.

Dessa forma a sua utilização não é disponibilizada e não há registro pela Anvisa (BARR & GRAHAM, 2010).

Anticorpos monoclonais humanizados já estão disponíveis para o tratamento da infecção por RSV (WELLIVER, 2010). O Palivizumab (Synagis®) – MEDI-493, é um anticorpo monoclonal humanizado, que se liga à glicoproteína F do RSV. Este composto neutraliza o vírus e inibe sua fusão com as células epiteliais do sistema respiratório, é bem tolerado e apresenta poucos efeitos colaterais. Estas características permitiram sua aprovação para uso em profilaxia de RSV em recém-nascidos de alto risco, conforme os critérios definidos pela Academia Americana de Pediatria (AAP) (JAFRI, 2002).

Nesse cenário tentou-se inserir o uso do Motavizumab, um derivado do Palivizumab, que se caracteriza como um potente anticorpo neutralizador do RSV em ensaios *in vitro*. Estudos mostraram que este composto apresentou efeitos adversos similares ao Palivizumab. No entanto, os efeitos adversos cutâneos foram mais frequentes nos indivíduos submetidos ao tratamento com Motavizumab. Dessa forma, este anticorpo permanece não licenciado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e sem registro pela Anvisa (BARR & GRAHAM, 2010).

Dados de um estudo profilático com 1500 crianças prematuras ou portadoras de displasia broncopulmonar, mostraram uma redução de 55% das internações hospitalares quando comparado com o grupo controle (The IMPact-RSV Study Group). Um estudo feito com crianças com idade de até 24 meses com doença cardíaca congênita revelou uma redução de 45% das internações hospitalares quando comparado com o grupo controle (FELTES et al., 2003). Atualmente, o MEDI-493 é o único anticorpo monoclonal aprovado para uso pela FDA o qual vem sendo usado praticamente no mundo todo.

O RSV é a causa principal de internações hospitalares no mundo todo por infecções agudas de vias aéreas inferiores. Mais importante, dos três principais organismos que causam infecções respiratórias (RSV, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) RSV, para o qual ainda não existe vacina, é o único agente que pode causar mortes (HALL et al., 2010). Além disso, o RSV foi definido prioritário para controle e desenvolvimento de vacinas por várias organizações nacionais de saúde há mais de 20 anos.

1.4. RECONSTITUIÇÃO DE VLPs DE hRSV

Durante infecções naturais por flavivírus, partículas tipo vírus (*virus-like particles* - VLPs) não infecciosas, são produzidas em adição a infecciosas, ou seja, os vírions maduros (RUSSELL et al., 1980). As VLPs são formadas através da expressão de algumas ou de todas as proteínas estruturais do vírus (JENNINGS & BACHMANN, 2008). São partículas não-infecciosas devido ao fato de que durante a sua expressão em cultura de células, proteínas virais são montadas na ausência de material genético, garantindo a segurança no uso de VLPs recombinantes (LI et al., 2015).

As VLPs são estruturas multiproteicas que mimetizam a organização e conformação de vírus nativos verdadeiros, mas com ausência do genoma viral, produzindo candidatos vacinais potencialmente mais seguros (ROLDÃO et al., 2010). As VLPs são apresentadas ao sistema imune como vírus naturais estimulando a imunidade inata, podendo desencadear respostas adaptativas e inflamatórias. A natureza das partículas tipo vírus lhes permite induzir potentes respostas imunes mediadas por células T através da interação com as células apresentadoras de antígenos e especialmente com células dendríticas (ROLDÃO et al., 2010).

Além das aplicações de VLPs como candidatos vacinais seguros, outra função para essas moléculas é a sua aplicação para fins diagnósticos (MATEU, 2011). Painéis de VLPs já foram desenvolvidos para diagnóstico de infecção por HIV (VETTER et al., 2014). Portanto, devido ao fato de as VLPs serem reconhecidas pelo sistema imune, essas moléculas podem ser empregadas em ensaios de captura para avaliação da afinidade de anticorpos recombinantes ao seu alvo.

Assim, como VLPs reconstituídas a partir de proteínas do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) já foram descritas na literatura, formadas a partir da co-expressão das proteínas M e G (glicoproteína de ligação) ou M e F (glicoproteína de fusão) de hRSV, a expressão dessas proteínas pode ser utilizada para reconstituição de VLPs de hRSV (SMITH et al., 2008). Além disso, trabalhos também demonstram a reconstituição de VLPs utilizando a proteína M1 de influenza e as proteínas F e G de hRSV (QUAN et al., 2011). Portanto, VLPs de hRSV serão reconstituídas, tornando-se ferramentas para testar o anticorpo recombinante anti-hRSV, de forma a validar a capacidade de reconhecimento do anticorpo ao seu alvo.

As VLPs formadas pela co-expressão das proteínas F de hRSV e M de hRSV ou F de hRSV e M1 de Influenza podem ser utilizadas como ferramentas para

determinação da função do anticorpo recombinante anti-hRSV. Isso se deve ao fato de os anticorpos monoclonais escolhidos para expressão reconhecerem um epítipo antigênico presente na proteína F1 do hRSV. Com isso, as VLPs de hRSV podem ser ferramentas a serem empregadas no diagnóstico de infecções pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano.

1.5. SISTEMAS DE EXPRESSÃO PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Anticorpos funcionais podem ser expressos em hospedeiros procariotos e eucariotos, incluindo *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, células de inseto, células de mamíferos e plantas (WURM, 2004). Proteínas complexas requerem ligações que influenciam diretamente na sua estrutura 3D, bem como na sua estabilidade no soro e nas funções efetoras da proteína (HAMILTON & GERNGROSS, 2007). A imunoglobulina G (IgG) é uma molécula heterotetramérica que consiste em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves que são conectadas através de pontes dissulfeto intramoleculares para estabilização (FRENZEL et al., 2013). Essas características também precisam ser levadas em consideração para escolha do melhor sistema de expressão.

Dentro do grupo das bactérias, *Escherichia coli* é o sistema de produção mais importante para proteínas recombinantes, sendo capaz de alcançar rendimentos volumétricos para a produção extracelular, a baixos custos e devido à simplicidade de cultivo, tornando-se uma opção preferível, tanto à escala de laboratório e na indústria. (NI & CHEN, 2009). No entanto, este sistema de expressão apresenta algumas desvantagens como incapacidade de realizar mudanças pós-traducionais e a tendência de acumular de agregados insolúveis de proteínas (KAMIONKA, 2011).

Por outro lado, as células eucarióticas desenvolveram uma capacidade de enovelamento avançada, mudanças pós-traducionais e um aparato de secreção que aumenta a produção de anticorpos incluindo imunoglobulinas completas se comparado com bactérias. Leveduras combinam as propriedades de células eucarióticas de curto tempo de geração e fácil manipulação genética com robustez e meio simples necessidades de hospedeiros microbianos unicelulares. *Pichia pastoris* representa a levedura mais utilizada para produção de anticorpos recombinantes (JEONG et al., 2011). Porém, as etapas de transfecção e lise de leveduras são mais

difíceis se comparadas com bactérias, além do fato de serem capazes de produzir quantidades consideráveis de proteases. Além disso, a variação do padrão de glicosilação entre espécies de eucariotos pode afetar o enovelamento e a secreção da proteína, particularmente se o e proteína hiperglicosilada (SCHIMIDT, 2004).

Fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* apresentam a capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas e metabolitos no meio (PUNT et al., 2002). Em contraste com leveduras, os fungos são capazes de realizar modificações pós-traducionais mais complexas com algumas proteínas que estejam sendo produzidas com os seus padrões de glicosilação naturais. Apesar do potencial para secreção de proteínas homologas a níveis muito elevados, problemas como a dificuldade na transfecção de fungos, devido à degradação de DNA estranho, e a integração genômica aleatória, que pode afetar genes endógenos (SCHIMIDT, 2004).

Existem também muitos exemplos de plantas transgênicas desenvolvidas para a produção de proteínas farmacêuticas devido à habilidade das plantas em produzirem proteínas heterólogas complexas. Algumas espécies cultiváveis bem estabelecidas como o tabaco, arroz, milho, soja e até mesmo banana são bastante empregadas em experimentos de transformação. Anticorpos produzidos em sementes de cereais, acumulando proteínas em sementes secas e permitindo o armazenamento a longo prazo a temperaturas ambientes sem a degradação ou perda de notável da atividade (MA et al., 2003). No entanto, como essas cultivares são fontes de alimento em várias regiões do mundo, surgiram questionamentos acerca do uso de plantas na produção de proteínas heterólogas devido à possibilidade de contaminação de linhagens alimentícias com material transgênico, tornando o tabaco a linhagem mais promissora nesse cenário (RAMESSAR et al., 2008).

Embora a produção de anticorpos em leveduras *Pichia pastoris* seja promissora, os sistemas de expressão de anticorpos em células de mamíferos ainda são mais utilizados sobre o rendimento da produção e qualidade do produto (WURM, 2004). Hoje em dia, quase todos os anticorpos terapêuticos são produzidos em células de mamíferos, principalmente devido ao seu aparelho de dobragem, secreção e mudanças pós-traducionais. Dessa forma, esse sistema torna-se mais adequado para a produção de anticorpos indistinguíveis daqueles produzidos no corpo humano, com menos preocupação com modificações imunogênicas (WURN, 2004).

Nesse contexto, as células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) representam a linhagem celular de mamífero mais amplamente utilizada para a produção industrial de proteínas recombinantes. Cerca de 70% de todas as proteínas recombinantes terapêuticas produzidas atualmente são obtidas a partir de células CHO (JAYAPAL et al., 2007). Muito bem caracterizada, células CHO têm sido utilizadas com sucesso na produção de uma gama de produtos biofarmacêuticos, onde novos bioprodutos produzidos a partir desta linhagem celular possivelmente obterão a aprovação mais rápida do que a de uma linhagem celular de menos caracterizada. A capacidade de as células CHO para produzir produtos que são adequados como agentes terapêuticos humanos pode ser explicada pela presença de genes homólogos para 99% das enzimas de glicosilação humanas (BUTLER & MENESES-ACOSTA, 2012).

No entanto, a linhagem HEK293 (células embrionárias de rim humano) também tem sido amplamente utilizadas na indústria para produção de anticorpos terapêuticos (BUTLER & MENESES-ACOSTA, 2012). A linhagem celular HEK 293 tem sido usada principalmente para expressão transiente de proteínas devido à sua alta eficiência de transfecção com plasmídeos de DNA. A transfecção transiente pode ser desenvolvida também em larga escala utilizando transfecção por fosfato de cálcio, lipossomos catiônicos e polímeros como polyethyleneimine (PEI) (MEISSNER et al., 2001; FANG et al., 2005).

1.6. JUSTIFICATIVA PARA A PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE

Infecções por Vírus Sincicial Respiratório Humano são evidentemente uma causa relevante de morte de crianças. De acordo com os dados apresentados, observa-se que o Vírus Sincicial Respiratório Humano é uma causa frequente de infecções pulmonares, bronquiolite e pneumonia, atingindo principalmente bebês e crianças ao longo do primeiro ano de vida. Evidentemente, a infecção por RSV é uma causa relevante de morte de crianças e uma geradora de custos elevados para o sistema de saúde. Esses gastos são decorrentes principalmente pelo internamento e tratamento de pacientes em estado grave (PEREIRA, 2007).

O medicamento disponível comercialmente para o tratamento de infecções por RSV é o anticorpo monoclonal humanizado Palivizumab (MEDI-493, Synagis®), cujo custo de importação acaba elevando o custo do tratamento da infecção. Estudos

mostram que o Palivizumab só apresenta custo-efetivo justificável quando utilizado apenas em crianças de alto risco, caracterizadas por recém-nascidos, crianças com doença cardíaca congênita ou com doença pulmonar crônica (CONITEC, 2012). Além disso, o Palivizumab não é produzido no país, o seu custo de importação acaba elevando o custo do tratamento da infecção.

Esses fatores justificam a produção nacional de um anticorpo anti-hRSV, resultando em menor custo para o tratamento pelo Sistema Único de Saúde. Dessa forma, pretende-se com este projeto realizar a produção do anticorpo monoclonal anti-RSV nacional, que possa ser empregado no diagnóstico da infecção causada pelo RSV e que possa ser distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Assim, com base no conhecimento apresentado, foram selecionados fragmentos de anticorpos direcionados contra a proteína F (glicoproteína de fusão) o hRSV para testar os diferentes sistemas de expressão. A escolha do Fab do anticorpo MEDI-493 para construção do anticorpo recombinante baseia-se também na data de expiração da patente do medicamento, processo ocorrido em outubro de 2015. Portanto, em caso de sucesso, o anticorpo poderá ser testado como inibidor de infecções causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) e também no diagnóstico de infecções causadas pelo vírus. Além disso, os novos vetores poderão ser utilizados na expressão de outros anticorpos e proteínas recombinantes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a melhor estrutura de vetor de expressão para proteínas heterodiméricas, utilizando como modelo o anticorpo anti-hRSV, cuja função será testada em ensaios de Western Blot e de ELISA utilizando diferentes amostras contendo a proteína F1 de hRSV.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenhar e obter genes sintéticos para produção de um novo anticorpo para o hRSV a partir de sequências de aminoácidos de anticorpos para hRSV depositados em bancos de dados.
- b) Subclonar os genes sintéticos e estabelecer a expressão em linhagem celular.
- c) Padronizar a purificação dos anticorpos recombinantes.
- d) Construir um novo vetor para co-expressão das duas cadeias do anticorpo, baseado em dois cassetes de expressão no mesmo plasmídeo.
- e) Testar uma nova construção para expressão do anticorpo baseada em proteína de fusão com peptídeo de autoclivagem e sítio de furina.
- f) Construir VLPs de hRSV através da co-expressão das proteínas F0-M e G-M, visando utilizá-las como controle nos testes funcionais do anticorpo recombinante.
- g) Testar o anti-hRSV contra diferentes amostras contendo a proteína F1 de hRSV, em ensaios de *Western Blot* e ELISA.

3. METODOLOGIA

3.1. DESENHO E OBTENÇÃO DE GENES SINTÉTICOS

3.1.1. Pesquisa de sequências de anticorpos

Para escolha das sequências nucleotídicas das cadeias leve e pesada do anticorpo foram analisadas diferentes bases de dados contendo as sequências de anticorpos direcionados contra a proteína F1 do Vírus Sincicial Respiratório. Nesse trabalho foram analisadas as diferenças entre as regiões determinantes de complementariedade (CDR) de diferentes anticorpos com o intuito de se escolher a melhor sequência para desenvolvimento do projeto.

Foram analisadas as sequências dos anticorpos MEDI-493 (Palivizumab - JOHNSON et al., 1997), D25 (SPITS & BEAUMONT, 2010), AM22 (BEAUMONT & BAKKER, 2012) e 101F (WU et al., 2007). Além desses anticorpos, também foram levados em consideração estudos relacionados ao anticorpo MEDI-524 (CARBONELL-ESTRANY et al., 2009), o que pode ser analisado nas figuras 3.1 e 3.2.

CADEIA LEVE - DOMÍNIO VARIÁVEL							
MAB	CONSTANTE	CDR1	CONSTANTE	CDR2	CONSTANTE	CDR3	CONSTANTE
MEDI 106 aa	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC 23	KQLSVGYMH 10	WYQQKPGKAPKLLIY 15	DTSKLAS 7	GVPSRFGSGSGTAFTLTISLQPD 32	FATYYC 9	FQSGYPFT 10
D25 107 aa	DIQMTQSPSLSAAVGDRTITC 23	QASQDIVNYLN 11	WYQQKPGKAPKLLIY 15	VASNLET 7	GVPSRFGSGSGTDFSLTISLQPE 32	DVATYYC 9	QQYDNLPLT 10
AM22 108 aa	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC 23	RASQIVSRNHLA 12	WYQQKPGQAPRLLIY 15	GASSRAT 7	GIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPE 32	DFAVYYC 9	LSSDSSIFT 10
101F 111 aa	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIFC 23	RASQSDVYNGISYMH 15	WFQKQPGQPKLLIY 15	AASNPEP 7	GIPARFTGSGSGDFTLNHPVEE 32	DAATYYC 9	QQIEDPWT 10
CADEIA LEVE - DOMÍNIO CONSTANTE							
MEDI/AM22 e D25	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC						
101F	RADAAPTIVSIFPPSDEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNEC						

FIGURA 3.1 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DA CADEIA LEVE DE ANTICORPOS DIRECIONADOS CONTRA A PROTEÍNA F1 DO HRSV.

CADEIA PESADA - DOMÍNIO VARIÁVEL							
MAB	CONSTANTE 1	CDR1	CONSTANTE2	CDR2	CONSTANTE 3	CDR 3	CONSTANTE 4
MEDI	QVTLRESGALVKPTQLTLTCTFS	GFSLSTSGMSVG	WIRQPPGKALEWLA	DIWDDDKDYNP SLKS	RLTISKDTSANQVVLKVTNMDPADTATYYCAR	SMITNWFYFDV	WGAGTTVTSS
	25	12	14	16	32	10	11
D25	QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQAS	GGPLRNYIIN	WLRQAPGQGP EWMG	GIIPVLGTVHYAPK FQG	RVTITADESTDTAYIHLSLRSEDTAMYYCAT	ETALVVSTTYLPHYFDN	WGQGLTVTVSS
	25	10	14	17	32	17	11
AM22	QVQLVQSGAEVKKPGATVKVCKIS	GHTLIKLSIH	WVRQAPGKGLEWLMG	GYEGEVDEIFYAQKFQH	RLTVIADTATDTVY MELGR L TSDDTAVYFCGT	LGVTVTEAGLGIDDDY	WGQGLTVTVSS
	25	10	14	17	32	15	11
101F	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFS	GFSLSTSGMGVSWIRQPSGKLEWLA	HIYDDDKRYNP SLKS	RLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCAR	LYGFTYGFAY	WGQGLTVTVSA	
	25	12	14	16	32	10	11

CADEIA PESADA - DOMÍNIO CONSTANTE	
MEDI	ASTKGPSVFPLAPSSAAAGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFP AVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTH
D25	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFP AVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDK
101F	AKTTPPSVYPLAPGSAAQ TNSMVT LGCLVKGYFPEPVTV T WNSGSLSSGVH TFP AVLQSDYTLSSSVTVPSSTW PSETVTCNVAHPASSTKVDK KIVPR

FIGURA 3.2 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DA CADEIA PESADA DE ANTICORPOS DIRECIONADOS CONTRA A F1 DO HRSV.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos para o fragmento de ligação o antígeno (Fab) do anticorpo MEDI-493 (*Synagis*) estavam disponíveis no depósito de patente do anticorpo (número de publicação US 6955717 B2) e no PDB (*Protein Data Bank* - acesso 2HWZ). Somando a disponibilidade desses dados e levando em consideração que a patente do MEDI-493 (*Synagis*) expirou em outubro de 2015, a sequência codificadora para o Fab desse anticorpo foi escolhida para construção do anticorpo anti-hRSV recombinante.

3.1.2. Desenho das sequências do anticorpo anti-hRSV

Para construção da cadeia pesada completa do anticorpo foi utilizada a sequência aminoacídica do Fab do anticorpo MEDI-493. Como a sequência codificadora para a fração cristalizável do anticorpo não estava disponível tanto no depósito de patente quanto no depósito da sequência no PDB, foi escolhida uma sequência completa codificadora para região da fração cristalizável de um anticorpo humano disponível no banco de dados *GenBank*. A sequência codificadora para a fração cristalizável da imunoglobulina G (IgG1) foi depositada sob o código de identificação AK301335.1.

A sequência nucleotídica da cadeia pesada total foi submetida a otimização de códons e filtrada para excluir sítios de *splicing*, poliadenilação e sequencias

desestabilizadoras de mRNA. Além disso, foi realizada a inserção ou remoção de sítios de restrição de interesse.

A sequência codificadora para a cadeia leve do anticorpo anti-hRSV foi baseada na sequência completa codificadora para a cadeia leve do anticorpo MEDI-493. Para substituição do Fab do anticorpo base descrito nessa seção, foi selecionada a sequência codificadora para as CDRs da região variável da cadeia leve e pesada do anticorpo MEDI-524 (Motavizumab).

3.1.3. Planejamento dos clones para VLPs de hRSV

Foram planejadas VLPs baseadas na co-expressão das proteínas M (proteína de matriz) e F0 (glicoproteína de fusão) ou M e G (glicoproteína de ligação) do Vírus Sincicial Respiratório, ou alternativamente com a proteína M1 de Influenza. Para alcançar a reconstituição das VLPs de hRSV, foram realizadas amplificações de alguns genes ou fragmentos de genes a partir de clones disponíveis dentro do grupo de pesquisa, através do uso dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (quadro 3.2), enquanto outros genes foram sintetizados (quadro 3.1).

Os genes sintéticos contendo as sequências codificadoras para as proteínas M do hRSV (GenBank AHY21317.1) e M1-Influenza (GenBank ADX99615.1), ambas contendo a sequência nucleotídica codificadora para a etiqueta c-Myc na região 3', e o gene sintético contendo a sequência codificadora para a proteína G de hRSV (GenBank AHY21319.1), contendo a etiqueta FLAG na região 3', foram adquiridos da empresa GenScript. Os genes sintéticos contendo as sequências codificadoras para as proteínas F1 e F2 (GenBank P12568.1, sequência completa da F0) de hRSV já estavam disponíveis no grupo de pesquisa (IBMP 10-1 e IBMP 10-2). As sequências codificadoras para as proteínas verde e vermelha fluorescentes foram obtidos a partir dos plasmídeos pcDNA-FLAG-EGFP e pDsRedMonomer.

A proteína F0 é formada pelas subunidades F1 e F2. Nesse contexto, de acordo com o trabalho de Smith e colaboradores (2012), modificações no sítio de furina II de KKRKRR para KKQKQQ aumentaram a expressão da proteína F1 de RSV em cerca de 3 vezes em células Sf9. Além disso, deleções no domínio de fusão de F1 de 2 a 18 aminoácidos foram introduzidas entre os resíduos Phe137 a Val154, onde foi possível observar que deleções de até 10 aminoácidos entre os resíduos N-terminal

Phe137 e Ser146 aumentaram o nível de expressão de F1 na superfície das células Sf9 (figura 3.3).

Baseando-se nessas informações, com o objetivo de aumentar a expressão da proteína F1, foi desenhado um oligonucleotídeo iniciador (HRSV-F2-R-MOD – ONZ1038) para remoção de 30 resíduos da sequência nucleotídica codificadora para a proteína F0 e a alteração de no sítio de furina II, através da substituição de códons codificadores do aminoácido arginina para glutamina.

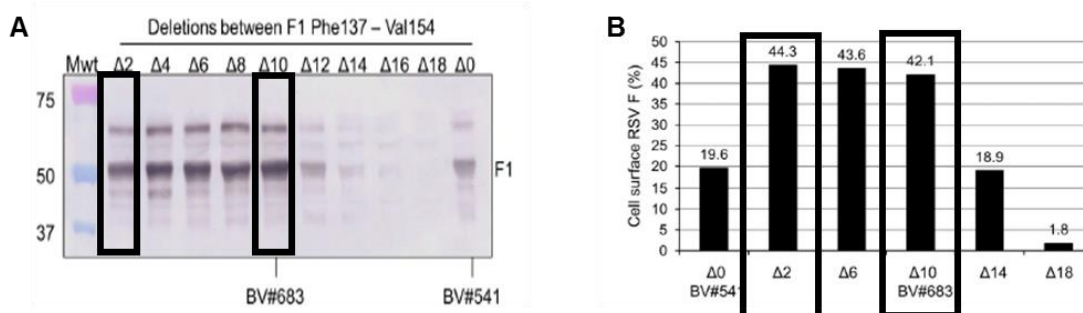


FIGURA 3.3 - AUMENTO DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS EM CÉLULAS Sf9 COM ALTERAÇÃO DO SÍTIO DE FURINA. **A.** *WESTERN BLOT* APRESENTANDO A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA F1 ENTRE OS CLONES SUBMETIDOS A DELEÇÕES DE AMINOÁCIDOS, ONDE Δ REPRESENTA O NÚMERO DELEÇÕES. **B.** NÍVEL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA F EM CÉLULAS Sf9 ENTRE OS MELHORES CLONES MUTADOS TESTADOS. **FONTE:** SMITH ET AL., 2012.

3.2. RECUPERAÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS GENES SINTÉTICOS

Todos os clones sintéticos necessários para desenvolvimentos das construções genéticas (quadro 3.1) foram obtidos pela empresa GenScript e recebidos em vetor pUC57, com exceção do clone contendo a sequência codificadora para a proteína G de hRSV, que foi recebido no plasmídeo pCC1BAC. Os plasmídeos foram recebidos em papel filtro. Em capela de fluxo laminar cada membrana de papel filtro contendo DNA foi cortada em pequenos pedaços e transferida para um tubo de microcentrífuga. Após esse procedimento, foi adicionado a cada tubo 100 μ L de H₂O ultrapura para eluição dos plasmídeos. As amostras foram incubadas por 16 horas a 4°C para completa eluição dos plasmídeos recebidos.

Os tubos contendo os plasmídeos recuperados foram centrifugados por 1 minuto a uma rotação de 10.000 rpm para obtenção de um pequeno volume da solução de eluição dos plasmídeos para transformação de células de *Escherichia coli DH5a* através de choque térmico por 2 minutos a 42°C, seguido de incubação em gelo por 5 minutos. Após recuperação por 1 hora através de incubação a 37°C, 200 rpm

em meio LB, 100 µL da cultura foram plaqueados em placas LB (Luria-Bertani) mais ampicilina (100 µg/ml). A placa foi incubada por 18 horas a 37°C.

Foram selecionadas várias colônias referentes a cada clone para lançamento de inóculos. Cada colônia isolada foi utilizada para preparo de um inóculo em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. Os inóculos foram incubados sob agitação de 200 rpm, por 18 horas a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação e submetidas a extração do DNA plasmideal através do uso do kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Os DNAs purificados foram eluídos em 30 µL de H₂O e quantificados em espectrofotômetro.

Os DNAs plasmideais obtidos foram analisados por digestão com as respectivas enzimas de restrição utilizadas nas clonagens (quadro 3.1). Devido ao fato de os clones terem sido sequenciados pelo fornecedor, os mesmos não foram submetidos a análise por sequenciamento. Os DNAs plasmideais foram armazenados a -20°C para posterior digestão e ligação com os vetores de expressão.

CÓDIGO	INSERTO	NUMERO DE PARES DE BASE (pb)	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO
pNZ653	Fab CH MEDI-493 e Fc IgG	1827	HindIII / NotI
pNZ654	Fab CL MEDI-493	421	HindIII / NotI
pNZ655	CDRs CH MEDI-524	349	EcoRI/KpnI
pNZ656	CDRs CL MEDI-524	205	EcoRI/BamHI
pNZ677	G hRSV	991	HindIII / NcoI
pNZ678	M hRSV	827	HindIII / NotI
pNZ679	M1 INFLUENZA	815	HindIII / NotI
10-1	F1 RSV	1354	PstI / NotI
10-2	F2 RSV	383	PstI / HindIII

QUADRO 3.1 - GENES SINTÉTICOS UTILIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO DAS CONSTRUÇÕES GENÉTICAS.

3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR E LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA

Todos os oligonucleotídeos iniciadores necessários para construção dos novos vetores de expressão e das VLPs de hRSV foram obtidos a partir do IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná), Midland ou IDT (Integrated DNA Technologies) (quadro 3.2). Os oligonucleotídeos recebidos foram centrifugados por 1 minuto a 5.000 rpm e diluídos em H₂O ultrapura para uma concentração final de 100 pmol/µL. Em

seguida, os tubos contendo os oligos foram homogeneizados e incubados por 18 horas a 4°C para completa diluição.

CÓDIGO	NOME	SEQUÊNCIA
ONZ982	HRSV-F2-F	5' AAG CTT ATG GAG TTG CCA ATC CTC AAA ACA AAT GCT ATT ACC ACA ATC CTT GCT GCC GTC ACA CT CTG TTT TGC AAG CAG TCA GAA TAT CAC CG 3'
ONZ983	HRSV-F2-R	5' CTG CAG TAC CGG AGG CTA TAG CTG ACC CAA CAC CTA ACA GAA AGC CAA GAA AAC GGC GTT TCC TTT TCT TGC TCA AG 3'
ONZ984	HRSV-F1-F	5' A GCT ATA GCC TCC GGT ACT GCA GTT TC 3'
ONZ985	HRSV-F1-R	5' GC GGC CGC TTA GGA TCC GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTT GGA GAA CGC GAT GTT ATT AAT ACC 3'
ONZ986	P2A-mRFP-F	5' GGA TCC GGA GCT ACT AAC TTC AGC CTG CTG AAG CAG GCT GGA GAC GTG GAG GAG AAC CCT GGA CCC ATG GAC AAC ACC GAG GAC GTC ATC AAG G 3'
ONZ987	P2A-mRFP-R	5' GC GGC CGC TTA CTG GGA GCC GGA GTG GCG GGC CTC GG3'
ONZ988	EGFP-F	5' CC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC 3'
ONZ989	EGFP-R	5' GC GGC CGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG 3'
ONZ1018	HRSV-G-F	5' GACTAAGCTTATGTCCAAAAACAAGACC 3'
ONZ1019	HRSV-G-R	5' AGTCCCATGGGTCCAGGGTTCTCCTC 3'
ONZ1038	HRSV-F2-R-MOD	5' CTG CAG TAC CGG AGG CTA TAG CTT GCT GTT TTT GTT TCT TGC TCA AG 3'
ONZ1005	pCMVPstI-F	5' GACTCTGCAGACTAGTGACATTGATTATTGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATT ACGG3'
ONZ1006	PCMVXX-R	5' CTCGAGGATTCTAGATACAGATCTGCGGCCGCTTAACCAAGCTTCCAGCTTGG GTCTCCCTATAGTGAG3'
ONZ901	BGHpA-F	5' GATCGGATCCGGCCCGTTAAACCCGCTGATC 3'
ONZ902	BGHpA-R	5' GACTACTAGTAGATCTGACTACTCTAGACACACATTCCACAGAATTAATTCGCG 3'
ONZ1007	NeoXB-F	5' TAATTCTAGATAATAGATCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTG 3'
ONZ904	Neo-Rsall	5' GCTCTAGCTAGAGGTCGACGGTATACAG 3'
ONZ905	Amp-FXhol	5' ATACCCTGCAGCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGG 3'
ONZ1004	AmpR-Nsil	5' CCCGAATGCATGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG 3'
ONZ978	antiRSV-HF	5' AAG CTT ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG 3'
ONZ979	antiRSV-HR	5' TTA GGA TCC TCG GCG TCT ACG ATG GTG ATG GTG ATG GTG TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT C 3'
ONZ980	antiRSV-LF	5' AGA TCT GGT TCT GGA GCT ACT AAC TTC AGC CTG CTG AAG CAG GCT GGA GAC GTG GAG GAG AAC CCT GGA CCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TC 3'
ONZ981	antiRSV-LR	5' GC GGC CGC TTA CTT GTC GTC ATC GTC TTT GTA GTC TCC AGA ACC ACC ACC AGA GCC GCC G 3'

QUADRO 3.2 - LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS OU GENES PARA CONSTRUÇÃO DAS VLPs DE HRSV E DOS NOVOS VETORES DE EXPRESSÃO.

Todos os fragmentos foram amplificados com a enzima DNA polimerase de alta fidelidade Pfx DNA Polimerase (Invitrogen). As concentrações dos reagentes utilizados para amplificação de todos os fragmentos estão descritas no quadro 3.3.

COMPONENTES	VOLUME NA REAÇÃO	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tampão PCR	2,5 µL	10X	1 x
MgSO ₄	0,5 µL	50 mM	1 mM
Dntp	2 µL	10 mM/µL	1,25 mM
Iniciador direto	1 µL	10 pmol/µL	0,5 pmol
Iniciador reverso	1 µL	10 pmol/µL	0,5 pmol
Pfx DNA Polimerase	0,4 µL	2,5 U/ µL	1 U
DNA molde	1 µL	100 ng	Variável
Água ultra-pura	16,6 µL	-	-
Total	25 µL	-	-

QUADRO 3.3 - REAGENTES E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES PARA PREPARO DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA POR PCR.

3.3.1.Reconstituição das VLPs de hRSV

Primeiramente, todos os fragmentos necessários para reconstituição das VLPs de hRSV foram amplificados a partir dos seus respectivos clones IBMP 10-2 (F2), IBMP 10-1 (F1), pCC1BAC-G, pcDNA-FLAG-EGFP e pDsRed-Monomer-C1. As amostras amplificadas de acordo com a temperatura de anelamento indicada para cada um dos pares de oligonucleotídeos iniciadores, foram purificadas a partir de gel de agarose a 1% através do uso do kit de purificação de DNA Illustra Gfx (*GE Healthcare*). Os DNAs purificados foram eluídos em H₂O ultrapura, foram quantificados e submetidos a reação de adenilação para adição de adenosinas nas extremidades dos fragmentos para posterior ligação com o vetor pGEM-T Easy (Promega).

A adenilação dos fragmentos foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante do kit (Promega), através de incubação das amostras a 70°C por 30 minutos com 0,2 mM de dATP (adenosina trifosfato). Os fragmentos adenilados foram submetidos a ligação com o vetor pGEM-T Easy de acordo com as instruções do fabricante, através de incubação por 18 horas a 16°C.

Todo o volume das ligações, 10 µL, foram utilizados para transformação de células de *Escherichia coli DH5a* como descrito no item 3.2. Foram selecionadas várias colônias referentes a cada ligação para lançamento de inóculos com o objetivo

de verificar a ligação dos insertos com o vetor pGEM-T Easy. Após extração dos DNAs plasmideais, os mesmos foram analisados por digestão com as respectivas enzimas de restrição utilizadas nas clonagens (quadro 3.1) e posteriormente analisadas por sequenciamento. As sequências nucleotídicas dos fragmentos que puderam ser confirmadas por sequenciamento foram submetidas às etapas ligação de DNA para construção das VLPs.

A proteína F0 do hRSV é constituída pelos fragmentos F1 e F2. Dessa forma, para reconstituição da VLP baseada na expressão das proteínas M e F de hRSV, o fragmento F2, previamente amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ONZ984 e ONZ985, foi digerido com as enzimas HindIII e PstI enquanto o fragmento F1, previamente amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ONZ982 e ONZ983, foi digerido com as enzimas PstI e NotI. Após purificação dos fragmentos a partir de gel de agarose, ambos os fragmentos foram ligados com o novo vetor de expressão (item 3.4), entre os sítios de restrição HindIII e NotI.

O plasmídeo resultante e o fragmento previamente amplificado P2A-RFP (peptídeo de autoclivagem e proteína vermelha fluorescente) foram digeridos com as enzimas BamHI e NotI. Esses fragmentos foram purificados de gel de agarose e submetidos a ligação de DNA. A ligação foi transformada em células de *E. coli* DH5 α e os clones obtidos foram testados quanto à presença do inserto completo. O esquema na figura 3.4 representa a ordem de ligação dos fragmentos com o vetor de expressão.

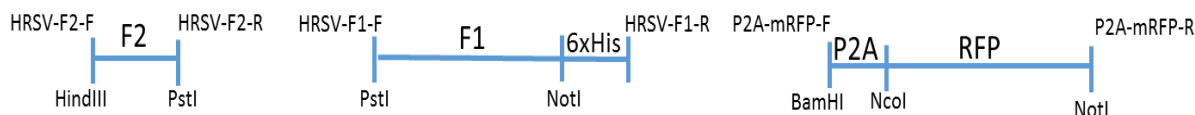


FIGURA 3.4 - CONSTRUÇÃO DA VLP DE HRSV. ESQUEMA REPRESENTANDO OS PRODUTOS DE PCR DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA AS PROTEÍNAS F1, F2 E PARA A PROTEÍNA VERMELHA FLUORESCENTE (RFP).

Para construção da VLP baseada na co-expressão das proteínas M e G de hRSV, o clone contendo a sequência nucleotídica da proteína G foi recebido no vetor pCC1BAC, que não pode ser propagado em células de *Escherichia coli* DH5 α . Dessa forma, a sequência codificadora foi amplificada com uso dos oligonucleotídeos iniciadores HRSV-G-R e HRSV-G-F e foi clonada no vetor pGEM-T Easy.

A sequência codificadora para a proteína EGFP foi amplificada a partir do plasmídeo pcDNA-FLAG-EGFP que contém o gene da EGFP otimizado para expressão em células de mamíferos. O iniciador direto (ONZ988) para amplificação dessa sequência foi desenhado para inserir o sítio de restrição para a enzima NcoI, e o iniciador reverso (ONZ989) para inserção do sítio de restrição para a enzima NotI para ligação com o gene da proteína G. Ambos os genes foram clonados no vetor pGEM-T Easy. Esses fragmentos foram purificados de gel de agarose e submetidos a ligação de DNA. A ligação foi transformada em células de *E. coli* DH5 α e os clones obtidos foram testados quanto à presença do inserto completo. O esquema na figura 3.5 representa a ordem de ligação dos fragmentos com o vetor de expressão.

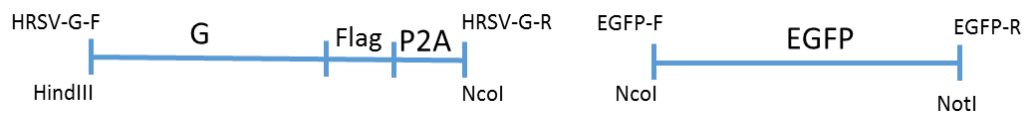


FIGURA 3.5 - ESQUEMA PARA CONSTRUÇÃO DA VLP DE HRSV. ESQUEMA REPRESENTANDO OS PRODUTOS DE PCR DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA AS PROTEÍNAS G DE HRSV E EGFP.

O esquema da construção dos vetores finais, baseados em dois cassetes de expressão em um único plasmídeo em associação com o uso de peptídeo de autoclivagem P2A, pode ser observado na figura 3.6. O esquema apresenta a ligação de todos os fragmentos necessários para reconstituição das partículas tipo-vírus de hRSV.

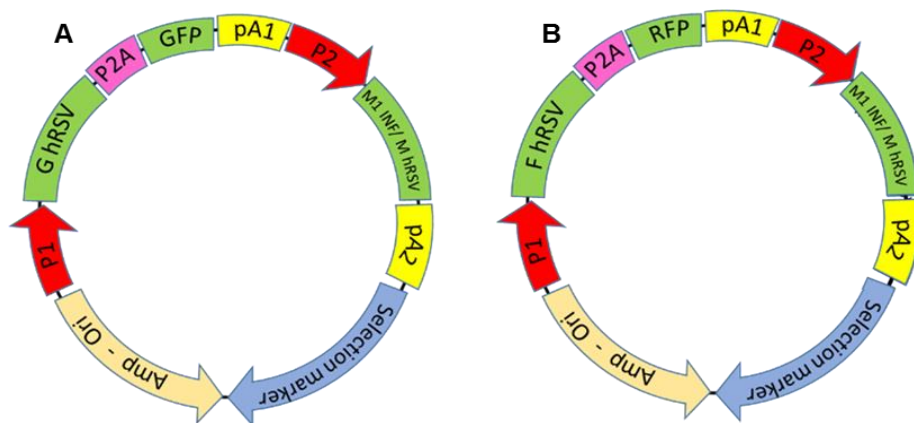


FIGURA 3.6 - ESQUEMA DAS CONSTRUÇÕES PLASMÍDEAS PARA EXPRESSÃO DAS VLPs DE HRSV. **A.** CO-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS G DE HRSV E M (DE INFLUENZA OU HRSV). **B.** CO-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS F0 DE HRSV E M (DE INFLUENZA OU HRSV). P2A – PEPTÍDEO DE AUTOCLIVAGEM, PA1 E PA2 – SINAL DE POLIADENILAÇÃO BGHPA, P1 E P2 – PROMOTOR PCMV, AMP – ORI – ORIGEM DE REPLICAÇÃO PUC E RESISTÊNCIA A AMPICILINA, SELECTION MARKER – GENE DE RESISTÊNCIA A HYGROMICINA.

3.4. DEFINIÇÃO DA ESTRUTURA DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Para comparação entre os diferentes sistemas para expressão de proteínas diméricas, foram planejadas duas construções plasmídeais. Essas construções foram baseadas em modificação no vetor base escolhido, o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+), que tem sido utilizado com eficiência para expressão de proteínas em células de mamíferos.

3.4.1. Co-transfecção de vetores

O plasmídeo pcDNA3.1 foi escolhido para ser utilizado como o sistema convencional de co-transfecção para ser comparado com as novas construções. Para alcançar esse objetivo, planejou-se a clonagem de cada uma das cadeias do anticorpo nos vetores pcDNA3.1, sob diferentes marcas de seleção. Essa abordagem possibilita a comparação entre esse sistema convencional de expressão de proteínas diméricas com as novas construções baseadas em dois cassetes de expressão a partir de um único plasmídeo ou baseadas no uso do peptídeo de autoclivagem P2A, que serão apresentadas nos itens a seguir.

3.4.2. Vetor baseado em peptídeo de autoclivagem P2A

Peptídeos de autoclivagem já foram descritos na literatura e caracterizados quando à sua capacidade de originar a separação de duas cadeias polipeptídicas adjacentes a esse motivo, levando à expressão de proteínas diméricas. Assim, com base no trabalho de Kim e colaboradores (2011), foi escolhida a sequência do peptídeo de autoclivagem P2A, isolado do vírus *Porcine Teschovirus 1*, para construção do novo plasmídeo de expressão.

Além disso, a nova construção também conta com a adição de um sítio de furina para garantir a clivagem da sequência no complexo de Golgi, permitindo a liberação das duas cadeias polipeptídicas expressas sem o peptídeo de 2A associado. Dessa forma, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores cujas sequências permitiram a inserção do peptídeo P2A entre as cadeias pesada e leve do anticorpo anti-hRSV. Na cadeia pesada, o iniciador reverso promove a inserção de uma cauda de seis histidinas na extremidade C-terminal da sequência aminoácidos (figura 3.7A, em

vermelho), e a inserção de um sítio de furina e de um sítio de restrição para clivagem pela enzima BamHI.

Na cadeia leve, o iniciador direto foi utilizado para inserir a sequência nucleotídica codificadora para o peptídeo de autoclivagem P2A (figura 3.7-B, em roxo) e o sítio de restrição para a enzima BglII que é compatível com o sítio de restrição para a enzima BamHI, presente no iniciador reverso da cadeia pesada, utilizados para ligação dos dois fragmentos de DNA amplificados. O iniciador reverso foi utilizado para inserção da sequência codificadora para a etiqueta FLAG na cadeia leve do anticorpo (figura 3.7-A, em alaranjado). O plasmídeo final foi nomeado como pcDNAmodCHP2ACL.

A CADEIA PESADA HHHHHHRKRRGSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP CADEIA LEVE DYKDDDDK-

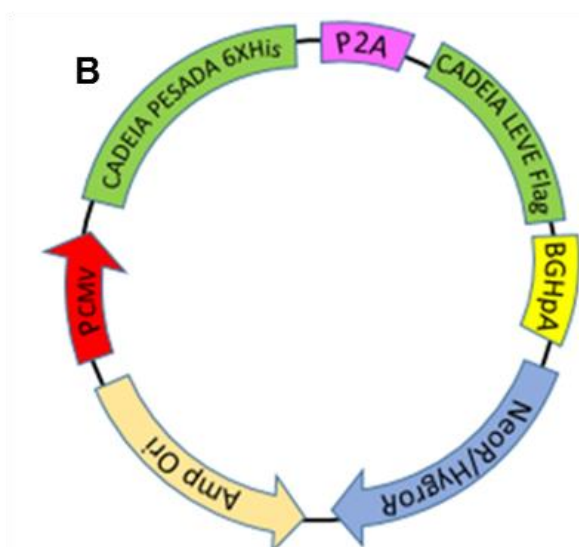


FIGURA 3.7 - REPRESENTAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INSERIDAS NAS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO ANTI-HRSV PARA EXPRESSÃO UTILIZANDO O PEPTÍDEO P2A. **A.** EM AZUL ESTÃO REPRESENTADOS OS SÍTIOS DE CLIVAGEM PARA FURINA E P2A, CONSECUTIVAMENTE; EM VERMELHO A ETIQUETA DE SEIS HISTIDINAS FUSIONADA À CADEIA PESADA DO ANTICORPO E EM ALARANJADO A ETIQUETA FLAG FUSIONADA À CADEIA LEVE DO ANTICORPO. **B.** ESQUEMA DO PLASMÍDEO BASEADO NO PEPTÍDEO DE AUTOCLIVAGEM P2A. EM ROXO ESTÁ REPRESENTADO O PEPTÍDEO P2A FUSIONADO ENTRE AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO (REPRESENTADAS EM VERDE). TODA A CONSTRUÇÃO FOI CLONADA SOB UM ÚNICO PROMOTOR (PCMV, EM VERMELHO).

3.4.3. Vetor baseado em dois cassetes de expressão

Para construção do novo vetor para expressão de proteínas diméricas a partir de um único plasmídeo, utilizou-se o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) como base para o planejamento de alterações da sequência nucleotídica do mesmo através de PCR (reação em cadeia da polimerase). Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para inserção ou remoção de sítios de restrição presentes no vetor original para possibilitar a construção de um vetor que permita a inserção de dois cassetes.

Os fragmentos amplificados correspondem ao promotor do Citomegalovirus (PCMV), para obtenção de altos níveis de expressão; terminador baseado no sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGHpA); o gene de resistência a Higromicina como marca de seleção, e origem de replicação pUC e resistência a ampicilina para propagação em *E. coli* (Amp+Ori). Todos os fragmentos foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores necessários para alteração do vetor base pcDNA3.1/Hygro(+) descritos no quadro 3.2 do item 3.3. Os fragmentos amplificados foram adenilados e ligados com o vetor pGEM-T Easy, como descrito no item 3.3.1.

Para construção do vetor final, foi utilizada a abordagem de geração de extremidades coesivas para ligação de cada um dos quatro fragmentos. Com essa abordagem, a ligação de dois sítios de restrição diferentes que possuem extremidades coesivas, promove a reconstituição de uma região sem a presença de nenhum dos dois sítios de restrição. Dessa foram, após confirmação dos clones por sequenciamento, estes foram digeridos e ligados de acordo com os passos descritos na figura 3.8, de modo a construir o vetor baseado em dois cassetes de expressão, nomeado como pcDNAmod.

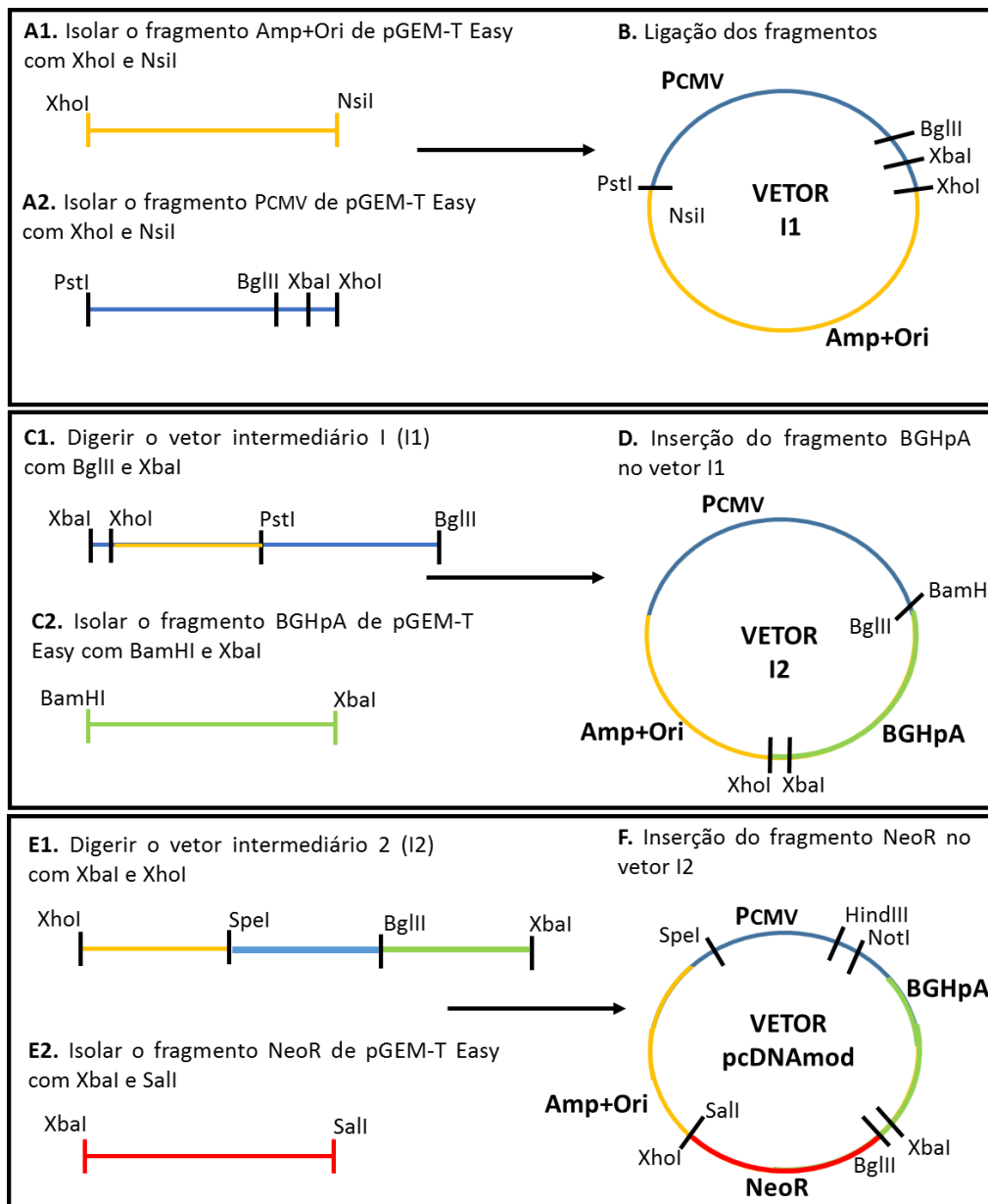


FIGURA 3.8 - ESQUEMA APRESENTANDO A CONSTRUÇÃO DO VETOR BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO - PCDNAMOD. OS PASSOS INDICAM AS CONSECUTIVAS ETAPAS DE DIGESTÃO E LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA PARA CONSTRUÇÃO DO VETOR FINAL. I1 E I2 – VETORES INTERMEDIÁRIOS OBTIDOS POR LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS.

Através da inserção dessas alterações, o vetor base final permitiu a clonagem das sequências codificadoras para as cadeias polipeptídicas entre os sítios de restrição HindIII e NotI, em dois plasmídeos independentes. Após clonagem dos insertos de interesse, três sítios únicos de restrição possibilitaram a formação do plasmídeo final contendo os dois cassetes de expressão. Primeiramente, o vetor base contendo um dos insertos pode ser linearizado através de digestão com as enzimas XbaI e BglII (figura 3.9-A), para inserção do segundo cassete de expressão, liberado

do vetor base após digestão com as enzimas SpeI e BglII (figura 3.9-B), as quais são compatíveis para ligação com as enzimas XbaI e BamHI, respectivamente. Assim, a ligação dos dois fragmentos (figura 3.9-C), permitiu a construção do plasmídeo final contendo os dois cassetes de expressão, nomeado pcDNAModCH-CL (figura 3.9-D).

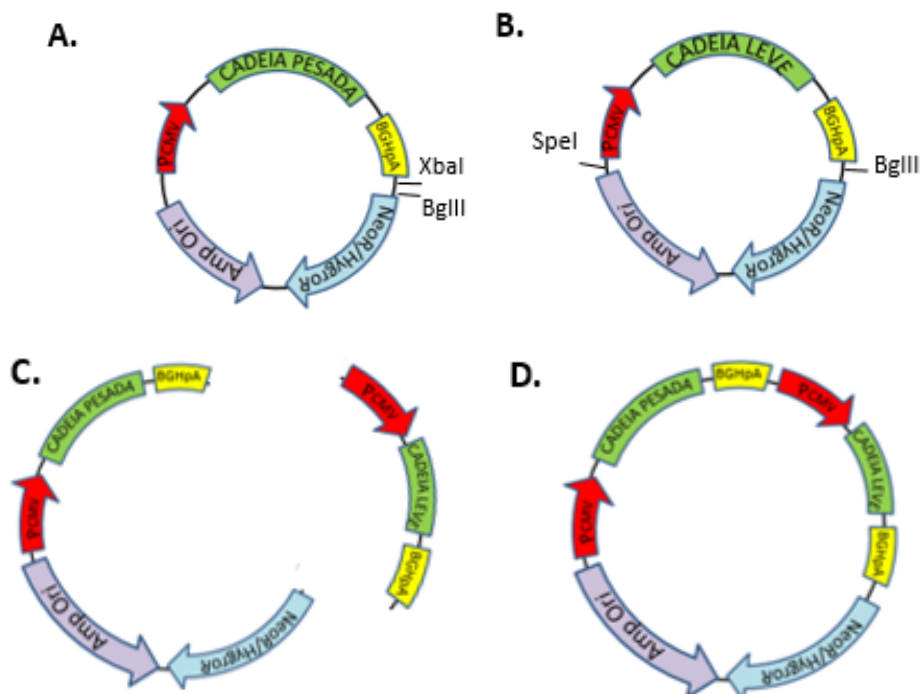


FIGURA 3.9 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO VETOR CONTENDO DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO – PCDNAMODCH-CL – PARA EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-HRSV. **A.** ESQUEMA DE PCDNAMOD CONTENDO A CADEIA POLIPEPTÍDICA CODIFICADORA PARA A CADEIA PESADA DO ANTICORPO NO VETOR MODIFICADO; **B.** ESQUEMA DE PCDNAMOD CONTENDO A CADEIA POLIPEPTÍDICA CODIFICADORA PARA A CADEIA LEVE DO ANTICORPO NO VETOR MODIFICADO; **C.** FRAGMENTOS DOS PLASMÍDEOS MODIFICADOS CONTENDO AS CADEIAS DO ANTICORPO USADOS NA LIGAÇÃO E **D.** ESQUEMA DO VETOR FINAL BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO EM UM ÚNICO PLASMÍDEO – PCDNAMODCH-CL.

3.5. EXPERIMENTOS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

3.5.1. Propagação dos vetores de expressão

Para subclonagem dos genes das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hRSV no vetor de expressão pcDNA3.1/Hygro(+), o plasmídeo foi propagado como descrito no item 3.2. Para confirmação do vetor propagado, este foi submetido a digestão de DNA com diferentes enzimas de restrição pelo período de 2 horas, a 37°C. A primeira digestão foi conduzida com a enzima de restrição EcoRI e a segunda com as enzimas de restrição NotI e BamHI (BioLabs).

O plasmídeo base para construção do vetor baseado em dois cassetes de expressão também foi propagado e submetido a digestão com as enzimas chave para

formação do vetor final, sendo estas BglII, SpeI e XbaI (BioLabs). Todas as amostras digeridas foram analisadas em gel de agarose a 1%. Após corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídeo e analisados em fotodocumentador.

3.5.2. Preparação de DNA dos vetores e dos insertos

Após a confirmação do vetor pcDNA3.1 vazio e confirmação de todos fragmentos correspondentes a cada gene sintético, todos esses plasmídeos foram propagados para obtenção de maiores quantidades de DNA para realização das reações de ligação para montagem das construções genéticas. Foi lançado um pré-inóculo para cada plasmídeo através da adição de uma colônia previamente transformada com o plasmídeo de interesse em 5 mL de meio LB adicionado de ampicilina. A cultura foi incubada por 18 horas sob agitação de 200 rpm, a 37°C. Após o período de incubação, cada pré-inóculo foi inoculado em 250 mL de meio LB, sendo incubados por 18 horas sob agitação de 200 rpm, a 37°C.

As culturas foram centrifugadas por 15 minutos, 6.000xg a 4°C. Em seguida, as células foram submetidas a Midiprep de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). Ao final do processo, as amostras de DNA foram eluídas em 500 µL de H₂O ultrapura através de homogeneização por pipetagem, seguida de incubação a 4°C por 18 horas. Os DNAs foram quantificados e armazenados a -20°C.

3.5.3. Subclonagem das sequências codificadoras nos vetores de expressão

Foi feita a digestão de 5 µg de cada plasmídeo contendo os insertos relativos às cadeias leve e pesada completas do anticorpo, com e sem etiquetas. Também foram digeridos os clones contendo os fragmentos para modificações nas CDRs do anticorpo anti-hRSV e os genes para construção das VLPs.

Em paralelo, foi conduzida a digestão de 10 µg dos vetores pcDNA3.1/Hygro(+), pcDNA3.1/Neo(+), pcDNAmo (baseado em dois cassetes de expressão) e do vetor baseado em peptídeo de autoclivagem P2A com as enzimas HndIII e NotI (BioLabs). As digestões dos vetores foram mantidas por 2 horas a 37°C, seguida de desfosforilação. Para desfosforilação, foi adicionado às reações de digestão dos vetores 20 U da enzima FastAP (*ThermoScientific*). As reações de desfosforilação foram conduzidas por 1 hora a 37°C. Ao final do processo, a fosfatase foi inativada por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

As amostras dos vetores digeridas foram submetidas a precipitação através da adição de 10 µL (10%) de acetado de sódio 3M, pH 5,2 e 550 µL de isopropanol na amostra, seguido de homogeneização e incubação a -20°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 20.000 xg, por 30 minutos a 4°C, sendo os sobrenadantes obtidos descartados. As amostras foram adicionadas de 600 µL de etanol 70% para lavagem através de centrifugação por 15 minutos, a 15.000xg, 4°C. Os sobrenadantes foram novamente descartados e as amostras precipitadas foram submetidas a secagem por aquecimento a 37°C em termobloco por 15 minutos. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de H₂O ultra-pura e submetido a quantificação.

Todas as amostras digeridas foram purificadas a partir de separação em gel de agarose. Primeiramente, todo o volume das digestões foi aplicado em gel de agarose a 1%. Ao término da corrida eletroforética, as bandas de DNA relativas aos insertos foram excisadas do gel e pesadas. A purificação de todos os fragmentos foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante do kit de purificação de DNA Illustra Gfx (*GE Healthcare*).

Com exceção aos fragmentos dos clones pNZ655 e pNZ656, que foram armazenados a -20°C para posterior alteração das CDRs do anticorpo, todos os demais insertos e vetores foram quantificados e submetidos a reações de ligação. Todas as ligações foram preparadas na proporção 3:1, utilizando 300 ng dos insertos, 100 ng dos vetores e 5 unidades da enzima T4 DNA Ligase (ThermoScientific). As reações de ligação foram mantidas por 18 horas a 4°C. Após essa etapa, 10µL de cada ligação foram transformadas em células de *E. coli* DH5α como descrito no item 3.2.

3.5.4. Análise de DNA de plasmídeos

Para confirmação da ligação dos insertos através de digestão do DNA plasmideal, foram lançados inóculos para cada uma das ligações em 5 mL de meio LB. Após crescimento por 18 horas a 37°C, todas as culturas foram centrifugadas a 11.000 xg por 30 segundos para recuperação das células. Em seguida, adicionou-se a estas 300 µL do tampão 1 (50mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 100 µg de RNase). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 300 µL do tampão 2 (200mM de NaOH e 1% de SDS) em cada amostra, seguido de

homogeneização por inversão e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos para lise das células. Em seguida, adicionou-se 300 µL do tampão 3 (acetato de potássio pH 5,5) para neutralização das amostras, estas foram homogeneizadas por inversão e submetidas a centrifugação a 12.000xg, por 10 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo tubo e novamente centrifugados a 12.000 x g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo tubo e adicionados de 400 µL de isopropanol, homogeneizados por inversão e submetidos a nova centrifugação. Os sobrenadantes obtidos foram descartados e as amostras precipitadas foram lavadas com 500 µL de etanol 70% e centrifugadas novamente a 12.000xg, por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as amostras foram submetidas a secagem. Os DNAs precipitados foram eluídos em 40 µL de H₂O e submetidos a quantificação.

Todos os clones obtidos foram analisados por digestão de DNA. Os clones que liberaram fragmentos de DNA correspondentes aos fragmentos esperados foram analisados por sequenciamento para confirmação das sequências nucleotídicas (verificação da ausência de mutações). Após confirmação das sequências, foi realizada a extração de DNA dos clones selecionados para obtenção de maior quantidade de DNA plasmideal para os ensaios de transfecção da linhagem celular HEK293T.

3.6. ENSAIOS DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

3.6.1. Descongelamento de linhagens celulares

Células HEK293T foram descongeladas em fluxo laminar através da adição de meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, diretamente no tubo utilizado para armazenamento em nitrogênio líquido. Através de consecutivas adições e pipetagens de meio DMEM previamente aquecido, a cultura descongelada foi transferida para uma garrafa de cultivo de 25cm² contendo 5 mL de meio de cultura. A garrafa foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.6.2. Padronização da transfecção

Para padronização do ensaio de transfecção, células HEK293T foram plaqueadas em placas de cultivo de 6 poços. As células foram contadas em câmara de Neubauer, na proporção 2:1 com azul de *Trypan* (Trypan Blue Solution – SIGMA).

Foram plaqueadas 200.000 células em três poços e 400.000 células em outros 3 poços da placa em 2 mL de meio de cultura DMEM adicionado de 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C.

As células foram transfectadas com 5µL de *Lipofectamin Transfection Reagent* (Thermo Fisher), mais o DNA de interesse, em 1 mL de meio DMEM sem soro 24 horas após o plaqueamento, quando estas apresentavam confluência entre 50 e 80%. Primeiramente, adicionou-se 25 µL de Lipofectamina a 500 µL de meio DMEM sem soro. Em paralelo, adicionou-se 10 µL de pcDNA-FLAG-eGFP a 200 µL de meio de cultura e 10 µL de pcDNA3.1 também em 200 µL de meio de cultura. As amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos.

Em seguida, misturou-se 100 µL do meio de cultura mais o reagente de transfecção com 100 µL de meio de cultura mais o plasmídeo a ser transfectado, estes foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Essa mistura foi adicionada às respectivas células, como no esquema apresentado na figura 3.10. As células foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C.

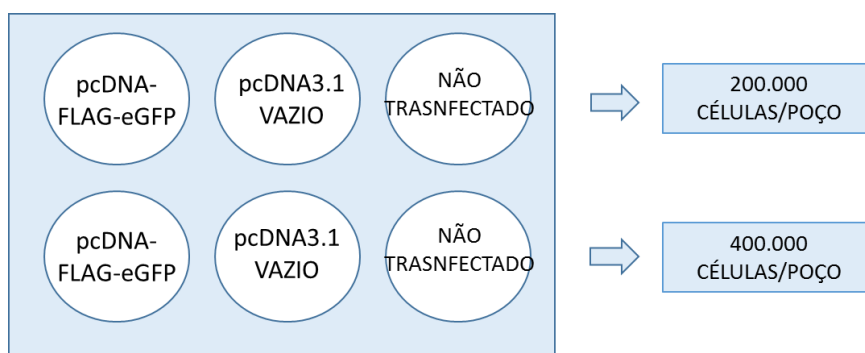


FIGURA 3.10 - ESQUEMA DO TESTE DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T COM O PLASMÍDEO pcDNA-FLAG-eGFP E COM O PLASMÍDEO pcDNA3.1 VAZIO. OS TRÊS POÇOS SUPERIORES FORAM ADICIONADOS DE 200.000 CÉLULAS 24 HORAS ANTES DAS TRANSFEÇÃO, ENQUANTO OS TRÊS POÇOS INFERIORES FORAM ADICIONADOS DE 400.000 CÉLULAS.

Passadas 6 horas após a transfecção, o meio sem soro foi removido, e adicionou-se aos poços 2 mL de meio DMEM adicionado de soro fetal bovino. Após 72 horas da transfecção, as células foram coradas com Hoechst 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate - 10 mg/mL) para visualização em microscópio de fluorescência *EVOS® FLoid® Cell Imaging Station*. O meio de cultura dos poços foi removido e os mesmos foram lavados com 1 mL de PBS (tampão fosfato salino). Em

seguida, adicionou-se aos poços uma solução contendo 6 µg/mL do corante Hoechst 33342 diluído em PBS.

As células foram centrifugadas a 500 xg por 5 minutos para remoção do meio de cultura e lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão PBS. Em seguida, as células foram submetidas a incubação por 30 minutos, em gelo, com 500 µL do tampão de lise (150 nM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 50 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF) para lise celular. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado para análise por SDS-PAGE.

3.6.3. Comparação entre os diferentes sistemas de expressão

Para execução do ensaio de comparação do nível de expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV entre os diferentes sistemas de expressão, plaqueou-se 200.000 células HEK293T por poço em placa de 6 poços. Células com 70% de confluência foram submetidas a transfecção com as diferentes construções plasmideais contendo as sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada do anticorpo recombinante anti-hRSV. A transfecção foi conduzida como descrito no item 3.6.2, sendo testadas as concentrações de 1 e 2 µg de DNA plasmideal. O experimento foi conduzido como descrito na figura 3.11.

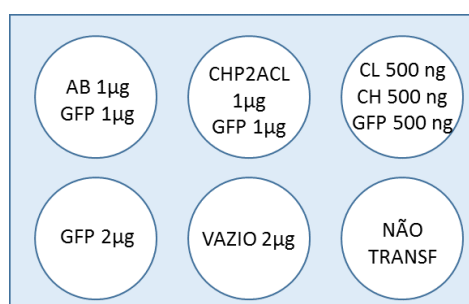


FIGURA 3.11 - ESQUEMA DE TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS HEK293T COM DIFERENTES CONSTRUÇÕES PLASMIDEAIS PARA EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-hRSV. AB. VETOR BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO CONTENDO AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO ANTI-hRS, GFP – VETOR pCDNA-FLAG-eGFP, CH – pCDNA3.1/HYGRO COM A SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA A CADEIA PESADA DO ANTICORPO, CL - pCDNA3.1/HYGRO COM A SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA A CADEIA LEVE DO ANTICORPO, VAZIO – pCDNA3.1 SEM INSERTO.

Após 48 horas da transfecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a 4°C para posterior purificação. As células foram mantidas em cultura até o 5º dia após a transfecção, quando os sobrenadantes foram novamente coletados para purificação.

3.6.4. Curva de seleção com antibióticos

Com o objetivo de determinar a melhor concentração dos antibióticos de seleção para obtenção de linhagens estáveis expressando as proteínas de interesse, foi feita uma curva de seleção com antibióticos. Foram plaqueadas 40.000 células de HEK293T por poço em placa de poços. 24 horas após o plaqueamento, as células começaram a ser tratadas diariamente com diferentes concentrações dos antibióticos Hygromicina ou G418, durante o período de 10 dias. Para Hygromicina foram testadas as concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 115 µg/mL de antibiótico. Para G418, foram testadas as concentrações de 1.000, 1.200, 1.400 e 1.600 µg/mL de antibiótico. As células tratadas com antibióticos foram comparadas durante esse período com células não tratadas. As concentrações efetivas para morte das células após três dias de tratamento foram 115 µg/mL de Hygromicina e 1.600 µg/mL de G418.

3.6.5. Seleção de clones por citometria de fluxo

Primeiramente foi realizada a padronização de *nozzle* a ser utilizado no ensaio de citometria de fluxo com células HEK293. O *nozzle* é um bico ejetor que produz um fino esguicho de fluido, originando microgotas que promovem o enfileiramento das partículas, possibilitando uma análise individual (BD MEDICAL SUPPLIED, 2010). O tamanho do bico ejetor é importante do ponto de vista da manutenção da viabilidade das células analisadas, de modo a evitar a lesão das mesmas.

Para isso, uma garrafa de 25 cm² contendo células HEK293 em confluência foi tripsinizadas e submetida a centrifugação por 7 minutos a 300xg para remoção do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado às células 5 mL de tampão PBS para lavagem. As células foram novamente centrifugadas e o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de tampão PBS para seleção (*sorting*) em FACSAria II com o uso do filtro FSC 2.0, em bico ejetor de 85 µm.

Após contagem no equipamento, verificou-se a concentração aproximada de células por mililitro de solução de 3x10⁴ células em 25 µL. Preparou-se para seleção uma solução contendo 200 µL de PBS mais 25 µL de células. As células separadas foram então adicionadas de iodeto de propídeo (kit V13245) para avaliação da viabilidade celular (marcador de apoptose) e novamente submetidas a separação no equipamento. Em seguida, esse ensaio foi repetido em bico ejetor de 100 µm, onde

foi verificado um perfil aberrante das células, onde constatou-se que a manutenção das mesmas à temperatura ambiente ocasiona a agregação das mesmas.

O ensaio foi repetido mantendo-se as células a 4°C, onde foi estabelecido o uso do bico ejetor de 85µm. Para seleção de células HEK293T transfectadas com as diferentes construções para expressão do anticorpo recombinante e para expressão das VLPs de hRSV, os experimentos foram realizados como descrito na figura 3.12.

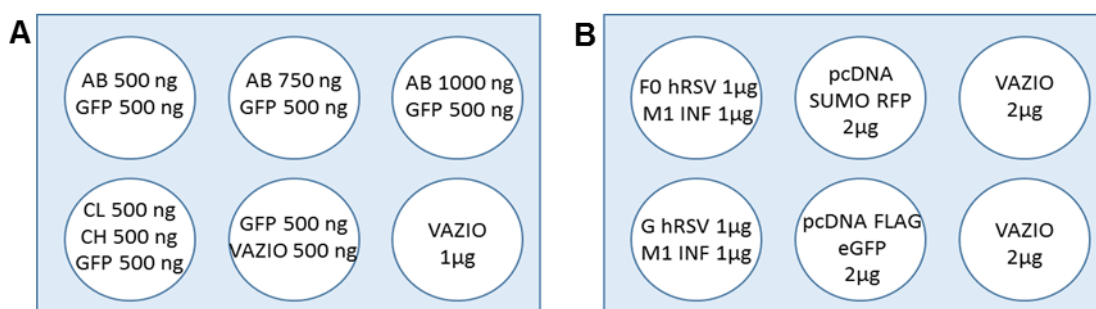


FIGURA 3.12 - ESQUEMA DE TRANSFECCÃO PARA SELEÇÃO POR SORTING. **A.** TRANSFECCÃO COMPARANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-HRSV. AB – PCDNAMODCH-CL, GFP – PLASMÍDEO PCDNA-FLAG-EGFP, CL - CADEIA LEVE CLONADA EM PCDNA3.1, CH - CADEIA PESADA CLONADA EM PCDNA3.1, E VAZIO - PCDNA3.1 SEM INSERTO. **B.** TRANSFECCÃO DAS CONSTRUÇÕES PARA EXPRESSÃO DAS VLPs DE HRSV. F0 HRSV – PCDNAMOD CONTENDO A CONSTRUÇÃO F0+RFP, M1 INF - PCDNAMOD CONTENDO A SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA A PROTEÍNA M1 DE INFLUENZA, E G HRSV - PCDNAMOD CONTENDO A CONSTRUÇÃO G+GFP.

As células foram submetidas a seleção por citometria após 48 horas após a transfecção. Foi testada a abordagem de seleção de células por fluorescência através de coleta de uma célula por poço em placa de 96 poços (*single cell sorting*).

3.7. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.7.1. Purificação do anti-hRSV por cromatografia de afinidade a proteína A

A purificação do anticorpo recombinante feita a partir dos sobrenadantes das culturas obtidos 2 e 5 dias após a transfecção de células HEK293T. Primeiramente, as microesferas magnéticas conjugadas à proteína A foram lavadas para remoção do tampão de preservação através de três incubações com 1 mL de PBS (tampão fosfato salino - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). Em seguida, os sobrenadantes da cultura foram centrifugados por 5 minutos a 500 xg seguido de filtração em filtro de 0,45 µm. Os sobrenadantes clarificados foram incubados com 100 µL de microesferas magnéticas acopladas à proteína A por 2 horas à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, as microesferas foram recuperadas em estante magnética, sendo os sobrenadantes (não-ligado) coletados para análise. As microesferas foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e os anticorpos ligados foram eluídos por adição de 50 µL de tampão de amostra para proteínas (40 mM Tris-HCl 1M pH 6,8, 1% dodecil sulfato de sódio, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol, 0,005% azul de bromofenol), seguido de aquecimento a 95°C por 5 minutos, ou alternativamente pela adição de 50 µL de glicina 0,1 M, pH 2,7.

Para purificação de maiores quantidades do anticorpo recombinante, a linhagem estável selecionada expressando o anticorpo anti-hRSV foi propagada para 6 garrafas de 150 cm², através de cultivo com 20 mL de meio DMEM, com ou sem soro fetal bovino. O volume total de sobrenadante obtido a partir das garrafas de cultura (120 mL) foi centrifugado por 10 minutos a 500 xg. O sobrenadante foi passado através de filtro de 0,45 µm e adicionado de 10 mL do tampão de ligação (20mM de fosfato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,0) concentrado 10 vezes.

Para purificação das amostras foi utilizada a coluna HiTrap Protein A HP, 1 mL (GE Healthcare). O método cromatográfico foi constituído de 2 passos, primeiro com 5 volumes de coluna com 70% do tampão de eluição (0,1M de ácido cítrico, pH 3,0) seguido de 10 volumes de coluna com 100% do tampão de eluição. Cada amostra eluída foi adicionada de 10% do tampão de neutralização (0,1M de Tris-HCl, pH 9,0). As amostras foram submetidas a análise por SDS-PAGE e *Western Blot*.

3.7.2. Purificação de VLPs de hRSV

Para purificação das VLPs de hRSV, após seleção dos transfectantes com antibiótico, coletou-se o sobrenadante de células confluentes em garrafa de 25 cm². Os sobrenadantes das células transfectadas para reconstituição da VLP contendo as sequências codificadoras para as proteínas G de hRSV e M1 Influenza foram imunoprecipitados através de incubação por 1 hora com microesferas magnéticas acopladas a proteína A, previamente ligadas com 1 µg do anticorpo *anti-flag-M2-mouse* (F1084 – SIGMA) por 1 hora. Ao final do período de incubação, as microesferas foram recuperadas em estante magnéticas, e as amostras ligadas foram eluídas por aquecimento a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra de proteínas (item 3.7.1).

Os sobrenadantes das células transfectadas para reconstituição da VLP F0 de hRSV e M1 de Influenza foram incubados com 50 µL de resina Ni-NTA por 2 horas

sob agitação, a 4°C. Após incubação, a resina foi lavada 2 vezes com tampão A (item 3.7.1) através de centrifugação a 100 xg por 1 minuto. As amostras foram eluídas através de incubação por 5 minutos em 300 µL de tampão B (item 3.7.1).

Alternativamente, os sobrenadantes também foram submetidos a purificação através de centrifugação do meio de cultura em colunas Amicon Ultra-0,5 (Merck Millipore) de 100 kDa. Dessa forma, através de consecutivas centrifugações por 5 minutos, a 14.000 xg, 4°C, apenas proteínas com massa molecular superior a 100 kDa ficariam retidas na coluna. As amostras foram recuperadas e submetidas a aquecimento a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra de proteínas (item 3.7.1).

Como as VLPs de hRSV poderiam não estar sendo secretadas, também foi testado o lisado das células transfectadas. As células foram coletadas de uma garrafa de 75 cm² e foram lavadas com 5 mL de PBS para remoção do meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas em gelo por 30 minutos com a solução de lise (10 mM de Tris HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100, 1 mM de PMSF), seguida de centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos. Todas as amostras, eluídas a partir do sobrenadante ou lisado, foram preparadas para análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13% e posterior *Western Blot*.

3.7.3. Western Blot

As amostras eluídas referentes ao anticorpo recombinante a às VLPs (20 µL de cada) foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13%. Em seguida, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose, ou alternativamente para membrana de PVDF (Fluoreto Polivinidileno) e submetidas a *Western Blot*. Após bloqueio por 1 hora com solução PBS + 5% de leite em pó, as membranas foram lavadas com solução de PBS + 0,05% de Tween 20 e então incubados com os respectivos anticorpos por 1 hora:

- Amostras anti-hRSV: anticorpo anti-IgG Humana na diluição 1:30.000 (A3187 SIGMA).
- Amostras VLP G+M1: anti-G recombinante policlonal na diluição de 1:3.000.
- Amostras VLP F0+M1: anti-histidina 1:3.000 (27-4710-01 - GE Healthcare)

As membranas referentes às amostras das VLPs foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com PBS + 0,05% de Tween 20 e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* (A3688 - SIGMA) na diluição de 1:30.000. Após 1 hora de incubação com o

anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com PBS + 0,05% de Tween 20. A membrana referente às amostras do anticorpo recombinante não foi incubada com anticorpo secundário. Em seguida, o Western Blot foi revelado por fosfatase alcalina através de incubação das membranas com a solução de revelação contendo 10 mL de tampão (100 mM de Tris-HCl e 2 mM de MgCl) mais 66 µL de NBT (nitro blue tetrazolium) e 33 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (*Promega*). Para finalizar a revelação, as membranas foram incubadas com uma solução contendo 10 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético).

3.8. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A

Para padronização dos ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para verificação da expressão de anticorpos a partir do sobrenadante de culturas, foi realizada a purificação de proteína A de *Staphylococcus aureus*, proteína utilizada como ligante para purificação de anticorpos monoclonais.

3.8.1. Indução da expressão de proteína A recombinante

Primeiramente, células de *E. coli* DH5α foram transformadas com os clones 13.2, plasmídeo pET28a contendo a sequência codificadora para a quatro domínios Z da proteína A (28,8 kDa) e 13.6, plasmídeo pET28a contendo a sequência codificadora para a proteína A fusionada à sequência codificadora para a proteína verde fluorescente (GFP – *green fluorescent protein* - 55,9 kDa). Foi lançado um inóculo para cada clone para propagação dos DNAs plasmídeos. Os plasmídeos obtidos foram eluídos em 50 µL de H₂O ultra-pura e quantificados em espectrofotômetro e submetidos a transformação de células de *Escherichia coli* cepa BL-21 Star (DE3) para expressão das proteínas de interesse.

Para indução da expressão das proteínas, uma colônia de cada um dos clones foi utilizada para lançamento de pré-inóculos de 5mL em meio LB adicionado de 25µg/mL do antibiótico de seleção canamicina. Após incubação overnight, estes foram inoculados em 100 mL de meio LB para indução da expressão das proteínas de interesse. Os inóculos foram incubados a 37°C, 200 rpm por 2 horas. A leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras foi feita em espectrofotômetro a 600 nm.

Como ambas as culturas apresentaram D.O a 600 nm entre 0,6 e 0,8, realizou-se a indução da expressão das proteínas através da adição de 0,5 mM de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) nas culturas. As células foram submetidas a indução a 37°C, 200 rpm por 4 horas. Após o término do período de indução, as células foram recuperadas por centrifugação a 6.000 x g, por 10 min a 4°C. Os pellets foram estocados a -20 °C.

3.8.2. Purificação por cromatografia de afinidade por gravidade

A cultura induzida para expressão da proteína A foi descongelada e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol), adicionado de inibidor de protease e 200 μ g de lisozima. A lise das células foi desenvolvida por 50 minutos, através de incubação em gelo. Após esse período, as células foram sonicadas por 15 pulsos de 10 segundos a uma amplitude de 30% por, com intervalos de 50 segundos. Após sonicação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 minutos a 4°C.

Primeiramente, adicionou-se 100 μ L de resina Ni-NTA em dois tubos de centrífuga com capacidade para 1,7 mL. A resina foi equilibrada através incubação com 1 mL de tampão A, seguida de centrifugação por 100 xg por 1 minuto. O equilíbrio foi feito por 3 vezes. Em seguida, os sobrenadantes das amostras (1 mL de cada), foram incubados com as resinas Ni-NTA previamente equilibrada por 1 hora sob agitação a 4°C. Após incubação, as resinas foram lavadas 3 vezes com tampão A. Em seguida, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 500 μ L de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl e 20 mM Imidazol). Amostras foram estocadas a -20°C para análise em gel de poliacrilamida.

3.8.3. Cromatografia de afinidade em sistema semi-automatizado

Foi feita a indução de 2 L de cultura em meio LB contendo canamicina (20 μ g/mL) com 0,5 mM de IPTG a uma D.O. a 600 nm de 0,810. A cultura foi centrifugada a 6.000 xg por 10 minutos e as células foram armazenadas a -20°C. Para preparo do extrato, as células ressuspensas em tampão A (3 mL/g) adicionado de 0,5 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) e inibidor de protease em pastilha (Roche). As amostras foram lisadas em microfluidificador através de 6 passagens a 80 psi. O extrato foi submetido a centrifugação a 20.000 xg, por 30 minutos, 4°C. O

sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo e foi adicionado de 1% de sulfato de estreptomicina, seguido de centrifugação a 20.000 xg, 30 min, 4°C. o sobrenadante obtido foi filtrado a 0,45 µm.

Ao final do processo, 38 mL de amostra foram submetidos a purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP 5mL em cromatógrafo *ÅKTA purifier* UPC-900 (GE Healthcare). Adotou-se um fluxo de 5 mL por minuto para ligação da amostra à resina em tampão A (150 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% Glicerol, 20 mM Imidazol, 0,5 mM PMSF). As amostras foram eluídas em tampão B (250 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% Glicerol, 500 mM Imidazol, 0,5 mM PMSF), sendo coletadas frações de eluição de 1,5 mL. As frações eluídas foram adicionadas de inibidor protease e EDTA e estocada a -20 °C.

3.9. TESTES FUNCIONAIS

3.9.1. Seleção de clones por ensaio de ELISA

Para testar o nível de expressão de anticorpos dentre os transfectantes selecionados, padronizou-se um ensaio de ELISA indireto, com o uso de proteína A (item 3.7) para ligação dos anticorpos. A padronização do ensaio foi obtida através de uma curva de concentração do anticorpo comercial MEDI-593 (Synagis). O anticorpo foi cedido por uma farmácia de Curitiba vinculada à Secretaria Municipal de Saúde após ter sido aberto para aplicação em crianças pertencentes aos grupos de risco descritos em sua bula. Restou no frasco aproximadamente 350 µL do MEDI-493, a uma concentração de 100 mg/mL. O anticorpo foi então diluído em solução tampão PBS adicionado de 0,1% Tween-20 para uma concentração de 5 mg/mL e armazenado a -20°C.

Primeiramente, a placa de ELISA foi sensibilizada por 18 horas a 4°C com uma solução contendo 1000 µg/mL de proteína A em tampão PBS. Após essa etapa, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de tampão PBS e então bloqueados com 200 µL da solução de BSA a 1% por 2 horas a 37°C. Os poços foram novamente lavados 2 vezes com 200 µL de tampão PBS e adicionados da solução contendo o anticorpo MEDI-493 diluído em PBS para obtenção das concentrações descritas no quadro 3.4.

150 ng/mL	150 ng/mL	250 pg/mL	250 pg/mL
100 ng/mL	100 ng/mL	150 pg/mL	150 pg/mL
50 ng/mL	50 ng/mL	50 pg/mL	50 pg/mL
25 ng/mL	25 ng/mL	25 pg/mL	25 pg/mL
5 ng/mL	5 ng/mL	5 pg/mL	5 pg/mL
2,5 ng/mL	2,5 ng/mL	2,5 pg/mL	2,5 pg/mL
500 pg/mL	500 pg/mL	PBS1 X	PBS1 X

QUADRO 3.4 - PADRONIZAÇÃO DA CURVA DE DILUIÇÃO DO ANTICORPO MEDI-493. TODAS AS CONCENTRAÇÕES FORAM TESTADAS EM DUPLICATA.

A incubação com o anticorpo foi realizada por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, os poços foram lavados com PBS e incubados por 1 hora com 100 µL da solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG Humana conjugado à fosfatase alcalina (A3187 - SIGMA), na diluição de 1:2500.

Após incubação com o anticorpo secundário, os poços foram novamente lavados com PBS e então adicionados de 200 µL do substrato líquido para fosfatase alcalina pNPP (*p-Nitrophenyl Phosphate Substrate* - P7998 - SIGMA). As amostras foram incubadas com o substrato ao abrigo da luz por 30 minutos, seguida de adição de 50 µL por poço de NaOH a 3N para inativar a enzima fosfatase alcalina. A placa foi lida em equipamento *Biotek Synergy H1 Hybrid Reader*, a 405 nm (nanômetros).

3.9.2. Reconhecimento da proteína F1 por *Western Blot*

Para testar a funcionalidade do anticorpo anti-hRSV, amostras purificadas a partir do sobrenadante da cultura foram utilizadas como anticorpo primário em ensaio de *Western Blot* contra a proteína F1 recombinante do hRSV. Primeiramente, em gel de poliacrilamida a 13% carregou-se 7 µL de proteína F1 recombinante (336 µg/mL) previamente aquecida a 95°C por 5 minutos com 3 µL de tampão de amostra de proteína (item 3.7.1). Aplicou-se 10 µL da proteína F1 em cada poço do gel.

Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi cortada para separar canaletas contendo proteína F1 para incubação separada com os respectivos anticorpos. As membranas foram bloqueadas por 1 hora, lavadas com PBS e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários: α-F1 Policlonal-mouse na diluição 1:3.000, anticorpo recombinante α-hRSV, soro negativo 1:3.000, monoclonal α-His 1:3.000 (27-4710-01 - *GE Healthcare*) e 2 e 5 µg/mL de MEDI-493 (*Synagis*).

Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas novamente com PBS e então incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados à fosfatase alcalina por 1 hora, nas seguintes condições: α -Mouse 1:30.000 e α -IgG Humana 1:30.000. Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram novamente lavadas com PBS e então submetidas a revelação com os reagentes NBT e BCIP (*Promega*), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.3. Reconhecimento do vírus hRSV por *Western Blot* e ELISA

Para testar a funcionalidade do anticorpo anti-hRSV recombinante, este foi testado contra amostras clínicas de pacientes infectados com o vírus hRSV, e também contra amostras negativas (controle). Todas as amostras utilizadas para esse estudo foram cedidas pelo LACEN-PR (Laboratório Central do Estado do Paraná), caracterizadas pelo lavado nasal de pacientes com Suspeita de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). As amostras foram previamente testadas pelo LACEN-PR através de Reação da Transcriptase Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex RT-PCR, de modo que o Ct (*threshold cycle*) de cada uma das amostras (quadro 3.5), indica o nível de infecção viral, onde um Ct mais baixo se refere a uma amostra com maior quantidade do vírus.

AMOSTRAS POSITIVAS PARA RSV		AMOSTRAS NEGATIVAS
Amostra	Ct	Amostra
4223	12	4580
4275	15	4588
4414	15	4592
4451	16	4593
4587	17	4665
4562	30	—
4420	30	—
4194	31	—
4236	32	—
4383	32	—

QUADRO 3.5 - AMOSTRAS DE LAVADO NASAL PARA ENSAIOS FUNCIONAIS DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-hRSV.

Foram utilizados 3 μ L de cada amostra para a análise. As amostras foram inicialmente submetidas a desnaturação a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra de proteína (item 3.7.1). Após desnaturação, as amostras foram analisadas por SDS-

PAGE em gel de agarose a 13%, seguida de transferência para membrana de PVDF para Western Blot.

Após bloqueio e lavagem, as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo comercial (3 µg/mL de MEDI-493 (Synagis) ou com o anticorpo recombinante obtido a partir de purificação do meio de cultura. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas novamente e então incubadas com o anticorpo secundário α-IgG Humana 1:30.000, conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora. Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram novamente lavadas e então submetidas a revelação com os reagentes NBT e BCIP (*Promega*), de acordo com as instruções do fabricante.

Para o ensaio de ELISA foram utilizados 5 µL de cada amostra em 95 µL de PBS para sensibilização da placa. As amostras foram incubadas por 2 horas com o anticorpo primário 100 µL do MEDI-493 (a 3 µg/mL) ou 100 µL do anticorpo recombinante. Após lavagem, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário α-IgG Humana 1:2.500 por 1 hora, seguido de revelação com substrato pNPP (SIGMA), de acordo com o item 4.2.3, seguido de quantificação em leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek), a 405 nm.

4. RESULTADOS

4.1. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

4.1.1. Subclonagem anticorpo anti-hRSV em pcDNA3.1

Para subclonagem das sequências codificadoras do anticorpo recombinante em vetor de expressão pcDNA3.1, todos os clones sintetizados pela GenScript foram recuperados e subsequentemente digeridos com suas respectivas enzimas de restrição, conforme descrito na metodologia (quadro 3.1). As digestões foram analisadas em gel de agarose a 0,8% (figura 4.1). Todos os clones apresentaram migração compatível com a massa molecular referente às sequências solicitadas.

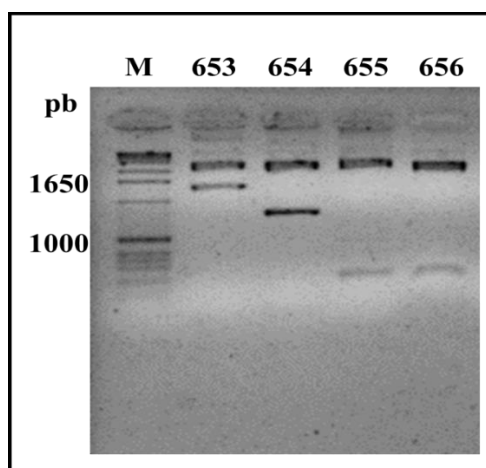


FIGURA 4.1 - DIGESTÃO DOS CLONES SINTETIZADOS PELA GENSCRIPT. **M** – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1 KB DNA LADDER, **653** – CLONE PNZ653 - CADEIA PESADA COMPLETA DO ANTICORPO (1427 PB), **654** – CLONE PNZ654 - CADEIA LEVE COMPLETA DO ANTICORPO (821 PB), **655** – CLONE PNZ655 – FRAGMENTO COM PARTE DA CDR DA CADEIA PESADA DO ANTICORPO MEDI-524 (205 PB) E **656** – CLONE PNZ656 - FRAGMENTO COM PARTE DA CDR DA CADEIA LEVE DO ANTICORPO MEDI-524 (205 PB).

O vetor pcDNA3.1/Hygro(+) foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI e NotI para verificar que o mesmo estava correto para realização das subclonagens. Após confirmação, o vetor foi digerido com as enzimas de restrição HindIII e NotI e foi ligado com os fragmentos de DNA que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo recombinante anti-hRSV. A ligação foi transformada na cepa de *E. coli* DH5 α . O DNA dos clones transformantes foi extraído e digerido com as enzimas de restrição HindIII e NotI (figura 4.2).

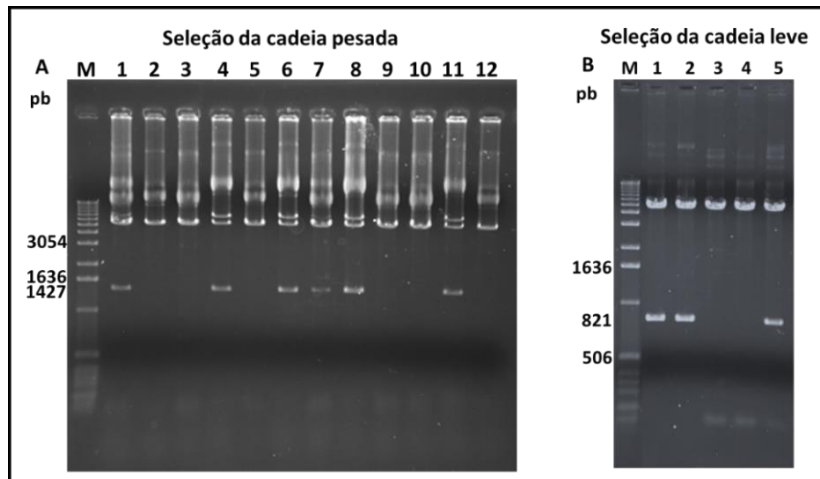


FIGURA 4.2 - GÉIS DE AGAROSE A 1% CORADOS COM BROMETO DE ETÍDEO CONFIRMANDO A SUBCLONAGEM DAS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO ANTI-HRSV EM VETOR DE EXPRESSÃO pcDNA3.1/(+)HYGRO. **A.** M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1 KB DNA LADDER, 1 A 12 – DIGESTÃO COM HINDIII E NOTI DOS CLONES TRANSFORMADOS COM pcDNA3.1 LIGADO COM A CADEIA PESADA. **B.** M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1 KB DNA LADDER, 1 A 5 – DIGESTÃO COM HINDIII E NOTI DOS CLONES TRANSFORMADOS COM pcDNA3.1 LIGADO COM A CADEIA PESADA.

4.1.2. Construção do vetor pcDNA3.1mod e subclonagem

Para construção do vetor baseado em dois cassetes de expressão (pcDNAmod), os fragmentos do promotor (PCMV), terminador (BGHpA), marca de seleção (gene de resistência à Hygromicina) e origem de replicação em bactérias (Amp+Ori), tiveram suas reações de amplificação padronizadas com sucesso (figura 4.3), utilizando como molde o DNA plasmideal do vetor pcDNA3.1/Hygro(+), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos no item 3.3.

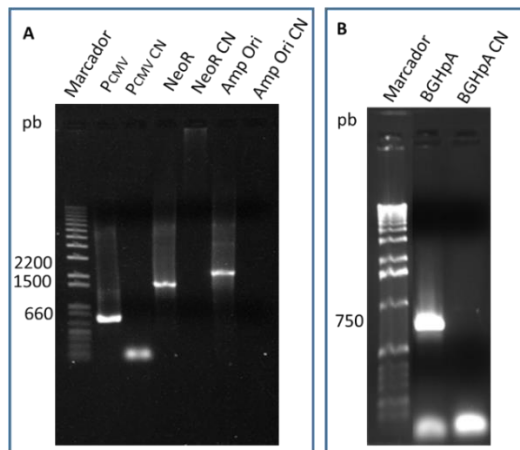


FIGURA 4.3 - GÉIS DE AGAROSE A 1% CORADO COM GELRED PARA ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR NECESSÁRIOS PARA CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pcDNAmod. **A.** M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, PCMV - 721 PARES DE BASE, NEOR - 1.710 PARES DE BASE, AMPR - 2.204 PARES DE BASE. **B.** M – MARCADOR DE PESO MOLECULAR, BGHPA - 785 PARES DE BASE. CN – CONTROLES NEGATIVOS DAS AMPLIFICAÇÕES.

Todas as bandas amplificadas apresentaram perfil de migração em gel de agarose a 1% correspondendo à massa molecular dos fragmentos. Dessa forma, cada um desses fragmentos foi adenilado para ligação com o vetor pGEM-T Easy para obtenção de maior quantidade de DNA para digestão e posterior ligação dos quatro fragmentos, de acordo com o processo descrito no item 3.3.1.

Primeiramente, o fragmento Amp+Ori, digerido com as enzimas XhoI e NsiI, foi ligado com o fragmento PCMV, digerido com as enzimas PstI e XhoI, já que os sítios de restrição para NsiI e PstI formam extremidades coesivas, compatíveis para ligação. Após obtenção do DNA plasmideal dessa ligação, o vetor intermediário 1 foi digerido com as enzimas BglII e XbaI, enquanto o fragmento BGHpA foi digerido com as enzimas BamHI e XbaI, de modo que os sítios de restrição para BglII e BamHI formam extremidades compatíveis para ligação. Esses fragmentos foram ligados, e, após obtenção do DNA plasmideal do vetor intermediário 2, foi conduzida a última etapa para ligação do fragmento faltante. O vetor intermediário 2 foi digerido com as enzimas XbaI e XhoI, enquanto o fragmento NeoR foi digerido com XbaI e Sall. Como os sítios de restrição Sall e XhoI formam extremidades coesivas, estes fragmentos foram submetidos a reação de ligação para obtenção do vetor pcDNAMod (figura 4.4).

Após a ligação de todos os fragmentos para construção do novo vetor de expressão, foi realizada a subclonagem das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hRSV, separadamente no vetor base pcDNAMod. Em seguida, o vetor final resultante ligado com a cadeia pesada foi digerido com as enzimas XbaI e BglII, para linearização desse plasmídeo. O vetor final resultante da ligação com a cadeia leve foi digerido com as enzimas SpeI e BglII, para liberação do cassete de expressão.

Os dois fragmentos foram purificados e ligados, devido à compatibilidade entre os sítios de xbaI e SpeI. Após transformação da ligação em células de *E. coli* DH5a e obtenção do DNA plasmideal, o vetor final baseado em dois cassetes de expressão em único plasmídeo, foi digerido com diferentes pares de enzima para confirmação do tamanho total esperado de 8.986 pares de base. As digestões foram realizadas com as enzimas HindIII e NotI (figura 4.5-A) ou com as enzimas HindIII e BglII).

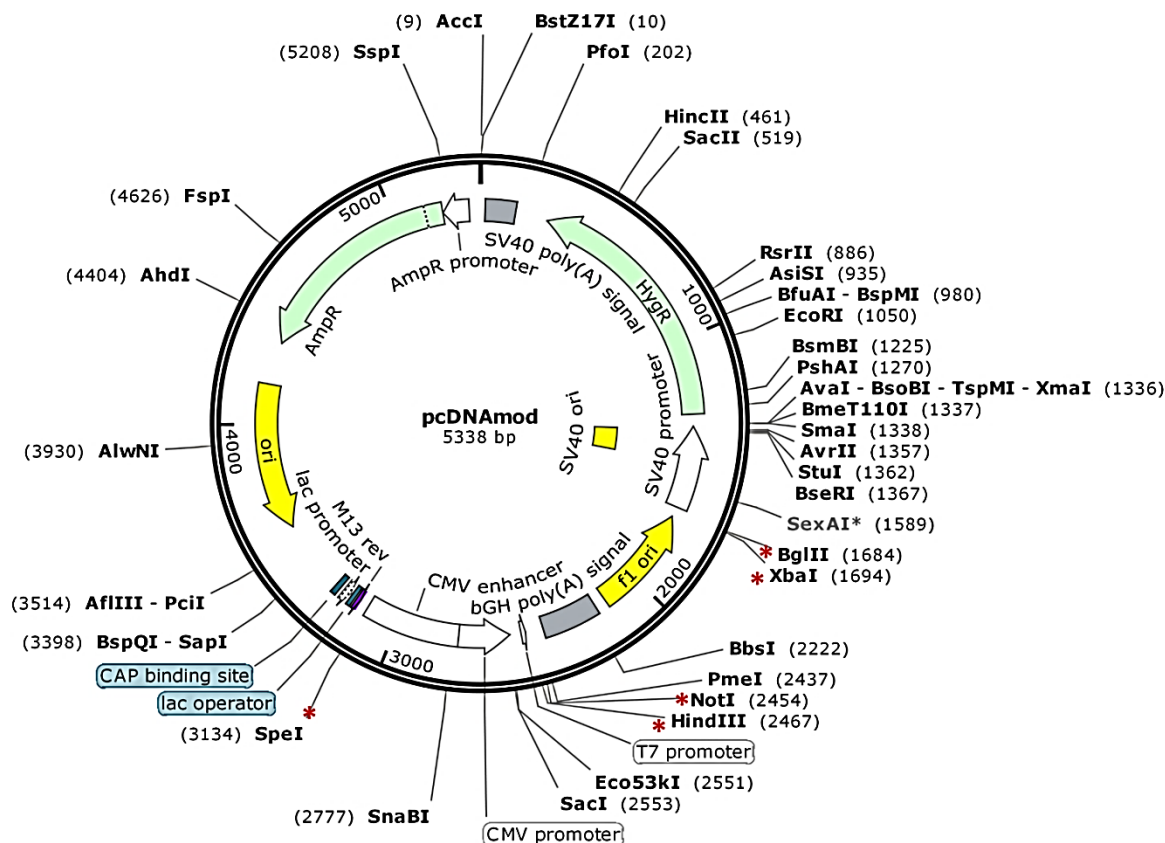


FIGURA 4.4 - ESQUEMA APRESENTANDO O PLASMÍDEO PCDNAMOD, BASE PARA MONTAGEM DO VETOR FINAL BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO. EM NEGRITO ESTÃO DESTACADOS OS SÍTIOS ÚNICOS DE RESTRIÇÃO, SENDO OS SÍTIOS HINDIII E NOTI USADOS PARA INSERIR AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS, ENQUANTO OS SÍTIOS BGLII E XBAI SÃO USADOS PARA INSERIR O SEGUNDO CASSETE DE EXPRESSÃO, PREVIAMENTE DIGERIDO COM SPEI E XBAI (TODOS DESTACADOS COM ASTERISCOS). ESQUEMA DO PLASMÍDEO CONSTRUÍDO UTILIZANDO O SOFTWARE SNAPGENE.

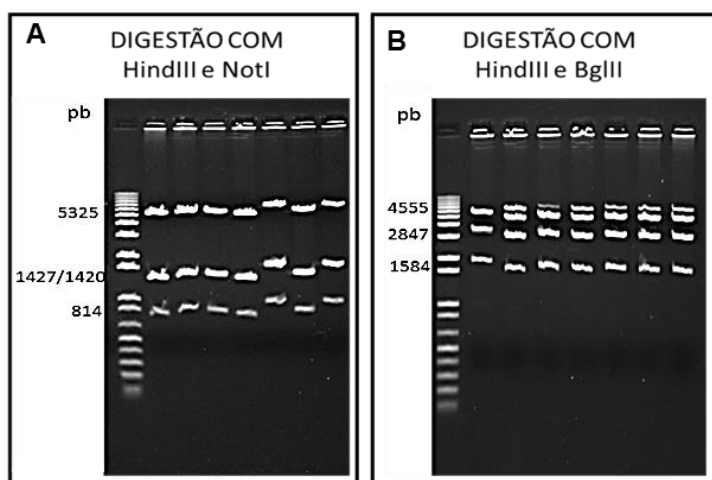


FIGURA 4.5 - GÉIS DE AGAROSE A 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO PARA ANÁLISE DE DIGESTÃO DE PLASMÍDEOS PCDNAMODCH-CL OBTIDO A PARTIR DA LIGAÇÃO COM AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO. **A.** DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE PLASMÍDEOS COM AS ENZIMAS HINDIII E NOTI, GERANDO OS FRAGMENTOS DE 5325, 1427, 1420 E 814 PARES DE BASE. **B.** DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE PLASMÍDEOS COM AS ENZIMAS HINDIII E BGLII, GERANDO OS FRAGMENTOS DE 4555, 2847 E 1584 PARES DE BASE.

Pode-se observar que na figura 4.5-A, são verificadas apenas 3 bandas, ao invés de 4. Isso se deve ao fato de que as digestões resultaram em fragmentos de tamanhos em pares de base aproximados, correspondentes a 1427 e 1420, não podendo ser observada a presença das duas bandas em gel de agarose a 1%. No entanto, a digestão com as enzimas HindIII e BglIII (figura 4.5-B) pode ser confirmada a presença de todas as bandas correspondentes ao vetor final. De acordo com o padrão de migração no gel, compatível com os fragmentos esperados após digestão dos plasmídeos, o clone 1 foi o escolhido para transfecção de células HEK293T. A figura 4.6 apresenta o esquema do vetor final, após ligação com as cadeias leve e pesada do anticorpo (pcDNAModCH-CL).

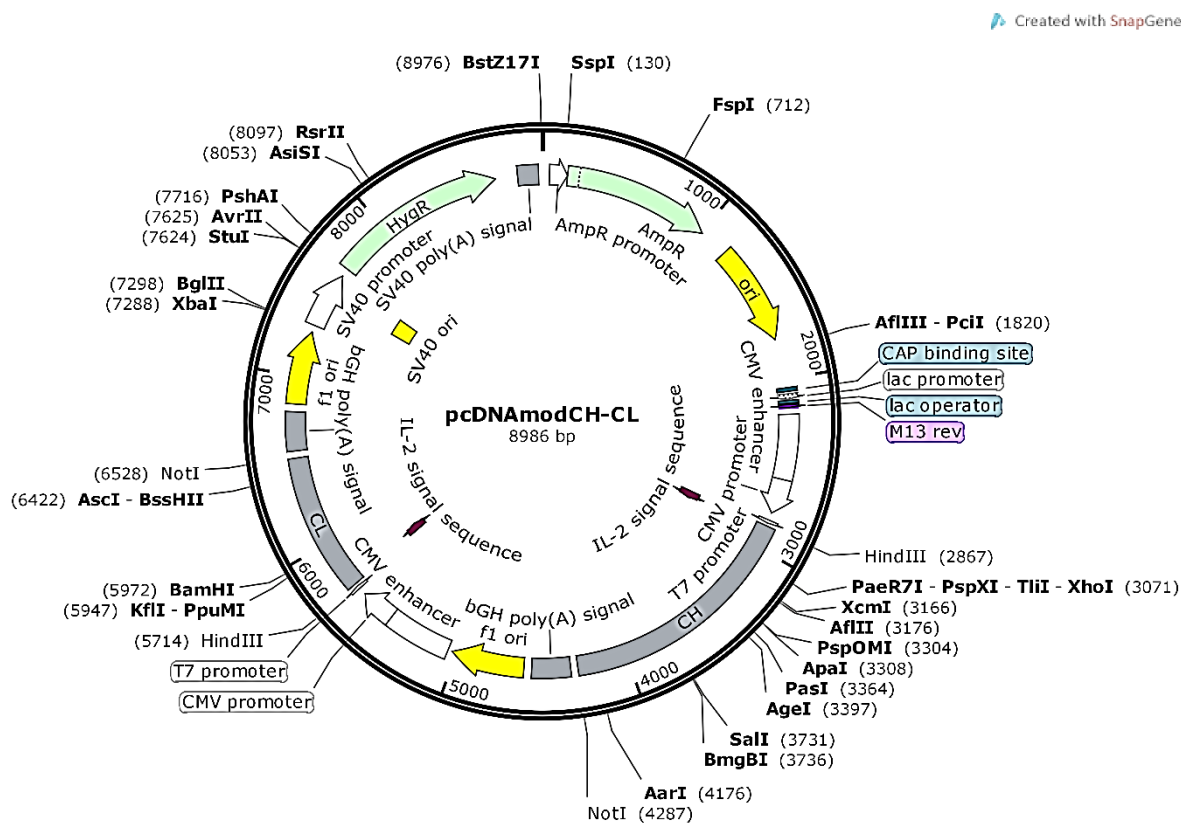


FIGURA 4.6 - ESQUEMA APRESENTANDO O VETOR PCDNAMODCH-CL, UTILIZADO PARA EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-HRSV A PARTIR DE UM ÚNICO PLASMÍDEO. EM NEGRITO ESTÃO DESTACADOS OS SÍTIOS ÚNICOS DE RESTRIÇÃO. ESQUEMA DO PLASMÍDEO CONSTRUÍDO UTILIZANDO O SOFTWARE *SNAPGENE*.

4.1.3. Construção do vetor baseado em peptídeo de autoclivagem

As cadeias leve e pesada do anticorpo foram amplificadas com sucesso (figura 4.7), utilizando como DNA molde os clones pNZ653 (cadeia pesada) e pNZ654 (cadeia leve), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos no quadro 3.1 (item 3.2)

para inserção das alterações necessárias para construção desse sistema de expressão.

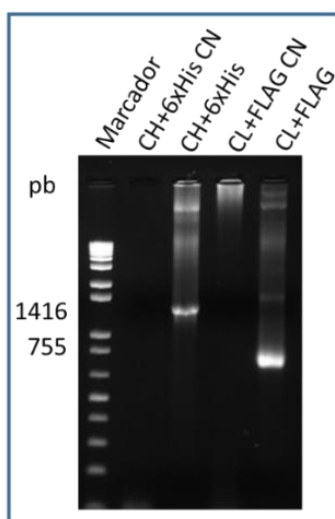


FIGURA 4.7 - GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM GELRED PARA ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR NECESSÁRIOS PARA CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO BASEADO EM PEPTÍDEO DE AUTOCLIVAGEM – PCDNAMODCHP2ACL. M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR, CH+6xHis – CADEIA PESADA ADICIONADA DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA A CAUDA DE SEIS HISTIDINAS COM 1.416 PARES DE BASE, CL+FLAG – AMPLIFICAÇÃO DA CADEIA LEVE ADICIONADA DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA O P2A E ETIQUETA FLAG, COM 755 PARES DE BASE, CN – CONTROLES NEGATIVOS DAS AMPLIFICAÇÕES.

As amostras amplificadas foram ligadas com o plasmídeo pGEM-T Easy para obtenção de maior quantidade de DNA para digestão e posterior ligação dos fragmentos com o vetor pcDNAMod, como processo descrito na figura 3.7 (item 3.4.1). As ligações foram transformadas em células de *E. coli* DH5 α e foram submetidas a digestão com as enzimas HindIII e NotI para verificação da ligação das duas sequências codificadoras com o vetor de expressão. Cinco clones positivos foram selecionados para ensaio de transfecção de células HEK293T.

4.1.4. Clonagens para construção das VLPs de hRSV

Todos os fragmentos necessários para reconstituição das VLPs de hRSV foram amplificados com sucesso (figura 4.8), a partir dos respectivos DNA moldes apresentados no quadro 3.1 (item 3.2) com uso dos oligonucleotídeos iniciadores descritos no quadro 3.2 (item 3.3). Através do processo de amplificação, puderam ser inseridas as sequências codificadoras para etiquetas de cauda de hexahistidina para F1 de hRSV e FLAG para G de hRSV. Os clones sintéticos codificadores para as proteínas M de hRSV e M1 de Influenza (figura 4.9) foram adicionados da sequência codificadora para a etiqueta c-Myc. Essas etiquetas foram inseridas visando a fácil

identificação da expressão das proteínas constituintes das VLPs através de ensaios de *Western Blot*, bem como podendo auxiliar na purificação das VLPs. Além disso, a ligação de proteínas fluorescentes favorece a identificação da expressão das proteínas fusionadas a estas através de microscopia de fluorescência.

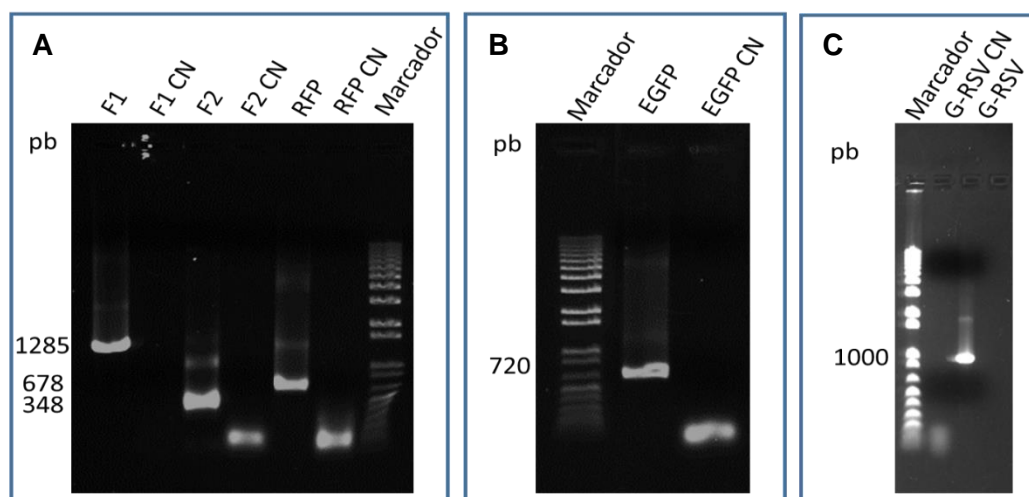


FIGURA 4.8 - GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM *GELRED* PARA ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR NECESSÁRIOS PARA CONSTRUÇÃO DAS VLPs DE HRSV. **A.** F1 – 1.285 PARES DE BASE; F2 – 348 PARES DE BASE, RFP - 678 PARRES DE BASE. **B.** EGFP - 720 PARES DE BASE. **C.** G-RSV – 991 PARES DE BASE. **A, B, C.** M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1 KB PLUS DNA LADDER E CN - CONTROLE NEGATIVO DE CADA AMPLIFICAÇÃO.

Todos os fragmentos amplificados foram ligados com o vetor pGEM-T Easy para obtenção de maiores quantidades de DNA para as etapas de digestão de ligação com o vetor de expressão pcDNAmod. Após ligação com o novo vetor de expressão, os clones confirmados por sequenciamento foram armazenados para condução dos ensaios de transfecção de células HEK293T.

Os clones pNZ678 – M-RSV e pNZ679 – M1-Influenza, foram recebidos em pUC57 e após transformação em *E. coli* DH5 α para propagação do DNA plasmideal, foram analisados por digestão enzimática com as enzimas HindIII e NotI (figura 4.9). Os fragmentos obtidos foram compatíveis com o esperado, sendo 827 e 815 pares de base respectivamente para as sequências codificadoras para M hRSV e M1 de Influenza.

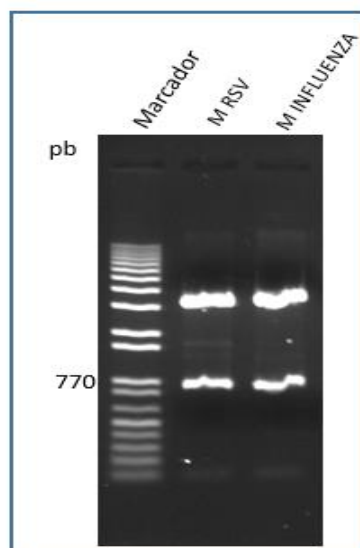


FIGURA 4.9 - GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO APRESENTANDO A DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PUC57 CONTENDO AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA M DE HRSV (PNZ678), COM 827 PARES DE BASE E M1 DE INFLUENZA (PNZ679) 815 PARES DE BASE, COM AS ENZIMAS HINDIII E NOTI. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1 Kb PLUS DNA LADDER.

Após confirmação por digestão enzimática, as sequências codificadoras para M1 de Influenza e M de hRSV foram subclonadas no novo vetor pcDNAmod para construção do sistema baseado em dois cassetes de expressão e para condução dos ensaios de transfecção de células HEK293T.

4.2. ENSAIOS DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS HEK293T

4.2.1. Padronização da transfecção

Para padronização dos ensaios de transfecção, foram transfectadas diferentes densidades de células HEK293T, com 200.000 ou 400.000 células por poço. As células foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA-FLAG-eGFP ou com o plasmídeo pcDNA3.1 vazio com o reagente Lipofectamina. Foi possível verificar que com o plaqueamento de 400.000 células por poço, a confluência total das células foi atingida com apenas 24 horas de cultivo, o que diminui a eficiência dessa transfecção. Por outro lado, com o plaqueamento de 200.000 células por poço, a transfecção com o plasmídeo pcDNA-FLAG-eGFP foi positiva e eficiente, e que pode ser analisada por microscopia de fluorescência após as células terem sido coradas com marcado de ácidos nucleicos Hoechst 33342 (figura 4.10).

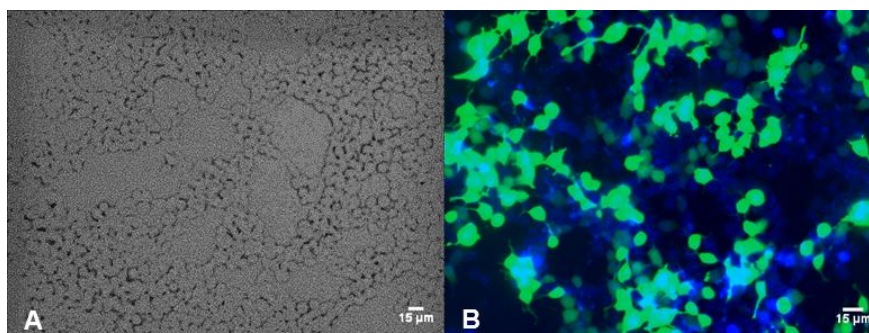


FIGURA 4.10 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS COM O PLASMÍDEO pCDNA-FLAG-EGFP CORADAS COM HOECHST 33342. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO *EVOS® FLOID® CELL IMAGING STATION* **A.** CAMPO CLARO DE CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS COM pCDNA-FLAG-EGFP. **B.** SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS OBTIDAS ATRAVÉS DE ANÁLISE PELOS FILTROS AZUL (MARCAÇÃO COM HOECHST 33342) E VERDE (FLUORESCÊNCIA GFP).

4.2.2. Teste de expressão do anticorpo anti-hRSV

Após padronização da transfecção de células HEK293T com Lipofectamina, foi feito o teste de expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV através de co-transfecção das células com dois plasmídeos de expressão pCDNA3.1 contendo as sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada do anticorpo. Nesse ensaio, foram testadas diferentes concentrações de DNA plasmideal, sendo 1 ou 2 µg total de DNA plasmideal por poço.

Foram coletados os sobrenadantes das culturas 48 horas e 5 dias após a transfecção. As amostras foram purificadas com microesferas magnéticas conjugadas a proteína A (item 3.7.) e foram eluídas por aquecimento (figura 4.11) ou através de incubação com glicina 0,1 M, pH 2,7 (figura 4.12).

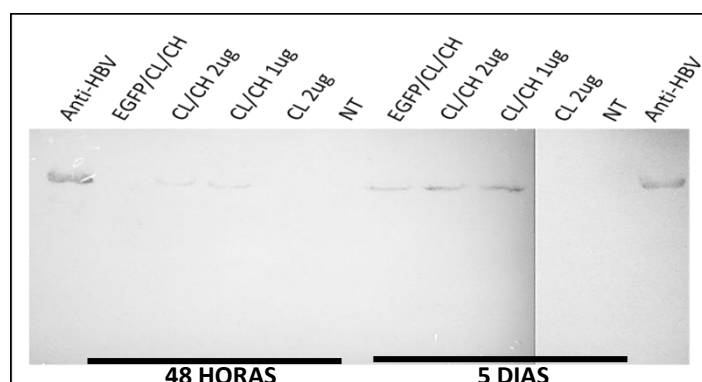


FIGURA 4.11 - WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-hRSV POR CO-TRANSFECÇÃO DE PLASMÍDEOS. ANTI-HBV – SORO HUMANO UTILIZADO COMO CONTROLE POSITIVO, EGFP/CL/CH – AMOSTRAS TRANSFECTADAS COM OS PLASMÍDEOS pCDNA-FLAG-EGFP, MAIS CADEIA LEVE E CADEIA PESADA EM pCDNA3.1/HYGRO(+), CL/CH – CO-TRANSFECÇÃO DA CADEIA LEVE E CADEIA PESADA EM pCDNA3.1/HYGRO(+), CL – APENAS CADEIA LEVE, NT - NÃO TRANSFECTADO. 1 E 2 µg - CONCENTRAÇÃO TOTAL DE DNA UTILIZADA NA TRANSFECÇÃO E 48 HORAS E 5 DIAS AO PERÍODO DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOBRENADANTES.

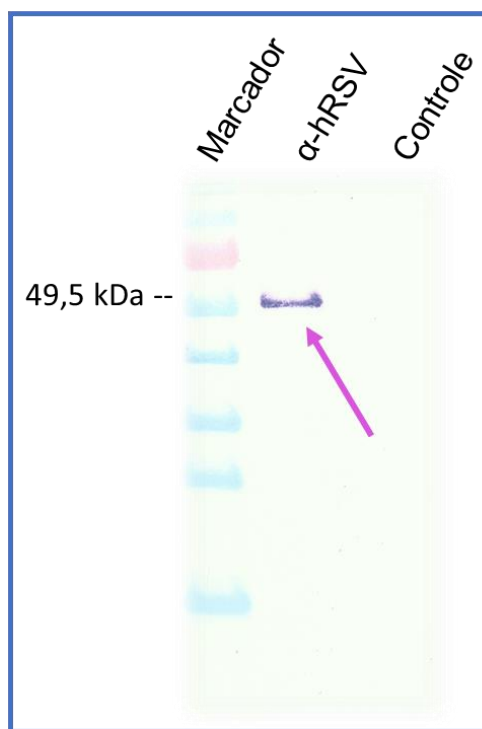


FIGURA 4.12 - *WESTERN BLOT* PARA CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-HRSV POR CO-TRANSFEÇÃO DE PLASMÍDEOS. M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR BENCHMARK PRÉ-CORADO, A-HRSV – AMOSTRA PURIFICADA A PARTIR DO SOBRENADANTE DE CULTURA TRANSFECTADA COM AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO EM pCDNA3.1/HYGRO(+), CONTROLE – CONTROLE NEGATIVO PURIFICADO DO SOBRENADANTE DE CULTURA TRANSFECTADA COM pCDNA3.1 VAZIO.

Foi possível verificar que ambas as condições de transfecção, com 1 ou 2 µg total de DNA, apresentaram expressão similar do anticorpo recombinante (cadeia pesada com 49,5 kDa). Também foi possível verificar que o sistema de purificação de anticorpos a partir do sobrenadante de cultura foi eficiente através de incubação com microesferas magnéticas conjugadas a proteína A/G. A eluição dos anticorpos foi alcançada tanto por aquecimento quanto por adição de solução de baixo pH. Com esses ensaios foi possível concluir que o desenvolvimento de *Western Blot* utilizando o anticorpo anti-IgG Humana foi eficiente para detecção da expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV.

Também foi avaliado se parte do anticorpo recombinante expresso não estava sendo retido dentro das células. Assim, células HEK293T expressando o anti-hRSV recombinante e células não transfectadas (controle negativo) foram submetidas a lise celular. Como pode ser verificado na figura 4.13, o anticorpo recombinante estava sendo secretado pelas células HEK293T, não havendo retenção do mesmo dentro das células transfectadas.

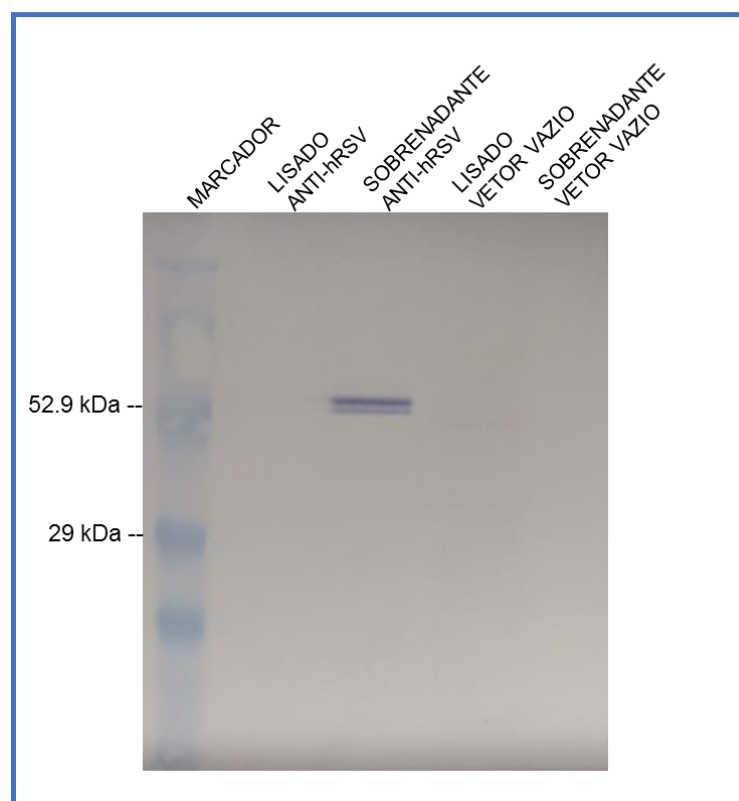


FIGURA 4.13 - WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-HRSV. MARCADOR - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR BIORAD PRÉ-CORADO; LISADO ANTI-HRSV – LISADO DE CÉLULAS TRANSFECTADAS COM pCDNAMODCH-CL; SOBRENADANTE ANTI-HRSV – SOBRENADANTE PURIFICADO COM MICROESFERAS MAGNÉTICAS CONJUGADAS A PROTEÍNA G; LISADO VETOR VAZIO – LISADO DE CÉLULAS TRANSFECTADAS COM pCDNA3.1 VAZIO; SOBRENADANTE VETOR VAZIO – SOBRENADANTE DE CÉLULAS TRANSFECTADAS COM pCDNA3.1 VAZIO PURIFICADO COM MICROESFERAS MAGNÉTICAS CONJUGADAS À PROTEÍNA G.

4.2.3. Teste do vetor de expressão pcDNAMod

Para avaliar se o novo plasmídeo baseado em dois cassetes de expressão era funcional para expressar proteínas diméricas, as cadeias leve e pesada do anticorpo foram ligadas ao vetor base pcDNAMod, para construção do plasmídeo final. Com a ligação, transformação e obtenção do vetor final, células HEK293T foram transfectadas com 2 µg de DNA plasmideal total, comparando a co-transfecção de dois plasmídeos contendo as sequências codificadoras para as cadeias leve e pesada do anticorpo, com o novo vetor de expressão.

As amostras de sobrenadante de cultura transfectadas foram coletadas 2 dias após a transfecção e foram submetidas a purificação com microesferas magnéticas conjugadas à proteína A/G para posterior Western Blot. Foi possível confirmar que o novo vetor baseado em dois cassetes de expressão eficiente para expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV (figura 4.14).

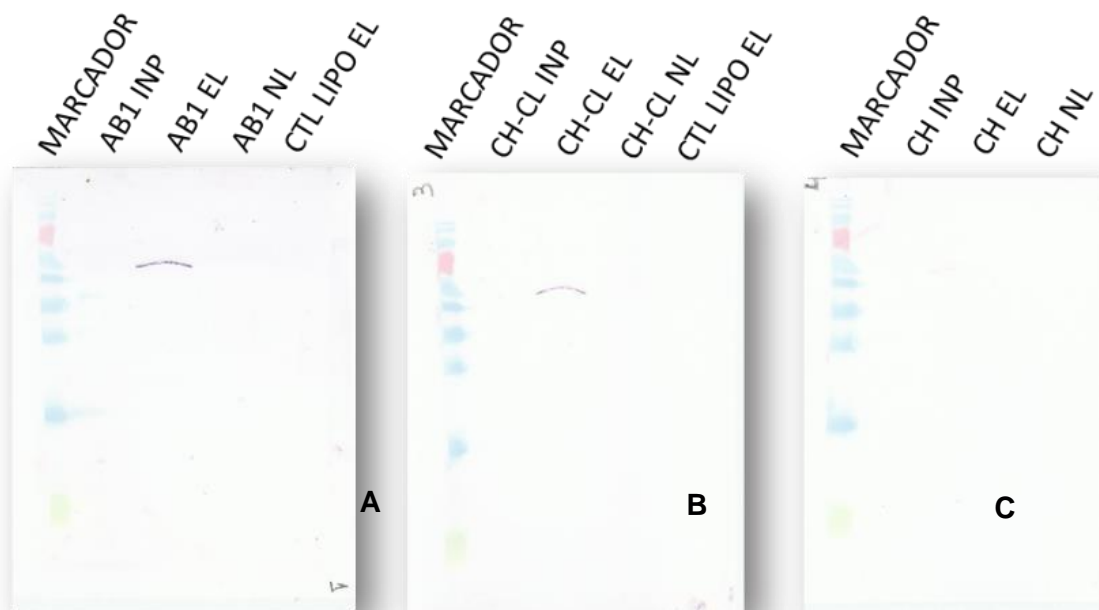


FIGURA 4.14 - *WESTERN BLOT* PARA AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO NOVO VETOR PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO. **A.** TRANSFECCÃO COM VETOR PCDNAMODCH-CL (AB1). **B.** CO-TRANSFECCÃO DE VETORES (CODIFICANDO AS CADEIAS LEVE (CL) E PESADA (CH) DO ANTICORPO). **C.** TRANSFECCÃO APENAS DA CADEIA PESADA DO ANTICORPO EM PCDNA3.1 (CONTROLE NEGATIVO - CH). INP – SOBRENADANTE DE CULTURA TRANSFECTADA SEM PURIFICAÇÃO (*INPUT*), EL – AMOSTRA ELUÍDA APÓS PURIFICAÇÃO COM MICROESFERAS MAGNÉTICAS, NL – NÃO-LIGADO ÀS MICROESFERAS, CTL LIPO EL – CONTROLE NEGATIVO, CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PCDNA3.1 VAZIO, MARCADOR – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR *BENCHMARK* PRÉ-CORADO.

4.2.4. Comparação entre os sistemas de expressão

Para avaliação entre os três sistemas de expressão para proteínas diméricas, (co-transfecção de vetores, novo vetor de expressão baseado em dois cassetes de expressão e vetor baseado em peptídeo de autoclivagem P2A), foi realizada a transfecção de células HEK293T com cada um desses plasmídeos. Os sobrenadantes das culturas transfectadas com as diferentes construções foram purificados após 48 horas através de incubação com microesferas magnéticas conjugadas a proteína A/G. As amostras eluídas foram submetidas a SDS-PAGE e posterior *Western Blot* com diferentes anticorpos (anti-IgG humana para o controle MEDI-493, anti-Histidina para as cadeias pesadas das demais construções e anti-flag para as cadeias leves das construções baseadas em P2A).

Com o ensaio de transfecção com as diferentes construções para expressão do anticorpo anti-hRSV, foi possível verificar que o anticorpo foi expresso a partir de todas as construções genéticas testadas (figura 4.15).

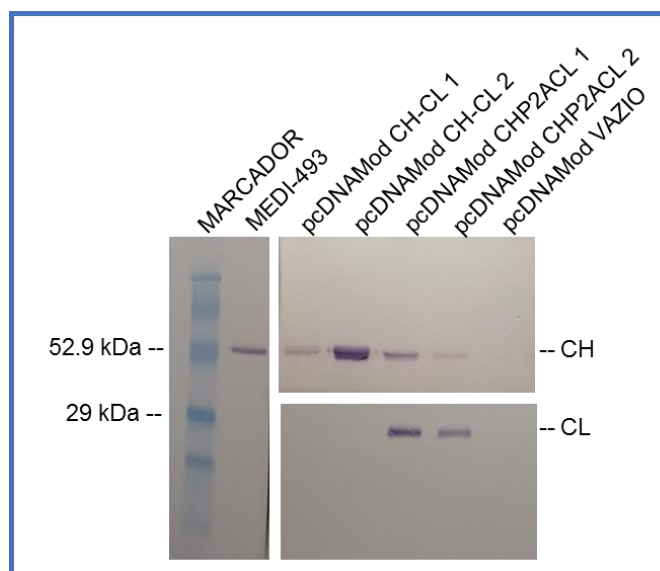


FIGURA 4.15 - *WESTERN BLOT* PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS. M. MARCADOR DE MASSA MOLECULAR BIO RAD PRÉ-CORADO, MEDI-493 – CONTROLE POSITIVO - ANTICORPO MEDI-493, pcDNAMOD CH-CL – VETOR BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO, pcDNAMOD CHP2ACL – VETOR DE EXPRESSÃO BASEADO EM PEPTÍDEO DE AUTOCLIVAGEM P2A, pcDNAMOD VAZIO – CONTROLE NEGATIVO, PLASMÍDEO SEM INSERTO. CH – CADEIA PESADA DO ANTI-HRSV (49,5 kDa), DETECTADA COM ANTICORPO ANTI-HISTIDINA, COM EXCEÇÃO DA AMOSTRA MEDI-493 QUE FOI DETECTADA COM O ANTICORPO ANTI-IGG HUMANA; CL – CADEIA LEVE DO ANTI-HRSV (26,5 kDa), DETECTADA COM ANTICORPO ANTI-FLAG.

4.3. ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS

Para padronização dos ensaios de ELISA para quantificação da expressão de anticorpos foi necessário padronizar um ensaio de detecção. Como a fração cristalizável de anticorpos humanos é reconhecida por proteína A, planejou-se a padronização do ensaio de ELISA utilizando a proteína A como ligante para purificação dos anticorpos expressos no sobrenadante das culturas.

4.3.1. Expressão de proteína A recombinante

A proteína A recombinante de *Staphylococcus aureus*, constituída de quatro domínios Z (28,8 kDa), foi expressa em células de *E. coli* BL21 Star (DE3) (figura 4.16). As células foram transformadas com o plasmídeo pET28a codificando para a proteína A recombinante, e foram induzidas através da adição de 0,5mM de IPTG. Após preparo do extrato celular, a proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade ao níquel em sistema semi-automatizado (*ÄKTApurifier*), utilizando a coluna de purificação HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare). Ao todo foram purificados 12 mL de proteína A recombinante, com concentração de 8,26 mg/mL.

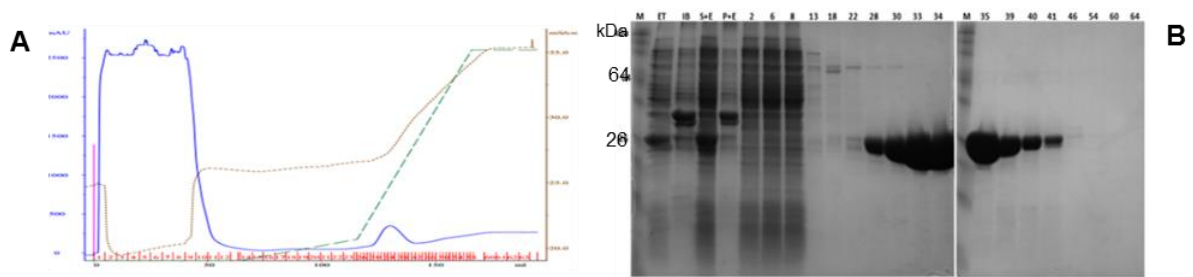


FIGURA 4.16 - ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA A RECOMBINANTE. **A.** CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA A RECOMBINANTE EM COLUNA HiTRAP HP DE 5 ML EM SISTEMA SEMI-AUTOMATIZADO. **B.** SDS-PAGE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 13%. M – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR BENCHMARK PRÉ-CORADO, ET – EXTRATO TOTAL, IB – CORPOS DE INCLUSÃO, S+E – FRAÇÃO SOLÚVEL APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE ESTREPTOMICINA, P+E – PRECIPITADO APÓS ADIÇÃO DE ESTREPTOMICINA, 2-6-8- FRAÇÕES NÃO-LIGADO, 13-18-22- FRAÇÕES LAVADO, 28-30-33-34-35-39-40- FRAÇÕES DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA, 46-54-60-64- TÉRMINO DA ELUIÇÃO.

4.3.2. Padronização de ELISA com proteína A recombinante

A proteína A purificada foi utilizada para sensibilização de placas de ELISA, para obtenção de uma curva padrão para os ensaios de quantificação da expressão do anticorpo recombinante. Com 100 ng da proteína por poço, uma curva de concentração do anticorpo monoclonal comercial MEDI-493 (Synagis), de 150 ng/mL a 500 pg/mL e utilizando o anticorpo anti-IgG humana, conjugado à fosfatase alcalina, na diluição de 1:2.500 foi possível estabelecer a curva padrão. As absorbâncias obtidas no ensaio, lidas em equipamento *Biotek Synergy H1 Hybrid Reader*, a 405 nanômetros, foram plotadas e podem ser observadas na figura 4.17.

A partir da análise dos dados, após subtração do controle negativo (apenas PBS, sem adição do anticorpo MEDI-493), foi possível observar que a partir de 100 ng/mL ocorre a saturação da detecção da amostra (figura 4.17-A). Dessa forma, para análise da linearidade do ensaio, foram removidos os pontos de saturação de 100 e 150 ng/mL de anticorpo, resultando em uma curva padrão com R^2 de 0,9988 (figura 4.17-B).

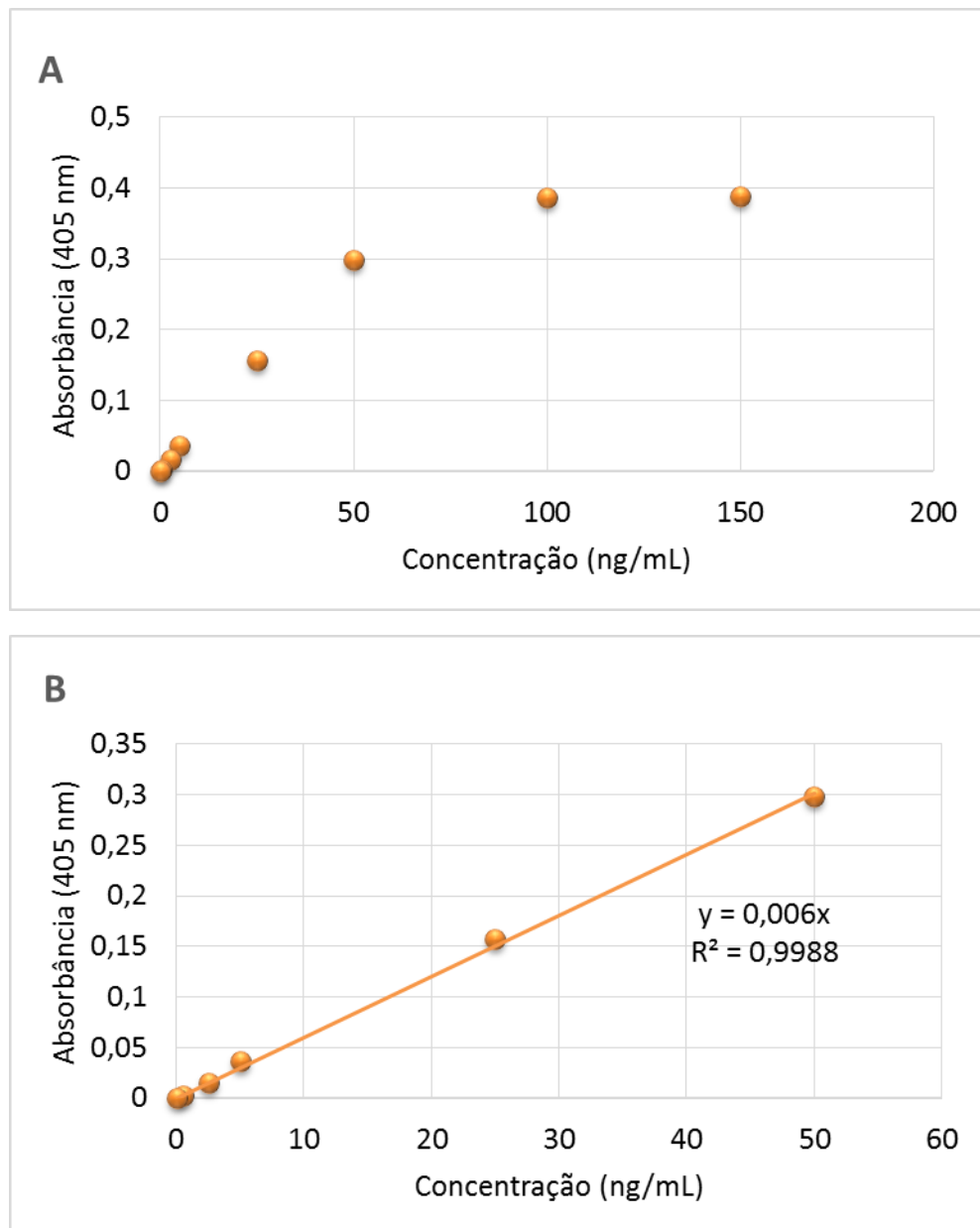


FIGURA 4.17 - PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO PROTEÍNA A COMO LIGANTE E A CURVA DE DILUIÇÃO DO ANTICORPO MEDI-493. **A.** DADOS DE ANÁLISE DE DISPERSÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO MEDI-493 E A ABSORBÂNCIA OBTIDA A 405 NANÔMETROS. **B.** CURVA DE CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO APÓS EXCLUSÃO DO PONTO DE SATURAÇÃO DE 150 NG/ML PARA VERIFICAR A LINEARIDADE DO ENSAIO.

4.4. SELEÇÃO DE LINHAGENS ESTÁVEIS

4.4.1. Linhagem estável expressando o anti-hRSV – seleção por antibiótico

Para obtenção de transfectantes expressando constitutivamente o anticorpo recombinante anti-hRSV, foi feita a transfecção de células HEK293T com os diferentes vetores de expressão. Foi utilizada a co-transfecção de plasmídeos pcDNA3.1(+)/Hygro-CL e pcDNA3.1(+)/Hygro-CH e a transfecção com o vetor

pcDNAmodCH-CL. As células passaram a ser selecionadas com o antibiótico Hygromicina 24 horas após a transfecção. Ao todo foram obtidos 5 transfectantes para co-transfecção de plasmídeos e 6 transfectantes para o sistema de expressão baseado no novo vetor de expressão.

Para comparação dos níveis de expressão de anticorpos entre os diferentes sistemas de expressão, foram plaqueadas 50.000 células dos transfectantes por poço em placa de 6 poços. Três dias após a transfecção, 1,3 mL dos sobrenadantes das culturas foram purificados para análise preliminar por *Western Blot* (figura 4.18), onde foi possível verificar maior nível de expressão entre os transfectantes obtidos a partir do uso do vetor pcDNAmodCH-CL.

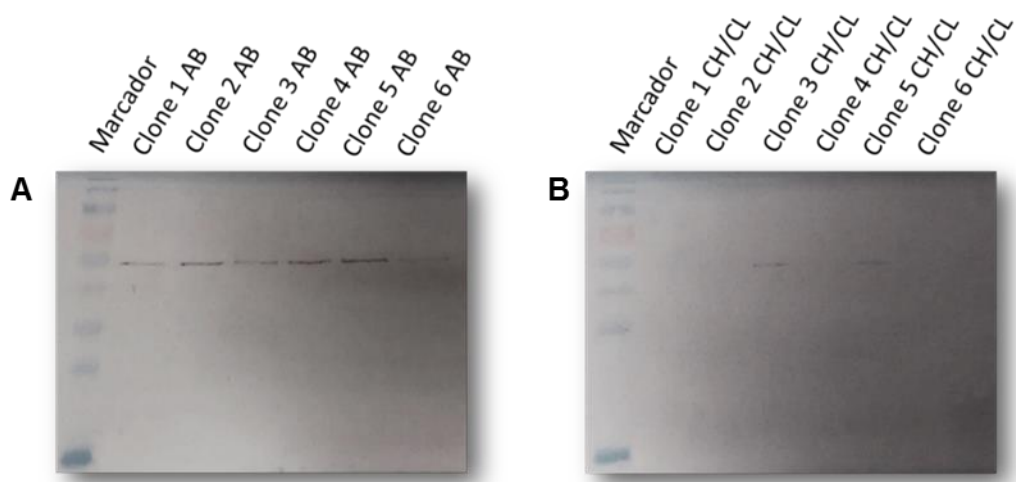


FIGURA 4.18 - WESTERN BLOT PARA COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE ANTICORPO RECOMBINANTE ENTRE OS DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESSÃO. A. CÉLULAS HEK283T TRANSFECTADAS COM O NOVO VETOR PCDNA MODCH-CL (AB). B. CÉLULAS HEK293T CO-TRANSFECTADAS COM PLASMÍDEOS PCDNA3.1(+HYGRO-CL E PCDNA3.1(+HYGRO-CH

Para confirmar essa análise, já que a mesma não possuía um normalizador, 200 μ L de cada sobrenadante foi quantificado por ensaio de ELISA (figura 4.19), tendo a proteína A como ligante. Esse ensaio confirmou que as células HEK293T transfectadas com o novo vetor de expressão e selecionadas com antibiótico apresentaram maior nível de expressão ao serem comparadas com as células co-transfectadas com as cadeias leve e pesada do anticorpo.

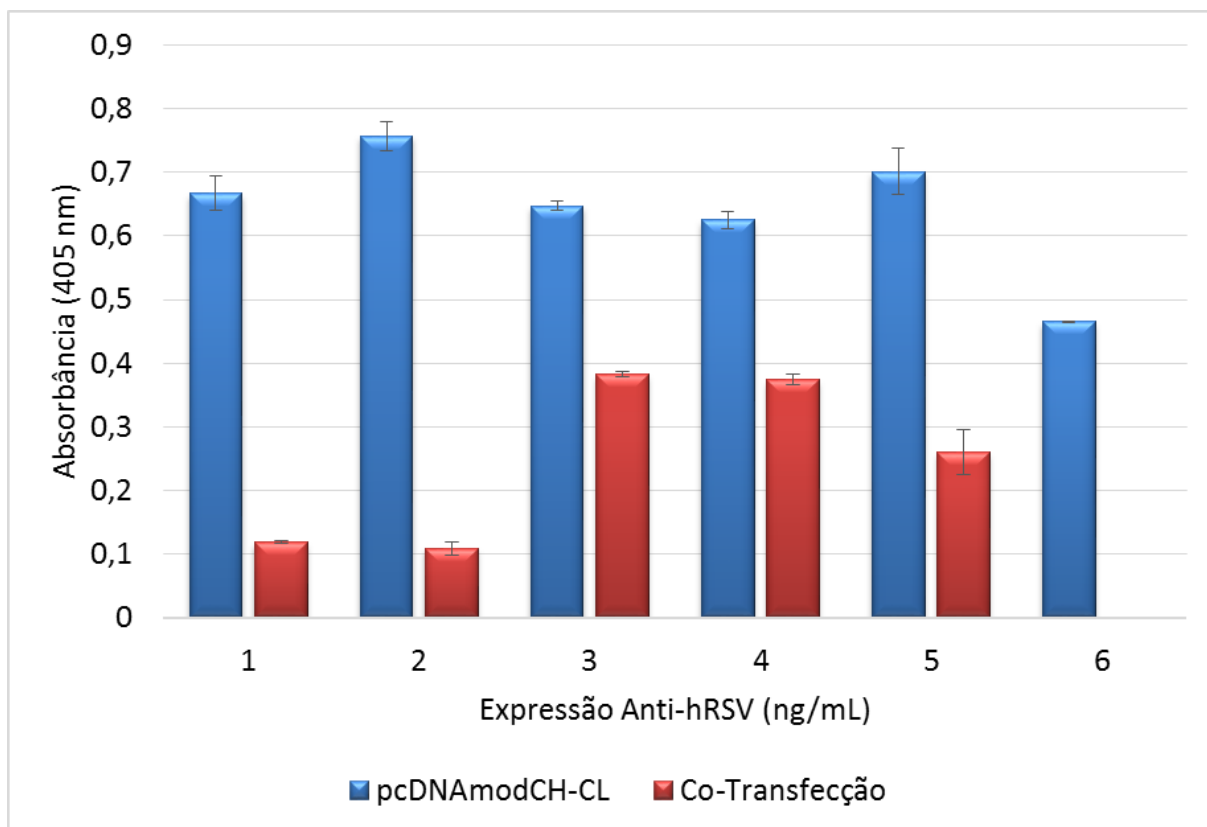


FIGURA 4.19 - ENSAIO DE ELISA PARA COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-hRSV. COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE EXPRESSÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE PELAS CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS COM O PLASMÍDEO PCDNAMODCH-CL (EM AZUL) OU CO-TRANSFECTADAS COM OS VETORES PCDNA3.1 CONTENDO AS CADEIAS LEVE E PESADA CODIFICADORAS PARA O ANTICORPO ANTI-hRSV (EM VERMELHO).

Os dois resultados confirmaram que os clones selecionados após transfecção com o novo vetor baseado em dois cassetes de expressão codificando para as cadeias polipeptídicas do anticorpo anti-hRSV resultou em níveis mais elevados de expressão em comparação com os clones selecionados após co-transfecção de plasmídeos.

Com a obtenção da construção expressando o anticorpo recombinante anti-hRSV baseada na fusão do peptídeo de autoclivagem, foi realizada a comparação entre o nível de expressão obtido a partir de cada construção para expressão. Como pode ser observado na figura 4.20, a construção baseada em dois cassetes de expressão a partir de um único plasmídeo, ou seja, pcDNAModCH-CL, foi mais eficiente para expressão do anticorpo do que a construção CHP2ACL e co-transfecção de plasmídeos.

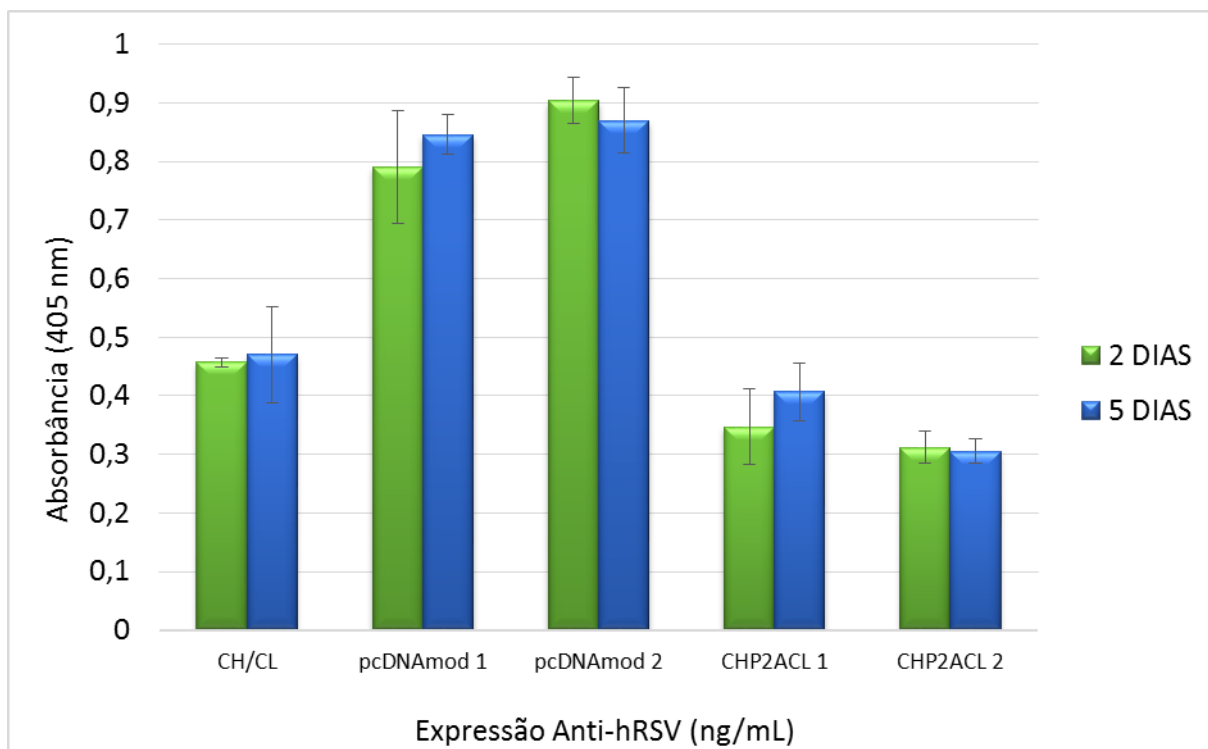


FIGURA 4.20 - ENSAIO DE ELISA PARA COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-hRSV ENTRE TODAS AS CONSTRUÇÕES GENÉTICAS. CH/CL – CO-TRANSFEÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTENDO AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO; PCDNAMOD 1 E PCDNAMOD 2 – CLONES TRANSFECTADOS COM O NOVO VETOR BASEADO EM DOIS CASSETES DE EXPRESSÃO A PARTIR DE UM ÚNICO PLASMÍDEO; CHP2ACL 1 E CHP2ACL 2 – VETOR BASEADO EM PEPTÍDEO DE AUTOCLIVAGEM P2A. COLETA DE AMOSTRAS APÓS 2 DIAS DE CULTIVO (VERDE) E APÓS 5 DIAS DE CULTIVO (AZUL).

Aplicando os valores de absorbância obtidos com as amostras testadas na equação da reta obtida a partir da curva do anticorpo comercial (figura 4.21), obtêm-se as concentrações do anticorpo recombinante em cada amostra. Para o clone de maior expressão, pcDNAMod 2 (clone 2 transfetado com pcDNAModCH-CL) com 5 dias de cultivo foi atingida uma absorbância de 0,904 nm. Com a substituição desse resultado na equação da reta, foi obtida a expressão de 76,61 ng/mL do anticorpo anti-hRSV pelas células HEK293T. Para o clone de menor expressão, CHP2ACL2, com 5 dias de cultivo foi atingida uma absorbância de 0,305 nm, equivalente a um rendimento de 25,84 ng/mL do anticorpo recombinante.

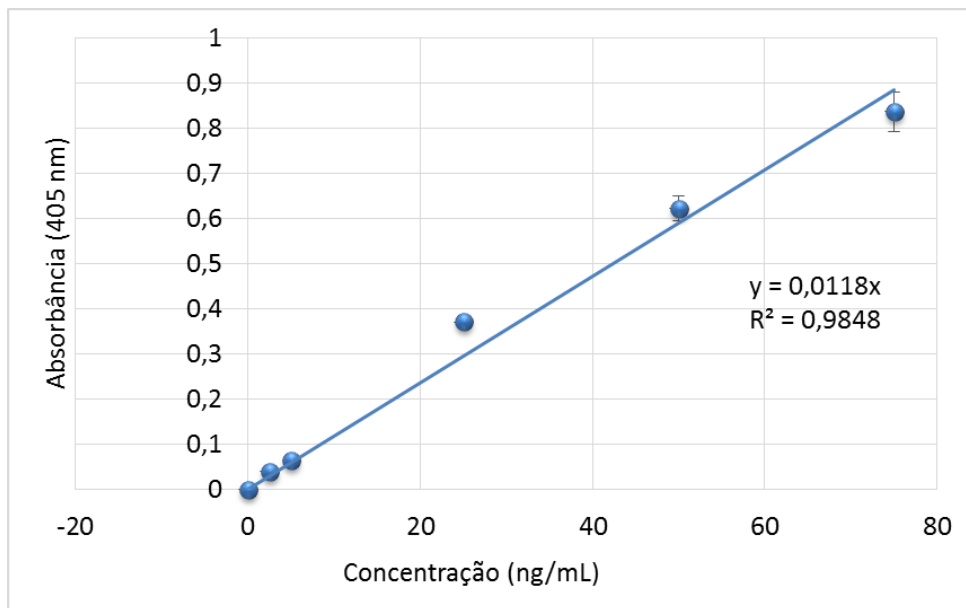


FIGURA 4.21 - CURVA PADRÃO ENSAIO DE ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE A PARTIR DAS DIFERENTES CONSTRUÇÕES GENÉTICAS.

4.4.2. Linhagem estável expressando as VLPs de hRSV – seleção por antibiótico

Células foram co-transfectadas com os plasmídeos pcDNAMod contendo as sequências codificadoras para G de hRSV e GFP e M1 de influenza (figura 4.22-B) ou com os plasmídeos pcDNAMod contendo as sequências codificadoras para F0 de hRSV e RFP e M1 de influenza (figura 4.22-E).

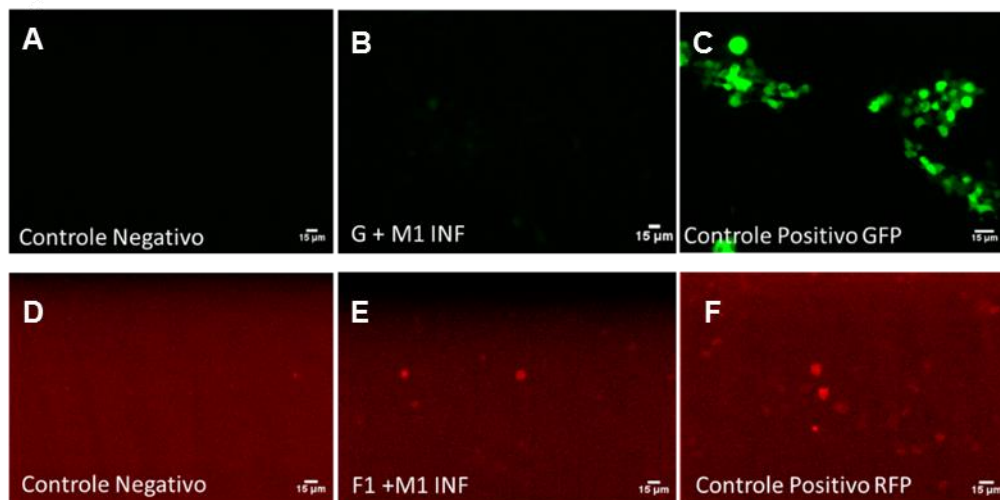


FIGURA 4.22 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HEK293T TRANSFECTADAS COM OS PLASMÍDEOS CODIFICADORES PARA AS VLPs DE hRSV. **A** e **D**. CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PCDNA3.1, **B**. CÉLULAS CO-TRANSFECTADAS COM PCDNAMOD G hRSV E PCDNAMOD M1 INFLUENZA, **C**. CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PCDNA-FLAG-EGFP, **E**. CÉLULAS CO-TRANSFECTADAS COM PCDNAMOD F0 hRSV E PCDNAMOD M1 INFLUENZA, **F**. CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PCDNA-SUMO-RFP.

Como foi verificada a expressão das proteínas fluorescentes (figura 4.22), para confirmação da expressão das VLPs de hRSV foi necessário conseguir com que as proteínas fossem expressas em maior quantidade pelas células HEK293T. Assim, após seleção com antibióticos, os sobrenadantes da cultura foram purificados e submetidos a análise por Western Blot (figura 4.23).

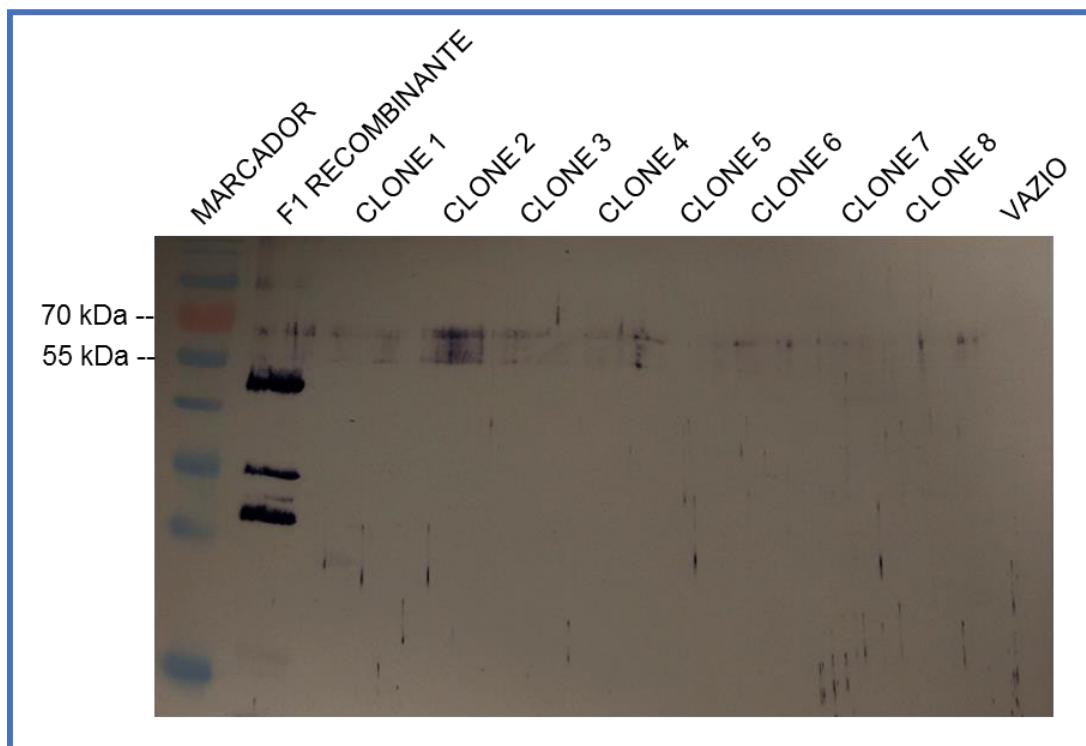


FIGURA 4.23 - WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VLP BASEADA NA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS F1 E M DE hRSV. MARCADOR - MARCADOR DE MASSA MOLECULAR BENCHMARK PRÉ-CORADO; F1 RECOMBINANTE – CONTROLE POSITIVO COM 51 kDa; CLONES 1 A 8 - pCDNAMOD CONTENDO A SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA F1 E F2; VAZIO – pCDNAMOD SEM INSERTO.

Como pode ser examinado na figura 4.23, não foi detectada a expressão das VLPs pelas células HEK293T co-transfectadas com os plasmídeos contendo as sequências codificadoras para as proteínas F1 de hRSV e M1 de Influenza nas condições testadas nesse estudo. Mesmo após a obtenção da construção genética contendo todas as sequências para expressão da VLP a partir de um único plasmídeo, a expressão não foi positiva a partir de nenhuma forma de purificação.

O mesmo ocorreu com a VLP baseada na expressão das proteínas G de hRSV e M1 de influenza. Não houve nenhum sinal de expressão a partir de análises por Western Blot, tanto de amostras do sobrenadante, quanto do lisado celular.

4.4.3. Linhagem estável expressando o anti-hRSV - Seleção por citometria de fluxo

Para seleção de células HEK293T por *sorting* em equipamento FACSAria II, utilizando o filtro FSC 2.0, foi necessário testar qual *nozzle* (bico ejetor) não causaria danos às células após seleção. Dessa forma, as células foram submetidas a *sorting* utilizando *nozzle* de 85 µm (figura 4.24-A) e 100 µm (figura 4.24-B), mantidas a 4°C durante todo o ensaio. As células selecionadas foram transferidas para placas de cultivo e foram avaliadas por três dias, onde verificou-se que em ambas as condições, as células foram capazes de voltar a proliferar.

Com esse ensaio de padronização, foi possível verificar que o uso de qualquer um dos *nozzle* testados não resultou em danos irreversíveis às células. Portanto, para seleção de uma linhagem estável expressando os anticorpos recombinantes anti-hRSV, células HEK293T foram transfectadas com diferentes concentrações do plasmídeo pcDNAModCH-CL com uma concentração fixa de pcDNA-FLAG-eGFP (500 ng). Partindo do princípio que ambos os plasmídeos seriam transfectados em uma mesma célula, as células HEK293T foram selecionadas por fluorescência de GFP através da abordagem *single cell*, ou seja, através da coleta de apenas uma célula por poço adicionada em placa de 96 poços.

Foi possível verificar fluorescência nas células transfectadas com pcDNA-FLAG-eGFP (figura 4.25), mas o controle positivo apresentou sinal inferior ao das células transfectadas com mais de um plasmídeo. Houve maior intensidade de expressão de GFP na transfecção realizada através da co-transfecção de 500 ng pcDNA3.1(+)/Hygro-CH, pcDNA3.1(+)/Hygro-CL (figura 4.25-C) e na transfecção realizada com 1000 ng do vetor pcDNAModCH-CL (figura 4.25-F).

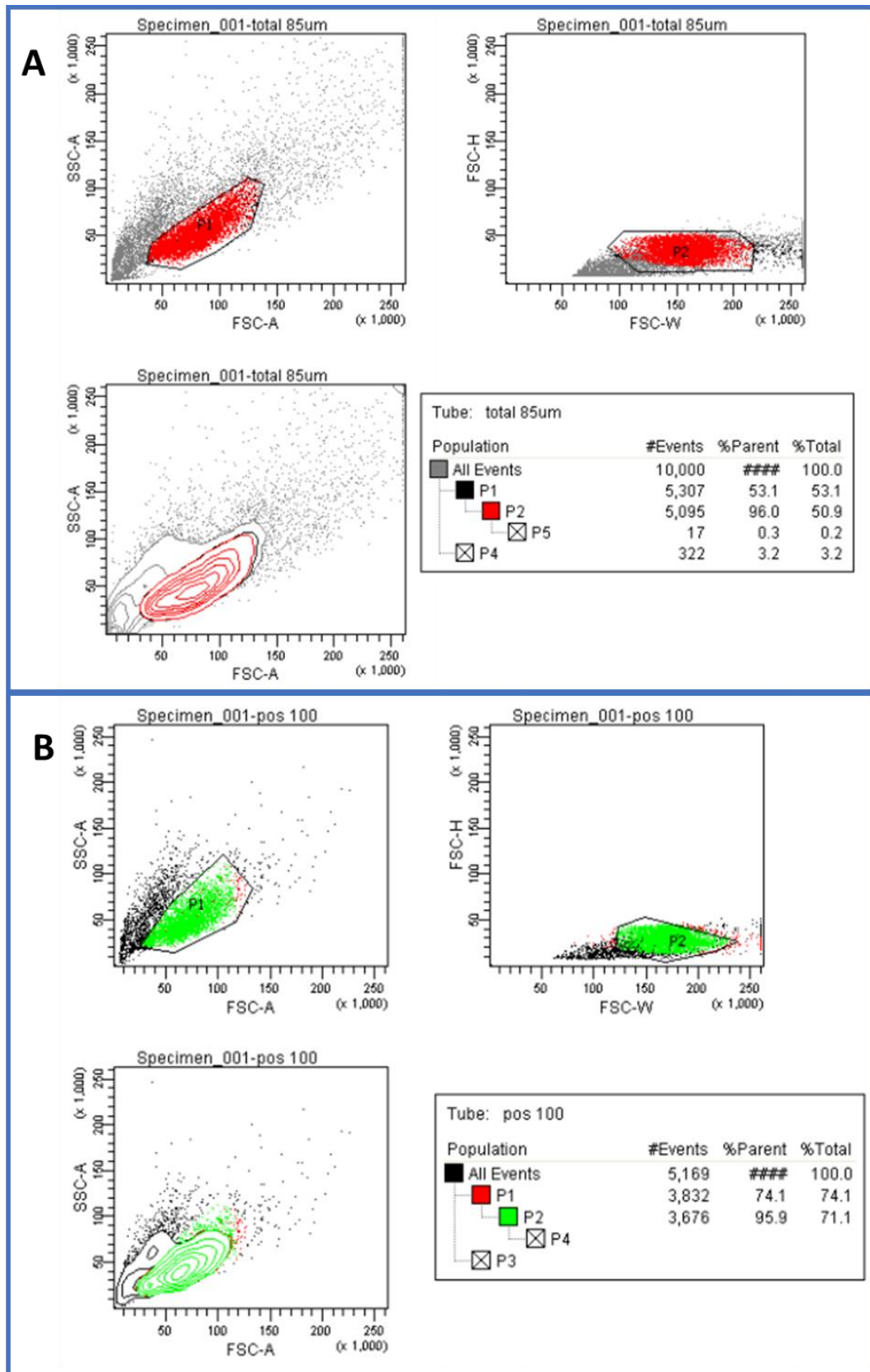
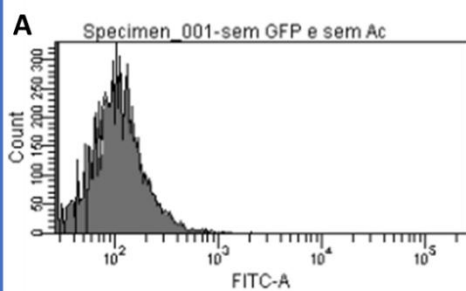
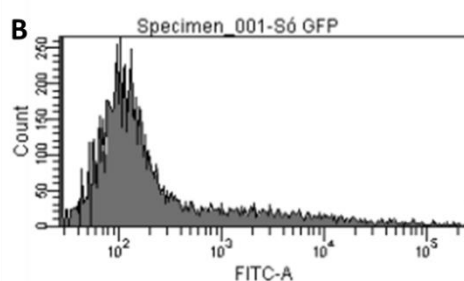
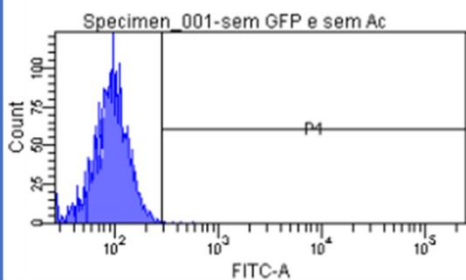


FIGURA 4.24 - PADRONIZAÇÃO DO BICO EJETOR PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T POR SORTING EM EQUIPAMENTO FACSAria II. **A.** NOZZLE DE 85 μ M E **B.** NOZZLE DE 100 μ M. GATES INDICAM A POPULAÇÃO SELECIONADA PARA SORTING, P1 – POPULAÇÃO HOMOGÊNEA, P2 – REMOÇÃO DE AGREGADOS CELULARES DENTRO DA POPULAÇÃO P1; P5, P4 E P3 – FRAGMENTOS CELULARES.



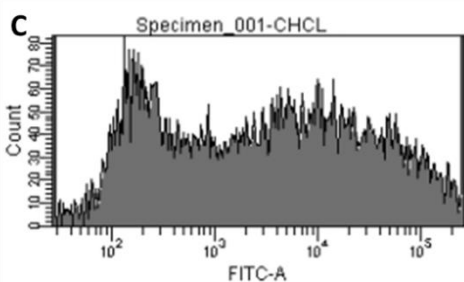
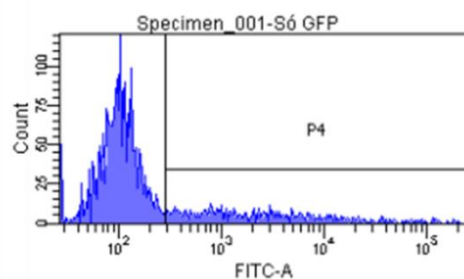
Tube: sem GFP e sem Ac

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	2,591	25.9	25.9
P2	2,272	87.7	22.7
P3	2,154	94.8	21.5
P4	5	0.2	0.0



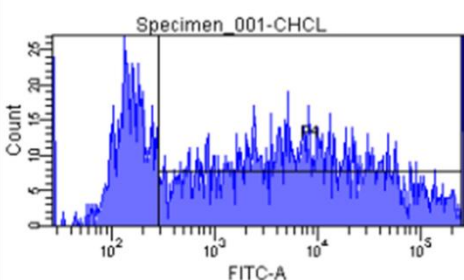
Tube: Só GFP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	3,402	34.0	34.0
P2	2,959	87.0	29.6
P3	2,778	93.9	27.8
P4	624	22.5	6.2



Tube: CHCL

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	2,527	25.3	25.3
P2	2,197	86.9	22.0
P3	2,088	95.0	20.9
P4	1,498	71.7	15.0



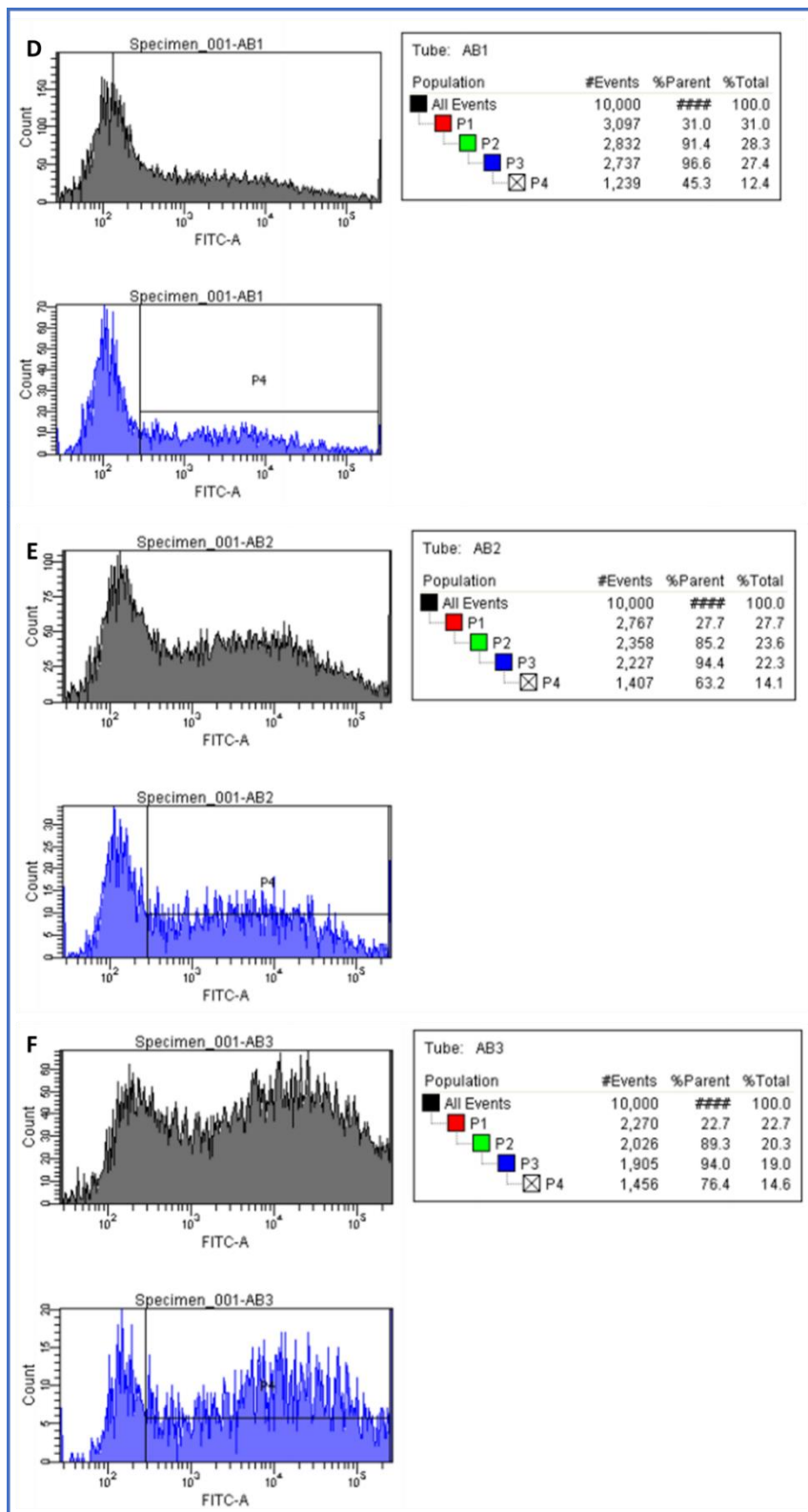


FIGURA 4.25 - SELEÇÃO POR FACS DE CÉLULAS HEK293 EXPRESSANDO O ANTICORPO ANTI-HRSV. **A.** NÃO TRANSFECTADO, **B.** PCDNA-FLAG-EGFP, **C.** CO-TRANSFEÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA CLONADAS EM PCDNA3.1/HYGRO (+), **D.** PCDNAMOD 500 NG E PCDNA-FLAG-EGFP 500 NG, **E.** PCDNAMOD 750 NG E PCDNA-FLAG-EGFP 500 NG, **F.** PCDNAMOD 1000 NG E PCDNA-FLAG-EGFP 500 NG. **P1** – POPULAÇÃO MAIS HOMOGÊNEA, **P2 E P3** – REMOÇÃO DE AGREGADOS, **P4** – SINAL DE FLUORESCÊNCIA.

As células plaqueadas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C. No entanto, nenhuma célula foi visualizada nos poços 4 horas após a seleção. A placa foi mantida em estufa por 7 dias, mas nenhum dos clones apresentou crescimento, sugerindo algum problema durante o *sorting*. Por esse motivo, a abordagem de seleção de células expressando o anticorpo recombinante por citometria de fluxo não foi eficiente.

4.5. PURIFICAÇÃO ANTI-hRSV

4.5.1. Purificação por cromatografia de afinidade a proteína A

A purificação de anticorpos anti-hRSV do sobrenadante de cultura de HEK293T através de cromatografia de afinidade à proteína A foi feita em sistema semi-automatizado, utilizando a coluna *HiTrap HP Protein A* (GE Healthcare). A amostra purificada foi eluída com 70% de tampão citrato 0,1 M, pH 3,0. Ao analisar as figuras 4.26-B e 4.26-C, é possível observar que há a co-purificação dos anticorpos presentes no soro fetal bovino juntamente com os anticorpos anti-hRSV, onde a fração 11 verificada em gel de poliacrilamida não foi verificada através de *Western Blot*, utilizando anti-IgG Humana para reconhecimento da proteína de interesse. A co-purificação interferiu na pureza dos anticorpos anti-hRSV, impedindo a realização de ensaios funcionais e biofísicos mais específicos.

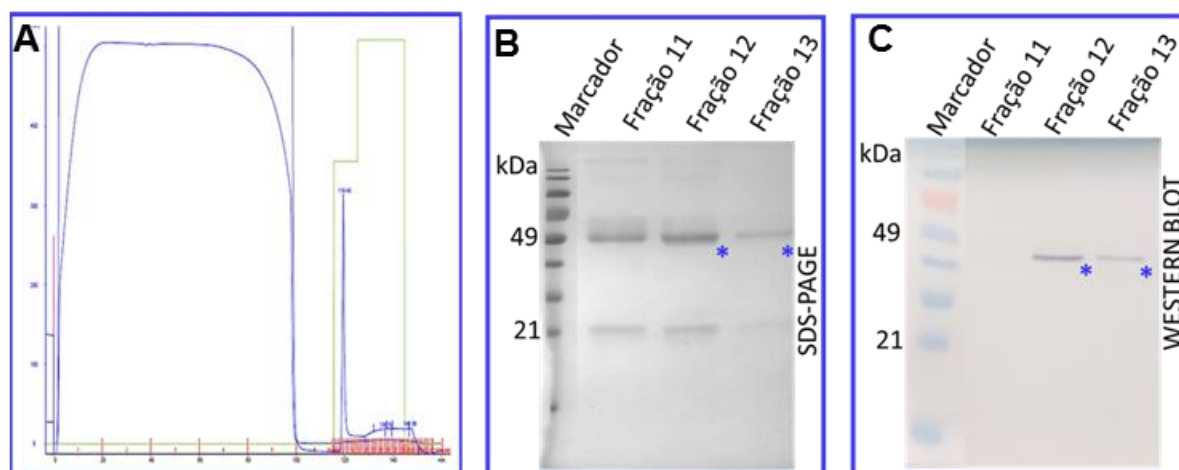


FIGURA 4.26 - PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CULTURA CONTENDO SORO FETAL BOVINO. **A.** CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS A PARTIR DO SOBRENADANTE DE CULTURA PURIFICADO COM COLUNA *HiTRAP HP PROTEIN A*; **B.** SDS-PAGE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 13% CORADO COM *COOMASSIE BLUE*, FRAÇÃO 11, 12 E 13 - PICO DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS. **C.** *WESTERN BLOT*, FRAÇÕES 11, 12 E 13 - PICO DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS.

Por esse motivo, os anticorpos foram novamente purificados, mas a partir do sobrenadante de cultura não suplementado com soro fetal bovino. O objetivo desse processo foi verificar se o uso de um meio de cultura sem soro fetal bovino poderia favorecer a purificação dos anticorpos anti-hRSV (figura 4.27).

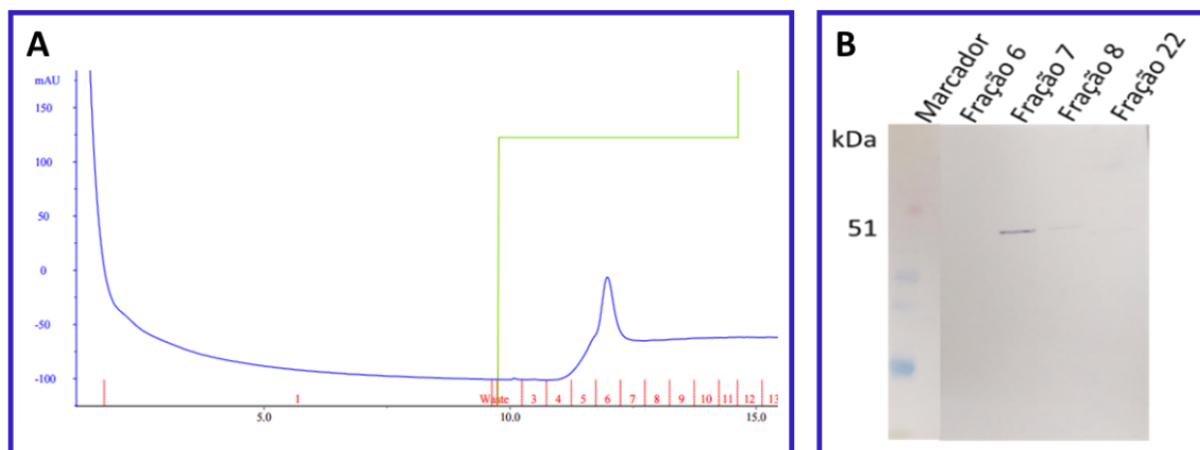


FIGURA 4.27 - ANTICORPOS PURIFICADOS DO SOBRENADANTE DE CULTURA SEM ADIÇÃO DE SORO FETAL BOVINO. **A.** CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS A PARTIR DO SOBRENADANTE DE CULTURA PURIFICADO COM COLUNA HiTRAP HP PROTEIN A. **B.** *WESTERN BLOT*, FRAÇÕES 7 E 8 - PICO DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA.

A remoção de soro fetal bovino do meio de cultura permitiu a purificação dos anticorpos anti-hRSV com menor quantidade de anticorpos do soro fetal bovino. A diminuição do pico de eluição comprova que o pico de eluição visualizado na figura 4.27-A contava com anticorpos do soro fetal bovino, e não apenas com a amostra de interesse. As amostras purificadas através dos dois ensaios foram comparadas em gel de poliacrilamida a 13% (figura 4.28).

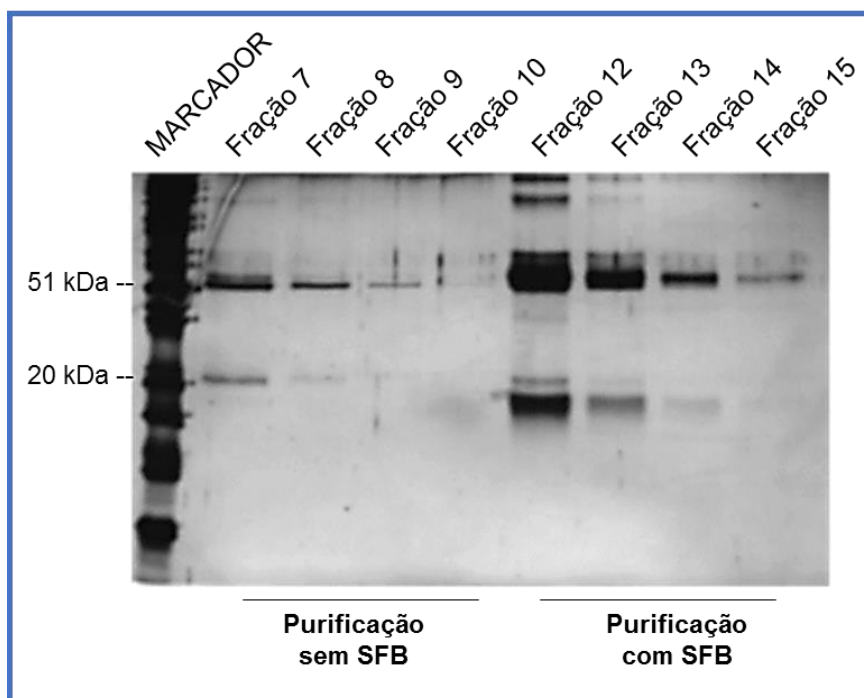


FIGURA 4.28 - GEL DE POLIACRILAMIDA A 13% CORADO COM NITRATO DE PRATA PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS DE ANTICORPO PURIFICADAS COM MEIO DE CULTURA ADICIONADO OU NÃO DE SORO FETAL BOVINO (SFB). 7 A 10 – FRAÇÕES DE ELUIÇÃO DE ANTICORPOS PURIFICADOS A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CULTURA SEM ADIÇÃO DE SFB; 12 A 15 – FRAÇÕES DE ELUIÇÃO DE ANTICORPOS PURIFICADOS A PARTIR DE SOBRENADANTE DE CULTURA ADICIONADO DE SFB.

Foi possível verificar a diminuição dos contaminantes através do uso do meio de cultura sem adição de soro fetal bovino, e o rendimento da purificação foi de 1,5 µg de anticorpo em 1 mL de amostra eluída a partir de 100 mL de sobrenadante de cultura. Assim, o rendimento de anticorpos recombinantes a partir de 1 litro de cultura é de aproximadamente 15 µg. Dessa forma, para obtenção de maiores concentrações do anticorpo será necessário conduzir o cultivo das células em meio de cultura específico, que não necessite da adição de soro fetal bovino ou utilizar uma etiqueta para purificação do anticorpo através de cromatografia de afinidade a outro elemento que não seja a proteína A.

4.6. ENSAIOS FUNCIONAIS

4.6.1. *Western Blot* direcionado contra a proteínas F1 recombinante

Como o anticorpo recombinante anti-hRSV foi construído com a sequência codificadora para o Fab do anticorpo MEDI-493, o mesmo deve apresentar a capacidade de reconhecer a proteína F1 do vírus hRSV. Para testar a funcionalidade

do anticorpo recombinante, amostras foram purificadas a partir do sobrenadante de cultura de células HEK293T, transfectadas com diferentes plasmídeos contendo as sequências codificadoras para as cadeias do anticorpo.

A proteína F1 recombinante do hRSV (51 kDa) foi submetida a SDS-PAGE e a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose/PVDF. Após bloqueio, as membranas foram incubadas com diferentes anticorpos primários: anticorpo recombinantes anti-hRSV, obtido a partir de co-transfecção de plasmídeos (figura 4.29), ou a partir de um único plasmídeo baseado em dois cassetes de expressão (figura 4.30); Anticorpo policlonal direcionado contra a proteína F1, produzido em camundongo, Soro negativo, produzido em camundongo inoculado com PBS, Anticorpo comercial MEDI-493 (Synagis), Anticorpo anti-histidina.

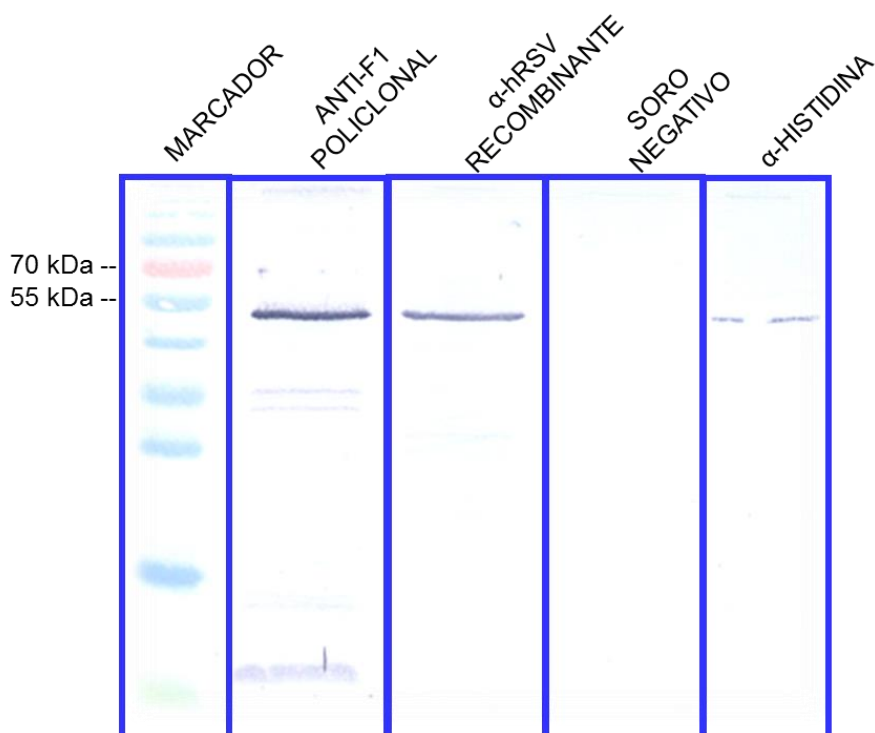


FIGURA 4.29 - WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-HRSV. ANTI-F1 POLICLONAL – 1:3.000, ANTICORPO OBTIDO A PARTIR DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA F1 RECOMBINANTE – CONTROLE POSITIVO; A-HRSV RECOMBINANTE – OBTIDO A PARTIR DA CO-TRANSFEÇÃO DE PLASMÍDEOS pCDNA3.1 CODIFICANDO PARA AS CADEIAS LEVE E PESADA DO ANTICORPO; SORO NEGATIVO – 1:3.000, OBTIDO A PARTIR DA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM PBS, A-HISTIDINA – 1:3.000 - ETIQUETA FUSIONADA À PROTEÍNA F1 RECOMBINANTE. ANTICORPOS SECUNDÁRIOS – ANTI-IGG HUMANA PARA A-HRSV E ANTI-MOUSE PARA OS DEMAIS (1:30.000).

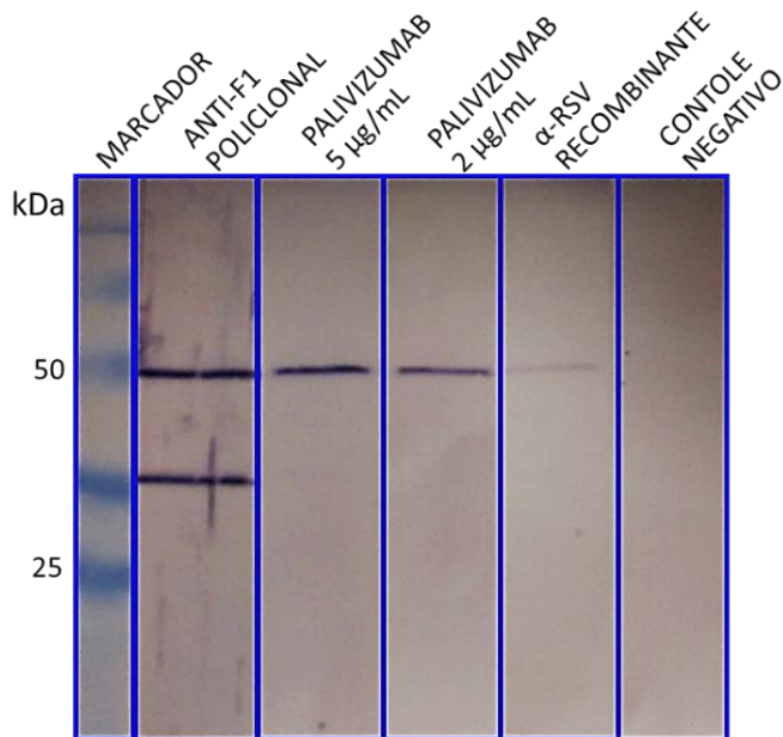


FIGURA 4.30 - WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-HRSV. ANTI-F1 POLICLONAL – 1:3.000, ANTICORPO OBTIDO A PARTIR DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA F1 RECOMBINANTE; PALIVIZUMAB – ANTICORPO COMERCIAL MEDI-493 (SYNAGIS) UTILIZADO NAS CONCENTRAÇÕES DE 5 E 2 µG/ML; A-HRSV RECOMBINANTE – OBTIDO A PARTIR DA TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDEO PCDNAMODCH-CL; CONTROLE NEGATIVO - SORO NEGATIVO – 1:3000, OBTIDO A PARTIR DA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM PBS, ANTICORPOS SECUNDÁRIOS – ANTI-IGG HUMANA PARA A-HRSV E MEDI-493 E ANTI-MOUSE PARA OS DEMAIS (1:30.000).

Através dos ensaios funcionais por *Western Blot*, foi possível confirmar que o anticorpo expresso pelos dois sistemas de expressão foi capaz de reconhecer o seu alvo (figuras 4.29 e 4.30). Com essa análise, é possível afirmar que está havendo correta dimerização molécula e que a mesma se mantém estável durante o processo de purificação.

Com a confirmação da atividade funcional do anticorpo recombinante anti-hRSV contra a proteína F1 recombinante, novas purificações da molécula foram realizadas para desenvolvimento dos ensaios funcionais dirigidos contra amostras clínicas de pacientes infectados com o vírus RSV. Dessa forma, amostras de lavado nasal, cedidas pelo LACEN-PR, foram submetidas a Western Blot (figura 4.31). Para comparação entre o anticorpo comercial MEDI-493 e o anticorpo recombinante, todas as amostras foram submetidas a incubação para reconhecimento por ambos os anticorpos.

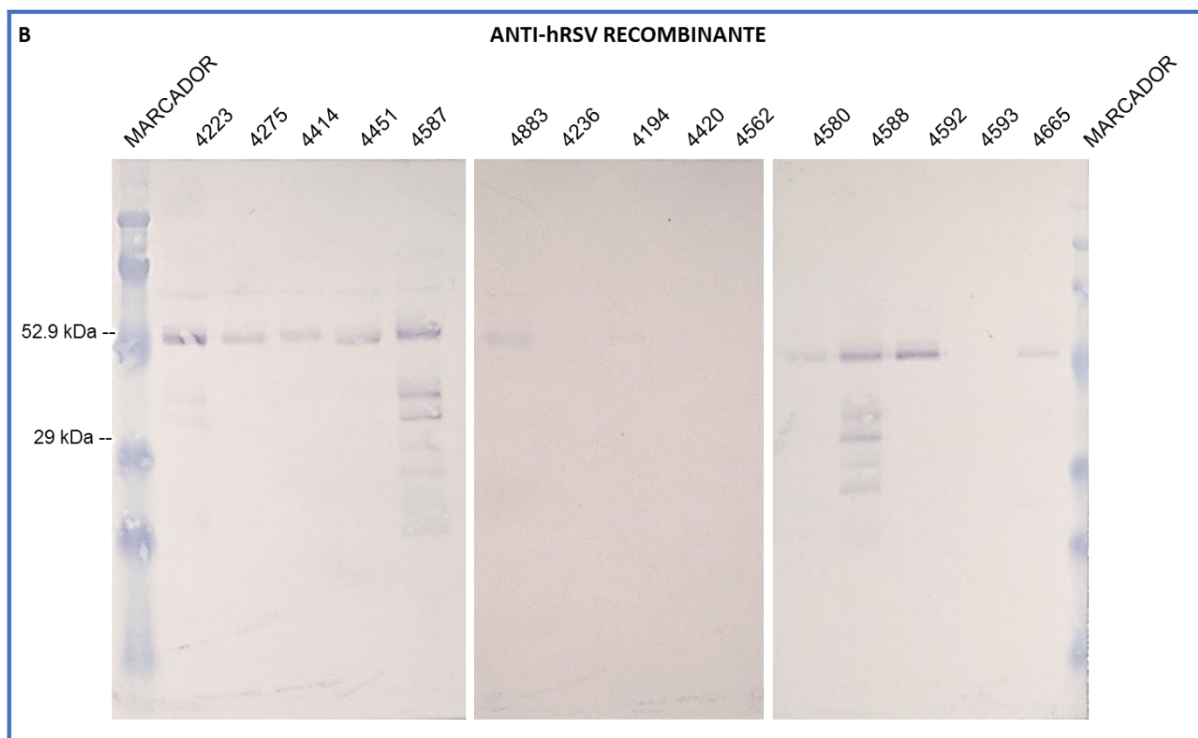
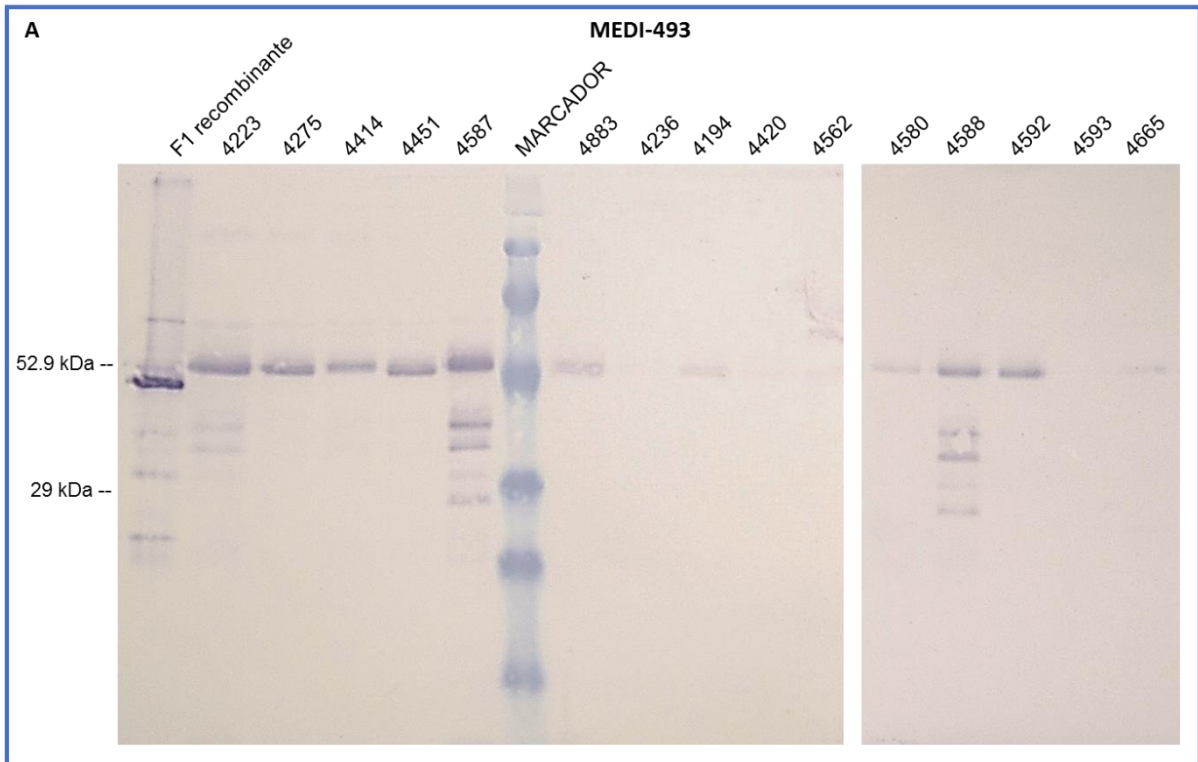


FIGURA 4.31 - WESTERN BLOT CONTRA AMOSTRAS DE LAVADO NASAL DE PACIENTES INFECTADOS COM HRSV. **A.** RECONHECIMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS PELO ANTICORPO COMERCIAL MEDI-493 (3 µG/ML). **B.** RECONHECIMENTO DAS AMOSTRAS CLINICAS PELO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-HRSV. AMOSTRAS DE BAIXO CT - 4223, 4275, 4414, 4451, 4587; AMOSTRAS COM ALTO CT - 4236, 4383, 4194, 4420, 4562; AMOSTRAS NEGATIVAS – 4580, 4588, 4592, 4593, 4665.

Com base no resultado obtido a partir do Western Blot dirigido contra as amostras clínicas de pacientes infectados pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano, foi possível verificar que o anticorpo comercial (MEDI-493) e o anticorpo recombinante anti-hRSV apresentaram o mesmo padrão de reconhecimento das amostras. As mesmas amostras analisadas por Western Blot foram também analisadas através de ensaio de ELISA. Os poços sensibilizados com 5 µL de cada amostra clínica e incubados com o anticorpo recombinante também apresentaram absorvâncias equivalentes às do anticorpo comercial MEDI-493 (figura 4.32). As maiores absorvâncias obtidas com o anticorpo anti-hRSV (em vermelho) foram, provavelmente, resultado de erros de pipetagem no desenvolvimento do ensaio. Também pode ser observado que as amostras que apresentaram sinal negativo por Western Blot (4236, 4420, 4562 e 4593), também apresentaram baixas absorvâncias no ensaio de ELISA. A única exceção foi o resultado obtido com a amostra 4194, que por Western Blot apresentou uma banda de baixa intensidade, mas que apresentou absorvância inferior a amostras que não foram visualizadas por Western Blot.

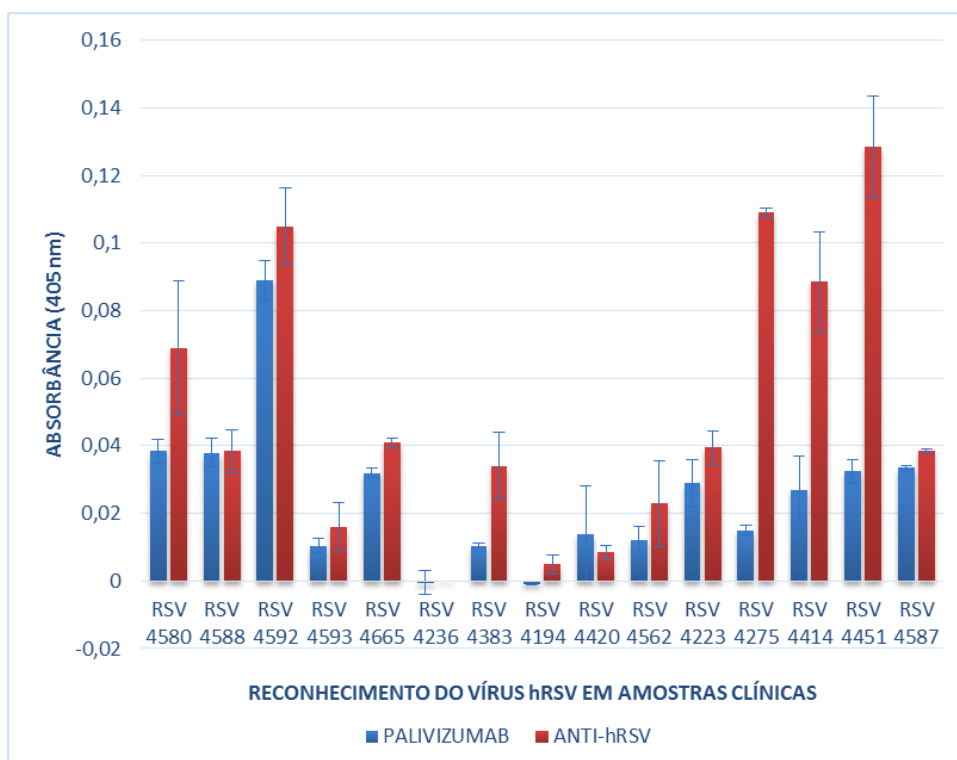


FIGURA 4.32 - RECONHECIMENTO DE AMOSTRAS CLÍNICAS INFECTADAS COM HRSV POR ENSAIO DE ELISA. EM VERMELHO, RECONHECIMENTO POR ANTI-HRSV RECOMBINANTE. EM AZUL, RECONHECIMENTO POR MEDI-493.

Nos Western blots, foi verificado que dentre a amostras com baixo Ct (12 a 17 ciclos), todas foram positivas e apresentaram bandas fortes. Dentre as amostras de

alto Ct (de 30 a 32 ciclos), por outro lado, apenas 2 amostras foram positivas, com bandas menos intensas. A ausência de bandas poderia ser explicada se houvesse menor quantidade de proteínas virais nestas amostras. Todavia, em relação às 5 amostras caracterizadas como negativas por Multiplex RT-PCR, 4 deram resultados positivos nos Western Blots realizados nesse trabalho, tanto com o anticorpo comercial MEDI-493 como para o anticorpo recombinante produzido neste trabalho. Além disso, como pode ser observado as amostras caracterizadas por banda fortes no ensaio de Western Blot, também apresentaram maior absorvância no ensaio de ELISA. Esta equivalência de resultados indica que os experimentos são consistentes. Considerando que as amostras foram positivas para os dois anticorpos, tanto o comercial MEDI-493 quanto para o recombinante anti-hRSV, em ambos os ensaios realizados, existe a possibilidade de que estas sejam realmente positivas. As razões que podem embasar esta possibilidade serão abordadas na discussão.

5. DISCUSSÃO

5.1. ESCOLHA DO ANTICORPO E SISTEMA DE EXPRESSÃO

A escolha do anticorpo anti-hRSV, baseada na sequência codificadora para o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) do anticorpo comercial MEDI-493 (Synagis), fundamenta-se principalmente no fato de a patente do anticorpo comercial ter expirado em outubro de 2015. O Fab do anticorpo recombinante tem a capacidade de reconhecer o sítio antigênico II (sítio A) da proteína F1, que inclui os resíduos de aminoácidos 255 a 275 (BEELER, et al., 1989). A sequência da proteína F1 do hRSV é altamente conservada entre os isolados do vírus, de modo que anticorpos direcionados contra essa proteína promovem reconhecimento e proteção contra ambas as cepas A e B do hRSV (SINGH et al., 2007). Assim, além das aplicações para tratamento das infecções causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano, o anticorpo recombinante anti-hRSV também pode ser utilizado para aplicações no diagnóstico das infecções causadas pelo vírus.

Células de mamíferos possuem maquinaria celular para desenvolvimento do correto enovelamento proteico, processamento de modificações pós-traducionais e um sistema de secreção aprimorado que possibilitam a produção de anticorpos indistinguíveis daqueles produzidos pelo corpo humano. Esse fator diminui consideravelmente as preocupações relativas a reações imunogênicas que podem ser desencadeadas por moléculas que não sejam reconhecidas como próprias pelo sistema imune humano (WURM et al., 2004). É nesse contexto que a célula hospedeira HEK293T foi escolhida para expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV, já que para expressão transiente as células HEK293 e CHO-K1 tem sido as principais linhagens utilizadas. A facilidade de transfecção e a glicosilação humana nativa, tornam as células HEK293 aplicáveis para expressão do anticorpo recombinante.

5.2. NOVOS VETORES PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS

Anticorpos humanos da classe IgG consistem em duas cadeias leves e pesadas idênticas, de modo que a expressão eficiente de ambas as cadeias requer peptídeos-sinal apropriados para transporte dos polipeptídeos para o retículo endoplasmático, onde irá ocorrer o correto enovelamento proteico, montagem do oligômero e modificações pós-traducionais. Peptídeos sinal para secreção estão normalmente localizados na região N-terminal da proteína e seus tamanhos variam de 5 a 30 aminoácidos, sequência que é clivada após translocação pela membrana do retículo endoplasmático, fazendo com que o restante da proteína seja secretada (EMANUELSSON et al., 2007). O uso do peptídeo sinal interleucina-2, proveniente do plasmídeo pFUSE, foi eficiente para secreção do anticorpo recombinante expresso em células HEK293T.

Os métodos convencionais para expressão de moléculas completas de anticorpos recombinantes requerem a co-transfecção de plasmídeos, cada um codificando para uma das cadeias do anticorpo. A transfecção transiente destes vetores em células de mamífero HEK293 permite a rápida produção de anticorpos monoclonais (mAbs) recombinantes. No entanto, a co-transfecção transiente de vetores separados duplica o trabalho de preparação de DNA, requerendo grandes quantidades de plasmídeo e do reagente de transfecção para a produção de miligramas de anticorpo. Esta limitação tem sido trabalhada através da geração de vetores que possuem a capacidade de hospedar um duplo cassete de expressão (WIBERG et al., 2006).

A taxa de proporção 1:1 das cadeias leve e pesada do anticorpo, ou seja, a expressão estequiométrica das duas cadeias polipeptídicas, pode ser alcançada utilizando diferentes construções genéticas de plasmídeos. Vetores baseados em ORFs (fases abertas de leitura), onde uma cadeia leve e uma cadeia pesada são conectadas por uma inteína, são capazes de promover a transcrição desses elementos como um único RNA mensageiro que é traduzido como um único peptídeo (GION et al., 2013). Subsequentemente, esse peptídeo é clivado através de atividade autocatalítica da inteína, liberando as cadeias polipeptídicas do anticorpo para montagem. Desse modo, o uso desses vetores pode potencializar uma melhor integração cromossômica e estabilidade genética.

Além disso, são poucas as descrições na literatura acerca de vetores baseados em dois cassetes de expressão em único plasmídeo. Nessa linha de raciocínio foi concebida a ideia de construir um novo vetor para expressão de duas cadeias polipeptídicas a partir de um único plasmídeo, utilizando dois cassetes de expressão (pcDNAModCH-CL). Portanto, com a finalidade de avaliar qual a melhor construção para expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV, esse trabalho comparou a expressão das três diferentes construções para expressão do anticorpo recombinante anti-hRSV, onde o vetor pcDNAModCH-CL se mostrou mais eficiente do que os demais sistemas, ao serem avaliados os níveis de expressão através de ensaios de ELISA com os sobrenadantes de culturas transfectadas com as diferentes construções plasmideais.

Há uma década, a tecnologia para cultivo de células de mamíferos, atingia níveis de produção de aproximadamente 5 g/L de anticorpos em células de CHO (WURM et al., 2004). Atualmente, a produção industrial de IgG atinge níveis em torno de 12 g/L, tendo sido relatada a produção de IgG na linhagem celular de retina embrionária humana Per.C6 de 27 g/L (JONES et al., 2003). Comparando-se esses dados com o nível de expressão obtido nesse trabalho do anticorpo recombinante anti-hRSV, que foi de 0,015 mg/L, verifica-se que o nível de expressão do anticorpo em escala laboratorial ainda é muito baixo.

Isso se deve ao fato de que os meios de cultura e de manutenção das células não serem otimizados como as condições de cultivo em escala industrial, onde o aumento do rendimento é resultado de novas tecnologias que permitem a otimização do nível de produção de linhagens celulares, otimização do meio de produção, prolongado processo de cultura de altas densidades celulares (JOSTOCK, 2011). Além disso, com as tecnologias atuais, várias modificações foram realizadas em linhagens celulares produtoras de anticorpos visando atingir tempos de produção prolongados de quase 3 semanas com manutenção da viabilidade celular a altas densidades densidades. Essas modificações estão relacionadas com o metabolismo melhorado, reduzida apoptose e indução de parada do ciclo celular (BUTLER et al., 2005; FUSSENEGGER et al., 1998).

Em um trabalho utilizando a produção transiente de anticorpos tipo IgG, através da expressão do scFv (fragmento variável de cadeia única) ligado ao Fc (fração cristalizável) em células HEK293-6E geneticamente modificadas para crescimento em

suspensão e em meio quimicamente definido livre de soro, foi atingido o rendimento de 0.6 g/L através de cultivo em frascos simples sob agitação (ZHANG et al., 2009). Dessa forma, observa-se que a padronização de células crescendo em suspensão pode favorecer o aumento do rendimento da expressão. De outra forma, a aquisição de linhagens previamente adaptadas ao crescimento em meio livre de soro fetal bovino poderia favorecer a produção de maiores quantidades do anticorpo anti-hRSV, auxiliando também na purificação desses anticorpos a partir do sobrenadante da cultura, sem interferência da co-purificação de anticorpos do soro.

5.3. RECONSTITUIÇÃO DAS VLPs DE hRSV E POSSÍVEIS APLICAÇÕES

Partículas tipo-vírus são formadas pela automontagem de proteínas estruturais que formam estruturas altamente relacionadas aos vírus nativos (PUMPENS & GRENS, 2002). Por não possuírem material genético para replicação, a montagem das VLPs é obtida através da clonagem dos genes correspondentes para as proteínas estruturais em para expressão recombinante. Portanto, para desenvolvimento dos ensaios funcionais, o uso das VLPs de hRSV exclui a necessidade do cultivo do vírus, uma etapa laboriosa e que requer instalações apropriadas para evitar contágio do operador, substituindo testes de microneutralização do vírus por ensaios de ELISA de captura com as VLPs.

De modo a facilitar a purificação das partículas tipo-vírus através de cromatografia de afinidade, foram inseridas etiquetas fusionadas às proteínas virais. Segundo trabalho de JU e colaboradores (2011), quando a região N-terminal da proteína de ligação (por exemplo, F ou G de hRSV) está localizada na superfície da VLP, a adição de pequenos peptídeos na região N-terminal, como cauda de hexahistidinas (*his-tag*) ou pequenos epítomos proteicos, não prejudicam a formação da partícula, podendo ser introduzidos na estrutura da VLP.

Portanto, a ausência de verificação da expressão das VLPs por Western Blot não deve ser resultado da inserção dos peptídeos referentes aos *tags* de histidina, c-myc e FLAG. Provavelmente, o peptídeo sinal nativo, ou seja, próprio das sequências virais, utilizado para construção das VLPs, não foi reconhecido pela maquinaria da célula, direcionando as proteínas virais para degradação antes da montagem da partícula e consequente secreção.

As VLPs podem ser classificadas de acordo com sua arquitetura, distinguindo VLPs envelopadas e não-envelopadas. Partículas não envelopadas são tipicamente compostas por uma ou mais proteínas estruturais virais, não envolvidas por proteína de membrana do hospedeiro, e são mais fáceis de produzir e purificar. As VLPs envelopadas consistem em proteínas envolvidas por membrana da célula hospedeira, são mais flexíveis, de modo que antígenos de diferentes patógenos podem ser integrados, bem como proteínas do hospedeiro (Kushnir et al., 2012; Buonaguro et al., 2011).

Nesse contexto, o hRSV, assim como outras paramyxoviroses, possui um envelope lipídico derivado da membrana plasmática. Em adição, as partículas virais de hRSV são pleomórficas, apresentando-se tanto nas formas esférica quanto filamentosa e em partículas de diferentes tamanhos (LILJEROOSA et al., 2013). Esses fatores exemplificam a dificuldade na reconstituição de VLPs do Vírus Sincicial Respiratório, de modo que através das condições testadas nesse trabalho não foi possível verificar a expressão dessas moléculas.

5.4. TESTES FUNCIONAIS

Mesmo com a produção de baixas quantidade do anticorpo, foi possível o seu uso em ensaios para o reconhecimento da proteína alvo F1 recombinante do hRSV. O anticorpo monoclonal neutralizante MEDI-493, escolhido como base para construção do anticorpo anti-hRSV recombinante, possui a capacidade de reconhecer e se ligar ao sítio antigênico II da proteína F do hRSV (Asn258 - Val278) (BEELER et al., 1989). Em um estudo de cristalização do anticorpo MEDI-524 (análogo do anticorpo MEDI-493), a sequência do peptídeo completo co-cristalizado com o anticorpo contém 24 resíduos de aminoácidos, cuja sequência está descrita sob o depósito no PDB 3IXT (McLELLAN et al., 2010).

Portanto, em comparação com o anticorpo comercial MEDI-493, utilizado como controle em ensaios de *Western Blot*, foi possível verificar que o anticorpo recombinante anti-hRSV também foi capaz de reconhecer o sítio antigênico A da proteína F1 recombinante do Vírus Sincicial Respiratório Humano. Assim, como alternativa para desenvolvimento dos ensaios funcionais, as VLPs foram substituídas por amostras clínicas de pacientes infectados pelo hRSV. As amostras de lavado

nasal foram cedidas pelo LACEN-PR e haviam sido previamente testadas por multiplex RT-PCR, sendo o Ct (*threshold cycle*) de cada amostra disponibilizado para comparação. O Ct reflete o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente ultrapasse o limiar (*threshold*), sendo uma medida relativa da concentração do alvo na reação de PCR. Dessa forma, quanto menor o Ct das amostras clínicas, maior a quantidade do vírus.

O PCR em tempo-real transcriptase reversa (RT-PCR) é uma ferramenta rápida e sensível para detecção do RSV (FALSEY et al., 2002; HENRICKSON, 2004). No entanto, os primers utilizados para detecção do vírus devem abranger todas as cepas possíveis do alvo para que o diagnóstico seja confiável e preciso. A falta de compatibilidade entre os resultados fornecidos por RT-PCR e Western Blot ou ELISA, refletem uma problemática no diagnóstico de infecções por hRSV.

Para diagnóstico por RT-PCR são necessários os passos de extração do RNA viral, síntese do cDNA e por fim, a amplificação do fragmento por PCR. Para que a amplificação seja alcançada, é preciso que o RNA genômico viral esteja intacto na região de amplificação. Diante disso, como as amostras clínicas de pacientes infectados com hRSV são coletadas em vários locais e então enviadas para o LACEN-PR, pode haver degradação do RNA viral decorrente do acondicionamento inadequado dessas amostras.

O hRSV é um vírus altamente termolábil que requer diretrizes rigorosas para o transporte e armazenamento das amostras, além de inoculação imediata das mesmas em linhagem celular adequada para recuperação ideal do vírus. O hRSV não tolera congelamento e descongelamento lentos, de modo que cerca de 50% da RSV infectividade do vírus é perdida quando as amostras são submetidas a um único ciclo de congelamento e descongelamento, com completa perda da viabilidade quando congelado a -20°C e em seguida descongelado (PIEDRA et al., 2002). Uma vez que o vírus se rompe, o RNA pode ser degradado rapidamente no aspirado nasal.

Isto posto, os falsos negativos obtidos por RT-PCR podem ser decorrentes basicamente de três principais razões, sendo a primeira relacionada à ineficiência dos processos de extração do RNA, reação de síntese do cDNA ou reação de PCR. Outro ponto a ser levado em consideração é a possibilidade de degradação do RNA viral durante a coleta, transporte ou armazenamento das amostras (PIEDRA et al., 2002), de modo que, em termos de molaridade, as amostras apresentam maior quantidade

de proteína F1 (detectável por ensaios imunoenzimáticos) do que de RNA genômico. Mas além dessas questões, uma terceira possibilidade está relacionada com a variabilidade genética na região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores não possibilitando a amplificação de algumas variantes do vírus hRSV.

Existem sequências nucleotídicas de 16 variantes de hRSV depositadas no banco de dados NCBI. Tomando como base a sequência da proteína F1 do vírus hRSV (*Fusion glycoprotein F0, Human respiratory syncytial virus A – UNIPROT A0A0B4L8X2*), a diferença entre as sequências nucleotídicas para a região do epítipo antigênico II pode chegar a até 29% (quadro 5.1).

VARIANTE hRSV	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO SÍTIO ANTIGÊNICO II	% ID
A	AATAGTGAGTTATTATCATTAAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAGCAAT	100
B	AACAGTGAGTTACTATCATTGATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAATTAATGTCAAGCAAT	93
B1	AACAGTGAGTTACTATCATTGATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAATTAATGTCAAGCAAT	93
MinA	AATAGTGAATTATTGTCATTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAAT	96
MinB	AATCCGAACTGTTAAGCTTAATTAAAGATATGCCAATTACTAACGATCAGAAGAAATTGATGTCTAATAAC	71
MinL	AATAGTGAATTATTGTCATTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAAT	96
MinFLC	AATCCGAACTGTTAAGCTTAATTAAAGATATGCCAATTACTAACGATCAGAAGAAATTGATGTCTAATAAC	71
LA2 19/2013	AATAGTGAATTATTATCATTAAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAAT	97
S2	AATAGTGAATTATTATCATTAAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAAT	97
B 9320	AACAGTGAGTTACTATCATTGATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAATTAATGTCAAGCAAT	93

QUADRO 5.1 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO SÍTIO ANTIGÊNICO II DA PROTEÍNA F1 ENTRE VARIANTES DO VÍRUS HRSV. EM AMARELO ESTÃO DESTACADOS OS NUCLEOTÍDEOS DIVERGENTES EM RELAÇÃO À VARIANTE A DO VÍRUS. % ID – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE.

No entanto, levando-se em consideração a sequência aminoacídica do epítipo antigênico II da proteína F1, a diferença de resíduos da sequência é de apenas 4% (quadro 5.2). Assim, o reconhecimento das amostras clínicas pelos anticorpos está relacionado com a menor variabilidade na sequência aminoacídica da proteína F1. Desse modo, possivelmente falsos negativos não puderam ser detectados pelo multiplex RT-PCR devido à maior variabilidade nas sequências nucleotídicas dos genes do hRSV. Diante disso, o anticorpo recombinante anti-hRSV se mostra uma ferramenta eficiente para o diagnóstico de infecções causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano.

VARIANTE hRSV	ALINHAMENTO SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO SÍTIO ANTIGÊNICO II	% ID
A	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
B	NSELLSLINDMPITNDQKKLMS ^S N	96
B1	NSELLSLINDMPITNDQKKLMS ^S N	96
RSS-2	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
S2	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
MinA	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
MinB	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
MinL	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
MinFLC	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
LA2 19/2013	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN	100
B 9320	NSELLSLINDMPITNDQKKLMS ^S N	96

QUADRO 5.2 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO SÍTIO ANTIGÊNICO II DA PROTEÍNA F1 ENTRE VARIANTES DO VÍRUS hRSV. EM AMARELO ESTÃO DESTACADOS OS AMINOÁCIDOS DIVERGENTES EM RELAÇÃO À VARIANTE A DO VÍRUS. % ID – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE.

No âmbito da aplicação do anticorpo recombinante para diagnóstico de infecções por hRSV, o anti-hRSV pode ser utilizado para desenvolvimento de testes rápidos. As técnicas de diagnóstico têm melhorado ao longo das últimas décadas, de modo que ferramentas que possibilitem aumento da velocidade e acurácia do diagnóstico passaram a utilizar testes que viabilizam o reconhecimento do antígeno nas amostras clínicas (PRENDERGAST & PAPENBURG, 2013). Esse procedimento facilita o desenvolvimento da técnica, bem como a análise dos resultados.

Assim, no contexto de infecções causadas pelo hRSV, resultados mais ágeis permitem o estabelecimento de precauções de controle da infecção mais eficientes, tais como isolamento de pacientes RSV-positivos, diminuindo conseqüentemente a taxa de transmissão nosocomial (MILLS et al., 2011; BERGER et al., 2010). Portanto, no campo de obtenção de melhores diagnósticos para infecções causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humana, o uso do anticorpo recombinante anti-hRSV torna-se uma alternativa viável e funcional.

CONCLUSÃO

Através dos ensaios de detecção por ELISA, foi possível confirmar que o anticorpo recombinante anti-hRSV foi expresso pelos diferentes sistemas expressão. Além disso, verificou-se que a construção baseada em dois cassetes de expressão a partir de um único plasmídeo foi capaz de expressar o anticorpo em maiores níveis em comparação as demais construções. Isso mostra que a abordagem utilizada na construção do novo vetor, pcDNAmoD, é superior para expressão estequiométrica de proteínas diméricas em comparação ao uso de proteína em fusão com o peptídeo de autoclivagem P2A e em comparação com o sistema convencional de co-transfecção de plasmídeos.

Com as análises por Western Blot, foi possível confirmar que o anticorpo recombinante obtido a partir das diferentes construções plasmidiais foi capaz de reconhecer a proteína F1 recombinante do hRSV. Este dado confirma que o anticorpo recombinante apresenta-se corretamente dimerizado, forma na qual a sua atividade de reconhecimento do alvo torna-se possível.

Nesse ponto do trabalho de expressão de anticorpos recombinantes, ainda há a necessidade de otimizar a etapa de expressão do anticorpo. Para isso, devem ser utilizados nesse processo um meio de cultura livre de soro fetal bovino e células capazes de crescer em suspensão.

Mesmo com o insucesso na expressão das VLPs de hRSV, os ensaios funcionais puderam ser conduzidos através de análise por Western Blot e ELISA de amostras provenientes de pacientes infectados com o hRSV, substituindo os ensaios de captura de VLPs de hRSV. O painel de amostras foi obtido a partir do LACEN - Curitiba (Laboratório Central do Estado do Paraná), consistindo em amostras de secreção nasal de pacientes infectados com o vírus RSV bem como amostras de controle negativos. Os testes de comparação entre o reconhecimento pelo anticorpo recombinante e o anticorpo comercial MEDI-493 confirmaram a funcionalidade do anti-hRSV recombinante em reconhecer o seu alvo, de modo que este pode vir a ser utilizado como uma ferramenta no diagnóstico de infecções causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório Humano.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- BASTIEN N, NORMAND S, TAYLOR T, WARD D, PERET TC, BOIVIN G, ANDERSON LJ, LI Y. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. **Virus Res**. 2003 May;93(1):51-62.
- BARR, F.E. & GRAHAM, B.S. Respiratory syncytial vírus infection: Prevention. **UpToDate Individual Web**. 2010.
- BEAUMONT, T.; BAKKER, AQ.; YASUDA, E. RSV specific binding molecule. **Patent Application** 12/898,325. 2012.
- BRATS – Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Uso Profilático do Palivizumab em Crianças com Alto Risco para Doença por Vírus Sincicial Respiratório. **Anvisa**. Ano VI; 15. 2011.
- BEELEER, J. A., COELINGH, K. VAN WYKE. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. **J. Virol**. 1989. 63:2941–2950.
- BERGER, A.; OBWEGESER, E.; ABERLE, S.W.; LANGGARTNER, M.; POPOW-KRAUPP, T. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in neonatal intensive care and intermediate care units: a prospective epidemiologic study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**29(7),669–670. 2010.
- BUONAGURO, L.; TAGLIAMONTE M., TORNESELLO, M.L. & BUONAGURO, F.M. Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Rev. Vaccines* 10: 1569-1583. 2011.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2005. 68:283–91.
- BUTLER, M. & MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2012; 96:885–894.
- CALEGARI, T.; QUEIROZ, D.A.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H.L.; COSTA, L.F.; OLIVEIRA, T.F. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2005; 9(2):156-61. Epub 2005 Aug 18.
- CANE, P.A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev Med Virol**. 2001. 11(2): p. 103-16.

CARBALLAL, G.; VIDELA, C.M.; ESPINOSA, M.A.; SAVY, V.; UEZ, O.; SEQUEIRA, M.D.; KNEZ, V.; REQUEIJO, P.V.; POSSE, C.R.; MICELI, I. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. **J Med Virol.** 2001 Jun;64(2):167-74.

CARBONELL-ESTRANY, X.; SIMÕES, E.A.; DAGAN, R.; HALL, C.B.; HARRIS, B.; HULTQUIST, M.; CONNOR, E.M.; LOSONSKY, G.A. Motavizumab Study Group. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. **Pediatrics.** 2010 Jan;125(1):e35-51.

COLLINS, P. L., & CROWE JR, J. E. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus (Eds.), *Fields Virology* (5th ed., pp. 1601-1636). Philadelphia, USA: **Lippincott Williams & Wilkins.** 2007.

CONITEC. Palivizumabe para a prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – 16. **Ministério da Saúde.** 2012.

COYLE, P.V.; ONG, G.M.; O'NEILL, H.J.; MCCAUGHEY, C.; DE ORNELLAS, D.; MITCHELL, F.; MITCHELL, S.J.; FEENEY, S.A.; WYATT, D.E.; FORDE, M.; STOCKTON, J. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. **BMC Microbiol.** 2004 Oct 25;4:41.

DAUBIN, C.; PARIENTI, J.J.; VINCENT, S.; VABRET, A.D.U.; CHEYRON, D.; RAMAKERS, M.; FREYMUTH, F.; CHARBONNEAU, P. Epidemiology and clinical outcome of virus-positive respiratory samples in ventilated patients: a prospective cohort study. **Crit Care.** 2006;10(5):R142.

DE VINCENZO, J.P. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. In: Aronoff SC, ed. *Advances in pediatric infectious diseases.* Vol 13. St. Louis: **Mosby-Year Book,** 1998.

DE VINCENZO, J.P. Therapy of respiratory syncytial virus infection. **Pediatr Infect Dis J** 2000;19:786–90.

DOAN, Q.; ENARSON, P.; KISSOON, N.; KLASSEN, T.P.; JOHNSON, D.W. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the emergency department. **Cochrane Database Syst Rev.** 2009;7(4):CD006452.

DONNELLY, M.L. et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A sitedirected mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* 82, 1027–1041. 2001a.

DONNELLY, M.L.L.; LUKE, G.; MEHROTRA, A.; LI, X.; HUGHES, L.E.; GANI, D.; RYAN, M.D. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein cleavage mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal skip. **J Gen Virol.** 2001b;82:1013–1025

ELANGO, N.; PRINCE, G.A.; MURPHY, B.R.; VENKATESAN, S.; CHANOCK, R.M.; MOSS, B. Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1986 Mar;83(6):1906-10.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat Protoc**. 2007, 2(4):953–971

FALSEY, A.R.; FORMICA, M.A.; WALSH, E.E. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: Comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. **J Clin Microbiol** 2002;40:817–820.

FANG, J.; QIAN, J.J.; YI, S. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. **Nat Biotechnol**. 2005; 23:584–590.

FELTES, T.F.; CABALKA, A.K.; MEISSNER, C.; PIAZZA, F.M.; CARLIN, D.A.; TOP, F.H.; CONNOR, E.M.; SONDHEIMER, H.M. The Cardiac Synagis Study Group. Palivizumab Prophylaxis Reduces Hospitalization Due To Respiratory Syncytial Virus In Young Children With Hemodynamically Significant Congenital Heart Disease. **J Pediatr** 2003;143:532-40.

FERRAZ, A. I.; RODRIGUES, A. S. **Introdução à biotecnologia**. Portugal, 2007.

FITZGERALD, D. J. et al. Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. **Nat. Methods** 3, 1021–1032 (2006).

FRENZEL, André; HUST, Michael; SCHIRRMANN, Thomas. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**. 2013, V 4, 217

FUSSENEGGER, M. & BAILEY, J.E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnol Prog** (1998) 14:807–33.

GION, Wendy R.; DAVIS-TABER, Rachel A.; REGIER, Dean A.; FUNG, Emma; MEDINA, Limary; SANTORA, Ling C.; BOSE, Sahana; IVANOV, Alexander V.; PERILLI-PALMER, Barbara A.; CHUMSAE, Chris M.; MATUCK, Joseph G.; KUNES, Yune Z. & CARSON, Gerald R. Expression of antibodies using single open reading frame (sORF) vector design. **mAbs**, 2013. 5:4, 595-607

GUERGUERIAN, A.M.; GAUTHIER, M.; LEBEL, M.H.; FARRELL, C.A.; LACROIX, J. Ribavirin in ventilated respiratory syncytial virus bronchiolitis. A randomized, placebo-controlled trial. **Am J Respir Crit Care Med**. 1999 Sep;160(3):829-34.

GONZALEZ, R.; ANDREWS, B.A. & ASENJO, J.A. (2002) **J. Theor. Biol.**, 214, 529–537.

GURTU, V.; YAN, G.; ZHANG, G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**. 1996 Dec 4;229(1):295-8.

HALL, C.B. Respiratory syncytial virus in young children. **TheLancet.com**. Vol. 375 May. 1, 2010. 1501-1502.

HAMILTON, S. & GERNGROSS, T. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. **Curr Opin Biotechnol**. 2007, 18:387-392.

HANSEL, T.T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, T.; MITCHELL, J.A.; GEORGE, A.J. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nat Rev Drug Discov**. 13(4):325–338. 2010.

HELLEN, C.U.T. & SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes & Development**. 2001. 15: 1593–1612.

HENRICKSON, K.J. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. **Pediatr Infect Dis J**. 23:S6–S10. 2004.

HOUDEBINE, L.M. & ATTAL, J. Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. **Transgenic Res**. 1999, 8, 157.

JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.; PESTOVA, T.V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 11:113–127.

JAFRI, H.S. Role of chemokines in respiratory syncytial virus disease. **Pediatr Infect Dis J**. 2002;21:454–6.

JAYAPAL, K.P., WLASCHIN, K.F., HU, W.S., YAP, M.G.S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. **Chem Eng Prog**. 2007. 103:40-7

JENNINGS GT, BACHMANN MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biol Chem**. 2008 May;389(5):521-36.

JEONG, K.J.; JANG, S.H., VELMURUGAN, N. Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts. *Biotechnol J*. 2011 6:16–27. doi:10.1002/biot. 201000381

JOHNSON S, OLIVER C, PRINCE GA, HEMMING VG, PFARR DS, WANG SC, DORMITZER M, O'GRADY J, KOENIG S, TAMURA JK, WOODS R, BANSAL G, COUCHENOUR D, TSAO E, HALL WC, YOUNG JF. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. **J Infect Dis**. 1997 Nov;176(5):1215-24.

JONES, D.; KROOS, N.; ANEMA, R.; VAN MONTFORT, B.; VOOYS, A.; VAN DER KRAATS, S.; et al. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6. **Biotechnol Prog** (2003) 19:163–8. doi:10. 1021/bp025574h

JOSTOCK, T: Expression of antibody in mammalian cells. In *Antibody Expression and Production*. Edited by Al-Rubeai M. Heidelberg: **Springer**; 2011:1–24 [Cell Engineering, vol. 7].

JU, H., WEI, N., WANG, Q., WANG, C., JING, Z., GUO, L., et al. Goose parvovirus structural proteins expressed by recombinant baculoviruses self-assemble into virus-like particles with strong immunogenicity in goose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011. 409, 131–136.

KAMIONKA, Mariusz. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. **Curr Pharm Biotechnol**. 2011, 12(2): 268-274.

KAUFMAN RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. **Mol Biotechnol**. 2000; 16:151- 60.

KIM JH, LEE SR, LI LH, PARK HJ, PARK JH, LEE KY, KIM MK, SHIN BA, CHOI SY. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. **PLoS One**. 2011;6(4):e18556. doi: 10.1371/journal.pone.0018556. Epub 2011 Apr 29.

KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

KRIZ, A.; SCHMID, K.; BAUMGARTNER. N.; ZIEGLER, U.; BERGER, I.; BALLMER-HOFER, K.; BERGER, P. A plasmid-based multigene expression system for mammalian cells. *Nat Commun*. 2010 Nov 16;1:120.

KUNES YZ, GION WR, FUNG E, SALFELD JG, ZHU RR, SAKORAFAS P, et al. Expression of antibodies using single-open reading frame vector design and polyprotein processing from mammalian cells. **Biotechnol Prog**.2009;25:735–44.

KUSHNIR N., S.J. STREATFIELD AND V. YUSIBOV. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine** 31: 58-83. 2012.

LEITZGEN, K.; KNITTLER, M.R.; HAAS, I.G. Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. **J. Biol. Chem**. 1997, 272, 3117.

LI, Jiandong; ZHANG, Congcong; JOSTOCK, Thomas; DÜBEL, Stefan. Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. **Protein Engineering, Design & Selection**. 2007, vol. 20 n. 10 pp. 491–496.

LI, XIAOHUI; PUSHKO, PETER; & TRETAKOVA, IRINA. Recombinant Hemagglutinin and Virus-Like Particle Vaccines for H7N9 Influenza Virus. *J Vaccines Vaccin*. 2015 Jun; 6(3): 287.

LILJEROOSA, Lassi; KRZYZANIAKB, Magdalena Anna; HELENIUSB, Ari & BUTCHERA, Sarah Jane. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. **PNAS**. vol. 110, n. 27,11133–11138. 2013.

LONZA. Important Vector Factors for Gene Expression. Technical Reference Guide. BioResearch. **Lonza**. 2012.

MA, Julian K-C.; DRAKE, Pascal M.W.; CHRISTOU, Paul. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, 2005, v 4, 794-805.

MATEU, M.G. Virus engineering: functionalization and stabi-lization. **Protein Eng. Des. Sel.** 2011. 24: 53–63.

McLELLAN, J.S.; CHEN, M.; KIM, A.; YANG, Y.; GRAHAM, B.S.; KWONG, P.D. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. **Nat.Struct.Mol.Biol.** 17: 248-250. 2010.

MEISSNER, P.; PICK, H.; KULANGARA, A.; CHATELLARD, P.; FRIEDRICH, K.; WURM, F.M. Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. **Biotechnol Bioeng** (2001) 75:197–203.

MILLS, J.M.; HARPER, J.; BROOMFIELD, D.; TEMPLETON, K.E. Rapid testing for respiratory syncytial virus in a paediatric emergency department: benefits for infection control and bed management. **J. Hosp. Infect.**77(3),248–251 (2011).

MORRISON, S. and SCHARFF, M. (1975) **J. Immunol.**, 114, 655–659

MUFSON, M.A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol** 1985;66: 2111–2124.

NAIR, H.; NOKES, D.J.; GESSNER, B.D.; DHERANI, M.; MADHI, A.S. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet** 2010;375: 1545–1555.

NASCIMENTO, C.A.. Detecção de Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) pela RT-PCR em tubo único, em amostras clínicas. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo- São Paulo: 2006).

NEHLSSEN K, SCHUCHT R, DA GAMANORTON L, KRÖMER W, BAER A, CAYLI A, et al. Recombinant protein expression by targeting preselected chromosomal loci. **BMC Biotechnol** (2009) 9:100.

NEWCOMB. J.; CARLSON, R.; ALDRICH, S.C. Genome synthesis and design futures: Implications for the U.S. economy. Cambridge, MA: **Bio Economic Research Associates**. 2007.

NI, Jian. **New Technologies for the Generation of Human Monoclonal Antibody**. Trends in Bio/Pharmaceutical Industry. BioPharma

- NI, Y. & CHEN, R. Extracellular recombinant protein production from Escherichia coli. **Biotechnol Lett.** 2009, 31:1661–70.
- OSIOWY, Carla. Direct Detection of Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Virus, and Adenovirus in Clinical Respiratory Specimens by a Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Nov; 36(11): 3149–3154.
- PAULUS, H. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. **Annu Rev Biochem** 2000; 69:447-96.
- PALMENBERG, A.C. et al. Proteolytic processing of the cardioviral P2 region: primary 2A/2B cleavage in clone-derived precursors. **Virology.** 1992. 190, 754–762
- PARVEEN, S.; BROOR, S.; KAPOOR, S.K.; FOWLER, K.; SULLENDER, W.M. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. **Journal of medical virology.** 2006, 78: 659–665.
- PEREIRA, S.D. Conceitos e definições da saúde e epidemiologia usados na vigilância sanitária. **Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE – SP – março 2007.**
- PERLER, F.B. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. **Cell.** 1998 Jan 9;92(1):1-4.
- PERLER, FB. Protein splicing mechanisms and applications. **IUBMB Life** 2005; 57:469-76;
- PIEDRA, P.A.; ENGLUND, J.A.; GLEZEN, W.P. Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In DD Richman, RJ Whitley, FG Hayden (eds), *Clinical Virology*, 2nd ed., **ASM Press**, Washington, p. 787-819. 2002.
- PUMPENS, P., & GRENS, E. Artificial genes for chimeric virus-like particles. In Y. E. Khudyakov & H. A. Fields (Eds.), *Artificial DNA: Methods and applications.* 2002. (pp. 249–327). Boca Raton: CRC Press.
- PUNT, P.J.; VAN, BIEZEN.; CONESA, A.; ALBERS, A.; MANGNUS, J.; VAN DEN HONDEL, C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends Biotechnol.** 2002;20:200–206.
- QUAN, P.L.; PALACIOS, G.; JABADO, O.J.; CONLAN, S.; HIRSCHBERG, D.L. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. **J Clin Microbiol.** 2007 Aug;45(8):2359-64
- QUAN, Fu-Shi; KIM, Yonghwan; LEE, Sujin; YI, Hong; KANG, Sang-Moo; BOZJA, Jadranka; MOORE, Martin L.; COMPANS, Richard W. Viruslike Particle Vaccine Induces Protection Against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. **J Infect Dis.** 2011 Oct 1; 204(7): 987–995.

- RAMESSAR, Koreen.; CAPELL, Teresa.; CHRISTOU, Paul. Molecular pharming in cereal crops. **Phytochemical reviews**. 2008, 7:579-582
- ROBINSON, R.F. Impact of respiratory syncytial virus in the United States. **Am J Health Syst Pharm** 2008;65 (23 Suppl 8):S3-S6.
- ROLDÃO, A.; MELLADO, M.C.; CASTILHO, L.R.; CARRONDO, M.J.; ALVES, P.M. Virus-like particles in vaccine development. **Expert Rev Vaccines**. 2010 Oct;9(10):1149-76. doi: 10.1586/erv.10.115.
- RUSSELL, P.K.; BRANDT, W.E.; DALRYMPLE, J.M. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. R.W. Schlesinger (Ed.), The togaviruses, **Academic Press**, New York (1980), pp. 503–529.
- SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2004, v. 65, 4, pp 363-372.
- SCHROFF, R.W.; FOON, K.A.; BEATTY, S.M.; OLDHAM, R.K.; MORGAN, A.C. JR. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. **Cancer Res**. 1985, 45, 879.
- SINGH SR, DENNIS VA, CARTER CL, PILLAI SR, JEFFERSON A, SAHI SV, MOORE EG. Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model. **Vaccine**. 2007 Aug 14;25(33):6211-23.
- SMITH G, RAGHUNANDAN R, WU Y, LIU Y, MASSARE M, NATHAN M, ZHOU B, LU H, BODDAPATI S, LI J, FLYER D, GLENN G. Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in insect cells form protein nanoparticles that induce protective immunity in cotton rats. **PLoS One**. 2012;7(11):e50852
- SPITS, H.; BEAUMONT, T. RSV-specific binding molecules and means for producing them. **Patent Application** 12/600,950. 2010.
- SPRIGGS, K.A.; STONELEY, M.; BUSHELL M.; WILLIS, A.E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. **Biol. Cell**. 2008. 100:27–38.
- SZYMCZAK, A.L.; WORKMAN, C.J.; WANG, Y.; VIGNALI, K.M.; DILIOGLOU, S.; VANIN, E.F.; VIGNALI, D.A. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. **Nat Biotechnol**. 2004 May;22(5):589-94.
- THYAGARAJAN B, GUIMARÃES MJ, GROTH AC, CALOS MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. **Gene**. 2000;244:47–54..
- TOPILINA, Natalya I. & MILLS, Kenneth V. Recent advances in in vivo applications of intein-mediated protein splicing. **Mobile DNA**. 2014, 5:5.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science** 304: 66–74. 2004.

VETTER, B.N.; ORLOWSKI, V.; FRANSEN, K.; NIEDERHAUSER, C.; AUBERT, V.; BRANDENBERGER, M.; CIARDO, D.; DOLLENMAIER, G.; KLIMKAIT, et al. Generation of a recombinant Gag virus-like-particle panel for the evaluation of p24 antigen detection by diagnostic HIV tests **PLoS One**. 2014 Oct 24;9(10):e111552.

VIGNALI, D.A.A. & VIGNALI, K.M. Profound enhancement of T cell activation mediated by the interaction between the T cell receptor and the D3 domain of CD4. **J. Immunol.** 162, 1431–1439 (1999).

WELLIVER, R.C. Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection. **Curr Opin Pharmacol.** 2010;10(3):289-93.

WIBERG, F. C. et al. Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 94, 396–405, 10.1002/bit.20865 (2006)

WU, S.-J., A. SCHMIDT, E. J. BEIL, N. D. DAY, P. J. BRANIGAN, C. LIU, L. L. GUTSHALL, C. PALOMO, J. FURZE, G. TAYLOR, J. A., et al. Characterization of the epitope for antihuman respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. **J. Gen. Virol.** 2007. 88:2719–2723.

WURM, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat Biotechnol.** 2004, 22:1393–1398.

ZHANG, J.; MACKENZIE, R.; DUROCHER, Y. Production of chimeric heavychain antibodies. *Methods Mol Biol.* 2009. 525:323–36.

ANEXOS

ANEXO I

Produção Intelectual

Esse projeto foi apresentado nos seguintes eventos científicos:

- a) 3º Congresso Sul Brasileiro de Iniciação Científica e Pós-Graduação - PUCPR
- b) 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq