

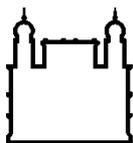
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LigANI CANDIDATA  
A VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE HUMANA E ANIMAL**

**GABRIELA DOS SANTOS ESTEVES**

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***GABRIELA DOS SANTOS ESTEVES***

Desenvolvimento de metodologias para purificação e caracterização da proteína recombinante LigANI candidata a vacina contra Leptospirose humana e animal

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Biologia Celular e  
Molecular

**Orientador:** Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2018

Esteves, Gabriela dos Santos.

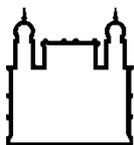
Desenvolvimento de metodologias para purificação e caracterização da proteína recombinante LigANI candidata a vacina contra Leptospirose humana e animal / Gabriela dos Santos Esteves. - Rio de Janeiro, 2018.  
175 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Marco Alberto Medeiros.

Bibliografia: f. 130-141

1. Proteínas recombinantes - isolamento e purificação. 2. Proteínas recombinantes - uso terapêutico. 3. Leptospirose - prevenção e controle. 4. Vacinas - isolamento e purificação. 5. Bioquímica - Métodos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**GABRIELA DOS SANTOS ESTEVES**

**Desenvolvimento de metodologias para purificação e caracterização da proteína recombinante LigANI candidata a vacina contra Leptospirose humana e animal**

**Aprovada em: 23 de fevereiro de 2018.**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Leila de Mendonça Lima - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr. Tito Livio Moitinho Alves** (COPPE/UFRJ)

**Prof. Dr. Nílson Ivo Tonin Zanchin** (Instituto Carlos Chagas/Fiocruz)

**Prof. Dr. Win Maurits Sylvain Degrave** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr. Marcos da Silva Freire** (Bio-Manguinhos/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2018.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Gabriela Dos Santos Esteves**, sob orientação do Dr. Marco Alberto Medeiros, foi aprovada em 23/02/2018, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“Desenvolvimento de metodologias para purificação e caracterização da proteína recombinante LigANI candidata a vacina contra Leptospirose humana e animal.”**, área de concentração: Biologia Celular e Molecular. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin - ICC -PR/FIOCRUZ e Dr. Tito Livio Moitinho Alves - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Wim Maurits Sylvain Degrave - IOC/FIOCRUZ e Dr. Marcos da Silva Freire - BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria n° 694, de 13 de junho de 1995, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2018.

  
Leila de Mendonça Lima  
Matrícula SIAPE 11919958

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob n° DCE-6600/18 no livro n° II, folha 7v em 23/02/2018.

A minha avó Gloria, meu exemplo de  
mulher guerreira e batalhadora.  
Obrigada por sempre acreditar em mim...

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força em todos os momentos em que o desânimo aparecia e a vontade de desistir também. Se hoje cheguei até aqui foi porque me sustentaste em todos os incontáveis momentos de dificuldade.

Meu agradecimento ao Dr. Marco Alberto Medeiros pelo incentivo e apoio durante toda a minha caminhada na FIOCRUZ. Sua insistência para que eu entrasse no Doutorado foi fundamental, porque acho que de outro modo talvez não tivesse chegado até aqui. Obrigada pela confiança!

Agradeço a todo o pessoal do LATER, saibam que neste último ano, vocês me ajudaram imensamente e entenderam que tive que priorizar ao máximo a tese. Minha eterna gratidão a todos vocês!

Meu agradecimento especial a Mariana Miguez e Ana Carolina Andrade por tudo. Desde a discussão dos experimentos a execução deles, foram vocês que estiveram comigo o tempo todo! Meu agradecimento é de coração e para a eternidade. Tenham certeza de que nunca esquecerei tudo o que vocês fizeram por mim.

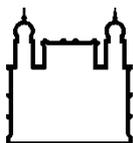
Quero agradecer ao pessoal do LAMAM pela ajuda com alguns dos experimentos realizados neste trabalho e pelas discussões em torno dos resultados. Valeu mesmo pela paciência e desculpem a perturbação!

E o mais importante agradecimento de todos vai para meus amigos e minha família, principalmente minha mãe e meu marido, que sempre me incentivaram e compreenderam minhas ausências. Obrigada pelo suporte e apoio em tudo. Amo vocês infinitamente!

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

"Renova-te.  
Renasce em ti mesmo.  
Multiplica os teus olhos, para verem mais.  
Multiplica-se os teus braços para semeares tudo.  
Destrói os olhos que tiverem visto.  
Cria outros, para as visões novas.  
Destrói os braços que tiverem semeado,  
Para se esquecerem de colher.  
Sê sempre o mesmo. Sempre outro. Mas sempre alto.  
Sempre longe.  
E dentro de tudo."

Cecília Meireles



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

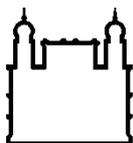
### DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LIGANI CANDIDATA A VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE HUMANA E ANIMAL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Gabriela dos Santos Esteves

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas pelo mundo de acordo com a OMS. No Brasil, nos últimos 10 anos foram notificados 42.891 casos e 3.762 foram a óbito. Os casos de leptospirose vêm aumentando ao longo dos anos e nesse sentido, nosso grupo vem trabalhando com as proteínas da família Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*) visando sua utilização como ferramenta para diagnóstico e como candidatas ao desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante. Em 2007, nosso grupo demonstrou o potencial da região não idêntica de LigA (LigANI) como candidata vacinal, já que foi capaz de proteger 67-100% dos animais contra desafio letal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a expressão em cultivo de alta densidade e estabelecer as metodologias para obtenção da proteína recombinante LigANI com alto grau de pureza e homogeneidade e além disso, determinar as características físico-químicas e biológicas da proteína LigANI, uma vez que estas informações são fundamentais para o desenvolvimento de um produto com aplicação bioterapêutica. Para tal, realizamos o aumento de escala em biorreator de 80 mL para 2 litros de cultivo e obtivemos 1058 mg de LigANI/L de cultivo. A proteína foi purificada utilizando três passos de cromatografia: afinidade por íons metálicos (IMAC), gel filtração (GF) e troca iônica (IEX) e o rendimento total do processo foi de 219,52 mg de LigANI/litro de cultivo com uma pureza de  $99,70 \pm 0,24\%$ . Os dados experimentais confirmaram a massa molecular de 66,9 kDa, ponto isoelétrico de 6,94 e estrutura secundária composta predominante por folha  $\beta$ . A proteína LigANI demonstrou a capacidade de aderir a diferentes proteínas de matriz extracelular e ser antigênica frente a soros de pacientes com leptospirose. Além disso, foi demonstrada a reatividade cruzada entre a proteína LigANI de *Leptospiras* patogênicas de diferentes sorovares a partir de soro hiperimune anti-LigANI de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*. Os dados de estabilidade demonstraram que a proteína se manteve estável por 120 dias quando armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  e liofilizada por 120 dias. Diante do conjunto de dados, demonstramos a viabilidade técnica do uso da proteína LigANI como uma candidata no desenvolvimento de uma vacina contra Leptospirose humana e veterinária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LIGANI CANDIDATA A VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE HUMANA E ANIMAL

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**Gabriela dos Santos Esteves**

Leptospirosis is one of the most common zoonoses in the world according to WHO and the number of leptospirosis cases have been increasing over the years. In Brazil, 42,891 cases have been reported in the last 10 years, and 3,762 have died. Our group has been working with Leptospiral immunoglobulin-like proteins as diagnostic and subunit vaccine candidate and in 2007, we demonstrated the potential of the non-identical LigA region (LigANI) as a vaccine candidate, as it was able to protect 67-100% of the animals against lethal challenge. Thus, the aim of this work was to establish the methodologies to obtain the recombinant LigANI protein with a high degree of purity and homogeneity and to determine the physico-chemical and biological characteristics of the LigANI protein, since these informations are essential for the development of a product with biotherapeutic application. So, we performed the scale up from 80 mL bioreactor to 2 liters of culture and obtained 1058 mg of LigANI per liter of culture. The protein was purified using three chromatographic steps: immobilized metal affinity chromatography (IMAC), gel filtration (GF) and ion exchange (IEX) and the total yield of the process was 219.52 mg of LigANI per liter of culture with a purity of  $99.70 \pm 0.24\%$ . The experimental data confirmed the molecular mass of 66.9 kDa, isoelectric point of 6.94 and secondary structure formed mostly by  $\beta$  sheet structure. The LigANI protein bound to different extracellular matrix proteins and was antigenic against sera from patients with leptospirosis. It also demonstrated cross-reactivity with of other pathogenic *Leptospiras* as hyperimmune serum of anti-LigANI of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni recognized LigANI from different serovars. Stability data showed that the protein remained stable when stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and lyophilized for 120 days. In summary, we demonstrated the technical feasibility of LigANI protein as a candidate in the development of a vaccine against human and veterinary Leptospirosis.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão Bibliográfica.....	1
1.1.1 Vacinas.....	1
1.1.2 Leptospirose .....	5
1.1.3 Vacinas para Leptospirose .....	10
1.1.4 Proteínas .....	17
1.1.5 Desenvolvimento de processos biotecnológicos .....	20
1.1.6 Cromatografia.....	24
1.1.7 Ensaio analítico e caracterização.....	27
1.1.8 Estabilidade proteica .....	29
1.2 JUSTIFICATIVA .....	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1 Cultivo em fermentador para obtenção da biomassa expressando a proteína recombinante LigANI:.....	34
3.1.1 Padronização das condições de cultivo iniciais em biorreator de 80 mL e escalonamento do cultivo para biorreator de 2 litros: .....	34
3.1.2 Controle de processo do cultivo em fermentador: .....	35
3.2 Estabelecimento do processo de lise e clarificação para obtenção da proteína recombinante LigANI: .....	36
3.3 Padronização e Estabelecimento dos Protocolos de Purificação da proteína recombinante LigANI:.....	38
3.3.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC): .....	38
3.3.2 Dessalinização da proteína recombinante LigANI .....	38
3.3.3 Cromatografia de troca iônica (IEX):.....	39
3.4 Metodologias de quantificação e avaliação de homogeneidade. ....	41
3.4.1 Quantificação de proteínas pelo método do ácido Bicinchonínico (BCA) 41	
3.4.2 Quantificação da massa seca da proteína LigANI .....	41
3.4.3 Densitometria.....	42
3.5 Produção de soro hiperimune anti-LigANI em camundongos: .....	42

3.5.1	Títulação dos soros hiperimunes anti-LigANI .....	43
3.6	Ensaio de antigenicidade para os antígenos recombinantes LigANI .....	43
3.6.1	Avaliação da reatividade cruzada entre as proteínas LigANI nas diferentes amostras de Leptospiras patogênicas:.....	44
3.7	Ensaio de adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz extracelular .....	44
3.8	Ensaio de caracterização físico-química da proteína LigANI purificada .....	46
3.8.1	Determinação do ponto isoelétrico: .....	46
3.8.2	Determinação da estrutura secundária da proteína recombinante LigANI por Dicroísmo Circular (DC):.....	46
3.8.3	Determinação da massa molecular da proteína LigANI recombinante: .....	47
3.9	Desenvolvimento de métodos para controle de processo durante e ao final da purificação:.....	48
3.9.1	Avaliação da presença de agregados nas amostras da proteína LigANI recombinante ao final do processo de purificação.....	48
3.9.2	Quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) residual através de fluorescência.....	49
3.9.3	Quantificação de endotoxinas .....	49
3.10	Estudo de estabilidade da proteína recombinante LigANI .....	51
3.10.1	Avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento .....	51
3.10.2	Avaliação de termoestabilidade acelerada de curto período ( <i>Short term accelerated stability</i> ) .....	51
3.10.3	Avaliação da estabilidade da proteína em diferentes condições de armazenamento .....	51
4	RESULTADOS .....	53
4.1	Cultivo em fermentador para obtenção da biomassa expressando a proteína recombinante LigANI:.....	53
4.2	Lise e clarificação para obtenção da proteína recombinante LigANI: .....	54
4.3	Estabelecimento de Métodos e Processos de Purificação para proteína recombinante LigANI:.....	58
4.3.1	Otimização das condições da Cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC): .....	58
4.3.2	Dessalinização da proteína LigANI:.....	64
4.3.3	Cromatografia de troca iônica.....	66
4.3.4	Cromatografia de troca aniônica:.....	66
4.3.5	Cromatografia de Troca catiônica:.....	70
4.3.6	Determinação da relação concentração de proteína vs. volume de resina e o impacto no rendimento: .....	74

4.3.7	Definição da metodologia para cromatografia de troca iônica para o processo de produção da proteína recombinante LigANI: .....	79
4.4	Estabelecimento dos lotes de consistência e rendimento do processo:.....	83
4.5	Reatividade cruzada entre a proteína LigANI de diferentes sorovares e espécies.....	85
4.5.1	Avaliação do título dos soros policlonais anti-LigANI produzidos em camundongo: .....	86
4.5.2	Ensaio de antigenicidade contra antígenos recombinantes de diferentes espécies e sorovares: .....	87
4.5.3	Avaliação da adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz extracelular .....	87
4.6	Caracterização físico-química da proteína recombinante LigANI .....	91
4.6.1	Avaliação do ponto isoelétrico .....	91
4.6.2	Determinação da estrutura secundária da proteína recombinante LigANI por dicroísmo circular (DC): .....	92
4.6.3	Determinação da massa molecular da proteína LigANI:.....	93
4.7	Controle de processo durante e ao final da purificação .....	97
4.7.1	Avaliação da presença de agregados nas amostras de proteína LigANI recombinante ao final do processo .....	97
4.7.2	Quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) residual através de fluorescência.....	99
4.7.3	Quantificação de endotoxinas .....	100
4.8	Estudo da estabilidade da proteína LigANI .....	101
4.8.1	Avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento .....	101
4.8.2	Estabilidade acelerada de curto período ( <i>Short term accelerated stability</i> ).....	104
4.8.3	Avaliação das condições de armazenamento da proteína LigANI:.....	107
5	DISCUSSÃO.....	113
6	CONCLUSÕES.....	127
7	PERSPECTIVAS .....	129
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	130
9	ANEXOS.....	142

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <b>Representação esquemática das proteínas LigA e LigB e seus respectivos fragmentos.</b> .....	14
Figura 2. <b>Esquema de válvulas do homogeneizador de alta pressão.</b> .....	23
Figura 3. <b>Expressão da proteína recombinante LigANI em <i>E. coli</i>.</b> .....	54
Figura 4. <b>Ruptura celular a partir de sonicador.</b> .....	55
Figura 5. <b>Ruptura celular a partir de prensa.</b> .....	56
Figura 6. <b>Ruptura celular a partir de homogeneizador.</b> .....	57
Figura 7. <b>Cromatografia de afinidade com adição de 100 mM de NaCl aos tampões da purificação</b> .....	60
Figura 8. <b>Cromatografia de afinidade com adição de 300 mM de NaCl aos tampões da purificação</b> .....	61
Figura 9. <b>Cromatografia de afinidade com adição de 500mM de NaCl aos tampões da purificação</b> .....	63
Figura 10. <b>Filtração tangencial com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0.</b> .....	64
Figura 11. <b>Filtração tangencial com os tampões Borato 50 mM pH 8,0 e Fosfato 50 mM pH 8,0.</b> .....	65
Figura 12. <b>Cromatograma relativo a cromatografia de gel filtração</b> .....	66
Figura 13. <b>Determinação do pH ideal do tampão Tris-HCl 20 mM para resina Q FF</b> .....	67
Figura 14. <b>Gradiente de NaCl em cromatografia de troca aniônica com resina QFF.</b> .....	68
Figura 15. <b>Metodologia de <i>step</i> na troca aniônica com resina Q FF.</b> .....	69
Figura 16. <b>Cromatografia de troca catiônica com resina CAPTO MMC.</b> .....	71
Figura 17. <b>Cromatografia de troca catiônica com resina CIM Multus SO<sub>3</sub>.</b> .....	72
Figura 18. <b>Cromatografia de troca catiônica com resina SP FF.</b> .....	73
Figura 19. <b>Cromatografia de troca catiônica com resina SP FF.</b> .....	74
Figura 20. <b>Estabelecimento das condições de escalonamento para IMAC.</b> .....	76
Figura 21. <b>Ajuste da etapa de lavagem para padronização da metodologia de escalonamento para IMAC.</b> .....	77
Figura 22. <b>Demonstração da reprodutibilidade da ruptura celular em homogeneizador e escalonamento da IMAC</b> .....	78
Figura 23. <b>Desempenho da resina SP FF em estudo comparativo entre as resinas de troca iônica</b> .....	80
Figura 24. <b>Desempenho da resina Q XL em estudo comparativo entre as resinas de troca iônica</b> .....	81
Figura 25. <b>Eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida 4-12% para determinação da pureza de LigANI purificada em Q XL e SP FF.</b> .....	82

Figura 26. Fluxograma representativo das etapas de separação e purificação da proteína recombinante LigANI. ....	84
Figura 27. <i>Imunoblotting</i> da titulação do pool de soros de camundongo anti-LigANI. ....	86
Figura 28. <i>Imunoblotting</i> do reconhecimento das proteínas recombinantes LigANI de diferentes espécies e sorovares pelo anti-soro anti-LigANI. ....	87
Figura 29. Comparação do desempenho das diluições do anticorpo secundário (anti-mouse IgG peroxidase – SIGMA) em relação a diluição 1:1.1500 do anticorpo anti-Histidina (SIGMA) .....	88
Figura 30. Comparação do desempenho das diluições do anticorpo secundário (anti-mouse IgG peroxidase – SIGMA) em relação a diluição 1:3.000 do anticorpo anti-Histidina (SIGMA) .....	88
Figura 31. Quadro com a relação entre concentração das proteínas de matriz extracelular e de LigANI. ....	89
Figura 32. Quadro demonstrativo da reprodutibilidade dos ensaios de adesão. ....	90
Figura 33. Quadro comparativo do ensaio de adesão de LigANI às diferentes proteínas de matriz extracelular .....	91
Figura 34 Focalização isoeétrica de LigANI. ....	92
Figura 35. Densitometria do IEF-PAGE da proteína LigANI purificada em coluna de troca aniônica Q XL .....	92
Figura 36. Espectros de dicroísmo circular da proteína recombinante LigANI. ....	93
Figura 37. Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de SEC. ....	94
Figura 38. Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de gel gradiente de poliacrilamida .....	95
Figura 39 . Modelo gerado pelo programa Phyre 2 relativo a região de homologia com Invasina. ....	95
Figura 40. Modelo de estrutura terciária para a proteína LigANI .....	96
Figura 41. Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de espectrometria de massa. ....	96
Figura 42. Espectros de fluorescência da amostra LigANI Q XL em diferentes condições. ....	97
Figura 43. Espectros de fluorescência da amostra LigANI Q XL em diferentes concentrações de uréia. ....	98
Figura 44. Espectro de DLS da proteína LigANI. ....	99
Figura 45. Análise da proteína recombinante LigANI submetida a ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos .....	102
Figura 46. Análise estrutural da proteína LigANI após cinco ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. ....	103
Figura 47. Análise da proteína LigANI mantida um mês a temperatura ambiente. ....	104

<b>Figura 48. Análises estruturais da proteína LigANI mantida a temperatura ambiente durante 1 mês .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 49 Análises da proteína LigANI após 1 mês a temperatura ambiente com e sem adição do inibidor de proteases. ....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 50. Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão Fosfato de Sódio. ....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 51. Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão HEPES 50 mM pH 6.8. ....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 52 Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão PBS.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 53. Ensaio de adesão de LigANI às proteínas de matriz extracelular a partir da proteína armazenada em diferentes condições. ....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <b>Seleção de vacinas recombinantes veterinárias comerciais</b> .....	4
Tabela 2. <b>Níveis de endotoxina recomendados para os diferentes tipos vacinais</b> .....	29
Tabela 3. <b>Planejamento experimental considerando fatorial 2<sup>2</sup> para duas variáveis: tempo de pré indução e concentração de IPTG</b> .....	34
Tabela 4. <b>Sequências iniciadoras utilizadas na avaliação da integridade do DNA plasmidial dos cultivos celulares</b> .....	36
Tabela 5. <b>Parâmetros de validação do teste cinético cromogênico</b> .....	50
Tabela 6. <b>Comparação entre os rendimentos obtidos através dos diferentes métodos de ruptura celular</b> .....	58
Tabela 7. <b>Análise densitométrica das bandas eletroforéticas oriundas da eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida das amostras LigANI SP FF e LigANI Q XL</b> .....	83
Tabela 8. <b>Purificação da proteína rLigANI</b> .....	85
Tabela 9. <b>Concentração de DNA total obtida através da metodologia de fluorescência (Qubit) em cada uma das etapas do processo para obtenção da proteína recombinante LigANI</b> .....	100
Tabela 10. <b>Quantificação de endotoxinas pelo teste cromogênico de cada etapa do processo de purificação da proteína LigANI</b> .....	101

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIG	do inglês, “Bacterial ImmunoGlobulin-like”
BCA	do inglês, “Bicinchoninic acid assay”
BSA	do inglês, “Bovine Serum Albumin”
DC	Dicroísmo Circular
DLS	do inglês “Dynamic Light Scattering”
DNA	do inglês, “deoxyribonucleic acid”
DO	densidade óptica
DPP	do inglês, “Dual Path Platform”
DSC	do inglês, “Differential Scanning Calorimetry”
DTT	Ditiotreitol
ECM	do inglês, “Extracellular Matrix”
EDTA	do inglês, “Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	do inglês, “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
EMEA	do inglês, “European Medicines Agency”
FDA	do inglês, “Food and Drug administration”
GF	Gel Filtração
h	hora
HEPES	do inglês “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”
HIC	do inglês “Hydrophobic interaction chromatography”
HPLC	do inglês, High performance liquid chromatography
HPV	do inglês, “Human Papiloma Virus
IEF	do inglês, “Isoelectric focusing”
IEX	do inglês, “Ion Exchange Chromatography”
IgM	imunoglobulina M
IgG	imunoglobulina G
IMAC	do inglês “Immobilized Metal Affinity Chromatography”
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	quilodalton

LAL	do inglês, “Limulus amebocyte assay”
LB	Luria-Bertani
LC-MS	do inglês, “Liquid Chromatography Mass Spectrometry”
Lig	do inglês, “Leptospiral ImmunoGlobulin-like”
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	do inglês, “MicroAgglutination Test”
mA	miliampere
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
OMP	do inglês, “Outer Membrane Protein”
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	do inglês, “Open Reading Frame”
PAGE	do inglês, “SDS Polyacrylamide gel electrophoresis”
PBS	do inglês, “Phosphate-Buffered Saline”
PCR	do inglês, “Polymerase Chain reaction”
pI	ponto isoelétrico
PTS	do inglês, “Portable Test System”
PVDF	do inglês, “Polyvinylidene fluoride”
Q FF	do inglês, “Q Sepharose Fast Flow”
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
SDS	do inglês, “Sodium Dodecyl Sulfate”
SEC	do inglês, “Size Exclusion Chromatography”
SP FF	do inglês, “Sepharose Fast Flow”
TB	do inglês, “Terrific Broth”
UE	Unidades de Endotoxina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USFDA	do inglês, “United States Food and Drug Administration”
USP	do inglês, “United States Pharmacopeia”
UV	ultravioleta

VLP do inglês, “vírus like particle”  
WFI do inglês, “water for injection”  
WHO do inglês, “World Health Organization”

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Revisão Bibliográfica

### 1.1.1 Vacinas

As vacinas são produtos biológicos com capacidade profilática capaz de proteger indivíduos contra determinadas doenças. Essas são constituídas por agentes patogênicos (vírus ou bactérias que causam doenças, fragmentos desses agentes) previamente atenuados, inativados ou por fragmentos desses agentes. As vacinas tem a função de estimular uma resposta imunológica no organismo hospedeiro, que passa a desenvolver proteção contra o patógeno através da produção de resposta imune efetora. A maioria das vacinas disponíveis comercialmente são atenuadas, inativadas (ou compostas de micro-organismos inativados) e de subunidade (fragmentos proteicos de agentes infecciosos). As vacinas atenuadas tendem a mimetizar uma infecção natural, visto que os agentes atenuados replicam-se no hospedeiro, induzindo resposta humoral e celular, as quais conferem proteção duradoura, geralmente com uma única dose vacinal. As vacinas atenuadas, disponíveis no mercado foram obtidas através da reversão da virulência através de passagens seriadas entretanto, os mecanismos de atenuação são pouco conhecidos e um risco associado com uma potencial reversão para um fenótipo virulento não pode ser descartado (Nascimento e Leite, 2012). Os organismos atenuados são muito eficazes como vacinas porque contêm os três principais elementos necessários para uma potente indução imune: (1) antígeno alvo para respostas de memória, (2) padrões moleculares associadas ao patógeno para estimulação da imunidade inata (isto é, efeitos adjuvantes) e (3) entrega eficiente resultante da invasividade natural do organismo (Ulmer et al., 2006). Como exemplo de vacinas atenuadas, temos: Febre Amarela, Sarampo, Catapora, Rubéola, Pólio oral e BCG. Contudo, atualmente algumas vacinas atenuadas em desenvolvimento já utilizam ferramentas genéticas para mutação e/ou deleção de regiões específicas relacionadas aos genes de virulência para o processo de obtenção da atenuação. Um exemplo que podemos destacar é uma vacina contra Zika que está sendo desenvolvida baseada em um vírus atenuado por manipulação genética (Shan et al., 2017).

As vacinas inativadas e de subunidade são mais seguras, entretanto são menos eficazes quanto a capacidade de induzir uma resposta protetora e de longa duração quando comparadas às vacinas atenuadas. Estas são capazes de induzir uma resposta robusta baseada em anticorpos, mas a resposta imune celular não é potente, sendo necessária a formulação com adjuvantes a fim de potencializá-la. Como exemplos de vacinas inativadas e de subunidade temos: Poliomielite Salk (injetável), Hepatite A, Coqueluche (célula inteira e acelular), Difteria e Tétano (Dellagostin et al., 2016).

#### 1.1.1.1 Vacinas recombinantes

As vacinas recombinantes podem ser de subunidade as quais são compostas por um ou vários antígenos que devem ser capazes de induzir imunidade contra o patógeno de interesse, ou as vetorizadas, que são antígenos vacinais expressos em vetores de expressão bacterianos ou virais (Nascimento e Leite, 2012). Os principais direcionadores para o desenvolvimento de proteínas de subunidade recombinantes é substituir as vacinas já existentes por vacinas menos reatogênicas, mais seguras e com antígenos caracterizados, proteção de maior espectro (múltiplos sorotipos, exemplo, *N. meningitidis B* – Bexsero) (Ulmer et al., 2006; Wang et al., 2016).

Um dos maiores desafios desta tecnologia consiste em desenvolver vacinas que promovam a resposta imune desejada, capaz de conferir imunidade contra patógenos e especialmente contra aqueles que estabelecem infecções crônicas e prolongadas. As vacinas recombinantes de subunidade induzem imunidade protetora sem o risco de efeitos colaterais ou reações causadas por outros microorganismos, e são conhecidas por induzir resposta imune do tipo T-helper 2, predominantemente, e uma resposta pouco potente ou ausente do tipo T-helper 1. Diferenças no tipo de imunidade produzida por vacinas recombinantes são observadas e podem ser influenciadas por diferenças nas formulações vacinais, rota de imunização, enovelamento correto e modificações pós-traducionais do antígeno (Wang et al., 2016; Dellagostin et al., 2016).

As vacinas recombinantes evitam algumas das maiores preocupações com relação as vacinas produzidas atualmente, tais como o risco de co-purificação de contaminantes indesejados e a reversão da toxidade nos casos das vacinas baseadas em toxóides, quando consideradas as vacinas para

difteria e tétano, por exemplo. Dentre as vacinas recombinantes atualmente licenciadas para uso humano estão: Hepatite B, HPV e Influenza (Flublok – Protein Science), *Neisseria meningitidis* B (Bexsero - GSK). A vacina contra Hepatite B (ENGERIX®-B), comercializada pela empresa Glaxo Smithkline, se baseia na expressão do antígeno de superfície B (HBsAg) em leveduras. O HBsAg se organiza em *virus-like particles* (VLPs), que são extremamente imunogênicas, tornando esta vacina altamente eficaz. A levedura secreta o HBsAg o que facilita a purificação e além disso tem a maquinaria celular eucariótica necessária para glicosilação do antígeno (Nascimento e Leite, 2012). Um exemplo mais recente de vacina recombinante desenvolvida para humanos é a vacina contra o HPV. No mercado brasileiro, existem duas vacinas disponíveis para HPV, desenvolvidas baseadas em VLPs derivadas dos subtipos HPV-6, -11, -16 e/ ou -18, são elas GARDASIL® produzida pela Merck e a CERVARIX®, produzida pela Glaxo Smithkline (somente subtipos 16 e 18). Estas vacinas usam proteínas recombinantes L1 de cada subtipo viral, produzidas em levedura e células de inseto, sendo a proteína L1 a principal proteína do capsídeo viral e sua expressão *in vitro* resulta na formação de VLPs (Nascimento e Leite, 2012).

Ao contrário da área humana, no mercado veterinário são encontradas diversas vacinas recombinantes disponíveis (tabela 1), mas devemos levar em consideração que o desenvolvimento de vacinas veterinárias oferece algumas vantagens, principalmente em relação a velocidade do licenciamento por questões regulatórias mais flexíveis quando comparamos com área de desenvolvimento de vacinas humanas, a qual deve atender um grande número de exigências regulatórias (por exemplo: segurança e eficácia). Outro fator importante que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de vacinas veterinárias para animais de produção é a viabilidade econômica, devido a curta expectativa de vida desses animais.

Tabela 1. Seleção de vacinas recombinantes veterinárias comerciais

Vacina	Espécie Animal	Patógeno	Tipo de Vacina	Fabricante
EURIFEL FeIV	Gatos	Vírus da Leucemia Felina	Vetorizada	Merial
PUREVAX Feline Rabies	Gatos	Vírus da Raiva	Vetorizada	Merial
Gavac	Gado	Carrapato de boi	Subunidade	Heber Biotec
TickGUARD	Gado	Carrapato de boi	Subunidade	Fort Dodge
RECOMBITEK rDistemper	Cães	Vírus da Cinomose Canina	Vetorizada	Merial
Leish-Tec	Cães	Leishmaniose visceral canina	Subunidade	Hertape
PUREVAX Ferret	Furões	Vírus da Cinomose Canina	Vetorizada	Merial
Distemper Apex-IHN	Peixes	Vírus da necrose hematopoética infecciosa	DNA	Novartis
ProteqFlu TE	Cavalos	Vírus influenza e toxina tetânica	Vetorizada	Merial
PROTEQ-FLU/RECOMBITEK	Cavalos	Vírus influenza	Vetorizada	Merial
RECOMBITEK Equine WNV	Cavalos	Vírus do oeste do Nilo	Vetorizada	Merial
West Nike-innovator DNA	Cavalos	Vírus do oeste do Nilo	DNA	Fort Dodge
Innovax RLT	Aves domésticas	Vírus da laringotraqueíte infecciosa	Vetorizada	Merck
Trovac-AHHS	Aves domésticas	Gripe aviária	Vetorizada	Merial
Vanoitek HVT + IBD	Aves domésticas	Vírus da Doença de Marek.	Vetorizada	Merial
Vectormune FND	Aves domésticas	Doença de Newcastle	Vetorizada	Biomune
Raboral	Guaxinins e Coiotes	Vírus da Raiva	Vetorizada	Merial
HIDATIL EG95	Cabras e ovelhas	Hidatidose ( <i>Echinococcus granulosus</i> )	Subunidade	Tecnovax
Bayovac CSF E2	suínos	Vírus da peste suína clássica	Vetorizada	Bayer
P. Cincument	suínos	Circovirose Suína	Subunidade	Intervet
PleuroStaer APP	suínos	Pleuropneumonia suína ( <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> )	Subunidade	Novartis
Poncilis APP	suínos	Pleuropneumonia suína ( <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> )	Subunidade	Intervet
Poncilis Pesti	suínos	Vírus da peste suína clássica	Vetorizada	Intervet
PRO-VAC Circomasser	suínos	Circovirose Suína	Subunidade	Vencofarma
Suvarym PCV2	suínos	Circovirose Suína	Vetorizada	Fort Dodge

Fonte: Dellagostin et al., 2016

Embora tenhamos várias vacinas veterinárias e biofármacos baseados em proteínas recombinantes (como por exemplo: Hormônio de crescimento humano (GH), Asparaginase, Interferon  $\alpha$  e Insulina) produzidos em *E. coli*, até o momento há somente uma vacina, que foi desenvolvida para Hepatite E (HEV 239) e licenciada para humanos utilizando esta plataforma de expressão (Li et al., 2015). Entretanto, existem várias iniciativas para desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças utilizando esta plataforma, como por exemplo: Leptospirose humana e veterinária, Malária, Chikungunya, Zika vírus, Dengue e Encefalite japonesa (Alves et al., 2016; Khan et al., 2012; Mathias et al., 2012; Salavatifar et al., 2015; Yang et al., 2017).

### 1.1.2 Leptospirose

A leptospirose é uma doença causada por bactérias espiroquetas, que apresentam diâmetro aproximado de 0,1  $\mu\text{m}$  e comprimento variando de 6 a 20  $\mu\text{m}$  (Cameron 2015; Evangelista e Coburn, 2010; Fraga et al., 2011; Ko et al., 2009). O envelope celular é característico de bactérias Gram-negativas, com presença de membrana externa, espaço periplasmático e lipopolissacarídeo (LPS), e também de bactérias gram-positivas, com a associação de uma espessa camada de peptidoglicano à membrana interna da bactéria. Assim como outras espiroquetas, as leptospirosas possuem dois endoflagelos ancorados no espaço periplasmático, que são responsáveis por sua intensa motilidade (Bharti et al., 2003; Cameron, 2015; Fraga et al., 2011). A sua forma característica de gancho ou ponto de interrogação a difere das demais espiroquetas (Cameron 2015; Evangelista e Coburn, 2010; Fraga et al., 2011; Ko et al., 2009).

Leptospirosas pertencem ao gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010). A atual classificação das espécies é baseada na relação genética e indica a existência de 22 espécies diferentes, dentre estas 15 são patogênicas e intermediárias e 7 espécies não infecciosas ou saprofitas. As espécies são, ainda, categorizadas em mais de 300 sorovares de acordo com a presença ou ausência de aglutinação frente aos soros heterólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são classificados em sorogrupos (Evangelista e Coburn, 2010; Ko et al., 2009; Levett, 2015). A classificação sorológica das espécies leva em consideração a heterogeneidade estrutural do LPS. As diferenças estruturais no carboidrato A do LPS determinam a diversidade antigênica entre os inúmeros sorovares. Tal classificação não apresenta relação

taxonômica, de modo que um sorovar pode estar relacionado a diferentes espécies. No entanto, a classificação sorológica é extremamente útil no diagnóstico laboratorial inicial da leptospirose e em estudos epidemiológicos (Evangelista e Coburn, 2010; Fraga et al., 2011; Levett, 2015). Entre as espécies patogênicas que constituem os principais agentes da leptospirose humana e animal, estão: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* and *L. alexanderi* (Evangelista e Coburn, 2010). A espécie empregada no presente estudo foi *L. interrogans* sorovar Copenhageni, pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e é o principal agente causador da leptospirose urbana no Brasil (Faria et al., 2008; Ko et al., 1999; Oliveira et al., 2017).

A infecção por Leptospiras em humanos ocorre a partir de contato direto com a urina de animais infectados ou indiretamente com água, comida e solo contaminados (Ko et al., 1999; Palaniappan et al., 2004). O contato indireto é importante para trabalhadores com atividades em redes de esgotos, mineradores, limpadores de caixas-d'água e praticantes de esportes aquáticos, por exemplo. A infecção por contato direto se destaca como responsável pela maior parte dos casos de doença em fazendeiros, veterinários, trabalhadores de controle de roedores, entre outros. (Haake e Levett, 2015; WHO, 2010). Os seres humanos, por sua vez, são considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo sinais e sintomas de leptospirose aguda e, algumas vezes, formas fatais da doença (Fraga et al., 2011). A eliminação da bactéria na urina de humanos infectados é transiente, de modo que a transmissão homem-homem da doença é extremamente rara.

Os ratos são considerados o principal reservatório no ciclo de transmissão da leptospirose humana, excretando grandes quantidades da bactéria até meses após a infecção inicial (Palaniappan et al., 2007). Neles, as leptospiras podem causar infecção sistêmica, mas são, em seguida, eliminadas de todos os órgãos, com exceção dos túbulos renais, que são um sítio imunoprivilegiado, característica essa que contribui para o alto grau de persistência do patógeno (Ko et al., 2009). A leptospirose atinge um grande número de espécies animais, principalmente cães, gado bovino, porcos, e cavalos, representando um grande impacto econômico, uma vez que pode provocar abortos, infertilidade, dificuldade de desenvolvimento dos animais, diminuição da produção de leite e morte dos animais (Fernandes et al., 2016).

### 1.1.2.1 Aspectos epidemiológicos

As manifestações clínicas da leptospirose em humanos variam desde uma doença febril aguda autolimitada à doença de Weil, forma grave clássica da leptospirose. A apresentação clínica da leptospirose costuma ser bifásica, com uma fase aguda septicêmica, que dura aproximadamente uma semana, seguida de uma fase imune, que é caracterizada pela produção de anticorpos, excreção da bactéria pela urina e desaparecimento dos sintomas (Fraga et al., 2011; Picardeau, 2013). Os sintomas incluem dor de cabeça, calafrios, náusea e vômitos, mialgia e, menos comumente, exantema (“rash” cutâneo). Estes sinais e sintomas são inespecíficos, sendo típicos também de outras doenças febris agudas como dengue, gripe e malária. A Síndrome de Weil é caracterizada por complicações sistêmicas, com disfunção simultânea de múltiplos órgãos como fígado, rins, pulmão e cérebro, levando à icterícia, meningite, hemorragias, falência hepática e renal e colapso cardiovascular (Evangelista e Coburn 2010; Haake e Levett 2015). A Síndrome Pulmonar Hemorrágica (SPH) vem sendo descrita como complicação grave da leptospirose e importante causa de febre hemorrágica em várias regiões do mundo (Gouveia et al., 2008; Helmerhorst et al., 2012; Marotto et al., 1999; Trevejo et al., 1998). As complicações relacionadas a SPH estão, em sua maioria, associadas à localização da bactéria nos tecidos durante a fase imune, ocorrendo, geralmente, durante a segunda semana da infecção.

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas pelo mundo de acordo com a Organização mundial de Saúde (Palaniappan et al., 2004; Adler, 2015). Aproximadamente 1 milhão de casos são notificados anualmente, destes 58.900 vão a óbito (Costa et al., 2015). De acordo com o Ministério da Saúde, foram notificados 42.981 casos de leptospirose no Brasil entre os anos de 2006 e 2016, sendo que 3.762 destes foram a óbito (Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>). A recente globalização e desigualdade social contribuíram enormemente para o avanço da leptospirose. Dessa forma, é uma importante causa de doença em favelas onde atualmente 1 bilhão de pessoas residem (Nations 2003), marginalizadas da sociedade e sem acesso a serviços básicos de saúde e saneamento, o que propicia a transmissão da leptospirose a partir dos ratos. As principais medidas para minimizar o impacto das doenças infecciosas emergentes são maior acesso à informação sobre a doença, a existência de um teste diagnóstico adequado, tratamento eficaz e

principalmente de prevenção. Dessa forma, a descoberta de alvos e sua aplicação a fim de que possam ser utilizados no desenvolvimento de vacinas e diagnóstico são medidas urgentes para reduzir a morbidade e mortalidade em humanos e o impacto econômico em animais devido a Leptospirose.

#### 1.1.2.2 Diagnóstico da Leptospirose

Devido à grande diversidade de sinais clínicos, o diagnóstico da leptospirose é difícil e depende de uma variedade de testes laboratoriais para a confirmação da doença (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010). Estes testes, na grande maioria das vezes são bastante laboriosos e o resultado é demorado prejudicando o início do tratamento da doença uma vez que a terapia antimicrobiana é bastante eficaz quando a doença é identificada no início, prevenindo sua progressão e a alta mortalidade (McClain et al., 1984).

O teste diagnóstico mais difundido e amplamente utilizado é o Teste de Microaglutinação *in vitro* (MAT, do inglês “Microagglutination test”), sendo considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose (Haake e Levett, 2015; Palaniappan et al., 2007; Picardeau, 2013). O MAT consiste na incubação do soro do paciente com um painel de suspensões de leptospiras vivas de diferentes sorovares (Palaniappan et al., 2007; Picardeau, 2013). A reação antígeno-anticorpo é avaliada ao microscópio óptico quanto à presença de aglutinação e os títulos dos anticorpos aglutinantes são determinados através de diluições seriadas da amostra de soro (WHO, 2002). O MAT tem a vantagem de ser altamente específico para os sorovares e, por esse motivo, o espectro de antígenos deve incluir sorovares representativos de todos os sorogrupos, além de todos os sorovares circulantes localmente (Haake e Levett, 2015; Turner, 1968). Entre as desvantagens deste método estão: técnicos bem treinados e baixa sensibilidade nas amostras de fase aguda o que faz com que haja a necessidade de se utilizar amostras pareadas de soro agudo e convalescente para que o resultado seja confirmatório nos casos em que os pacientes não vão à óbito. Além disso, quando existe a necessidade de uso de um painel com grande número de sorovares de leptospirose, o crescimento lento do micro-organismo pode retardar ainda mais o diagnóstico (Bharti et al., 2003; WHO, 2010; Picardeau, 2013; Turner, 1968).

Uma grande quantidade de protocolos de PCR (do inglês, “Polimerase Chain Reaction”) convencional e PCR em tempo real foram desenvolvidos para detecção do micro-organismo a partir de amostras clínicas, com limite de detecção usualmente entre 10 a 100 bactérias por mililitro de sangue ou urina (Picardeau, 2013). Um resultado positivo indica a presença do agente infeccioso na amostra e, no caso da técnica quantitativa, indica, ainda, a carga bacteriana do paciente. Entretanto, uma importante limitação dessas técnicas é a incapacidade de identificar o sorovar infectante que, apesar de não ser relevante para o diagnóstico em si, é importante para estudos epidemiológicos (Haake e Levett, 2015; Picardeau, 2013). Além disso, tal abordagem permanece restrita a laboratórios de referência, sendo improvável seu emprego em larga escala nos países em desenvolvimento, apesar da alta sensibilidade e capacidade de fornecer um diagnóstico preciso (Picardeau, 2013).

O isolamento de leptospiros de amostras clínicas como tecidos e sangue é considerada o diagnóstico definitivo, entretanto este é dificultado pela velocidade de crescimento das leptospiros, o longo período de incubação até que a cultura se estabeleça, baixa sensibilidade e alto custo em termo de recursos humanos e laboratoriais (Lessa-Aquino et al., 2013).

Devido à complexidade do MAT, outros testes sorológicos para detecção de anticorpos na fase inicial da doença foram desenvolvidos, como ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA (do inglês, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) e testes rápidos. Anticorpos IgM anti-leptospira podem ser detectados 4 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas – antes da detecção de IgG e de anticorpos aglutinantes – e persistem por pelo menos 5 meses nos pacientes (Picardeau, 2013). Inúmeros testes ELISAs para detecção de IgM estão disponíveis no mercado e baseiam-se na detecção de anticorpos contra o extrato total da bactéria. Entretanto, o fundo de reatividade desses testes pode ser alto uma vez que a cepa saprofítica *L. biflexa* compartilha muitos antígenos de superfície com cepas patogênicas (Haake e Levett, 2015). Os antígenos recombinantes também são comumente empregados para o desenvolvimento de ensaios de ELISA, embora não haja, até o presente momento, uma avaliação em larga escala de testes baseados em proteínas recombinantes (Haake e Levett, 2015; Signorini et al., 2013). A especificidade da detecção de anticorpos IgM por ELISA é dependente do antígeno empregado, da presença de anticorpos gerados em infecções prévias e da presença de doenças concomitantes (Bajani et al., 2003; Haake e Levett 2015). Srimanote e colaboradores (2008) avaliaram a potencial utilização da porção C-terminal da proteína LigA (resíduos 707-

1217) como antígeno em um ensaio de ELISA indireto. A especificidade do ELISA nas avaliações utilizando anticorpos IgG foi de 100 % enquanto que para anticorpos IgM foi de 98%, demonstrando que este fragmento pode ser utilizado para detectar anticorpos de indivíduos com suspeita de leptospirose durante a fase aguda da doença, momento em que os resultados de cultura e MAT ainda não estão disponíveis. Kitashoji e colaboradores (2015) também demonstraram a potencial utilização da porção C-terminal de LigA (708–1224 aminoácidos) em ELISA – IgM, que apresentou uma sensibilidade de 69,5%, maior do que o ELISA baseado em célula total e uma especificidade de 98%, mostrando que pode ser uma ferramenta para diagnóstico na fase inicial da doença.

Entre os modelos em formato de teste rápido estão as fitas indicadoras (“dipstick”) (Levett e Branch 2002; Smits et al., 2001b), aglutinação em látex (Smits et al., 2001a; Smits et al., 2000) e testes de fluxo lateral, mais conhecido como *Dual Path Platform* (DPP) (Nabity et al., 2012; Smits et al., 2001b). Este último pode ser executado nas unidades básicas de saúde com apenas uma gota de sangue, com resultado disponível em 10 minutos. Consiste na migração do complexo antígeno-anticorpo por capilaridade em membranas cobertas com extrato total da bactéria ou proteínas recombinantes, com a captura do anticorpo através de proteína A e/ou anti-IgM conjugada a ouro coloidal e visualização colorimétrica (Nabity et al., 2012; Picardeau, 2013). Tais testes, em geral, apresentam desempenho característico de outros ensaios, sendo pouco sensíveis na fase inicial da doença, de modo que a confirmação do resultado por um teste de referência é recomendada (Goris et al., 2013; Haake e Levett 2015). Em 2012, o nosso grupo desenvolveu um teste rápido baseado nas proteínas Ligs utilizando o formato de fluxo lateral – DPP e demonstraram a sua eficiência (Nabity et al., 2012). Os resultados demonstraram alta especificidade ( $\geq 93\%$ ) quando utilizados soros de pacientes com dengue, hepatite A, sífilis e indivíduos saudáveis de área endêmica, e sensibilidade na faixa de 85 % na fase aguda da doença.

### 1.1.3 Vacinas para Leptospirose

Vacinas contra leptospirose para humanos e animais têm sido usadas desde 1920 e praticamente todas foram desenvolvidas a partir de leptospiras mortas por diferentes métodos: calor, formalina, fenol, etc. (Adler e de la Peña Moctezuma 2010). O uso

destas formulações não foi bem-sucedido devido a reatogenicidade, mas ainda assim, vacinas humanas a partir de células mortas foram utilizadas na China após episódios de enchentes, para populações de risco.

O desenvolvimento de vacinas efetivas contra a leptospirose, com ampla proteção e poucos efeitos colaterais é um requisito básico para qualquer nova vacina humana, assim como para uma vacina de uso animal (Dellagostin et al., 2016). Devido ao menor número de restrições das autoridades regulatórias, uma nova vacina provavelmente será aprovada para uso em animais muito antes de uma vacina humana. As vacinas veterinárias comercialmente disponíveis são amplamente utilizadas em bovinos, porcos e cães (Adler, 2015), estas são baseadas em bacterinas, compostas de suspensões de sorovares diferentes, formuladas de acordo com as necessidades epidemiológicas. A preparação vacinal deve incluir sempre sorovares do local devido à natureza sorovar específica das bacterinas. As formulações para vacinas caninas geralmente incluem o sorogrupo *Canicola*, o agente mais importante da leptospirose canina em todo o mundo em combinação com o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Contudo, outros sorovares como *Pomona*, *Grippotyphosa* e *Bratislava* vem se destacando em casos de leptospirose canina na América do Norte. Os animais de produção, como bovinos e suínos são geralmente vacinados com formulações contendo os sorogrupos *Hardjo*, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae* para diminuir as chances de infecção humana por contato com esses animais. Embora as vacinas comerciais atuais possam reduzir os sintomas, a colonização renal e leptospiúria ainda persiste em animais imunizados. Contudo, a vacinação tem um papel importante na redução do número de abortos e natimortos no rebanho, o principal impacto econômico da leptospirose em rebanhos reprodutores (Dellagostin et al., 2011).

Atualmente, existem duas vacinas disponíveis para humanos. A vacina disponível mundialmente é a SPIROLEPT<sup>®</sup>, que é produzida pela empresa Sanofi-Pasteur. É uma vacina que tem na sua composição *Leptospira icterohaemorrhagiae* em sua forma inativada, é administrada por via subcutânea em duas doses e requer vacinação a cada dois anos. A vacina vax-SPIRAL<sup>®</sup> vem sendo utilizada em Cuba desde 1997 na população de risco e oferece proteção contra os sorogrupos *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Ballum*. Esta vacina possui uma eficácia de 78% e a revacinação é feita após 1 ano (Naranjo et al., 2008; Verma et al., 2013). Devido a estas questões, de baixa cobertura e reatogenicidade, esforços vem sendo

empregados no sentido de desenvolver uma vacina que ofereça proteção cruzada contra os diferentes sorovares, imunidade duradoura e baixa reatogenicidade. A expectativa é que uma vacina recombinante consiga atender a estes aspectos abordados.

Diferentes antígenos de *Leptospira* foram testados como candidatos para uma vacina de subunidade, dentre eles: Lipl41, OmpL1, Lpl32, Loa22 e outras lipoproteínas e ORFs. A lipoproteína Lipl41 e a porina OmpL1 foram clonadas e expressas em *E. coli*, e demonstrada a sua eficácia quanto a capacidade de induzir proteção em modelo experimental em hamsters, essas foram capazes de induzir resposta imune protetora significativa com uma taxa de sobrevivência de 71% (Haake et al., 1999). A proteína Lpl32 também foi produzida em *E. coli*, e quando formulada com adjuvante de Freund falhou nos desafios de proteção em hamsters, entretanto quando o gene *lpl32* foi usado na abordagem de vacina de DNA em modelo com gerbils, 60% dos animais sobreviveram em contraste com o grupo controle com percentual de sobrevivência de 35%. O gene *lpl32* foi explorado como candidato em outros sistemas, e dentre os avaliados estava a expressão em uma vacina viva, *Mycobacterium bovis* – BCG, que foi capaz de induzir uma resposta imune protetora em hamsters de 56% contra 12% observado no grupo controle, cabe ressaltar que esta construção foi capaz de induzir imunidade estéril nos animais sobreviventes (Dellagostin et al., 2011). Chang e colaboradores (2007) avaliaram o desempenho de 12 OMPs para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Estas foram clonadas, expressas, purificadas e formuladas com adjuvante Hidróxido de Alumínio para ensaios de desafio em hamsters contra *L. interrogans Pomona* e três dessas apresentaram resposta imune protetora entre 71 e 100%, entretanto no grupo controle 43% dos animais sobreviveram (Chang et al., 2007). Em 2013, Murray e colaboradores testaram uma abordagem baseada em vacinologia reversa, a fim de avaliar proteínas de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo usando modelo de infecção em hamster. Neste estudo foram selecionadas 262 proteínas entre OMPs e secretadas, e destas 238 foram expressas e purificadas. Foram montados *pools* com essas proteínas, que foram formuladas com o adjuvante Hidróxido de Alumínio e testadas quanto a proteção, entretanto nenhum dos grupos foram capazes de proteger contra infecção, apenas gerando uma resposta de anticorpos para a maioria das proteínas testadas (Murray et al., 2013).

Outra abordagem que vem sendo testada é a produção de proteínas quiméricas, um exemplo foi o trabalho de Lin e colaboradores (2016), no qual a

proteína continha epítomos imunodominantes das proteínas OmpL1, LipL32 e LipL21. A proteína quimérica foi clonada, expressa em *E. coli*, purificada e formulada com Hidróxido de Alumínio. O ensaio de proteção demonstrou que a proteína quimérica foi capaz de proteger 80% dos cobaios desafiados com *L. interrogans* Lai. No estudo de Fernandes e colaboradores (2017), a proteína quimérica foi desenhada baseada nas sequências de LigA, Mce, Lsa45, OmpL1 e LipL41, expressa em *E. coli* e purificada. Foi demonstrado que a proteína é reconhecida por soro de pacientes com leptospirose entretanto quando formulada com Hidróxido de Alumínio e MPLA (do inglês: *Monophosphoryl lipid A*), foi capaz de proteger somente 50% dos hamsters em desafio letal com leptospiras vivas (Fernandes et al., 2017).

#### 1.1.3.1 Vacinas recombinantes baseadas em Ligs

Em 2001, Fiocruz e colaboradores identificaram uma nova família de fatores putativos de virulência: as proteínas LigA, B e C (*Leptospiral immunoglobulin-like*), e os resultados preliminares demonstraram evidências de que tais proteínas seriam candidatas potenciais para o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico e vacina (Ko et al., 2002). Dados publicados indicam seu potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, pois são proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiras patogênicas e a expressão destas proteínas ocorre somente durante a infecção (Matsunaga et al., 2003). Outra indicação do potencial das Ligs como candidata vacinal é o fato de que os polipeptídeos de LigA e LigB derivados de preparações de antígeno recombinante ou nativo, são imunogênicos. Os anticorpos obtidos a partir de animais experimentais imunizados com polipeptídeos recombinantes purificados de LigA e LigB reconhecem o antígeno nativo de *Leptospira spp.*, e são úteis para detectar espiroquetas patogênicas em amostras obtidas de indivíduos com suspeita de infecção (Medeiros et al., 2005). As proteínas Ligs mostraram seu potencial como candidatas a diagnóstico quando foi demonstrado seu reconhecimento por soros de indivíduos infectados com Leptospiras patogênicas. Estes ensaios demonstraram sensibilidade de 98% e especificidade de 90% para IgM, e 93% de sensibilidade para IgG e especificidade de 80% para IgG. Apesar da amostragem testada ser pequena (80 indivíduos), os dados se mostraram bastante promissores (Medeiros et al., 2005).

As proteínas Ligs pertencem a superfamília de Bigs (do inglês: *bacterial immunoglobulin-like*), e possuem em sua sequência repetições de domínios de

imunoglobulinas como a intimina de *Escherichia coli* e a invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*, que são conhecidas por mediarem a adesão e invasão às células de hospedeiros. Esta família foi identificada em 2003, por Matsunaga e colaboradores, por meio de um *screening* realizado a partir de uma biblioteca genômica de *L. interrogans* e *L. kirschneri* utilizando soros de pacientes com leptospirose (Matsunaga et al., 2003). A proteína LigA já havia sido identificada previamente por Palaniappan e colaboradores em 2002, utilizando uma biblioteca genômica de *L. interrogans* sorovar *Pomona kenewicki* com o soro de uma égua que abortou por infecção por leptospirose (Palaniappan et al., 2002).

A família de Ligs (Leptospiral immunoglobulin-like) é composta por três proteínas denominadas: LigA, LigB e LigC. Os genes *ligA* (3.675 pb) e *ligB* (5.673 pb) codificam para polipeptídeos de 128 e 212 kDa, respectivamente. O gene *ligC* (5.871 pb) é um pseudogene nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, cuja fase de leitura aberta é interrompida no códon 499 (Matsunaga et al., 2003), sugerindo que LigC não seja essencial para virulência e patogenicidade das cepas (McBride et al., 2009; Adler, 2015). A porção N-terminal das proteínas LigA e LigB é idêntica, sendo denominada LigBrep. A partir do domínio 7, as sequências se diferenciam sendo que LigA possui um total de 13 domínios, enquanto que LigB possui 12 domínios e uma porção C-terminal, como pode ser visualizado na figura 1 (Silva et al., 2007).

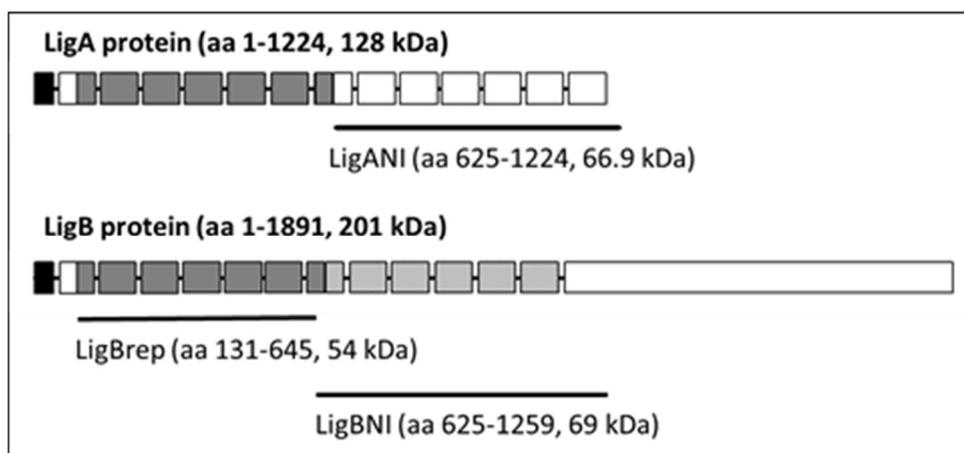


Figura 1. **Representação esquemática das proteínas LigA e LigB e seus respectivos fragmentos.**

As caixas representam os domínios repetitivos, sendo as caixas em cinza representando a região idêntica entre as duas proteínas e as caixas hachuradas representando a região não idêntica. (Fonte: Silva et al., 2007).

Na organização do genoma das Leptospiras, os genes que codificam para Ligs são encontrados em sequência, sendo *ligA* localizado anteriormente a *ligB*, e em

seguida *ligC*. McBride e colaboradores (2009) avaliaram a presença de Ligs em 10 espécies patogênicas, onde *ligB* foi encontrado em todas e *ligA* em cinco destas espécies, sendo elas: *L. interrogans Copenhageni*, *L. interrogans Canicola*, *L. interrogans Pomona* (2 cepas: Cornell e PO-06-47), e *L. kirshneri*. Quando analisadas comparativamente, demonstraram ser bastante conservados, sendo 85,4 a 99,8% de identidade quanto a sequência nucleotídica e 80,5 a 99,8% quanto a sequência de aminoácidos. A região que compreende os domínios de 11 a 13 de LigA mostrou o maior grau de variabilidade com 78,1% e 71,2% de identidade entre nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Ainda, de acordo com este estudo, foi observado que as sequências de *ligA* de *L. interrogans Canicola* e *L. interrogans Pomona* apresentaram 100% de identidade, e estas quando comparadas a *L. interrogans Copenhageni* e *L. kirshneri* apresentaram uma não identidade de 33% (McBride et al., 2009).

Estudos correlacionam o possível envolvimento desses genes na patogenicidade dessas bactérias. Estudos de Matsunaga e colaboradores em 2005, demonstraram que a diferença de osmolaridade causa um aumento na expressão de Ligs, sugerindo que este pode ser um sinal para o início da expressão de genes associados com virulência necessários nos estágios iniciais da infecção em mamíferos (Matsunaga et al., 2005). Esses dados geram uma hipótese de que essas proteínas podem estar envolvidas com interações do tipo bactéria-hospedeiro. Várias evidências dão suporte a esta hipótese, como o fato de que pacientes com leptospirose têm uma forte resposta de anticorpos aos domínios de repetição das Ligs. As proteínas Ligs são expressas na superfície da bactéria, o que foi confirmado a através de microscopia imunoeletrônica, sendo que LigA é secretada para o meio durante o crescimento das leptospiros (Matsunaga et al., 2003). O aumento da expressão de LigA e LigB pela indução osmótica resultou em *L. interrogans* com maior capacidade de adesão a diversas proteínas da matriz extracelular (Adler, 2015).

As proteínas Ligs são componentes da superfície da Leptospira e possuem a capacidade de se ligar as proteínas de matriz extracelular (do inglês: *extracellular matrix* - ECM), tais como: fibronectina, laminina, elastina e tropoelastina, e colágeno tipos I, III e IV. Desta forma, parecem ter associação com a ligação da bactéria ao tecido do hospedeiro e conseqüentemente envolvimento na colonização (Evangelista et al., 2017). Além de se ligar às proteínas de matriz extracelular, são capazes de se ligar ao plasminogênio. Leptospiros ligadas ao plasminogênio são capazes de clivar fibrinogênio e as proteínas do sistema complemento C3b e C5. Dessa forma, pode ser

atribuído um novo mecanismo de invasão das leptospiras, favorecendo sua sobrevivência no tecido hospedeiro. Outra característica das proteínas Ligs é sua capacidade de ligação a proteínas regulatórias do sistema complemento: fator H e proteína de ligação ao C4 (do inglês: *C4-binding protein* ou C4BP) e às proteínas do sistema complemento C3b e C4b podendo exercer um papel potencializador de dano aos tecidos através da sua ligação ao fibrinogênio e componentes de matriz associados com cicatrização tecidual. Evidências relacionam que a proteína LigB poderia estar envolvida na inibição da via alternativa de ativação do sistema complemento (Castiblanco-Valencia et al., 2016; Forster et al., 2013; Adler, 2015).

Em 2004, Koizumi e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos C3H/HeJ deficientes em receptores Toll do tipo 4, com a proteína LigA derivada de *L. interrogans* sorovar Manilae ficaram protegidos contra o desafio letal (Koizumi e Watanabe, 2004). No entanto, camundongos são menos susceptíveis a infecção por Leptospiras, sendo hamsters ou cobaias, os modelos experimentais aceitos para leptospirose. O nosso grupo inicialmente demonstrou que um único fragmento, LigANI, que corresponde aos seis domínios carboxi-terminais da molécula LigA, é capaz de conferir imunoproteção contra mortalidade (67-100%,  $P > 0.05$ ) em hamsters que receberam dose letal da cepa Fiocruz L1-130. Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a imunização com a região repetitiva de LigA e LigB conferiram 90-100% de proteção contra desafio letal por via intramuscular e subcutânea com 20 µg de proteína formulada com o adjuvante Hidróxido de Alumínio (Conrad et al., 2017). Vários estudos publicados por outros grupos comprovaram a capacidade do antígeno em formulações vacinais experimentais de subunidade ou vacinas de DNA protegerem contra desafio em modelos de roedores contra a infecção por desafio homólogo (Forster et al., 2013). Hartwig e colaboradores, em 2014, expressaram a proteína LigANI em *Pichia pastoris*, que foi formulada com adjuvante Hidróxido de Alumínio e também capaz de conferir proteção contra desafio letal em hamsters (Hartwig et al., 2014). Oliveira e colaboradores (2016) avaliaram a resposta imune humoral e proteção mediada pela proteína LigANI formulada com nanotubos de Carbono e oligodeoxinucleotídeos CpG, e apesar do aumento no título de anticorpos do tipo IgG observado com a formulação de LigANI com nanotubos de Carbono, os níveis de proteção para ambas as formulações foi de apenas 17% (Oliveira et al., 2016). Bacelo e colaboradores (2014) avaliaram LigANI formulada com xantana sendo demonstrado 100% de proteção utilizando esta formulação, entretanto

apesar de conferir proteção não foi capaz de induzir imunidade esterilizante nos animais testados (Bacelo et al., 2014).

#### 1.1.4 Proteínas

As proteínas são formadas por aminoácidos que podem se organizar em uma grande variedade de sequências, tamanhos e estruturas tridimensionais, que refletem seus diversos papéis em quase todas as funções celulares. Cada proteína tem uma estrutura particular necessária para se ligar com um alto grau de especificidade a uma ou algumas moléculas para desempenhar sua função; assim, a função está diretamente correlacionada com a estrutura da proteína. As proteínas formam cerca de 50% do peso seco das células e são as mais abundantes macromoléculas dentro da célula e das membranas celulares (Alberts et al., 2002).

Existem basicamente quatro níveis de organização na estrutura de uma proteína, a sequência de aminoácidos é conhecida como a estrutura primária, sendo a estrutura secundária da proteína constituída por interações não covalentes entre aminoácidos através da cadeia. Existem apenas duas ligações que podem girar no espaço entre cada aminoácido na coluna vertebral da sequência primária. Esses movimentos restritos, quando repetidos através de vários aminoácidos em uma cadeia, produzem os dois principais tipos de estrutura protéica secundária: a alfa hélice ( $\alpha$ ) e a cadeia beta ( $\beta$ ). A hélice  $\alpha$  tem a forma de uma escada em espiral, sendo estabilizada por pontes de Hidrogênio formadas entre o Oxigênio de um grupo Carbonila de uma ligação peptídica e o Hidrogênio de um grupo amina de outra ligação a partir do quarto aminoácido, já a conformação da folha  $\beta$  consiste de fios dispostos lado a lado. O Oxigênio da Carbonila de uma das cadeias se liga ao Hidrogênio da Amina da cadeia adjacente. Os fios podem ser paralelos ou anti-paralelos dependendo das direções da linha se são iguais ou opostas. A folha anti-paralela é mais estável devido ao alinhamento das ligações de hidrogênio enquanto que na folha  $\beta$  os aminoácidos formam uma estrutura linear bastante rígida, mantida por ligações de Hidrogênio que conectam às ligações peptídicas nas cadeias vizinhas. A estrutura terciária é a organização tridimensional de uma cadeia polipeptídica formada pela combinação das estruturas secundárias, sendo subdividida em certas porções formando motivos ou domínios. Por exemplo, em imunoglobulinas duas folhas  $\beta$  formam um domínio de estrutura tipo “barril” que é observado repetitivamente. A

estrutura quaternária é formada pela combinação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (Alberts et al., 2002; Houde e Berkowitz, 2015).

As interações que mantêm a estrutura terciária de uma proteína geralmente são fracas e por isso as proteínas são muito sensíveis. O estado nativo de uma proteína pode ser desestabilizado devido a um grande número de fatores externos, tais como: pH, temperatura, remoção de água, presença de superfícies hidrofóbicas, íons metálicos e alto cisalhamento. A perda da estrutura por qualquer um desses fatores é chamado de desnaturação, que resulta em um enovelamento aleatório ou incorreto. Uma proteína desnaturada pode ter um perfil de atividade diferente do observado na proteína nativa, geralmente ocorrendo uma perda de função. Além da desnaturação, a proteína pode formar agregados, que podem ser formados durante o processo de produção e são indesejáveis uma vez que podem causar resposta imune adversa quando administrados (Cromwell et al., 2006). As degradações químicas como oxidação, deamidação e hidrólise também podem ocorrer e os processos utilizados em formulações que utilizam proteínas, seja congelamento a baixas temperaturas ou liofilização, devem ser avaliados a fim de evitar degradação e aumentar a estabilidade do biofármaco ou componente vacinal durante o armazenamento e transporte. Dessa forma, a caracterização da proteína de interesse é necessária em cada estágio da sua produção, a fim de garantir uniformidade lote a lote e qualidade geral (Ratanji et al., 2014).

A desnaturação e formação de agregados devem ser evitados durante todo o processo para obtenção de uma proteína estável visando a sua aplicação industrial, seja como vacina ou biofármaco. Uma das estratégias para inibir a agregação e aumentar a eficácia e segurança da formulação final é a adição de estabilizantes, que agem ajudando a reestabelecer o equilíbrio entre o estado nativo da proteína e sua forma desnaturada, preferencialmente aumentando a estabilidade do estado nativo. Alguns dos estabilizantes utilizados são: açúcares como glicose, sacarose e trehalose; polióis como glicerol, sorbitol e manitol; e aminoácidos tais como: arginina, glicina e sarcosina (Patel et al., 2017). Outra metodologia utilizada a fim de estabilizar a proteína de interesse é a liofilização. Este processo envolve a dissolução de uma formulação de fármaco em matriz aquosa, que é então congelada, e a fase aquosa é removida por sublimação. Este método é amplamente utilizado na indústria biofarmacêutica para aumentar a vida útil e aumentar a estabilidade do produto (Ratanji et al., 2014; Particle sciences, 2009).

A complexidade de uma estrutura proteica torna sua elucidação completa uma tarefa extremamente difícil mesmo com o equipamento analítico mais avançado. Um analisador de aminoácidos pode ser usado para determinar quais os aminoácidos presentes e as proporções molares de cada um. A sequência da proteína pode também ser analisada por meio do mapeamento de peptídeos e o uso de degradação de Edman ou espectroscopia de massa. Este processo é rotineiro para peptídeos e proteínas pequenas, mas torna-se mais complexo para proteínas maiores (Nehete et al., 2013).

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é um método amplamente utilizado para caracterizar a estrutura secundária de uma proteína. Cada um dos diferentes tipos de estrutura secundária:  $\alpha$ -hélice, cadeia  $\beta$  e estrutura randômica (do inglês: *random coil*), todos possuem espectros de dicroísmo circular característicos na região do espectro distante (190-250 nm). Análises mais complexas e de alta resolução da estrutura tridimensional de uma proteína podem ser realizadas por meio de cristalografia de raios X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Para determinar a estrutura tridimensional de uma proteína por difração de raios X, é necessário um único cristal bem ordenado. A difração de raios X permite a medição das curtas distâncias entre átomos e produz um mapa de densidade eletrônica tridimensional, que pode ser usado para construir um modelo para a proteína de interesse. A utilização da RMN para determinar a estrutura tridimensional de uma proteína tem algumas vantagens em relação à difração de raios X, na medida em que pode ser realizada em solução e, portanto, não está condicionada a formação de cristais (Particle Sciences, 2009).

Muitas técnicas diferentes podem ser utilizadas para determinação da estabilidade de uma proteína. Para a verificação da sua conformação, podem ser utilizados métodos espectroscópicos como fluorescência, UV, infravermelho e DC. Os métodos termodinâmicos, como a calorimetria de varrimento diferencial (do inglês: *differential scanning calorimetry* - DSC), podem ser úteis para determinar o efeito da temperatura na estabilidade da proteína. O mapeamento comparativo de peptídeos (geralmente usando LC-MS) é uma ferramenta extremamente valiosa na determinação de mudanças químicas em uma proteína, como oxidação ou desamidação. A HPLC é uma ferramenta essencial na purificação preparativa e analítica de proteínas, o SDS-PAGE e a focalização isoelétrica além de serem utilizados para determinar a identidade e homogeneidade da proteína, também podem ser usados para avaliar a sua estabilidade (Particle sciences, 2009).

O isolamento e obtenção de proteínas de interesse a partir de células procarióticas e/ou eucarióticas alvo não é simples, uma vez que existe uma dificuldade em obter essas proteínas em quantidades e pureza para caracterização e aplicação bioterapêutica. Determinadas metodologias utilizam grandes quantidades de proteína, e o campo da tecnologia recombinante resolveu em parte essa necessidade e atualmente muitas sequências gênicas e proteínas são incorporadas às bases de dados todos os dias (Vedadi et al., 2010). Com o crescente avanço da tecnologia recombinante, esta é a estratégia principal para obtenção de proteínas para uso em diagnóstico e terapêutico (por exemplo: vacinas biofármacos), e o desenvolvimento de estratégias para obtenção das proteínas de interesse em quantidade e seu posterior isolamento precisam ser desenvolvidas para avaliação da sua aplicação e caracterização do alvo proteico. O isolamento de proteínas é uma etapa crítica no processo de desenvolvimento e produtivo, uma vez que é necessário identificar métodos de purificação robustos, reproduzíveis, escalonáveis e com custo que não inviabilizem o uso do produto (Jozala et al., 2016; de Carvalho et al., 2017). As etapas de purificação que foram estabelecidas neste trabalho obedecem aos critérios de criticidade de caracterização e escalonamento nas etapas de *upstream* e *downstream*.

#### 1.1.5 Desenvolvimento de processos biotecnológicos

A tecnologia de fabricação de produtos biofarmacêuticos pode ser dividida em duas etapas denominadas: *upstream* e *downstream*. *Upstream process* é definido como o crescimento microbiano necessário para produzir produtos biofarmacêuticos ou outras biomoléculas e envolve uma série de eventos, incluindo a seleção de linhagens celulares, meio de cultura, parâmetros de crescimento e otimização de processos, a fim de alcançar as condições ótimas de cultivo e conseqüentemente sua produção (Gronemeyer et al., 2014). Para isto, são necessárias condições bem controladas na utilização de biorreatores em grande escala. Vários fatores devem ser considerados como o tipo de cultivo: batelada, batelada alimentada ou contínua, temperatura, pH, oxigênio e esterilização de materiais e equipamentos empregados (Jozala et al., 2016; Schmidell et al., 2001).

O *Downstream process* é parte do processo que inclui todas as etapas necessárias para purificação do produto biológico a partir do extrato total proteico onde foi produzido até o produto final purificado. Este processo envolve múltiplas fases com o objetivo de capturar o alvo e remover impurezas relacionadas com células

hospedeiras (por exemplo: proteínas, DNA, etc.), com o processo (por exemplo, ligantes, antiespumantes, etc.) e com o produto (como por exemplo: agregados e fragmentos) (Azevedo et al., 2009; Rathore et al., 2015). Cada passo de purificação é capaz de remover uma ou mais classes de impurezas. Esta fase geralmente abrange três etapas principais: 1-recuperação inicial (extração ou isolamento), 2- purificação (remoção da maioria dos contaminantes), e 3- polimento (remoção de contaminantes especificados e formas indesejadas da biomolécula alvo que podem ter sido formadas durante o isolamento e a purificação) (Azevedo et al., 2009; Fields et al., 2016; Jozala et al., 2016; Rosa et al., 2010).

A recuperação inicial envolve a separação entre células e sobrenadante, ao que denomina-se clarificação do meio. Para este fim, as principais técnicas que podem ser empregadas são a centrifugação, filtração, sedimentação e floculação. Se a biomolécula alvo for produzida extracelularmente, o caldo clarificado é submetido à concentração (por exemplo, ultrafiltração) seguido da purificação. Para biomoléculas produzidas intracelularmente, as células colhidas devem ser submetidas à lise (por exemplo, homogeneizador de alta pressão ou sonicação) seguida de centrifugação para remoção de detritos celulares. A biomolécula alvo é purificada a partir do homogeneizado celular clarificado através de precipitação e/ou cromatografia (Jozala et al., 2016; Weinacker et al., 2013). Nos casos em que as proteínas são expressas como corpos de inclusão (como alguns recombinantes produzidos por *E. coli*), um passo extra de troca de tampão para reenovelamento da proteína é obrigatório, o que contribui significativamente para o aumento do tempo de produção e dos custos.

A recuperação e purificação de produtos biofarmacêuticos de forma eficiente é uma parte crítica no processo de produção. A ruptura celular de micro-organismos é frequentemente requerida para a produção em larga escala de produtos derivados deles, como enzimas, toxinas e proteínas para uso terapêutico. Existem múltiplas alternativas para a liberação do produto de interesse, mas para muitos bioprocessos são métodos não aplicáveis. As técnicas de rompimento celular mecânico podem ser utilizadas para todos os tipos celulares e de processos e tem um histórico de sucesso em produções de grande escala. A tecnologia ideal para rompimento celular deve: permitir a liberação do máximo de produto possível, o produto deve se manter íntegro ao final do processo, liberação mínima de proteases que podem vir a degradar o produto e de partículas ou contaminantes que possam vir a influenciar o processo. Outros atributos importantes também são: baixo custo operacional, fácil esterilização,

ser escalonável e automatizado (Balasundaram et al., 2009; Neves, 2003; Millis, 2012).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a recuperação de produtos intracelulares, que podem ser divididas em: mecânicas e não-mecânicas. Os métodos não mecânicos englobam o choque osmótico e os métodos químicos e enzimáticos (Neves, 2003; de Carvalho et al., 2017), que são limitados a escala laboratorial, uma vez que a adição de produtos químicos e enzimas aumenta o custo do produto final, além da dificuldade de remoção destes químicos exógenos ao produto de interesse (Neves, 2003). A lise mecânica pode utilizar diversas técnicas sendo elas: o ultrassom, a moagem e a homogeneização de alta pressão, que pode ser feita através de prensa e homogeneizador de alta pressão. A utilização do ultrassom consiste na aplicação de ondas sonoras de alta frequência (aproximadamente 20kHz) criando bolhas de cavitação, é a metodologia mais empregada nas áreas laboratoriais, devido a sua eficiência, entretanto não é empregado em escala industrial devido a sua dificuldade em transmitir potência suficiente para suspensões de célula muito concentradas e de grande volume. A moagem ou moinho de pérolas consiste de um equipamento que agita uma suspensão celular mantida em contato com pérolas de vidro (Neves, 2003; de Carvalho et al., 2017). A prensa é um equipamento usado principalmente em laboratórios para romper membranas e paredes celulares, e que consiste de uma bomba hidráulica que aciona um pistão que força a amostra líquida através de uma pequena válvula sob alta pressão na qual as células experimentam estresse por cisalhamento (Disponível em: <http://www.beei.com/blog/french-press-cell-lysis-how-does-it-compare-to-homogenization>). A homogeneização de alta pressão é uma técnica muito utilizada na indústria de biotecnologia para rompimento celular devido ao seu alto aproveitamento, uma vez que permite a ruptura de todas as células em uma suspensão e permite recuperação máxima do produto, embora com pouca seletividade, ou seja os contaminantes também são recuperados (Balasundaram et al., 2009; Millis, 2012). Um homogeneizador consiste de uma bomba de deslocamento positivo que empurra o lisado celular a uma alta pressão por uma válvula de orifício (Figura 2). O rompimento celular é resultante da força de cisalhamento e impacto na válvula e pode ser influenciado por diversos fatores, tais como: pressão, temperatura e concentração celular (Neves, 2003). O principal destes fatores é a temperatura, que tende a aumentar conforme o rompimento celular progride e deve ser controlada durante o processo para preservar o material biológico de desnaturação (Millis, 2012).

O processo de purificação deve ser robusto, confiável, facilmente escalonável, e capaz de remover impurezas ligadas ao processo e ao produto a fim de garantir a segurança do mesmo. A pureza alcançada, a velocidade de desenvolvimento do processo e seu rendimento global são alguns dos principais parâmetros que devem ser levados em consideração durante o desenvolvimento das etapas do *downstream process*. A fim de atingir a pureza exigida rigorosamente pela indústria biofarmacêutica, que muitas vezes excede 99%, são necessárias algumas etapas de cromatografia. A cromatografia permite alta resolução e tem sido tradicionalmente a principal técnica utilizada para purificação e polimento de proteínas. No entanto, é também o que envolve maior custo nos processos de purificação, principalmente devido ao alto valor das resinas utilizadas e ao longo período de tempo de cada etapa. Além disso, a indústria biofarmacêutica ainda enfrenta limitações práticas em termos de aumento de escala (Jozala et al., 2016; Weelwright, 1989).

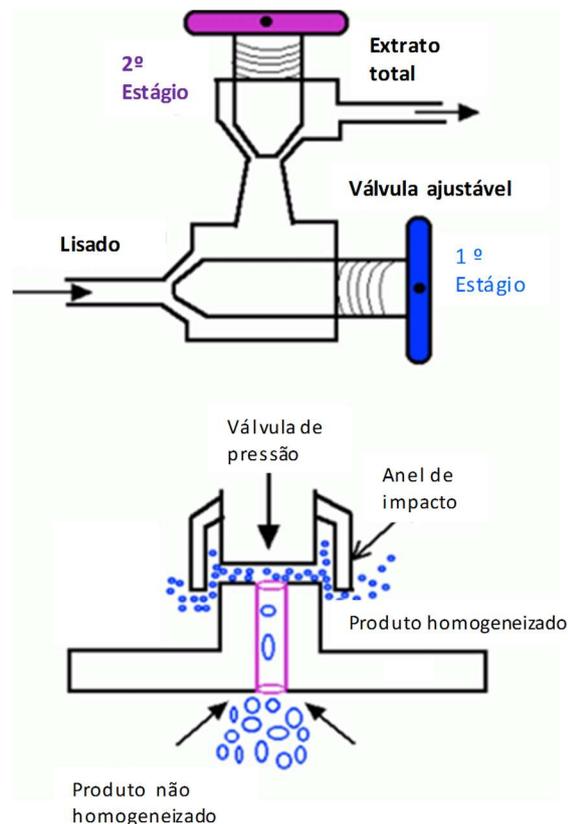


Figura 2. Esquema de válvulas do homogeneizador de alta pressão.

### 1.1.6 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de purificação muito efetiva com uma ampla gama de aplicações e atualmente representa a escolha favorita no desenvolvimento de bioprocessos devido à sua capacidade de alta resolução. O princípio de separação baseia-se nas diferenças de afinidade entre as espécies transportadas por uma fase móvel fluida em direção a uma fase estacionária sólida. Quando uma amostra é introduzida e transportada pelo eluente ao longo da coluna, alguns de seus componentes interagirão mais fortemente com a fase estacionária, gerando perfis de concentração que percolam a coluna cromatográfica a diferentes velocidades (Jozala et al., 2016; GE Healthcare, 2010).

As espécies menos retidas serão eluídas da coluna antes do que as mais retidas, eventualmente permitindo a coleta dos produtos de interesse com um grau de pureza elevado. Com base na interação entre a fase estacionária sólida e a biomolécula de interesse, técnicas cromatográficas podem ser resumidas em cinco classes: 1- afinidade, 2- troca iônica, 3- interações hidrofóbicas, 4- exclusão molecular e 5- modo misto (Jozala et al., 2016). Na cromatografia de afinidade, a proteína de interesse é capturada através do bioreconhecimento do *tag* ou cauda. Esta pode ser uma proteína A, por exemplo, utilizada com frequência na purificação de anticorpos ou uma cauda de poli-histidina, onde as proteínas marcadas têm afinidade seletiva para Níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e vários outros íons metálicos, que podem ser imobilizados em meios cromatográficos usando quelantes. Conseqüentemente, uma proteína contendo uma cauda de histidina se liga seletivamente a meios carregados com íons metálicos, e as outras proteínas não se ligam ou se ligam fracamente. Esta técnica cromatográfica é freqüentemente denominada cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC). Em geral, a proteína marcada com histidina é o ligante mais forte entre todas as proteínas em um extrato de amostra bruta (por exemplo, um lisado bacteriano). A utilização desta estratégia é simples e muito conveniente para se trabalhar com ampla utilização, sendo muitas vezes a única etapa de purificação utilizada para obtenção da proteína de interesse. Quando é necessário um maior grau de pureza do produto, muitas vezes é preciso a adição de outras etapas de purificação, sendo crucial a combinação das técnicas de purificação (Saraswat et al., 2013; GE Healthcare, 2010). A utilização da cauda de histidina como estratégia de purificação tem diversas vantagens, tais como: produção da proteína em diferentes sistemas de expressão, obtenção da proteína com grau de pureza elevado e alto

rendimento, facilidade na detecção da proteína em imunoenaios com anticorpo anti-histidina e baixa influência na conformação da proteína. A IMAC é comumente utilizada como uma estratégia de purificação de proteínas tanto no meio acadêmico quanto na indústria (Cheung et al., 2012). Além disso, várias proteínas candidatas a uso terapêutico foram purificadas através desta metodologia (Salavatifar et al., 2015; Sharma et al., 2012; Tripathi et al., 2012). Embora a cromatografia de afinidade possa ser um método muito útil em termos de seletividade e afinidade, nunca é utilizada de forma independente para a purificação de proteínas recombinantes, principalmente devido ao fato de que o acesso a ligantes adequados é frequentemente escasso e contaminação com endotoxinas também deve ser levada em consideração (Saraswat et al., 2013).

A técnica cromatográfica de gel filtração é de simples uso e permite a separação de moléculas com diferenças de massa molecular, sendo também chamada de cromatografia de exclusão molecular (do inglês: size exclusion chromatography – SEC), onde os tempos de retenção para moléculas maiores são mais curtos do que para analitos menores e, portanto, esta propriedade permite eficiência na separação. Devido a sua baixa resolução e excelentes propriedades dessalinizadoras, a SEC é utilizada principalmente como um passo de polimento quando o volume for reduzido e a remoção de agregados e uma mudança de solução são necessárias. Além disso, os volumes de amostras necessários para a SEC são muito pequenos portanto, é necessário um passo de concentração aumentando assim os custos associados ao processo. A fim de garantir uma boa resolução com a SEC, colunas longas e fluxo baixo são necessários devido a aumento de pressão e ambos os fatores reduzem a produtividade. Essas questões acima mencionadas são desvantagens fundamentais da SEC em ambientes industriais. A ultrafiltração de fluxo tangencial pode concentrar e trocar tampão em um único passo e esta metodologia vem gradualmente substituindo a SEC no desenvolvimento de bioprocessos (Saraswat et al., 2013; Houde e Berkowitz, 2015).

A cromatografia de troca iônica separa as proteínas baseada em diferenças na carga de superfície proporcionando uma separação de alta resolução com alta capacidade de carga da amostra (Fekete et al., 2015). A separação é baseada na interação reversível entre uma proteína carregada e a resina com a carga oposta. As proteínas alvo são concentradas durante a ligação e coletadas de forma concentrada. A resina pode ser usada com altos fluxos porque a cinética de ligação para o IEX é rápida. A carga de superfície líquida das proteínas varia de acordo com o pH da

solução onde a proteína foi solubilizada. Quando a proteína em solução, encontra-se em pH acima do seu ponto isoelétrico (pI), a proteína se liga a um permutador de ânions com carga positiva; quando abaixo do seu pI, uma proteína se liga a um permutador de cátions carregado negativamente. No entanto, mesmo que a proteína tenha uma carga negativa líquida, ela pode se associar negativamente a um trocador de cátions carregado, porque podem haver regiões carregadas positivamente na superfície da proteína que podem ser suficientes para a ligação a matriz. Isso pode acontecer com o caso oposto também. A proteína é eluída utilizando altas concentrações de sal, sendo o NaCl mais utilizado pelo fato de proporcionar efeitos de *salting-out* menos impactantes para a proteína evitando assim sua agregação (Saraswat et al., 2013). A ligação inesperada ou ausência de ligação também pode acontecer e ser causada por mudanças de pH no microambiente da resina. A IEX pode ser usada em qualquer parte de um procedimento de purificação de múltiplos passos podendo ser utilizada também para ligar impurezas como DNA e LPS, permitindo que a proteína alvo passe pela resina sem se ligar (Magalhães et al., 2007; Saraswat et al., 2013; GE Healthcare, 2010; Hernández et al., 2016).

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) separa proteínas com diferenças na hidrofobicidade. O método é adequado para a captura ou para etapas intermediárias da purificação. A separação é baseada na interação reversível entre uma proteína e a superfície hidrofóbica da matriz cromatográfica. A interação é aprimorada pelo tampão de alta força iônica, o que torna a HIC uma excelente etapa de purificação após precipitação com sulfato de amônio ou eluição em alto teor de sal como acontece na IEX. Não há teoria universalmente aceita sobre os mecanismos envolvidos na HIC. Muitos componentes da amostra se ligam a resina em solução de alta concentração iônica, tipicamente 1 a 2 M de Sulfato de Amônio ou 3 M de Cloreto de Sódio. As condições são então alteradas para que as substâncias ligadas sejam eluídas diferencialmente. A eluição geralmente é realizada diminuindo a concentração do sal. As alterações são feitas com um gradiente de sal decrescente contínuo ou usando a metodologia de *step*. Mais comumente, as amostras são eluídas com um gradiente decrescente de Sulfato de Amônio. As proteínas são concentradas durante a ligação e são coletadas de forma concentrada e purificada (GE Healthcare, 2010; Watson, 2017).

### 1.1.7 Ensaios analíticos e caracterização

Os ensaios analíticos são essenciais para acompanhar o progresso da purificação. Inicialmente, eles são necessários para o desenvolvimento da metodologia de expressão, preparação de amostras e as diferentes etapas de purificação, e mais tarde para análise do resultado das diferentes etapas no fluxo de trabalho de produção da proteína de interesse. São realizadas análises para determinar a qualidade da preparação final e após a purificação, a caracterização da proteína alvo é possível usando uma ampla gama de métodos analíticos físicos e químicos (Vedadi et al., 2010).

O desenvolvimento de um protocolo de purificação é facilitado por informações analíticas, como a identidade da proteína obtida e a concentração da proteína alvo, proteína total e impurezas. Durante o desenvolvimento da metodologia de purificação de uma proteína, existem vários parâmetros que devem ser otimizados como rendimento, pureza e atividade. A determinação da concentração de proteínas totais, concentração da proteína alvo, atividade e a pureza são geralmente avaliações necessárias no desenvolvimento e estabelecimento de protocolos de purificação de proteínas e para a determinação da qualidade da preparação (Ratanji et al., 2014; Carta e Jungbauer, 2010). A análise da homogeneidade do tamanho, ou seja, a determinação do estado de associação da proteína alvo, também é importante. A ausência de agregados numa composição proteica é um requisito para muitas aplicações, estes podem ser formados durante a expressão, mas também pode ser um resultado da instabilidade da proteína que pode ter levado à agregação durante a purificação (Ratanji et al., 2014; GE Healthcare, 2010).

De acordo com o guia da Administração americana de alimentos e medicamentos (do inglês: United States Food and Drug Administration - USFDA) para controle na indústria de vacinas e produtos relacionados (do inglês: Guidance for Industry Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment – Description information for a Vaccine or Related Product – 1999), deve ser realizada a caracterização da substância, demonstrando sua pureza, identidade, potência e estabilidade. As avaliações foram divididas em: caracterização biológica e físico-química do produto.

Dentre os ensaios para caracterização físico-química estão: sequenciamento nucleotídico e/ou de aminoácidos, eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), focalização isoeétrica, ressonância magnética nuclear (RMN), métodos

cromatográficos, ensaios para detectar proteínas relacionadas, incluindo oxidadas, processadas e formas agregadas e outras variantes, como substituições de aminoácidos e derivados, diferentes métodos cromatográficos, determinação dos contaminantes do processo, como: uréia (se for o caso), DNA e proteínas residuais do hospedeiro, e endotoxinas. Dentre os ensaios para caracterização biológica, estão: demonstração da identidade através de *Western blot* e ELISA, sorotipagem, testes de neurovirulência, estudos de inativação e neutralização (se for o caso), além disso deve ser fornecida uma descrição com os resultados de todos os testes biológicos *in vivo* e *in vitro* relevantes (bioensaios) realizados no lote padrão de referência do fabricante (se houver) ou outros lotes relevantes para demonstrar a potência e a(s) atividade(s) da substância. De acordo com o guia da Administração americana de alimentos e medicamentos (do inglês United States Food and Drug Administration - USFDA) para submissão de produtos derivados da tecnologia do DNA recombinante para uso *in vivo* de 1996 (do inglês: Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for Therapeutic Recombinant DNA-Derived Product or a Monoclonal Antibody Product for In Vivo Use, 1996), dentre os controles de processo está a validação dos estudos relativos ao processo de purificação e a demonstração da remoção de substâncias estranhas ao processo, como produtos químicos utilizados na purificação, contaminantes da coluna, endotoxinas, antibióticos, DNA e vírus se for o caso. Ainda de acordo com a USFDA, recomenda-se que as preparações vacinais tenham no máximo 10 ng de DNA residual por dose (Hernández et al., 2016)

Endotoxinas devem ser removidas das proteínas preparadas de bactérias gram-negativas, como *E. coli*, antes de sua administração em humanos e animais a fim de evitar qualquer efeito colateral adverso, que pode ser muito intenso e causar febre, tremores, hipotensão e coagulação intravascular (Ongkudon et al., 2012). Brito e Sighn (2011), em sua revisão sobre os limites quantitativos de LPS em diferentes vacinas, recomendam algumas concentrações de LPS, e de acordo com a Farmacopéia americana (do inglês, United States Pharmacopeia – USP) da Administração Americana de Alimentos e Medicamentos (do inglês, United States Food and Drug Administration - USFDA) e a Agência Européia de Medicamentos (do inglês, European Medicines Agency - EMEA) essas informações podem ser visualizadas na Tabela 3. Estes limites são recomendações, uma vez que os fabricantes não divulgam as especificações relativas a quantidade de endotoxinas do seu produto final. É importante destacar que os níveis de endotoxinas são específicos

para cada tipo de vacina e muitas vezes uma regra geral e sem exceções pode ser muito restritiva, portanto essa análise deve ser feita produto a produto (Brito e Sighn, 2011).

Tabela 2. Níveis de endotoxina recomendados para os diferentes tipos vacinais

Tipo de vacina	Nível máximo de LPS recomendado (EU/mL)
Vetorizada	< 10
Subunidade	< 20
Polissacarídeo	< 20
Atenuada	< 200
Inativada	< 500
Toxóide	< 200.000

A qualidade da preparação final da proteína é geralmente determinada usando os mesmos métodos utilizados no desenvolvimento do protocolo de purificação. Uma vez que a proteína é obtida com grau de pureza elevado e análises físico-químicas são realizadas para caracterizar melhor a proteína alvo, dentre estas, a verificação da integridade da sequência (Choi et al, 2006).

#### 1.1.8 Estabilidade proteica

Grande parte dos processos de purificação exigem que a proteína seja isolada e que esteja na sua forma ativa. Cada etapa do processo oferece o risco de diminuição da atividade proteica e perdas mínimas não podem ser evitadas e geralmente são aceitas.

A etapa de preparo da amostra é um passo especialmente crítico porque a amostra pode conter proteases que podem rapidamente degradar a proteína alvo. Além disso, uma alta concentração de outros componentes na amostra podem se associar à proteína alvo, causando agregação e, portanto, perda da mesma. A estabilidade das proteínas deve ser atendida durante todo o fluxo de processo de purificação e também para seu armazenamento (Ratanji et al., 2014).

A perda de atividade protéica pode ter várias causas, como por exemplo: problemas com o ensaio de atividade, inibidores na amostra, perda de estrutura terciária e quaternária, agregação (insolubilidade) e diminuição da solubilidade, precipitação, clivagem proteolítica, adsorção inespecífica em colunas, recipientes ou

outros equipamentos, perda de subunidades caso seja um complexo protéico, perda de cofactores ou coenzimas, modificações químicas. As causas acima podem ocorrer devido a: presença de impurezas prejudiciais, por exemplo, proteases, mudanças nas condições da solução durante a purificação, dessalinização ou troca de tampão, concentração da proteína, diluição de proteínas, e mudanças de condição física, por exemplo, congelamento e descongelamento ou aumento da temperatura (Ratanji et al., 2014; Wang et al., 2010).

Diferentes métodos analíticos podem ser usados para monitorar a integridade protéica, um deles é através da realização de um estudo completo da janela de estabilidade da proteína alvo. Isso pode ser realizado passo a passo por: 1) alterar as condições de pequenas alíquotas da proteína alvo através da troca do tampão no qual a proteína se encontra solubilizada, mudança de temperatura, ou exposição da proteína ao tratamento de interesse; 2) incubação possivelmente a temperatura elevada para estudo acelerado; e 3) análise da atividade (GE Healthcare, 2010; WHO, 2011).

De acordo com a Organização mundial de Saúde (WHO) em sua orientação sobre avaliação da estabilidade em vacinas (do inglês: Guidelines on stability evaluation of vaccines - 2011), a temperatura é o fator ambiental mais crítico que pode afetar diretamente características de uma vacina. Os testes de estabilidade se baseiam na determinação da mudança na propriedade de uma vacina que pode ser um indicador direto ou indireto da sua imunogenicidade e conseqüentemente eficácia. Os testes exigidos para a caracterização da vacina como atividade biológica (por exemplo, potência e toxicidade específica), devem ser realizados antes ou após a exposição da vacina a: 1- temperatura de armazenamento recomendada (estudo nas condições reais de armazenamento em tempo real, ou 2- temperaturas acima das recomendadas para armazenamento (estudos de estabilidade acelerada), a fim de verificar alguma possível variabilidade. Estes testes também servirão como indicativo da faixa de temperatura na qual a proteína pode ser estocada.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A leptospirose é uma das doenças mais negligenciadas sendo a zoonose mais difundida em todo mundo e que a cada ano 1 milhão de casos são notificados, sendo que 50.000 destes vão a óbito. O aumento do número de casos de leptospirose está diretamente associado com a desigualdade social e globalização, e

proporcionalmente ao número de pessoas residindo em ambientes insalubres, sem saneamento básico e acesso a serviços básicos de saúde. A fim de evitar o avanço da doença, medidas preventivas devem ser tomadas e a vacinação é uma delas. Atualmente existem três vacinas disponíveis no mundo para o controle da leptospirose humana, entretanto estas são baseadas em *Leptospiras* inativas (mortas), mas sua eficácia de proteção é de curta duração e sorovar específica, e além disso com alto grau de reatogenicidade. Desta forma, existe uma real necessidade de desenvolver vacinas eficazes, seguras e que protejam contra diferentes espécies e sorovares. A abordagem de desenvolvimento de vacinas recombinantes é uma alternativa nesse sentido para obtenção de uma nova vacina contra esse patógeno. Diante disso, diversos grupos vêm trabalhando na busca de candidatos vacinais para chegar a uma vacina recombinante e entre elas se destacam as proteínas Ligs, cujo potencial para diagnóstico e vacina já foram demonstrados.

As proteínas Ligs são componentes da superfície da leptospira, presentes em todos os sorovares das espécies patogênicas e expressas somente durante a infecção. Além disso, várias evidências na literatura indicam que essas proteínas estejam envolvidas na virulência de *Leptospiras*. O nosso grupo publicou e patenteou a aplicação dessas proteínas para diagnóstico e vacina em 2007 (Silva et al., 2007), descrevemos a clonagem e expressão dos fragmentos de Ligs, dentre estes a porção C-terminal de LigA (que equivale a região não idêntica, denominada LigANI) e seu potencial vacinal foi demonstrado, induzindo níveis de proteção de 67-100% em desafio letal em hamsters. No ano de 2012 (Nabity et al., 2012) publicamos um novo artigo destacando também a aplicação de LigANI no desenvolvimento de um ensaio diagnóstico para leptospirose baseado no formato de teste rápido. Atualmente, Bio-Manguinhos tem no seu portfólio de Kits para diagnóstico o DPP- Leptospirose, o qual tem na sua formulação o antígeno LigANI.

Diante do potencial da proteína LigANI como ferramenta de diagnóstico e candidata a uma vacina recombinante para leptospirose, foi considerada a necessidade de obtenção da proteína LigANI em quantidades e níveis de pureza aceitáveis para o desenvolvimento de um produto biológico que é o objetivo central deste estudo. Além disso, existem poucas informações a respeito das características biológicas e físico-químicas desse antígeno de *Leptospira sp.* patogênica. Para tal, propomos neste trabalho estudar e caracterizar a proteína recombinante LigANI através de ensaios físicos-químicos e biológicos, a fim de termos um maior

entendimento dos dados de eficácia de proteção promovida pelo antígeno LigANI. Além disso, se faz necessário este tipo de estudo quando uma proteína tem potencial de aplicação terapêutica, seja como biofármaco ou vacina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Estabelecer e padronizar as condições de obtenção da proteína recombinante LigANI com alto rendimento e realizar sua caracterização físico-química.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Otimizar o rendimento da proteína recombinante LigANI em cultivo em biorreator de 2,5L.
2. Estudo e avaliação das técnicas pré-purificativas (rompimento celular e clarificação do lisado).
3. Estudar e desenvolver as metodologias de purificação da proteína.
4. Avaliar e analisar o rendimento e os níveis de pureza.
5. Caracterizar físico quimicamente e biologicamente a proteína recombinante.
6. Desenvolver e avaliar técnicas para controle do processo para obtenção da proteína rLigANI.
7. Avaliar o escalonamento das técnicas pré-purificativas e de purificação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo em fermentador para obtenção da biomassa expressando a proteína recombinante LigANI:

##### 3.1.1 Padronização das condições de cultivo iniciais em biorreator de 80 mL e escalonamento do cultivo para biorreator de 2 litros:

A bactéria recombinante *E. coli* BL21 (DE3) Star / LigANI pET 100 (Silva et al., 2007) foi cultivada em 50 mL de pré inoculo com a inoculação do lote de trabalho armazenado a -80 °C na diluição de 1:1000 em meio de TB (Terrific Broth) (Extrato de levedura 23,6 g/L, triptona 11,8 g/L, Fosfato de Potássio dibásico 9,4 g/L, Fosfato de Potássio monobásico 2,2 g/L), suplementado com ampicilina 100 µg/mL, glicose 1% e glicerol 0,4%, a 37°C durante 6 horas a 200 rpm em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL. Após este período, o volume total do pré-inoculo foi recolhido em tubos estéreis e armazenado a 4°C. Previamente ao esfriamento, uma amostra foi plaqueada em meio ágar para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo do bioreator. No dia seguinte, foram preparados os biorreatores de 80 mL (Biopod Fogale) e volume de trabalho de 70 mL de meio de TB contendo glicose 1% e ampicilina 100 µg/mL. Estes reatores foram inoculados com  $1 \times 10^9$  UFC/mL. Os crescimentos para avaliação experimental das diferentes condições foram realizados de acordo com a tabela 3. Em todas as culturas, a indução foi realizada após uma mudança de temperatura de 37 para 28°C. No próximo passo foi realizado o cultivo em um biorreator 2,5 L e volume de trabalho de 2 litros (New Brunswick, EUA), o qual foi inoculado seguindo as condições estabelecidas e otimizadas no microbioreator, obtidas a partir das análises do planejamento experimental.

Tabela 3. **Planejamento experimental considerando fatorial 2<sup>2</sup> para duas variáveis: tempo de pré indução e concentração de IPTG**

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo de pré-indução (min)	30	47	90	133	150
Concentração de IPTG (mM)	0,1	0,23	0,55	0,87	1,0

Para a produção da biomassa produzida em biorreator de 2 litros, o pré-inóculo foi preparado a partir do lote de trabalho armazenado a -80°C. O lote de trabalho foi

diluído na proporção de 1: 1000 em meio TB contendo 1% de glicose e 100 µg/mL de ampicilina, num volume total de 500 mL e incubado sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 horas a 37°C. Após o cultivo o pré-inóculo de  $1 \times 10^9$  UFC/mL foi inoculado ao fermentador de 2,5 L. A densidade ótica (600 nm) foi monitorada até 5-6 e a expressão da proteína foi induzida com a adição de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 0,1 mM, a partir desse momento a temperatura de cultivo foi reduzida para 30°C e permaneceu por 6 horas de cultivo. A biomassa produzida foi centrifugada a 1556 x *g* por 15 minutos e armazenada a -20°C até o momento da ruptura celular.

### 3.1.2 Controle de processo do cultivo em fermentador:

Como controle de processo, foram realizados: avaliação da expressão da proteína recombinante através de eletroforese em gel de poliacrilamida, análise da viabilidade celular, e avaliação da identidade do gene *ligANi*. A fim de monitorar possíveis mutações durante o cultivo celular, a identidade genética foi checada através do sequenciamento nucleotídico a partir de amostras retiradas durante a fermentação em dois momentos: antes do momento da adição do IPTG ao cultivo e ao término do experimento. Foi feita a extração plasmidial utilizando o kit High pure plasmid isolation kit (Roche) seguindo as orientações do fabricante. A reação de sequenciamento é preparada utilizando 300 ng do DNA plasmidial, 2 µL do reagente Big Dye, 2 µL do tampão Big Dye e 1 µL de oligonucleotídeo, totalizando 10 µL de volume de reação. As sequências iniciadoras utilizadas estão indicadas na tabela 4:

**Tabela 4. Sequências iniciadoras utilizadas na avaliação da integridade do DNA plasmidial dos cultivos celulares**

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Posição (pb)</b>	<b>Sequência</b>
LigA domínio 7- F	1891	5' CAC CCT TAC CGT TTC CAA CAC AAA C 3'
LigA domínio 11- F	2827	5' CAC CAG AAT AGC TTC AAT CGA AGT AA 3'
LigA/BNI PET- F	1873	5' CAC CTC CTC TAA TAC GGA TAT T 3'
LigANI 400-800 F	2273	5' ACT CCC GCT GTT CTT ACT TCA A 3'
LigANI 1200-1600 F	3073	5' TTC TAC TAC CTT GTA TGT CAC TTC TGC 3'
LigANI 1600-1800 F	3473	5' CTT CAG CTT ACG GAT CTT GTG AC 3'
LigA R	3674	5' GGTCTAGATTATGGCTCCGTTTTAATAGAG 3'
LigA Middle NI R	2830	5' TTA AGC TAT TCT TGC CGG AGT AAC 3'
LigANI 300-700 R	2573	5' AGC ACA ATC TCA GTA AGT TCC G 3'
LigANI 700-1100 R	2973	5' AGC ACA ATC TCA GTA AGT TCC G 3'
LigANI 1500-1800 R	3673	5' TGG CTC CGT TTT AAT AGA GGC 3'

As reações foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems – modelo: Veriti) de acordo com o programa: desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto, em seguida foram realizados 25 ciclos de 96°C por 1 minuto, 50°C por 5 segundos, e 60°C por 1 minuto. As reações foram armazenadas a temperatura de 2-8°C e transferidas para a placa óptica de sequenciamento (MicroAmp – Applied Biosystems). Em seguida, as reações foram purificadas de acordo com o protocolo do fabricante e o sequenciamento automático das amostras foi conduzido no analisador genético de 24 capilares (Thermo Fisher Scientific - modelo: 3500xL). Para alinhamento e análise das sequências foi utilizado o programa DNA star, os eletroferogramas resultantes foram avaliados em comparação ao sequenciamento nucleotídico do lote de trabalho (realizado previamente) e a sequência de bases do gene *ligA* depositada no GenBank.

### 3.2 Estabelecimento do processo de lise e clarificação para obtenção da proteína recombinante LigANI:

Para a lise da biomassa e a clarificação para obtenção da proteína rLigANI foram avaliadas três diferentes metodologias de rompimento celular: sonicação, prensa e homogeneizador. Na sonicação, a biomassa úmida bacteriana foi ressuspensa em solução tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, Cloreto de Sódio (NaCl) 500 mM, Triton X-100 0,1% (Tampão de lise) numa proporção de 1 g

para 10 mL, obtendo-se assim o extrato total. Este material foi mantido sob agitação em banho de gelo por 30 minutos e em seguida foram realizados 4 ciclos de sonicação de 1 minuto, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo e com amplitude fixa de 70% (Misonix – XL-2000 series).

O rompimento da biomassa na prensa foi realizado no equipamento da marca Thermo Electron Corporation, localizado no Laboratório de Esquistossomose Experimental (IOC/Fiocruz). A biomassa foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,1% na temperatura de 4°C na proporção de 1 g para 10 mL. O lisado celular foi mantido sob agitação em banho gelo por 30 minutos e re-circulado na prensa por cinco vezes sob uma pressão máxima de 1900 psi. O extrato total foi mantido sob refrigeração por todo o processo. Ao final da lise, o material foi coletado e mantido sob refrigeração para análises e processamento.

O rompimento no homogeneizador foi realizado no equipamento da GEA Niro Soavi modelo: NS1001L2K. A biomassa foi ressuspensa no mesmo tampão, condições e proporções descritas citadas acima. O homogeneizador foi previamente refrigerado com o banho refrigerado ultratermostato (Nova Ética), afim de que o processo de rompimento ocorra sob refrigeração com objetivo de prevenir a desnaturação das proteínas no extrato total. O equipamento foi previamente lavado com o tampão de lise e a temperatura interna estabilizada a 4°C. Após essa etapa, o extrato total foi aplicado no equipamento e o mesmo ajustado de forma a manter uma velocidade de 55 rpm e pressão interna de 800 bar. O extrato total foi recirculado no sistema por 10 minutos e ao término desta etapa, o material foi recolhido e aplicado um volume adicional de tampão no equipamento com objetivo de recuperar o material no volume morto no interior do sistema, e este foi adicionado ao extrato total.

Nos três processos de rompimento da biomassa o extrato foi centrifugado a 15455 x g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf – modelo 5810R) com objetivo de separar a fração solúvel da insolúvel. A seguir a fração solúvel foi filtrada em Millex 0,22 µm PVDF e submetida ao processo de purificação.

As eficiências do rompimento celular dos processos foram monitoradas através da avaliação da viabilidade celular. O extrato total e a fração solúvel foram plaqueados em meio Luria Bertani (LB) / ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina e foi verificada a presença de células viáveis ou não após o processo de lise da biomassa. O extrato total foi diluído 10<sup>2</sup>/mL e 10<sup>3</sup>/mL, enquanto a fração solúvel em 10<sup>1</sup>/mL e 10<sup>2</sup>/mL. A seguir foram plaqueados 100 µL de cada diluição em meio LB/amp e incubado a 37°C por 16 horas.

### 3.3 Padronização e Estabelecimento dos Protocolos de Purificação da proteína recombinante LigANI:

#### 3.3.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC):

Após o processo de filtração da fração solúvel em membrana PVDF 0,22 µm, essa foi submetida ao processo de purificação pelo método de cromatografia de afinidade com objetivo de isolar a proteína recombinante LigANI. A cromatografia foi realizada no equipamento Akta Pure 25 (GE Healthcare) em coluna Histrap HP 5 mL (GE Healthcare). Foram avaliadas diferentes condições de purificação da proteína LigANI: concentração de NaCl (100-500 mM), concentração de Imidazol nas lavagens (30-60 mM) e quantidade de proteína total aplicada a coluna. As condições otimizadas estão descritas abaixo. A resina foi equilibrada com cinco volumes de coluna de tampão de equilíbrio Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,01%, Imidazol 20 mM num fluxo de 5 mL/minuto e mantido durante todo o procedimento. Em seguida, a amostra contendo 500 mg de proteínas totais foi aplicada e a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do tampão de equilíbrio. A seguir, outra etapa de lavagem foi realizada com 10 volumes de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,01%, Imidazol 30 mM. Após a etapa descrita acima, a proteína recombinante foi eluída da resina com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,01%, Imidazol 80 mM e coletada até a observação da redução da densidade óptica (DO) de 280 nm até a linha de base. Ao final do processo de purificação, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,01%, Imidazol 300 mM para eliminação dos contaminantes adsorvidos à resina.

#### 3.3.2 Dessalinização da proteína recombinante LigANI

Nesta etapa, a proteína recombinante LigANI oriunda da IMAC foi submetida ao processo de troca de tampão e dessalinização. Foram avaliadas por duas metodologias: filtração tangencial e a cromatografia de gel filtração com o objetivo de definir o processo e uma metodologia reprodutível e escalonável para minimizar as perdas ao longo do processo.

A amostra na concentração de 100 mg de proteína foi submetida à filtração tangencial utilizando a membrana de polietersulfona de 30 kDa (SARTOCON Slice 200-Sartorius) em sistema Sartoflow Slice 200 (Sartorius) na presença de três

diferentes tampões: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, Borato 50 mM pH 8,0 e Fosfato de Sódio 50 mM pH 8,0. Inicialmente, a membrana foi sanitizada com recirculação de solução de Hidróxido de Sódio 0,2 N por todo o sistema, que em seguida foi lavado com 3 litros de água. Ao final do processo de lavagem, o sistema foi equilibrado com um dos tampões avaliados acima descritos. Preliminarmente ao início do processo de filtração, a velocidade da bomba peristáltica foi ajustada para 30 rpm com objetivo de manter a pressão transmembrana. O pH e a condutividade do sistema foram monitoradas durante toda a etapa de equilíbrio a fim de verificar e garantir a total retirada do Hidróxido de Sódio.

Para o estabelecimento da metodologia de gel filtração, inicialmente foi utilizada uma coluna pré-empacotada de 5 mL (HiTrap Desalting - GE Healthcare). A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, a seguir a coluna foi carregada com 1,5 mL da proteína purificada, o equivalente a 1,5 mg. Após a aplicação da amostra, essa foi monitorada através do aumento da absorbância a 280 nm e a fração de aproximadamente 3 mL referente a proteína de interesse foi coletada para posterior análise. Após o aumento da condutividade equivalente a saída do sal da amostra, a resina pode ser re-equilibrada para uma nova corrida.

Com o estabelecimento das condições de dessalinização por gel filtração, a técnica foi escalonada para uma coluna XK50-60, empacotada com aproximadamente 1 litro de resina G-25 (medium – GE Healthcare), com capacidade de carregamento de até 20 mL de amostra num fluxo de 25 mL/min. Foram realizadas diversas corridas para obter uma preparação da proteína dessalinizada para uma próxima etapa de purificação.

### 3.3.3 Cromatografia de troca iônica (IEX):

Foram avaliadas diferentes resinas para avaliação da cromatografia de troca aniônica e catiônica, tais como: DEAE FF, Q FF, e Q XL (GE Healthcare), Capto MMC, SP FF (GE Healthcare), CIM Multus e CIM Multus SO3 (BIA Separations).

### 3.3.3.1 Cromatografia de troca catiônica:

Na tentativa de obter um parâmetro de comparação foram avaliados os tampões A (Acetato de Sódio 25 mM pH 4,5) para equilíbrio da amostra e resina, e para eluição foi avaliado o tampão B (Fosfato de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM, NaCl 1 M pH 8,0). A coluna foi equilibrada com cinco volumes de coluna de tampão A, em seguida rLigANI foi aplicada na coluna de duas formas: 1- dessalinizada previamente em tampão acetato 25 mM pH 4,5 e diluída 5 vezes nesse mesmo tampão Acetato, com objetivo de evitar a etapa de dessalinização entre as cromatografias de afinidade e troca iônica. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com cinco volumes do tampão A e em seguida eluída com tampão B.

### 3.3.3.2 Cromatografia de troca aniônica:

Foi feito um teste com tampão Tris-HCl 20 mM com o pH variando na faixa entre 7,0 a 10,0, com objetivo de identificar a faixa de pH que fosse mais eficiente para ligação da proteína a resina QFF (GE Healthcare), para isto foram preparadas várias alíquotas com 500  $\mu\text{L}$  da resina em microtubos. Esses foram centrifugados a 5000 rpm (Eppendorf – modelo: 5415D) por 1 minuto para retirada do álcool, a seguir foi adicionado o mesmo volume de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0 para equilibrar a resina). O tubo com a resina foi homogeneizado por inversão 5 vezes e em seguida centrifugado a 5000 rpm por 1 minuto (Eppendorf – modelo: 5415D). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  da proteína LigANI purificada e dessalinizada de acordo como descrito na etapa anterior. A amostra de proteína foi incubada sob agitação a temperatura ambiente por 15 minutos e logo depois foi realizada uma centrifugação a 5.000 rpm por 1 minuto (Eppendorf – modelo: 5415D) para separação das duas fases, onde o sobrenadante foi coletado para posterior avaliação. Aos microtubos contendo a resina, foram adicionados 1mL do tampão de equilíbrio e repetida a etapa de centrifugação, o sobrenadante também foi coletado para análise e em seguida foi feita a eluição da proteína com tampão Tris-HCl 20 mM pH (7-10) contendo NaCl 1 M.

A partir do resultado obtido acima, as condições selecionadas são descritas abaixo. A resina Hi Trap Q XL foi equilibrada com cinco volumes de coluna de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 num fluxo de 5 mL/minuto, que foi mantido durante todo o procedimento. Em seguida, a amostra foi aplicada e a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna do tampão de equilíbrio, a seguir a proteína recombinante foi eluída

da resina com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM e coletada até a observação da redução da densidade óptica (DO) até a linha de base.

### 3.4 Metodologias de quantificação e avaliação de homogeneidade.

#### 3.4.1 Quantificação de proteínas pelo método do ácido Bicinchonínico (BCA)

O ensaio proteico BCA é livre de detergentes e baseia-se no ácido bicinchonínico (BCA) para detecção colorimétrica. O método combina a redução dos cátions  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  pelas proteínas em meio alcalino (o método do biureto) com a detecção colorimétrica selectiva e sensível dos cátions  $\text{Cu}^{+1}$  através da reação destes com o ácido bicinchonínico. Foi utilizado o kit BCA protein assay (Pierce™), e as quantificações foram realizadas em placas de 96 poços de fundo chato. Foram preparadas 5 diluições da curva padrão com albumina bovina sérica (BSA) em tampão PBS pH 7,4. Os pontos da curva variaram entre 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. A solução final de trabalho, contendo ácido bicinchonínico, foi preparada misturando na proporção de 50 partes do reagente 'A' em 1 parte do reagente 'B' de forma a ficar homogênea. Em cada poço da placa foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  das amostras acrescido de 200  $\mu\text{L}$  da solução final de trabalho, anteriormente descrita. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e a absorbância das amostras foi lida a 562 nm em leitora de placas TECAN.

#### 3.4.2 Quantificação da massa seca da proteína LigANI

Alíquotas de 1 mL da proteína LigANI purificada foram liofilizadas por 24 horas (Liofilizador LioTop modelo: K105) a -100°C. A fim de garantir a secagem total das amostras, estas foram armazenadas em dessecador a temperatura de 40°C e uma vez ao dia durante 1 semana foram pesadas a fim de verificar a manutenção da massa das mesmas e garantir a evaporação total da água. A partir da massa obtida, foi feita a curva padrão (2,5 – 30  $\mu\text{g}$ ) com a proteína LigANI para utilização na quantificação das amostras em diferentes etapas do processo.

### 3.4.3 Densitometria

A fim de obter uma avaliação semi-quantitativa e pureza do material obtidas ao longo do processo de purificação, foi utilizada a avaliação densitométrica. Foi preparado um gel com um gradiente de SDS-PAGE 4-17% usando uma curva padrão com quantidades de LigANI purificada variando entre 2,5 a 30 µg (quantificada a partir de massa seca) e a proteína LigANI recombinante foi aplicada numa concentração de 20 µg totais considerando a quantificação obtida a partir do método de BCA. A eletroforese foi realizada a 20 mA durante 12 horas. As bandas referentes às diferentes concentrações de proteína foram visualizadas após incubação com Gel Code Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, Illinois) de acordo com as instruções do fornecedor. O gel foi analisado por densitometria usando um Densitômetro Calibrado Bio-Rad GS-800 e o programa QuantityOne 4.4.1 o qual informou a área percentual da amostra LigANI avaliada. A curva padrão foi determinada e a banda correspondente a proteína LigANI foi delimitada para determinar a concentração de acordo com a equação dada pelo programa QuantityOne 4.4.1. A pureza da proteína foi determinada considerando a porcentagem de todas as bandas em uma canaleta. As amostras do processo foram avaliadas desta forma também para cálculo do rendimento de cada etapa.

### 3.5 Produção de soro hiperimune anti-LigANI em camundongos:

A formulação experimental foi preparada utilizando a proporção de 200 µg da proteína recombinante LigANI e 2 mg do adjuvante Hidróxido de Alumínio (Brenntag). A formulação foi preparada em uma quantidade suficiente para as três imunizações. A adsorção do adjuvante à proteína foi feita a partir de incubação *overnight* a 4°C sob agitação e em seguida armazenada a 4°C até o momento das inoculações.

Foram selecionados seis camundongos da linhagem Balb/c com 4/6 semanas para realização dos experimentos. Os animais foram submetidos a uma pré-sangria e a primeira inoculação foi realizada um dia após com 100 µL da formulação vacinal via intramuscular contendo 30 µg da proteína recombinante LigANI, e o esquema de vacinação consistiu de três (3) inoculações, com intervalo de quatorze (14) dias. Os camundongos foram submetidos a três (3) sangrias via plexo retro-orbital, respeitando um intervalo mínimo de 14 dias entre cada coleta. Dez semanas (10) semanas após o início do experimento foram sangrados por punção cardíaca.

O sangue dos animais foi coletado de forma individual e este foi então incubado por 1 hora a temperatura ambiente, em seguida a 4°C por mais 1 hora e centrifugado para obtenção do soro. Este foi aliqotado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Os experimentos foram realizados mediante ao protocolo do comitê de ética animal LW-18/13.

### 3.5.1 Títulação dos soros hiperimunes anti-LigANI

Os soros produzidos em camundongos foram avaliados individualmente por *dot blot* para montagem de um pool de soros com os maiores títulos individuais. As membranas de PVDF (PVDF transfer membrane - Thermo Fischer scientific) foram cortadas e sensibilizadas com 500 ng da proteína recombinante LigANI. Após a secagem da proteína nas membranas, estas foram bloqueadas com Leite desnatado 5% diluído em PBS pH 7,4 contendo Tween 0,05% por incubação overnight a 4°C. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas uma vez com PBS pH 7,4, Tween 0,05% e incubadas com os soros nas diluições de 1:1000 à 1:32.000 em PBS pH 7,4, Tween 0,05%, BSA 0,25% por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir a incubação, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4, Tween 0,05% três vezes com intervalos de 10 minutos e as membranas incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG camundongo marcado com fosfatase alcalina na diluição 1:30.000 em PBS pH 7,4, Tween 0,05%, BSA 0,25% por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação do anticorpo secundário as membranas foram lavadas de acordo com o procedimento acima e reveladas com substrato para Fosfatase alcalina (*Western blue stabilized* – Promega) por 10 minutos.

Os soros que obtiveram maior título foram selecionados para a montagem do *pool* e posterior titulação e ensaios de antigenicidade.

### 3.6 Ensaio de antigenicidade para os antígenos recombinantes LigANI

Inicialmente os pools dos soros hiper-ímenes anti-LigANI foram avaliados por *immunoblotting* para determinação do título. Dessa forma, foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida preparativo na concentração de 12,5% a 20 mA por 1 h aproximadamente, onde foi aplicado o volume contendo 5 µg de LigANI recombinante de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhani purificada na etapa de troca aniônica.

Em seguida, esse gel foi transferido para uma membrana de PVDF em sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad) por 1 hora a 100 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada *overnight* com Leite 5% diluído em PBS pH 7,4, Tween 0,05% e cortada em tiras para posterior incubação com os soros nas diluições de 1:16.000 – 1:256.000 em PBS pH 7,4, Tween 20 0,05%, BSA 0,25% por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4, Tween 0,05% três vezes com intervalos de 10 minutos. A seguir as membranas foram incubadas com ao anticorpo secundário anti-IgG camundongo marcado com fosfatase alcalina na diluição 1:30.000 em PBS pH 7,4, Tween 20 0,05%, BSA 0,25% por 1 hora a temperatura ambiente. Após esta etapa as membranas foram lavadas de acordo com o procedimento acima e reveladas com substrato para Fosfatase alcalina (*Western blue stabilized* – Promega) por 10 minutos.

### 3.6.1 Avaliação da reatividade cruzada entre as proteínas LigANI nas diferentes amostras de *Leptospiras* patogênicas:

Em nosso laboratório foram clonadas, expressas e purificadas as proteínas LigANI de diferentes sorovares patogênicos, dentre os quais: *L. interrogans* sorovar *Autumnalis*, *Canicola* e *Pomona*. As proteínas recombinantes estocadas em freezer -80°C foram descongeladas e quantificadas através do método de BCA. A concentração de 1 µg destas foi submetido a SDS-PAGE 12,5% para posterior avaliação por *imunoblotting*. Assim, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% a 20 mA por 1 h aproximadamente. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF em sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad) por 1 hora a 100 V. Após a transferência, a reação antígeno e anticorpo foi realizada de acordo com o procedimento descrito acima, sendo a reação antígeno-anticorpo realizada com *pool* de soro hiperimune anti-LigANI na diluição de 1:64.000.

### 3.7 Ensaio de adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz extracelular

Inicialmente foram avaliadas as concentrações das proteínas de matriz e da proteína LigANI a serem utilizadas nas avaliações. As proteínas de matriz: Colágeno tipo IV, Fibrinogênio, Fibronectina e Laminina (SIGMA) foram testadas com 0,5 e 1 µg, e LigANI com concentrações variando entre 0,125-1 µg. A partir destes resultados

foram determinadas as diluições do anticorpo primário (anti-Histidina – SIGMA referência: H1029) e secundário (anticorpo IgG anti-camundongo marcado com peroxidase – SIGMA referência: A9044). Uma vez que o valor da DO destas avaliações foi muito baixo, as concentrações das proteínas de matriz e da proteína recombinante LigANI foram aumentadas e as diluições dos anticorpos revalidadas.

Placas de 96 poços (NUNC-Maxisorp) foram sensibilizadas com as proteínas de matriz Fibronectina, Fibrinogênio, Colágeno e Laminina nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 µg diluídas em tampão Carbonato Bicarbonato pH 9,6 e incubadas a 4°C *overnight*. Após sensibilização as placas foram lavadas uma vez com tampão PBS pH 7,4, Tween 0,05% e adicionada a solução de bloqueio contendo Leite desnatado 10% e albumina bovina (BSA) 0,5% diluída em PBS e incubadas por duas horas a 37°C. Na etapa seguinte as placas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4, Tween 0,05% e foi adicionada a proteína recombinante LigANI purificada nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 µg por poço e incubadas a 37°C por 1 hora e em seguida foram realizadas três lavagens com PBS Tween 20 0,05%. Como controles do teste foram utilizadas as proteínas: LigB7-11 de *L. interrogans Copenhageni*, como controle positivo (Lin et al., 2010) e PsaA de *Streptococcus pneumoniae* (Larentis et al., 2011) como controle negativo. Para LigB 7-11 foi utilizada a concentração de 0,5 µM e para PsaA a concentração foi de 2 µM (maior concentração de LigANI utilizada no teste). A seguir o anticorpo anti-Histidina (SIGMA) foi adicionado na diluição de 1:1.500 em PBS e incubado a 37°C por 1 hora. Após o período de incubação com o anticorpo primário foram realizadas lavagens de acordo com procedimento descrito acima e adicionado o anticorpo IgG anti-camundongo marcado com peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:15.000 em PBS e incubado por 1 hora a 37°C. Ao término deste período, as placas foram lavadas de acordo com o descrito acima e realizada a etapa de revelação, adicionando 100 µL do substrato Tetrametilbenzidina (TMB - Bio-rad) por poço, e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz, e em seguida foram adicionados 50 µL de ácido sulfúrico 2 N por poço para parar a reação. A leitura da placa foi feita a 450 nm em leitora de placas (TECAN).

### 3.8 Ensaios de caracterização físico-química da proteína LigANI purificada

#### 3.8.1 Determinação do ponto isoelétrico:

O ponto isoelétrico (pI) foi estimado a partir de focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE), conforme Phamacia Biotech (1990). Foi utilizado um gel comercial PhastGel® (GE Healthcare) com gradiente de pH 3 a 9 e padrões de pI de 3 a 10 Broad (GE Healthcare), cujas proteínas padrões são: amiloglicosidase (pH 3,50), inibidor de tripsina de soja (pH 4,55),  $\beta$ -lactoglobulina A (pH 5,20), anidrase carbônica B bovina (pH 5,85), anidrase carbônica B humana (pH 6,55), mioglobina ácida de cavalo (pH 6,85), mioglobina básica de cavalo (pH 7,35), lectina ácida de lentilha (pH 8,15), lectina intermediária de lentilha (pH 8,45), lectina básica de lentilha (pH 8,65) e tripsinogênio (pH 9,30). As amostras foram aplicadas no gel em triplicata, com o pente com a capacidade de aplicação de 1  $\mu$ L e 8 amostras. A eletroforese foi realizada no equipamento PhastSystem® (GE Healthcare) com corrente constante de 2.5 mA, voltagem de 2.000 V e duração de 30 minutos. A revelação do gel foi feita em solução aquosa contendo o corante de Coomassie Brilliant Blue R350 (PhastGel Blue R, GE Healthcare) diluído em Metanol 0,1% e ácido acético 10%. Após 1 hora de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel foi descorado por meio de lavagens sucessivas com solução de metanol 30% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi digitalizado e a densitometria das bandas eletroforéticas foi realizada no programa ImageMaster® 1D Prime V3.01.

#### 3.8.2 Determinação da estrutura secundária da proteína recombinante LigANI por Dicroísmo Circular (DC):

As amostras da proteína foram diluídas em tampão Fosfato 50 mM pH 8,0, na concentração de 0,5 mg/mL. Foi utilizado para as análises uma sensibilidade alta; *band width* de 5.00 nm. O escaneamento foi iniciado com 260 nm e finalizado com 190 nm. O escaneamento foi realizado em módulo contínuo, com velocidade de 50 nm/min. O resultado foi obtido a partir da média de três experimentos independentes. O ensaio foi realizado no Espectrômetro CD, modelo JASCO J-815 do Laboratório de Macromoléculas (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

### 3.8.3 Determinação da massa molecular da proteína LigANI recombinante:

#### 3.8.3.1 Cromatografia de exclusão molecular

A massa molecular da proteína LigANI foi determinada através da cromatografia de exclusão molecular (SEC). A amostra na concentração de 100ug foi submetida à SEC com a proteína em tampão PBS pH 7,4 em coluna Superdex 200 10/30 (24 mL) (GE Healthcare). O fluxo da cromatografia foi de 0,5 mL/min e o volume da amostra aplicado foi 200 µL no equipamento AKTA Pure (GE Healthcare). Além da matriz descrita, também utilizamos a coluna TSK SW2000 4,6 mm x 30cm (TOSOH), com fluxo de 0,35 mL/min e volume da amostra aplicado foi de 50 µL no AKTA Purifier (GE Healthcare). Ambas colunas foram previamente calibradas com padrões de massa molecular comerciais (GE Healthcare): Blue Dextran (2000 kDa), Aldolase (150 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa).

#### 3.8.3.2 Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (PAGE)

A homogeneidade e a massa molecular das amostras foram analisadas através de eletroforese em gel nativo utilizando os géis da GE Healthcare (PhastGel) com gradiente de concentração de poliacrilamida de 4 a 12% e/ou 8 a 25%. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem®, com corrente constante de 10 mA, voltagem de 250 V e duração de 30 minutos (Pharmacia Biotech, 1990). O gel foi revelado com solução corante de Coomassie Brilliant Blue R350 (PhastGel Blue R, GE Healthcare) 0,1% em metanol 30% e ácido acético 10%. Após 1 hora de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel foi descorado por meio de lavagens sucessivas com uma solução de metanol 30% e ácido acético 10%. Em seguida, o gel foi digitalizado e a imagem obtida foi analisada no programa ImageMaster® (GE Healthcare).

#### 3.8.3.3 Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

Uma etapa preliminar de preparo da amostra para espectrometria foi a dessalinização da proteína LigANI utilizando ponteiros Zip Tip *desalting* do tipo C4 (Millipore). A fase móvel da análise foi realizada em 70% acetonitrila/ 0,1% ácido fórmico. Para a análise, foram aplicados a 0,3 µL da proteína e 0,3 µL da matriz ácido

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic no espectrômetro de massa (AB Sciex TOF/TOF 5800 Applied Biosystems). Os dados gerados foram analisados pelo sistema operacional TOF/TOF Series explorer software versão 4.0.0). Aproximadamente 10 *scans* foram combinados, a linha de base subtraída e o centróide de cada pico foi determinado.

### 3.9 Desenvolvimento de métodos para controle de processo durante e ao final da purificação:

#### 3.9.1 Avaliação da presença de agregados nas amostras da proteína LigANI recombinante ao final do processo de purificação

##### 3.9.1.1 Avaliação por Espectroscopia de Fluorescência

As amostras foram analisadas na concentração de 0,4 mg/mL, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, no volume de 200  $\mu$ L. Durante a execução do método, foi utilizada uma baixa sensibilidade, com escaneamento de 295 a 415 nm e excitação à 280 nm para uma intensidade de fluorescência e para o espectro de espalhamento de luz, foi utilizado escaneamento de 300 a 340 nm, com excitação a 320 nm. As avaliações do impacto da temperatura variaram na faixa de 25-85°C. As análises foram realizadas no equipamento Fluorímetro (Modelo JASCO FP-6500) do Laboratório de Macromoléculas (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

##### 3.9.1.2 Análise da proteína por Espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* - DLS)

A avaliação da homogeneidade da proteína LigANI foi avaliada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* - DLS). A avaliação foi feita a temperatura ambiente no equipamento Zetasizer IV (Malvern, UK). A proteína foi centrifugada a 20817 x *g* por 10 minutos para remoção de possíveis impurezas e agregados. Em seguida, foi diluída nas concentrações de 1,6, 0,8, 0,4 mg/mL para posterior avaliação. Foram realizadas no mínimo três análises do material e múltiplas aquisições foram realizadas.

### 3.9.2 Quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) residual através de fluorescência

O método estudado e escolhido para a quantificação de ácido nucleico residual nas amostras de proteína purificada foi o método de fluorescência utilizando o kit Qubit® (Thermo Fischer Scientific). As quantificações foram realizadas em tubo de 0,5 mL (Axygen) e inicialmente foi preparada a solução de trabalho na proporção de 1:200, ou seja, 1 parte do reagente Qubit® (fluoróforo) foi diluído 200 vezes em tampão Qubit®, e então os padrões nas concentrações de 0 e 100 ng/μL, foram preparados diluindo-se cada um na solução de trabalho na proporção de 1:20. As amostras também foram preparadas podendo-se diluir cada uma numa faixa de 1-20 μL de amostra para um volume final de 200 μL diluídas em solução de trabalho. Todas as amostras foram colocadas sob agitação de 2-3 segundos antes da leitura em fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fischer Scientific).

### 3.9.3 Quantificação de endotoxinas

#### 3.9.3.1 Teste cinético cromogênico para quantificação de endotoxinas

O teste cinético cromogênico e o ensaio mais sensível e específico disponível para a detecção de endotoxina bacteriana contaminante na amostra (0,0050 UE/mL). O método LAL cromogênico é simples, reprodutível e é realizado através da reação da amostra a ser testada com o reagente LAL. Baseia-se na quantificação da coloração amarela durante a reação que é proporcional à concentração de endotoxinas (ENDOSAFE® ENDOCHROME-K™ - Charles River). Inicialmente foi preparada uma solução contendo a endotoxina padrão na concentração de 50 UE/mL, essa foi homogeneizada por 15 minutos e em seguida foram realizadas as diluições da curva padrão através de diluição seriada nas concentrações de: 5; 0,5; 0,05 e 0,005 UE/mL. Cada diluição foi homogeneizada por 3 minutos em cada etapa.

Em seguida, 100 μL de cada diluição foi aplicado em triplicata em placa de 96 poços, cuidando para que as amostras estejam sempre homogêneas. Para o controle negativo foi utilizada água para injetáveis (WFI). O controle positivo é preparado a partir da dopagem da amostra que consiste na adição de uma concentração de endotoxina já conhecida. A dopagem foi realizada adicionando-se 10 μL do frasco de endotoxina padrão com concentração de 50 UE/mL, quando a concentração final da

dopagem for 5,0 UE/mL ou de 10 µL da diluição 5,0 UE/mL, quando a concentração final da dopagem for 0,5 UE/mL. Esta contaminação proposital da amostra será mais um parâmetro a ser considerado para validar o ensaio e é avaliado em percentual de recuperação, ou seja, a recuperação indica o quanto a amostra dopada está acima ou abaixo do valor esperado. Este parâmetro garante que não há algum interferente que possa potencializar ou inibir a quantificação de endotoxinas na amostra analisada. Após a leitura cinética, espera-se encontrar uma recuperação no intervalo de 50 a 200%. As amostras foram preparadas utilizando água WFI nas seguintes proporções: Extrato total e fração solúvel: 1:100.000 e 1:200.000, IMAC: 1:10.000 e 1: 50.000, Gel filtração, Troca iônica e final: 1:1000.

Os parâmetros de validação do teste seguem os recomendados pela USP, Guideline FDA e Farmacopeia Europeia, como na tabela 5:

Tabela 5. **Parâmetros de validação do teste cinético cromogênico**

<b>Parâmetros</b>	<b>Especificação</b>
Coeficiente de correlação da curva padrão “R”	-1 a -0,98
Inclinação da curva padrão (slope) “a”	- 0,3 a -0,1
y- interseção da curva padrão “b”	2,5 a 3,5
% de recuperação do controle positivo do produto	50 a 200 %
% do coeficiente da variação das replicatas	< 10%

A leitura da placa foi feita a 405 nm no equipamento marca Biotek modelo ELX 808 em modo cinético. Os resultados foram avaliados no software Endoscan-V.

### 3.9.3.2 PTS - Endosafe

Ao final das etapas de processamento das amostras (extrato total, IMAC, Gel filtração e troca iônica) essas foram monitoradas quanto a concentração de endotoxina. As amostras da proteína de três experimentos independentes foram diluídas 1:1000 em água DEPC (DEPC treated water – Invitrogen) e 25 µL da amostra foram inseridos em quadruplicata no cartucho para quantificação no equipamento PTS-Endosafe (Charles Rivers Laboratories).

### 3.10 Estudo de estabilidade da proteína recombinante LigANI

#### 3.10.1 Avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O experimento foi conduzido utilizando amostras de dois experimentos independentes. As alíquotas da proteína recombinante LigANI estocadas no freezer -80°C em tampão PBS pH 7,4, Triton X-100 0,001% foram descongeladas em banho maria com temperatura mantida a 25°C. Este foi considerado 1º ciclo de descongelamento, e em seguida a proteína foi congelada novamente usando nitrogênio líquido e em seguida descongelada em banho maria a 25°C, sendo este o segundo ciclo. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes completando um total de cinco ciclos. Em cada etapa de descongelamento foi retirada uma alíquota para análise por dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, gel desnaturante e antigenicidade com *pool* de soros de pacientes com leptospirose com o intuito de verificar a integridade da proteína recombinante LigANI e estabilidade após o estresse.

#### 3.10.2 Avaliação de termoestabilidade acelerada de curto período (*Short term accelerated stability*)

A proteína recombinante LigANI purificada armazenada em freezer -70°C foi descongelada e mantida a temperatura ambiente por mais 1 mês. A cada semana, uma alíquota foi retirada para análise por dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, gel desnaturante e antigenicidade com *pool* de soros de pacientes com leptospirose. Este experimento foi realizado também na ausência e presença de inibidor de protease (Protease inhibitor cocktail set I- Calbiochem).

#### 3.10.3 Avaliação da estabilidade da proteína em diferentes condições de armazenamento

A proteína recombinante LigANI obtida ao final das três etapas de purificação foi estocada em três diferentes condições: Tampão HEPES 50 mM pH 6,8, Fosfato de Sódio pH 7,4 (NaCl 0,04 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8 mM) e PBS pH 7,4, Triton X-100 0,001%. As amostras foram congeladas a -80°C e uma parte delas foi liofilizada durante 24 horas (Liofilizador LioTop modelo: K105). A partir dessa etapa, parte das alíquotas permaneceram estocadas a -80°C e parte delas foi acondicionada nas

temperaturas a serem testadas: -20°C e 2-8°C. As amostras submetidas a liofilização foram estocadas a temperatura ambiente e a 2-8°C. A partir de então as amostras submetidas a diferentes condições de armazenagem foram avaliadas a cada 30 dias, até completar 120 dias por SDS-PAGE 12,5%, *imunoblotting* com pool de soros de pacientes com leptospirose e ensaio de adesão a proteínas de matriz com o objetivo de verificar a integridade da proteína nas diferentes condições.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cultivo em fermentador para obtenção da biomassa expressando a proteína recombinante LigANI:

Para estabelecimento dos processos de purificação e posterior caracterização da proteína recombinante LigANI foram realizados cultivos em fermentador de 2,5 L. Inicialmente, os parâmetros de concentração de IPTG e tempo de cultivo pré-indução foram otimizados e estabelecidos no microfermentador Fogale, essas condições foram validadas em três experimentos independentes e os resultados demonstraram um rendimento de expressão de  $276,60 \pm 26,35$  mg/L de LigANI solúvel. A condição de cultivo otimizada no microfermentador foi escalonada em 25 vezes e validada em três experimentos independentes com aumento da produtividade para  $396,60 \pm 17,45$  mg/L de LigANI solúvel. As condições finais do processo fermentativo foram utilizadas na produção dos lotes de biomassa para o estabelecimento das metodologias para purificação da proteína recombinante LigANI. Foram realizados três experimentos independentes onde foram obtidas  $2295,03 \pm 538,19$  mg de proteína total na fração solúvel, dentre estas  $46,41 \pm 8,10\%$  correspondem a proteína recombinante LigANI, totalizando uma produtividade específica de 1058 mg de LigANI/litro de cultivo, sendo 679,72 mg/mL de LigANI na fração solúvel. A diferença observada a partir da comparação entre a produtividade obtida em fermentador de 2,5 L na comparação com o microbiorreator foi obtida a partir de densitometria utilizando 5  $\mu$ g de BSA como padrão de massa, enquanto que os resultados demonstrados a partir de cultivo de três experimentos independentes foram obtidos a partir de densitometria utilizando curva padrão de massa seca de LigANI.

A avaliação da expressão foi monitorada em todos os lotes produzidos através de SDS-PAGE com alíquotas do cultivo antes e após a indução com IPTG de acordo com a figura 2. A fim de avaliar possíveis alterações da sequência codificante durante todo processo de expansão do cultivo e fermentação, o que poderia impactar na identidade da sequência com mutações silenciosas e que não poderiam alterar a sequência da proteína e nível de expressão, foi realizado o sequenciamento nucleotídico do DNA plasmidial obtido a partir dos lotes semente, trabalho e cultivos em alta densidade (fermentação) para produção da proteína recombinante LigANI. Este material foi sequenciado utilizando sequências iniciadoras que anelam em diferentes partes do gene e o alinhamento realizado através do programa DNA star, a partir da sequência do lote de trabalho e da sequência depositada no GenBank

(AY221109.1). O resultado demonstrou que a sequência do gene extraído do vetor de expressão nas diferentes etapas de cultivo tinha 100% de identidade com a sequência original. O resultado do alinhamento entre as diversas sequências pode ser observado no anexo 1.

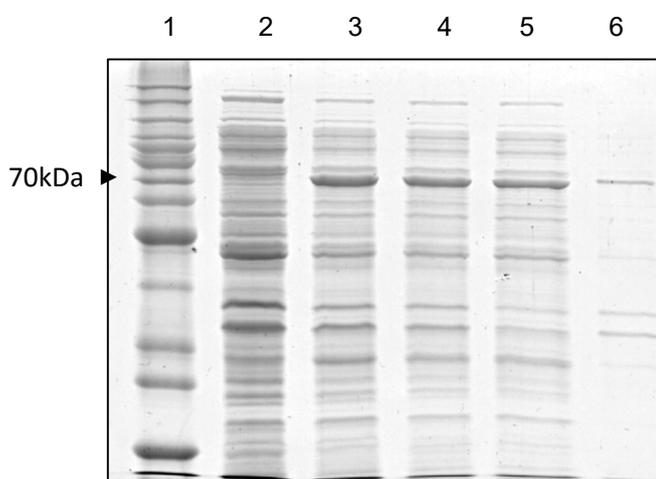


Figura 3. **Expressão da proteína recombinante LigANI em *E. coli*.**

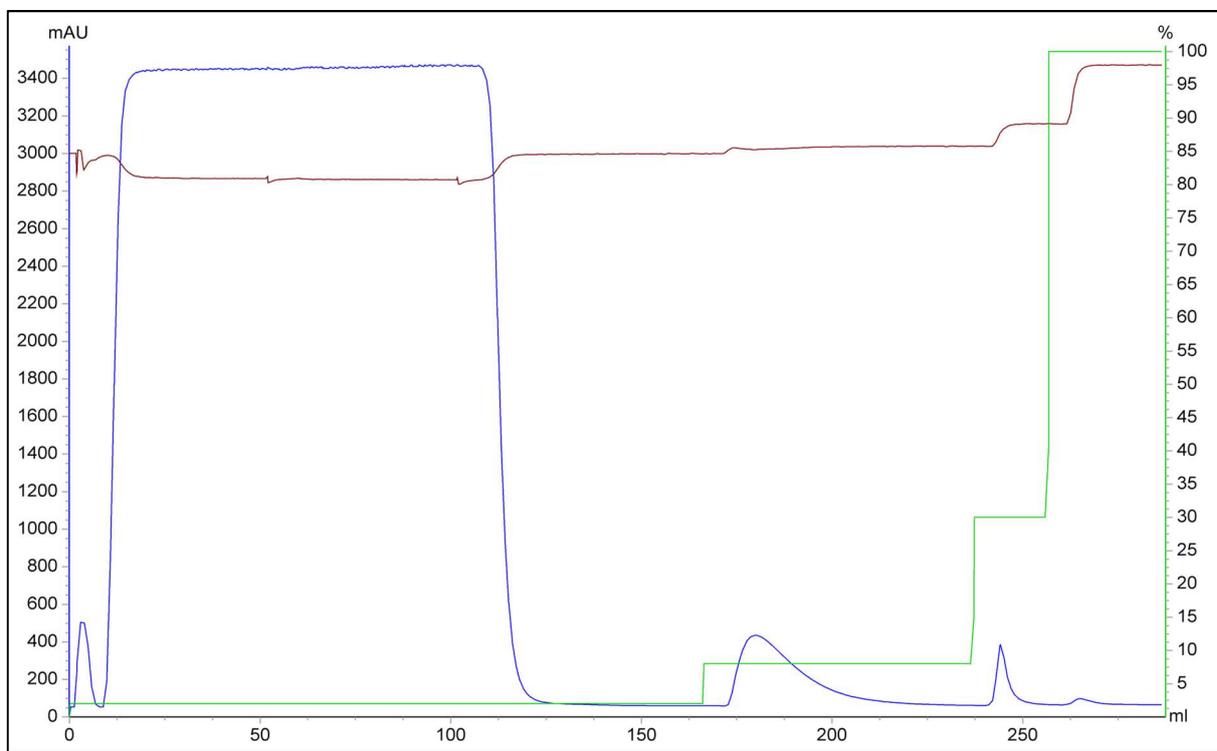
SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent, onde foram aplicados 10uL das amostras a seguir: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fisher Scientific), 2- cultivo celular antes da indução com IPTG, 3- cultivo celular após indução com IPTG, 4- extrato total, 5- fração solúvel e 6- fração insolúvel.

#### 4.2 Lise e clarificação para obtenção da proteína recombinante LigANI:

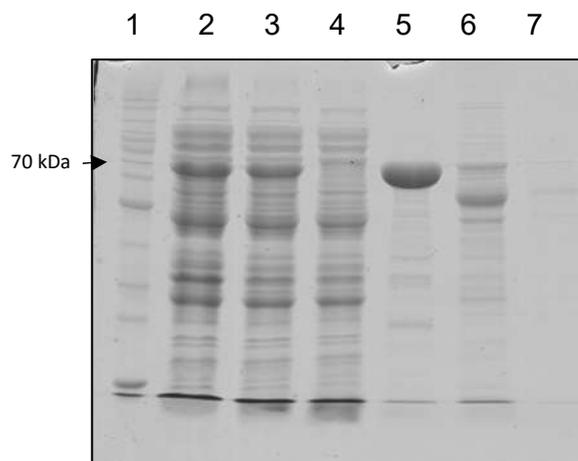
Com objetivo de definir as condições para rompimento celular com parâmetros escalonáveis foram avaliados: o homogeneizador (GEA Niro Soavi modelo: NS1001L2K) e a prensa (Thermo Fischer Scientific). É importante ressaltar que as metodologias foram escolhidas visando um possível escalonamento. Dessa forma, a sonicação foi utilizada como controle, cujo resultado pode ser observado na figura 4. A fim de demonstrar a eficiência dos métodos, a viabilidade celular, o perfil eletroforético da proteína recombinante obtido a partir da cromatografia de afinidade e o rendimento de cada etapa foram avaliados. Os resultados não demonstraram alterações no perfil cromatográfico e eletroforético do material processado entre os métodos: sonicação, prensa e homogeneizador como podemos observar nas figuras 4, 5 e 6. A partir do método empregado na cromatografia de afinidade, o cromatograma obtido a partir das três metodologias manteve o mesmo padrão e a visualização do gel de poliacrilamida referente a cada processo demonstrou a integridade da proteína LigANI uma vez que não possível verificar degradação. Foi observado o aumento do rendimento da proteína LigANI quando foram utilizados os

métodos de rompimento celular, homogeneizador e a prensa como pode ser visualizado nos resultados apresentados na tabela 6.

**A**

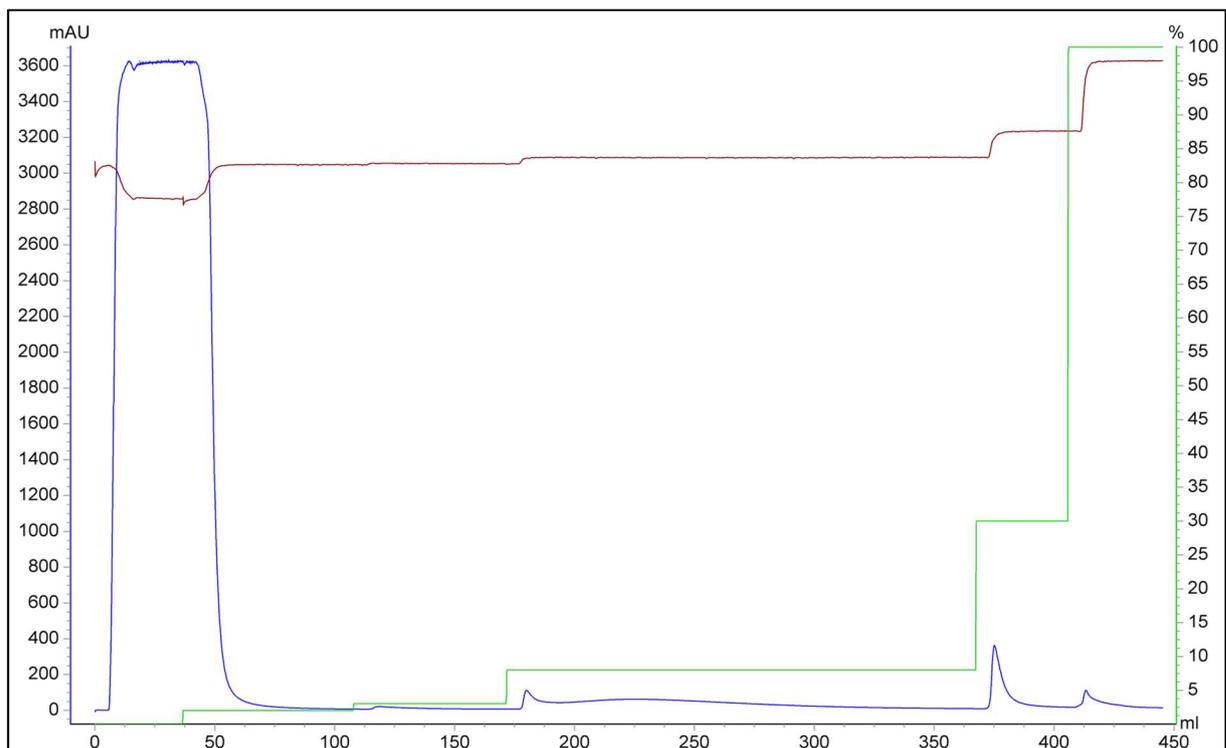
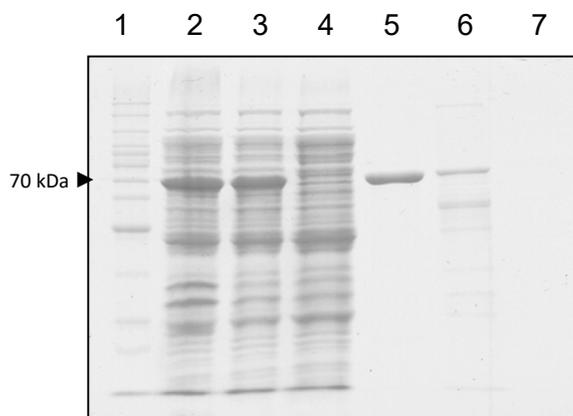


**B**



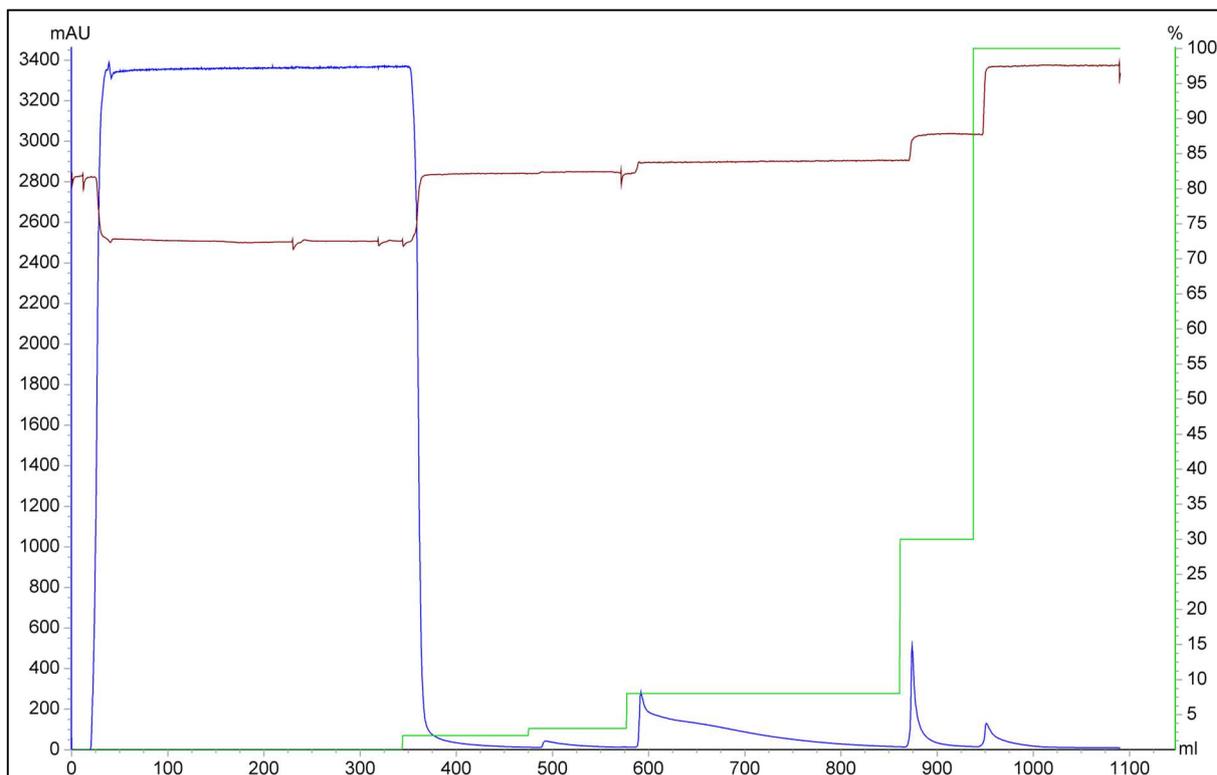
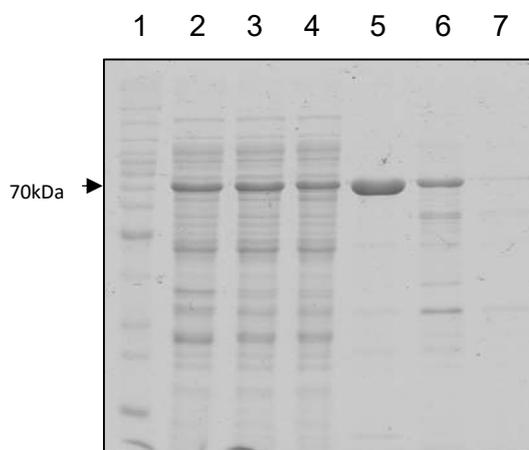
**Figura 4. Ruptura celular a partir de sonicador.**

A - Perfil cromatográfico da IMAC, em azul- densidade óptica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição (%B), marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent das frações obtidas na cromatografia de afinidade: 1- marcador de peso molecular (Bench mark, Thermo Fisher Scientific); 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- lavagem da coluna com solução tampão contendo 20 mM de Imidazol, 5- eluição com 80 mM de Imidazol, 6- lavagem com 300 mM de Imidazol e 7- lavagem com 1 M de Imidazol.

**A****B**

**Figura 5. Ruptura celular a partir de prensa.**

A - Perfil cromatográfico da IMAC, em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição (%B), marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent das frações obtidas na cromatografia de afinidade: 1- marcador de peso molecular (Bench mark, Thermo Fischer Scientific); 2-extrato total, 3- fração solúvel, 4- lavagem da coluna com solução tampão contendo 20 mM de Imidazol, 5- eluição com 80 mM de Imidazol, 6- lavagem com 300 mM de Imidazol e 7- lavagem com 1 M de Imidazol.

**A****B****Figura 6. Ruptura celular a partir de homogeneizador.**

A - Perfil cromatográfico da IMAC com lisado obtido a partir do homogeneizador, em azul-densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e coloração com Gel code blue stain reagent das frações obtidas na cromatografia de afinidade: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fischer Scientific); 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- fração solúvel 16 h a 4°C, 5- eluição com 80 mM de Imidazol, 6- lavagem com 300 mM de Imidazol, e 7- lavagem com 1 M de Imidazol.

Os métodos de rompimento de celular com homogeneizador e a prensa demonstraram ser eficientes e os níveis de recuperação da proteína recombinante LigANI se mostraram equivalentes como pode ser observado na tabela 6. A prensa não se demonstrou totalmente eficiente no rompimento celular, uma vez que o material processado quando plaqueado em meio LB apresentou bactérias viáveis no extrato total,  $10^2$  CFU/mL. Diante dos resultados de viabilidade e recuperação da proteína, optou-se pelo homogeneizador, uma vez que o rendimento da proteína obtida a partir desta técnica foi equivalente entre as metodologias avaliadas, além de ser a metodologia que apresentou os resultados mais consistentes e reprodutíveis.

Tabela 6. **Comparação entre os rendimentos obtidos através dos diferentes métodos de ruptura celular.**

<b>Métodos de rompimento celular</b>	<b>Etapa da purificação</b>	<b>Proteína total (mg/L)<sup>a</sup></b>	<b>Recuperação de LigANI (mg/L)<sup>a</sup>(%)<sup>b</sup></b>
<b>Sonicação</b>	Extrato total	1420,15	540,8 (100)
	Fração solúvel	1144,58	404,45 (74,8)
<b>Prensa</b>	Extrato total	3060,61	1234,0 (100)
	Fração solúvel	2208,63	802,61 (65,0)
<b>Homogeneizador</b>	Extrato total	3695,31	1701,7 (100)
	Fração solúvel	2965,57	1143,7(67,2)

<sup>a</sup>A quantificação de proteínas totais de cada etapa de purificação foi obtida através do método de BCA.

<sup>b</sup> Os dados de rendimento foram calculados por densitometria a partir da eletroforese por SDS-PAGE12,5% com as amostras das frações proteicas acima.

#### 4.3 Estabelecimento de Métodos e Processos de Purificação para proteína recombinante LigANI:

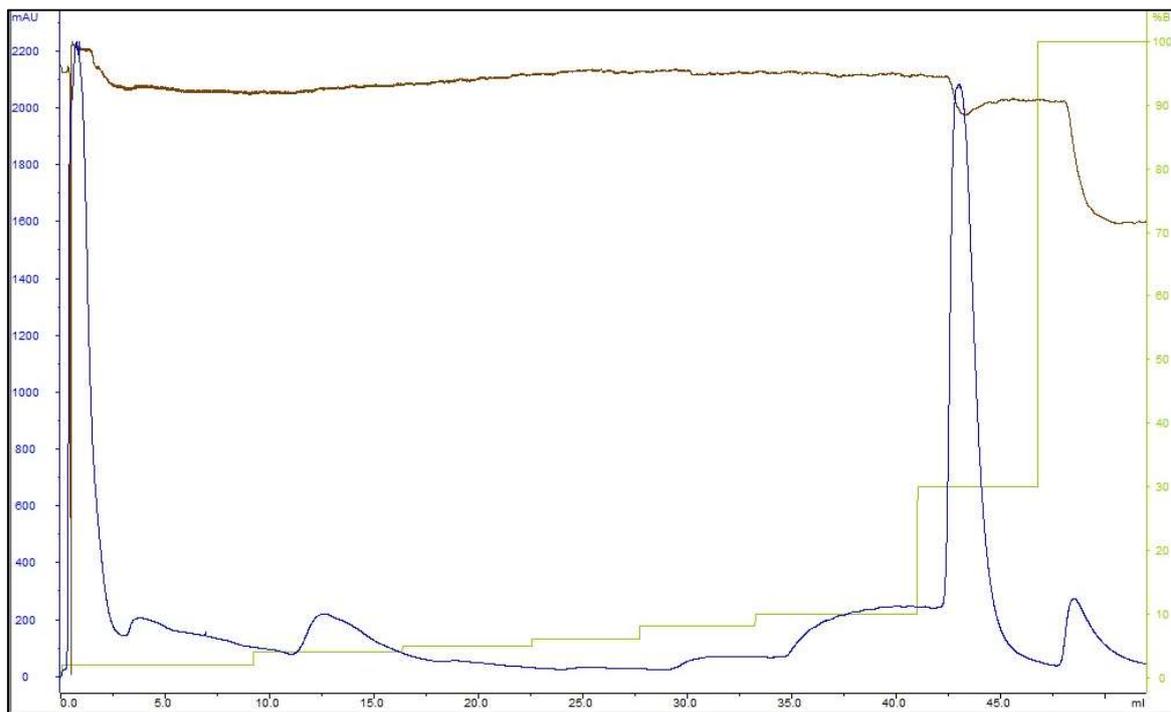
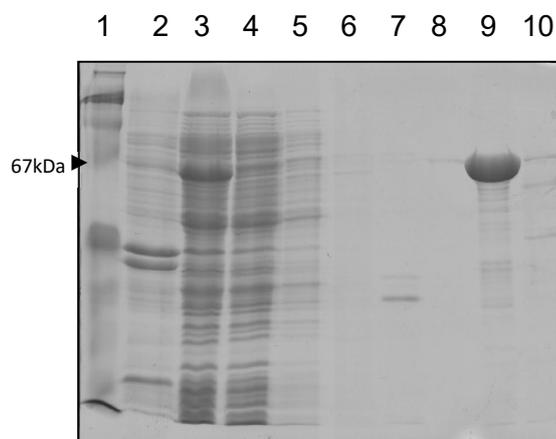
##### 4.3.1 Otimização das condições da Cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC):

Com o objetivo de estabelecer as condições da cromatografia de afinidade, inicialmente foram realizados testes utilizando concentrações crescentes de Cloreto de Sódio (NaCl) nos tampões da purificação. As concentrações de sal avaliadas foram: 100, 300 e 500 mM adicionadas ao tampão de lise Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, Imidazol 20 mM, Triton X-100 0,1% com o propósito de aumentar o grau de pureza da proteína. Inicialmente, as avaliações foram feitas utilizando aproximadamente 1g de massa úmida lisada, o que equivale a 100 mg de proteína total, e resina pré-empacotada Histrap HP de 1 mL.

A condição de 100 mM de NaCl foi testada inicialmente utilizando lavagens de 40, 80 e 100 mM de Imidazol e a eluição foi feita com 300 mM deste. Nesta tentativa,

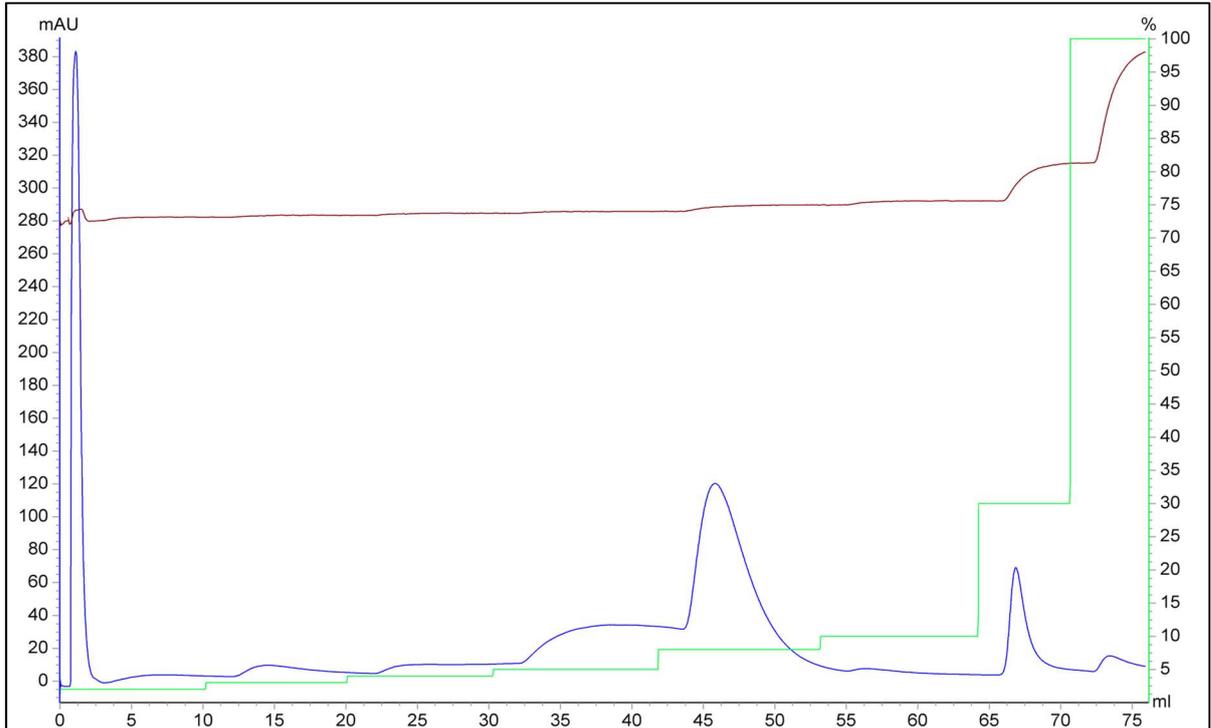
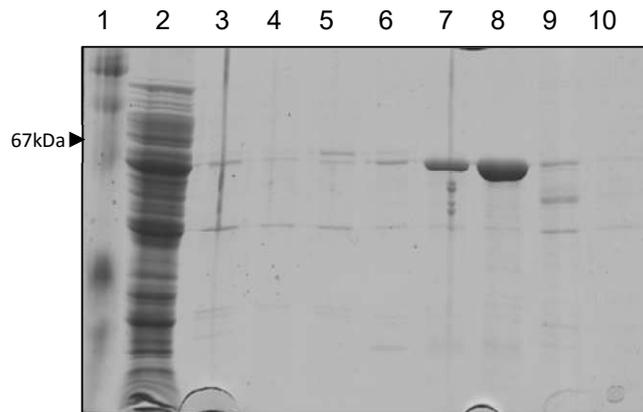
a proteína começou a ser eluída com a concentração de 80 mM de Imidazol, o que acarretou numa diminuição do rendimento da proteína total. Diante dos dados, a concentração de imidazol na etapa de lavagem foi reduzida de 80 para 60 mM. Então, o método foi avaliado com lavagens com tampão com as concentrações 40 e 60 mM de Imidazol. De acordo com o cromatograma, que pode ser observado na figura 6, é possível verificar três picos mais evidentes a 280 nm, que correspondem em ordem: lavagem com 20 mM de Imidazol, eluição com 300 mM de Imidazol (pico maior) e lavagem da coluna com 1 M de Imidazol. A proteína foi eluída com 300 mM de Imidazol como pode ser observado a partir do cromatograma e visualização do gel de poliacrilamida, contudo contaminantes eluíram em conjunto com a proteína de interesse o que compromete o grau de pureza da proteína LigANI (Figura 7).

Diante dos resultados, foi avaliada a condição com a adição de 300 mM de NaCl aos tampões da purificação, na tentativa de melhorar a recuperação e obter altos níveis de pureza. Para tal, foi utilizada a metodologia de *step* com lavagem com concentrações de Imidazol de: 40, 60, 80 e 100 mM. Os dados demonstram que a proteína iniciou a sua eluição a partir de 60 mM. Diante das observações dos resultados foi realizado um novo experimento alterando as condições de lavagem, onde foram avaliadas as concentrações de 40, 50 e 100 mM de Imidazol. O resultado demonstrou que houve pequena perda da proteína na lavagem de 50 mM, entretanto foi possível separar os contaminantes da fração contendo a proteína de interesse, que foi eluída na concentração de 100 mM de Imidazol. Contudo, como o grau de homogeneidade não foi satisfatório, foi realizado novo experimento com as etapas de lavagem: 30, 40 50, 80 e 100 mM de Imidazol. De acordo com a figura 8, é possível visualizar a partir do cromatograma uma pequena perda da proteína na lavagem de 50 mM, o que foi confirmado pelo gel de poliacrilamida e corresponde a uma perda de 21% em relação ao rendimento total. O resultado demonstrou também que foi possível separar os contaminantes da fração contendo a proteína de interesse, que foi eluída na concentração de 80 mM de Imidazol, contudo, o grau de homogeneidade não foi satisfatório. Estes resultados serviram de base para as alterações que foram feitas nas avaliações com a adição de 500 mM de NaCl nos tampões da IMAC.

**A****B**

**Figura 7. Cromatografia de afinidade com adição de 100 mM de NaCl aos tampões da purificação**

A- Cromatograma relativo à metodologia utilizada na cromatografia de afinidade testando tampões com 100 mM de Sal, e lavagens de 40 e 60 mM de Imidazol. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code Blue stain reagent. Em 1- marcador de peso molecular, 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- fração solúvel após adsorção a resina, 5 e 6- lavagem com tampão contendo 20 mM de Imidazol, 7- lavagem com tampão contendo 40 mM de Imidazol, 8- lavagem com tampão contendo 60 mM de Imidazol, 9- eluição com tampão contendo 300 mM de Imidazol, 10- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol.

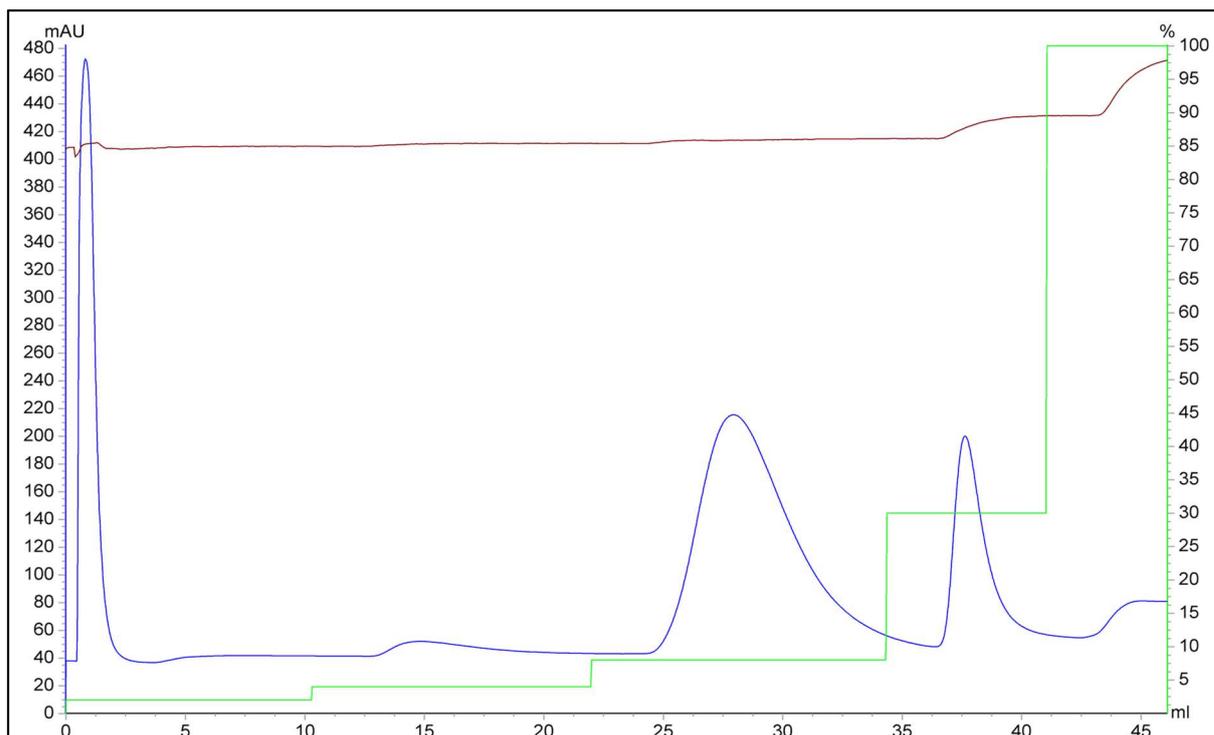
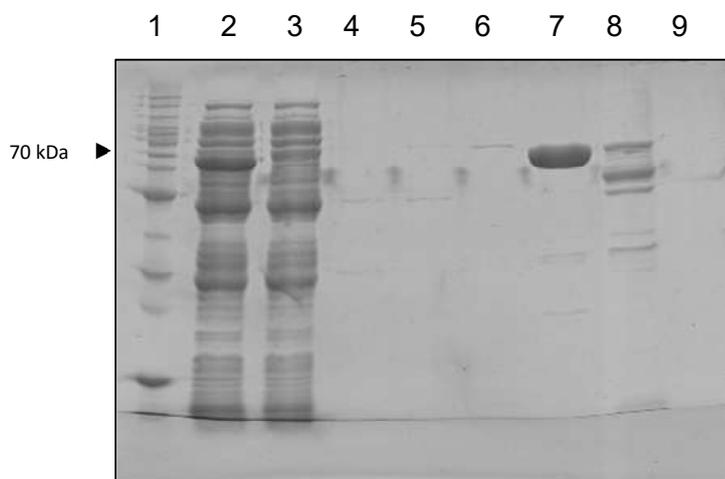
**A****B**

**Figura 8. Cromatografia de afinidade com adição de 300 mM de NaCl aos tampões da purificação**

A- Cromatograma relativo à metodologia utilizada na cromatografia de afinidade testando a concentração de 300 mM de Sal, e lavagens de 30, 40 e 50 mM de Imidazol. Em azul-densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent. Em 1- marcador de peso molecular, 2- fração solúvel, 3- fração solúvel após adsorção a resina, 4- lavagem da coluna com tampão contendo 20 mM de Imidazol, 5- lavagem com tampão contendo 30 mM de Imidazol, 6- lavagem com tampão contendo 40 mM de Imidazol, 7- lavagem com tampão contendo 50 mM de Imidazol, 8- eluição com tampão contendo 80 mM de Imidazol, 9- lavagem com tampão contendo 300mM de Imidazol, 10- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol.

Os resultados obtidos com a adição de 300 mM de NaCl foram importantes, pois foi observado que os contaminantes podem ser separados da fração de eluição da proteína rLigANI nas concentrações maiores de Imidazol, e que as etapas de lavagem devem ser nas faixas de concentrações de Imidazol entre 20 e 40 mM. Diante dos dados preliminares, foi feito um experimento inicial com 500 mM de NaCl e lavagens de 40 e 60 mM de Imidazol, e eluição com 80 mM de Imidazol, entretanto ainda nos deparamos com a eluição prévia da proteína durante a etapa de lavagem com a concentração de 60 mM de Imidazol. Uma nova avaliação foi realizada com ajustes, lavagens com as concentrações de 20 e 40 mM de Imidazol. Como pode ser observado na figura 8, de acordo com o cromatograma é possível observar somente dois picos majoritários correspondentes a fração de eluição com 80 mM de Imidazol e fração contendo 300 mM de Imidazol referente aos contaminantes, o que foi confirmado através do gel de poliacrilamida. Enfim os resultados se mostraram satisfatórios e a proteína LigANI foi eluída majoritariamente na fração contendo 80 mM de Imidazol com grau de pureza de 98,8% determinado através de densitometria em gel de SDS-PAGE 12,5% como pode ser observado na figura 9, enquanto parte dos contaminantes foram separados na fração eluída contendo a concentração de 300 mM de Imidazol, acarretando numa recuperação de 90% de LigANI.

De acordo com o cromatograma e a eletroforese em gel de poliacrilamida, podemos observar que a partir dessa metodologia, foi possível isolar a proteína de interesse dos contaminantes com alto grau de pureza. A partir da definição do protocolo de purificação, foram determinados os seguintes parâmetros: quantidade de proteína total a ser carregada na cromatografia IMAC, metodologia de dessalinização, resina e condições da cromatografia de troca iônica e padronização da metodologia.

**A****B**

**Figura 9. Cromatografia de afinidade com adição de 500mM de NaCl aos tampões da purificação**

A- Cromatograma relativo à metodologia utilizada na cromatografia de afinidade testando a concentração de 500 mM de Sal, e lavagens de 20 e 40 mM de Imidazol. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS) B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent. Em 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fischer Scientific), 2- extrato total, 3- fração solúvel após adsorção a resina, 4 e 5- lavagem com tampão contendo 20 mM de Imidazol, 6- lavagem com tampão contendo 40 mM de Imidazol, 7- eluição da proteína com 80 mM de Imidazol, 8- lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol, 9- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol.

#### 4.3.2 Dessalinização da proteína LigANI:

A dessalinização é uma importante etapa no processo de purificação, esta foi realizada entre as etapas de cromatografia de afinidade e a cromatografia de troca iônica. Foram avaliadas as metodologias de filtração tangencial e a cromatografia de gel filtração, com o objetivo de realizar a troca de tampão com a menor perda de proteína durante o processo. Nos diferentes protocolos aplicamos uma massa total de 100 mg de LigANI.

A filtração tangencial foi realizada com uma membrana com poro de 30 kDa e tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 a ser utilizado na cromatografia de troca iônica, e o resultado desta avaliação pode ser observado na figura 10.

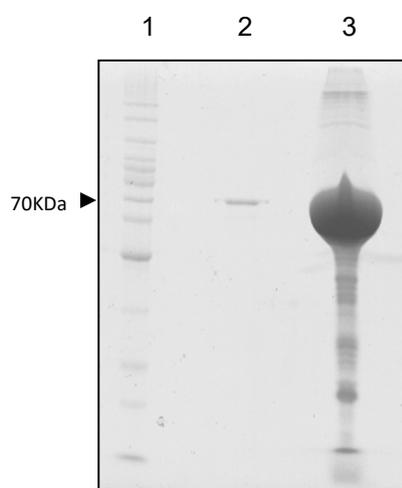
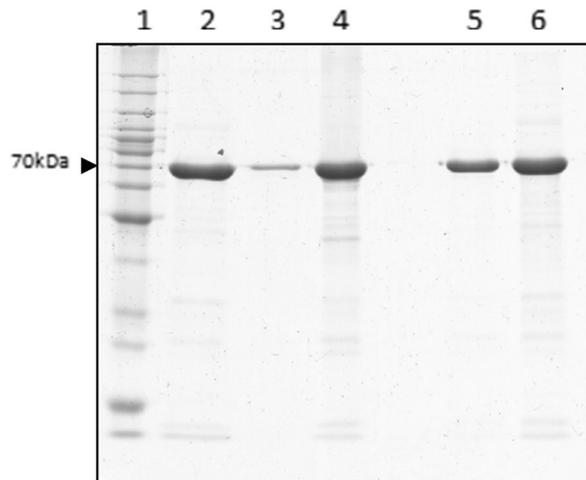


Figura 10. **Filtração tangencial com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0.** SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent com as frações obtidas a partir da filtração tangencial. Em 1: marcador de peso molecular, 2- sobrenadante do retido, 3- precipitado do retido.

O resultado obtido não foi satisfatório. Foi observada a precipitação da proteína rLigANI durante o processo de dessalinização em quantidade além das aceitáveis, o que causaria impacto no rendimento final como pode ser observado na figura 10. Para minimizar perdas, foram avaliados dois outros tampões (Borato 50 mM pH 8,0 e Fosfato 50 mM pH 8,0), uma vez que a filtração tangencial é a metodologia mais indicada para processos de escalonamento no *downstream*.



**Figura 11. Filtração tangencial com os tampões Borato 50 mM pH 8,0 e Fosfato 50 mM pH 8,0.**

SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent. Em 1: marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fisher Scientific), 2- rLigANI (IMAC), 3- Sobrenadante Filtração tangencial em tampão Borato 50 mM pH 8,0, 4- precipitado Filtração tangencial Tampão Borato 50 mM pH 8,0, 5- Sobrenadante Filtração tangencial em tampão Fosfato pH 8,0, 6- precipitado da Filtração tangencial em tampão Fosfato 50 mM pH 8,0.

O processo de filtração tangencial na condição com o tampão fosfato 50 mM pH 8,0 foi a que apresentou o melhor resultado. Entretanto, a partir da quantificação por BCA, estimou-se que houve uma perda de 75% da proteína total utilizada no processo de dessalinização, neste sistema foi recuperado, como observado no SDS-PAGE 12,5% (figura 11). Os resultados usando a metodologia de filtração tangencial, quando avaliada nas condições testadas neste trabalho, não foram satisfatórios.

Outra metodologia avaliada para dessalinização da proteína foi a cromatografia de gel filtração testada como etapa prévia à cromatografia de troca aniônica. Neste caso foi utilizado como fase móvel a solução tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e a eficiência do protocolo foi monitorado através da quantificação de proteínas pelo método de BCA. Foi recuperado aproximadamente 88% da proteína LigANI com a utilização desta metodologia. A eficiência dos dados está representada na figura 12, onde pode-se observar um cromatograma típico de uma cromatografia de gel filtração, onde em azul é observado o aumento da absorbância relativo a proteína de interesse, e em marrom, o aumento da condutividade, confirmando a retirada do Sal da amostra.

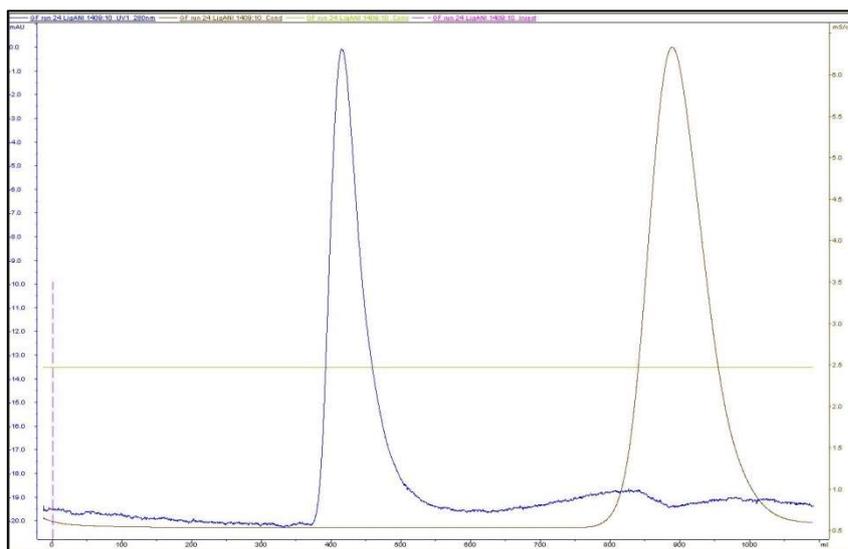


Figura 12. **Cromatograma relativo a cromatografia de gel filtração**  
Em azul o pico referente a proteína LigANI e em marrom o pico relativo a condutividade.

#### 4.3.3 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica foi a metodologia de escolha para polimento no processo de produção da proteína recombinante LigANI. Foram avaliadas diferentes metodologias e resinas de troca aniônica e catiônica, buscando altos rendimentos, minimização das perdas e obtenção da proteína LigANI com alto grau de pureza. Estas metodologias foram avaliadas comparativamente utilizando amostras da IMAC (1 mg/mL) e dessalinizadas por gel filtração (0,8 mg/mL), com o objetivo de definir a metodologia ideal para troca iônica, respeitando principalmente o critério de maior recuperação da amostra.

#### 4.3.4 Cromatografia de troca aniônica:

A troca aniônica foi a primeira metodologia avaliada e a resina testada foi Hi Trap Q FF (GE Healthcare), que tem como características: matriz constituída de agarose formando uma rede, é um trocador aniônico forte que tem alta capacidade de ligação e é facilmente escalonável. O tampão Tris-HCl 20 mM foi avaliado com pH: 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. Dessa forma, foi realizado um teste de ligação da proteína a resina em pequena escala utilizando em torno de 1 mg da proteína LigANI. Na figura 12, o gel de poliácridamida demonstra os resultados da eficiência de ligação da proteína LigANI nas diferentes faixas de pH. As avaliações com as faixas de pH 8,0; 9,0 e 10,0 não demonstraram diferenças significativas entre elas. A proteína se ligou a resina em todas as condições avaliadas, sendo que nas faixas de pH 8,0; 9,0 e 10,0 foi

observada uma diminuição na proporção de contaminantes em relação a amostra aplicada e uma recuperação de 85,5% da proteína LigANI em relação ao total. Para dar continuidade à padronização do método foi selecionada a condição de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, por ter demonstrado resultado satisfatório e também por ser a mesma faixa de pH utilizada nos tampões da IMAC.

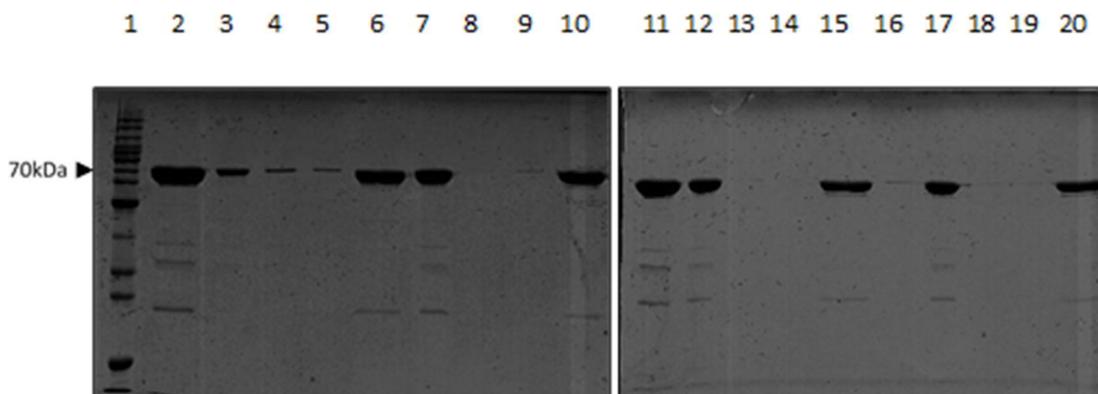


Figura 13. **Determinação do pH ideal do tampão Tris-HCl 20 mM para resina Q FF**

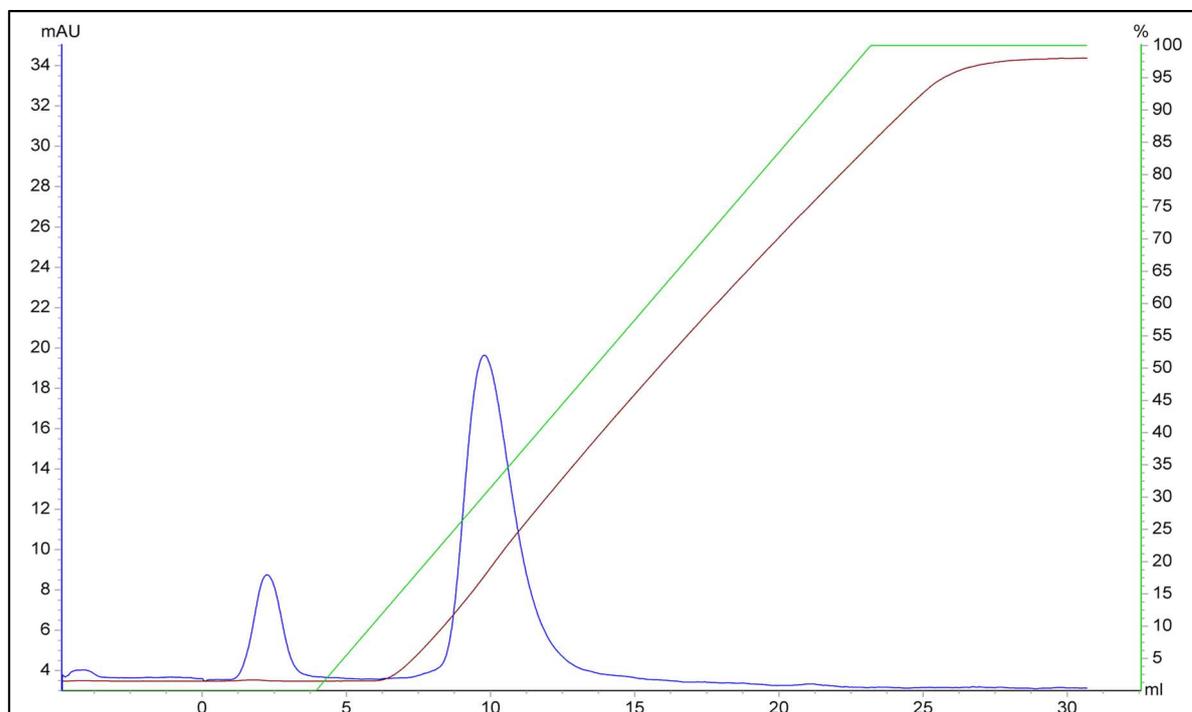
SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent com as frações obtidas a partir do teste com tampão Tris-HCl 20 mM com pH entre 7 e 10. Em 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fisher Scientific), 2- Fração eluída da IMAC, 3- LigANI dessalinizada em pH 7, 4- Fração de LigANI não ligada a resina, 5- lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7, 6- Fração referente a eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0, 7- LigANI dessalinizada em pH 8,0 8- Fração de LigANI não ligada a resina, 9- lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, 10- Fração referente a eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, 11- Fração eluída da IMAC, 12- LigANI dessalinizada em pH 9, 13- Fração de LigANI não ligada a resina, 14- lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM pH 9, 15- Fração referente a eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 9, 16- lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, 17- LigANI dessalinizada em pH10, 18- Fração de LigANI não ligada a resina, 19- lavagem da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM pH 10, 20- Fração referente a eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 10.

Com a triagem e escolha do tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 foi iniciada a etapa de padronização da metodologia de purificação por troca iônica. Inicialmente, foi utilizada a metodologia de gradiente, a fim de definir a melhor concentração de NaCl com a qual a proteína inicia a sua eluição. A figura 14 mostra o cromatograma relativo a avaliação e o gel de SDS-PAGE 12,5% com as frações obtidas.

O resultado obtido foi satisfatório e foi observado que a proteína começou a ser eluída da resina a partir da concentração de 190 mM de NaCl. Na sequência da padronização do método, foi realizado experimento com a metodologia de *step* a fim de avaliar a homogeneidade da proteína purificada. Uma vez que o cromatograma apresentou um pico único de eluição, foi estabelecido que o método teria apenas uma lavagem com dez volumes de coluna do tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e em seguida seria realizada a eluição da proteína LigANI com Tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0,

NaCl 300 mM. O resultado deste experimento pode ser observado na figura 15, onde observamos um pico único referente a proteína LigANI.

**A**



**B**

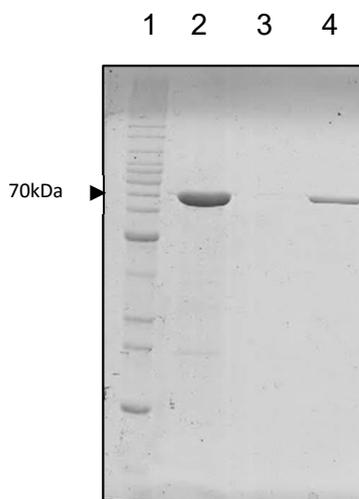


Figura 14. **Gradiente de NaCl em cromatografia de troca aniônica com resina QFF.**

A- Cromatograma relativo a avaliação do gradiente de NaCl na eluição da proteína LigANI com a resina Q FF. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent. Em 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder, Thermo Fisher Scientific), 2- fração IMAC dessalinizada com Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 3- fração correspondente ao pico da lavagem com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 4- fração correspondente ao pico do gradiente de Sal.

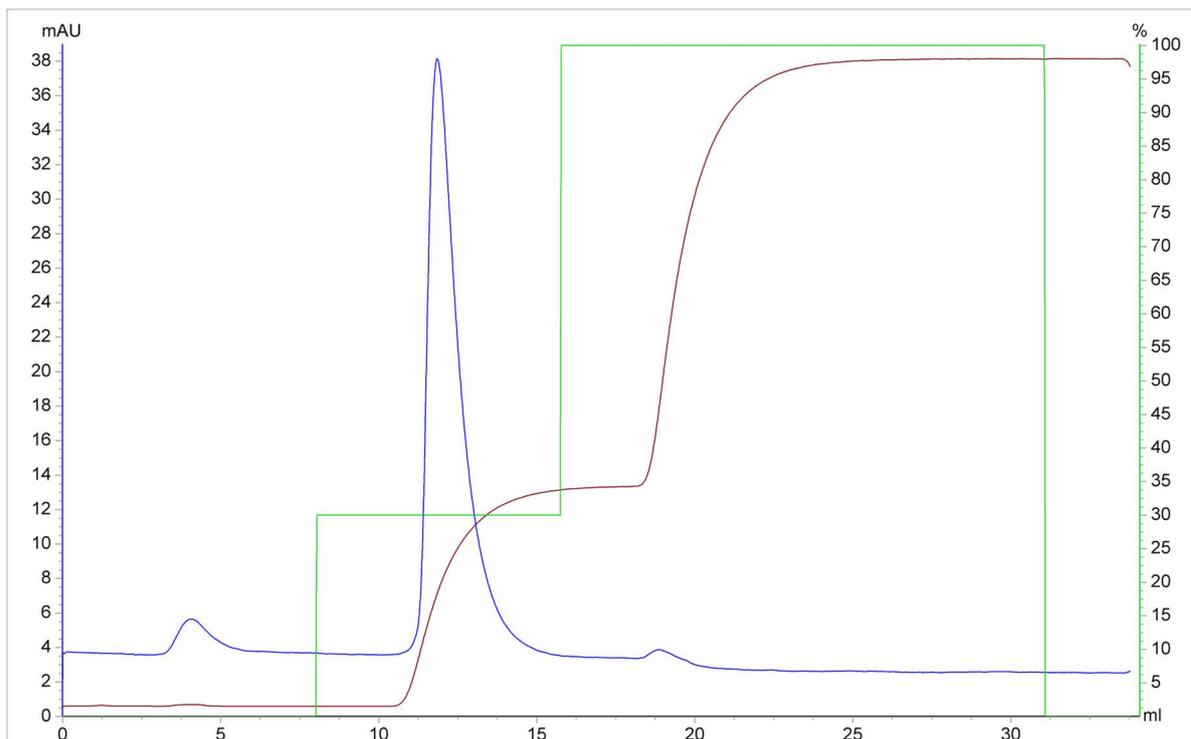
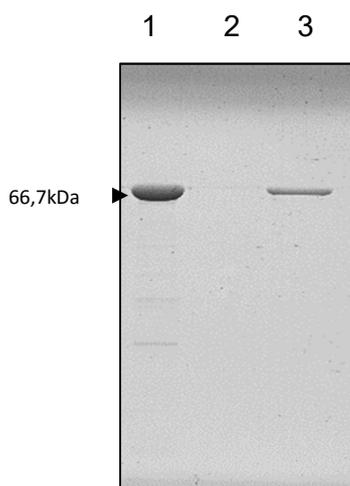
**A****B**

Figura 15. **Metodologia de step na troca aniônica com resina Q FF.**

A- Cromatograma relativo a metodologia de *step* utilizada para a purificação da proteína LigANI. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent com as frações da purificação com a resina Q FF onde foram aplicados 10  $\mu$ L de cada. 1- Fração da IMAC, 2- lavagem com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, 3- eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 / Cloreto de Sódio 300 mM.

Os resultados obtidos foram satisfatórios e em seguida utilizados para determinação das condições do escalonamento.

#### 4.3.5 Cromatografia de Troca catiônica:

Uma vez que a proteína recombinante LigANI possui um ponto isoelétrico de 6,94, apresenta uma distribuição de cargas próxima da neutralidade, dessa forma a estratégia de cromatografia de troca iônica pode ser aplicada tanto na estratégia catiônica ou aniônica ou seja ambas poderiam ser adotadas para a segunda etapa do *downstream processing* de LigANI. Diante dessa observação, diferentes resinas de troca catiônica foram avaliadas. As resinas foram comparadas a partir da observação do perfil cromatográfico e recuperação da amostra.

Inicialmente, foi avaliada a resina CAPTO MMC que é composta por uma matriz de agarose que possui um ligante que pode interagir com a proteína de interesse priorizando interações iônicas ou interações hidrofóbicas. Diversos testes foram realizados, entre eles: aplicação das amostras de proteínas da purificação da IMAC (1 mg da proteína não diluída e diluída cinco vezes em Tampão Acetato) e dessalinizada (diluída em Tampão Acetato 25 mM pH 4.5). As amostras foram eluídas na presença de tampão Fosfato 50 mM/ NaCl 1 M pH 8,0). Contudo, os resultados desse experimento não foram satisfatórios, e as amostras obtidas a partir da cromatografia afinidade e dessalinizadas se ligaram parcialmente a resina como pode ser visualizado na figura 16. De acordo com o cromatograma é possível observar um pico na etapa de lavagem da resina, e outro de baixa intensidade durante o gradiente, mostrando que apenas uma pequena parte da proteína foi eluída.

Diante dos resultados com a matriz catiônica CAPTO MMC, avaliamos a resina CIM Multus SO<sub>3</sub> como opção de cromatografia de troca catiônica. A CIM Multus SO<sub>3</sub> tem como matriz (poly glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), que forma uma rede altamente porosa que permite a aplicação de fluxos maiores do que outras resinas convencionais. A área de superfície maior permite aumentar a capacidade de ligação à proteína de interesse, além de ser facilmente escalonável.

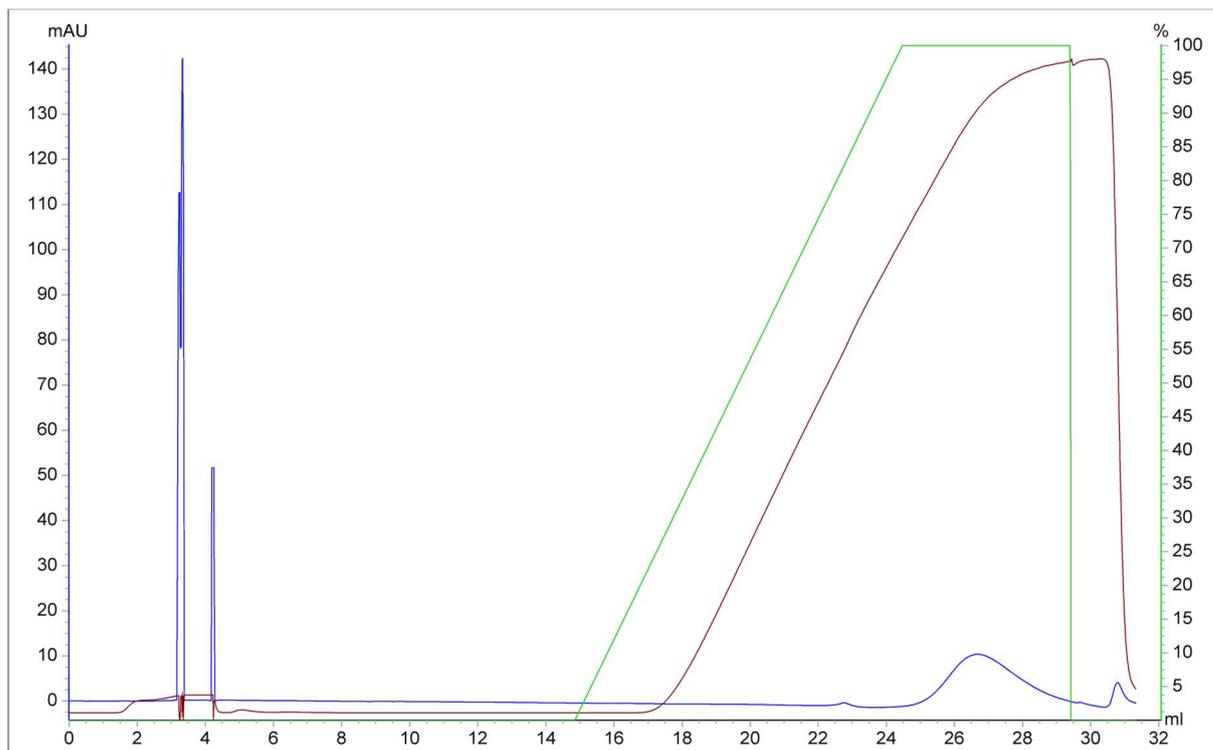
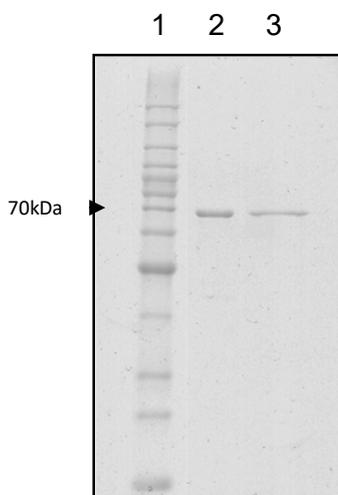
**A****B**

Figura 16. **Cromatografia de troca catiônica com resina CAPTO MMC.**

A- Cromatograma relativo a troca catiônica com a coluna pré-empacotada CAPTO MMC utilizando como amostra fração de eluição da IMAC previamente dessalinizada em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5. Em azul- densidade óptica a 280nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS) B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent. Em 1- marcador de peso molecular (Bench Mark protein ladder), 2- amostra aplicada, 3- fração eluída com tampão Fosfato 50 mM / NaCl 1 M pH 8.

A amostra de LigANI dessalinizada em tampão Acetato 25 mM pH 4,5. O tampão Acetato foi usado como tampão de ligação e na eluição foi utilizado tampão Fosfato 50 mM, NaCl 1 M pH 8,0. Infelizmente os resultados com essa estratégia não foram satisfatórios, de acordo com o cromatograma da figura 17 pode ser observado um pico inicial na etapa de lavagem, mostrando que a proteína não se ligou a matriz, o outro pico não foi considerado significativo em virtude de a DO ser muito baixa. Diante dos resultados obtidos, a utilização desta resina foi descartada como possível estratégia nessa etapa.

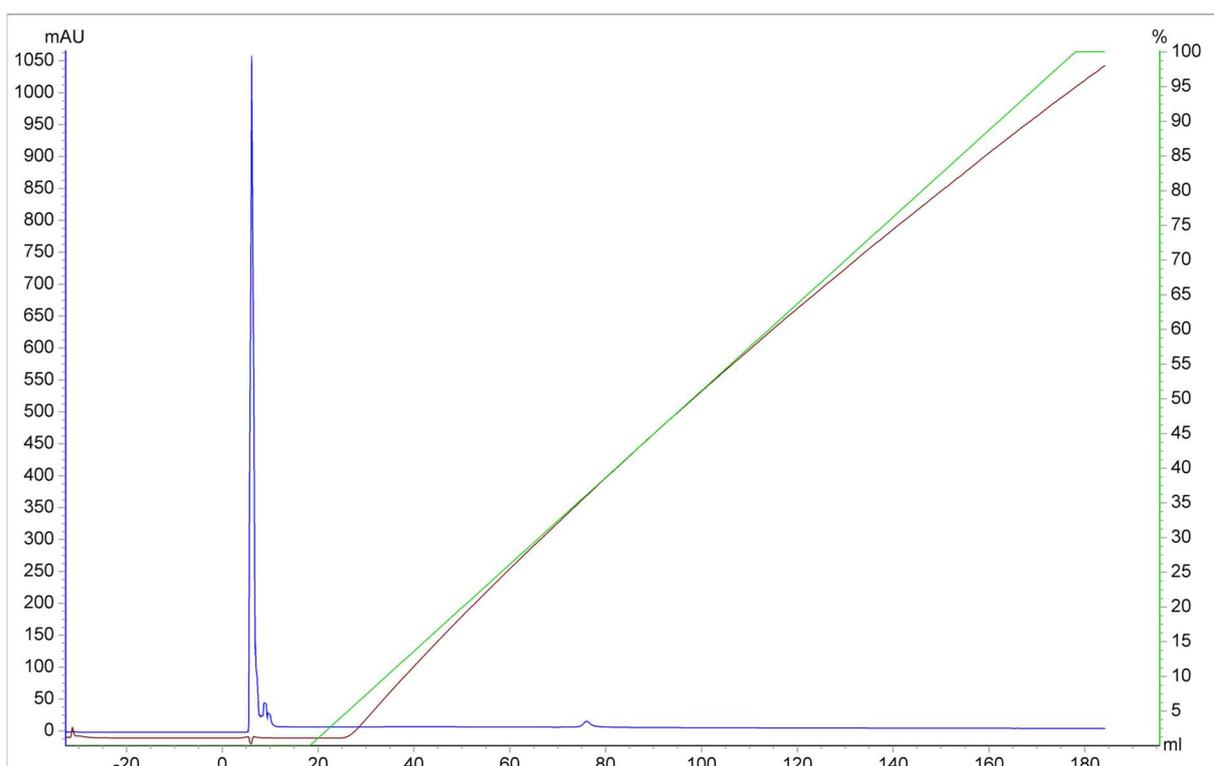


Figura 17. **Cromatografia de troca catiônica com resina CIM Multus SO<sub>3</sub>.** Cromatograma relativo a troca catiônica com a coluna pré-empacotada CIM Multus SO<sub>3</sub> (BIA Separations), utilizando como amostra fração de eluição da IMAC previamente dessalinizada em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS)

A resina Hi Trap SP FF (GE Healthcare) tem como matriz a agarose formando uma rede, é um trocador catiônico forte, tem alta capacidade de ligação e é facilmente escalonável. Esta resina foi avaliada de duas formas diferentes: diluindo a fração proteica 1:5 da IMAC em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5 e dessalinização prévia da amostra. A figura 18 demonstra o cromatograma do teste realizado com a proteína dessalinizada em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5 e ao comparar com os testes realizados com outras resinas foi observado um perfil bem diferente. O resultado

demonstra que a proteína se ligou a resina e é possível visualizar aumento da absorvância ao longo do gradiente relativo a eluição da proteína de interesse.

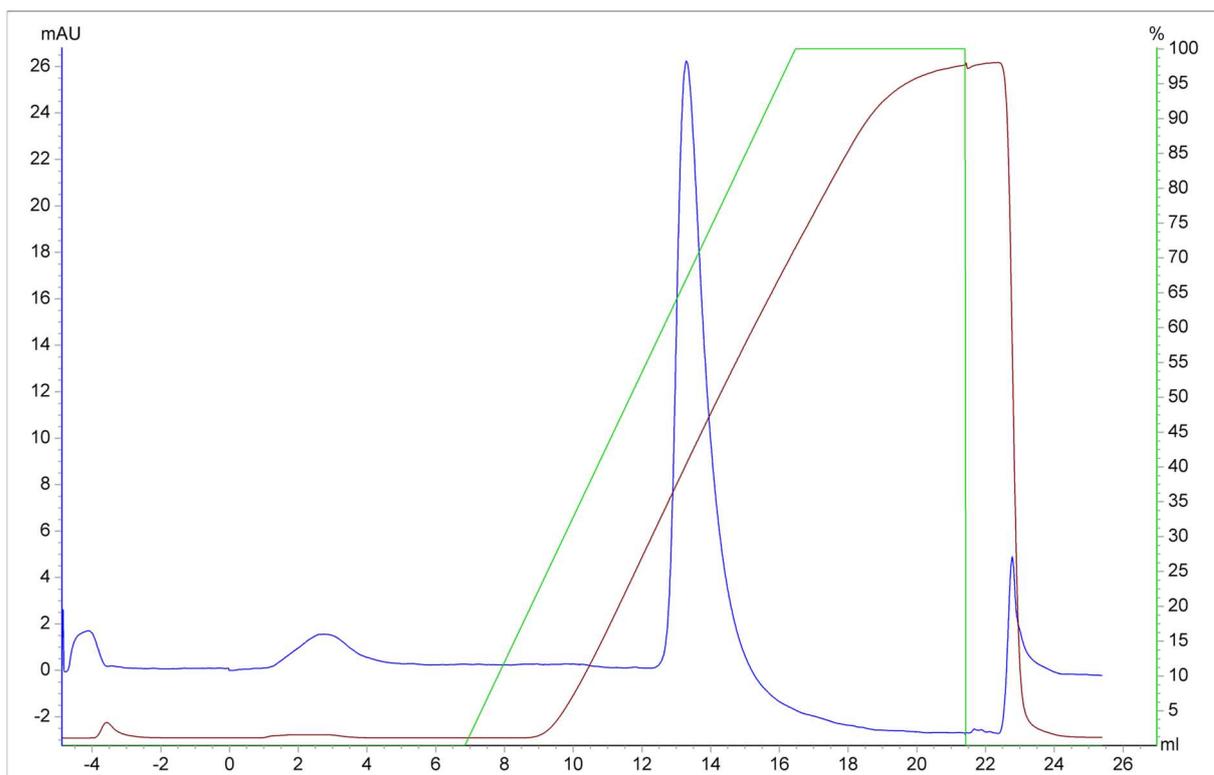


Figura 18. **Cromatografia de troca catiônica com resina SP FF.**

Cromatograma relativo a troca catiônica com a coluna pré-empacotada HiTrap SP FF 1 mL (GE Healthcare), utilizando como amostra fração de eluição da IMAC previamente dessalinizada em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS)

A diluição da amostra proveniente da IMAC foi uma abordagem para eliminar a etapa de dessalinização após a IMAC. O resultado obtido nesta estratégia foi parcialmente satisfatório. A proteína aplicada na resina não se ligou totalmente a matriz cromatográfica, ocasionando perdas de rendimento durante o processo como pode ser observado na figura 19, onde é possível verificar um pico inicial referente a proteína que não aderiu a resina.

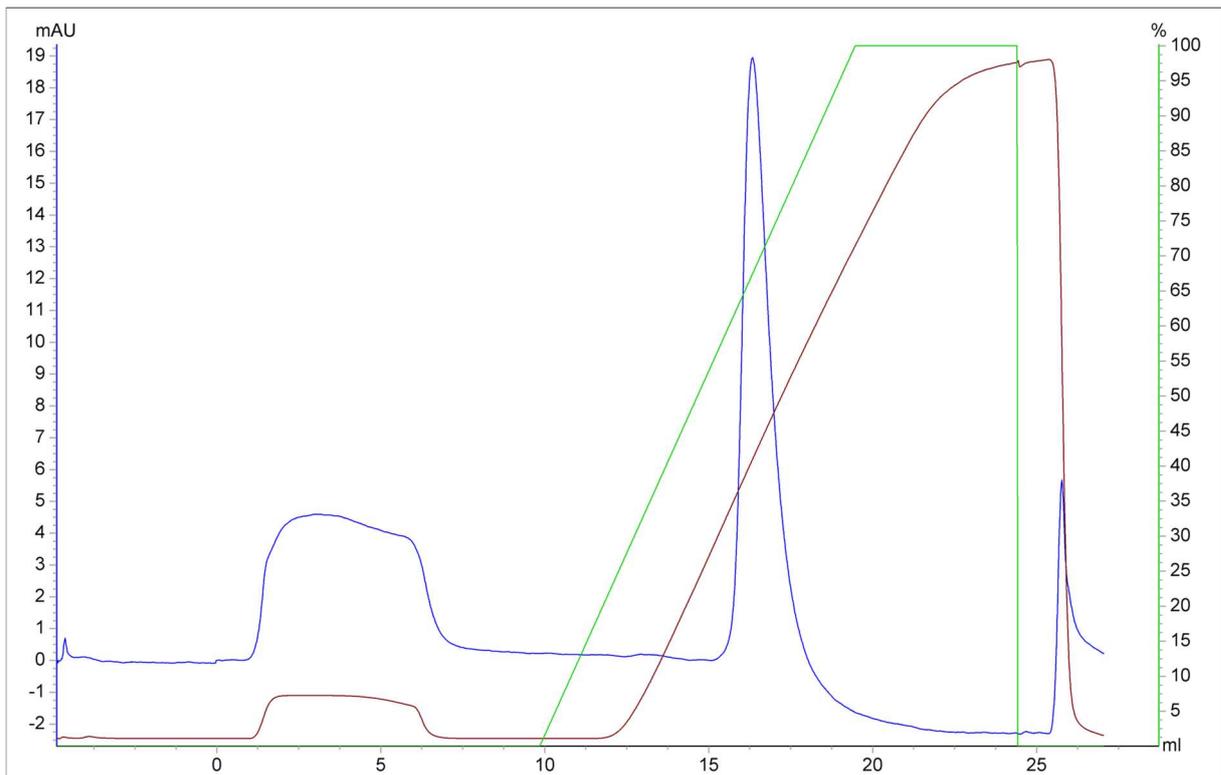


Figura 19. **Cromatografia de troca catiônica com resina SP FF.**

Cromatograma relativo a troca catiônica com a coluna pré-empacotada SP FF 1 mL (GE Healthcare), utilizando como amostra fração de eluição da IMAC diluída na proporção de 1:5 em Tampão Acetato 25 mM pH 4,5. Em azul- densidade óptica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS).

Diante dos resultados obtidos e utilizando critérios como capacidade de ligação da proteína a resina e recuperação de proteína em cada método testado, foi definido que a resina SP FF obteve o melhor desempenho dentre as testadas e seu desempenho foi comparado ao da resina Q FF na troca aniônica, a partir da verificação da homogeneidade e rendimento de proteína LigANI ao final das etapas.

#### 4.3.6 Determinação da relação concentração de proteína vs. volume de resina e o impacto no rendimento:

Os ensaios para definição da metodologia utilizaram 1 g de massa úmida processado para 1 mL de resina pré-empacotada, o equivalente a aproximadamente 100 mg de proteína total aplicada. A fim de iniciar o escalonamento da purificação foi importante determinar a quantidade de proteína total a ser aplicada na primeira etapa cromatográfica.

A primeira avaliação foi realizada com material produzido a partir da lise de 10 g de sedimento bacteriano por sonicação. A estratégia foi usar essa proporção de

proteína total, ou seja, para cada 500 mg - 5 mL de resina. Ao passo que a concentração de proteína foi aumentada, a concentração de resina foi aumentada proporcionalmente a fim de observar se o comportamento obtido na condição de pequena escala poderia ser reproduzido em escala maior. Nesta etapa utilizamos até 10 mL de resina, através de duas 2 colunas Hi Trap HP de 5 mL (GE Healthcare) conectadas.

A metodologia que forneceu os resultados mais reprodutíveis no item 3.1 acima (que trata do estabelecimento da cromatografia de afinidade) foi repetida (vide resultado na figura 10), o qual foi tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1%, Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM pH 8,0 e lavagens com 20 e 40 mM de Imidazol. O perfil cromatográfico obtido não foi reproduzido e tivemos a eluição prévia da proteína na etapa de lavagem com 40 mM de Imidazol, como pode ser visualizado no SDS-PAGE da figura 20. De acordo com o cromatograma foi possível observar um aumento da absorbância com o aumento da concentração de Imidazol de 20 para 40 mM, e a mesma não retornou para a linha de base quando do início da eluição de LigANI. No SDS-PAGE foi possível observar que a proteína iniciou a sua eluição no aumento da concentração de Imidazol de 20 para 40 mM, diferente do resultado obtido nas etapas de padronização da metodologia em uma escala menor.

Diante dos resultados descritos acima, o experimento foi reformulado diminuindo a concentração de Imidazol de 40 para 30 mM na lavagem, com o intuito de não prejudicar o rendimento de proteína de interesse e sua obtenção com grau satisfatório de pureza. O resultado pode ser observado na figura 21, no qual a proteína LigANI foi obtida com 97,4% de pureza e 15 % de recuperação em relação a concentração de proteína total aplicada na resina.

Na fase de avaliação dos sistemas de ruptura celular, foi definido o sistema lise mecânica por homogenizador, baseados nos seguintes motivos: resultados satisfatórios na lise das células, recuperação de proteína total e solubilidade, e além disso por ser um método escalonável. No experimento de padronização e estabelecimento do método partimos de 20 g de biomassa para 200 mL de tampão de lise. No experimento abaixo (figura 22) apresentamos os resultados de IMAC o qual purificamos a proteína LigANI a partir de uma biomassa de 20 g para 10 mL de resina. Dados obtidos demonstraram que a proteína foi obtida com grau de pureza de 98,8 % e rendimento de 265 mg de LigANI por litro de cultivo.

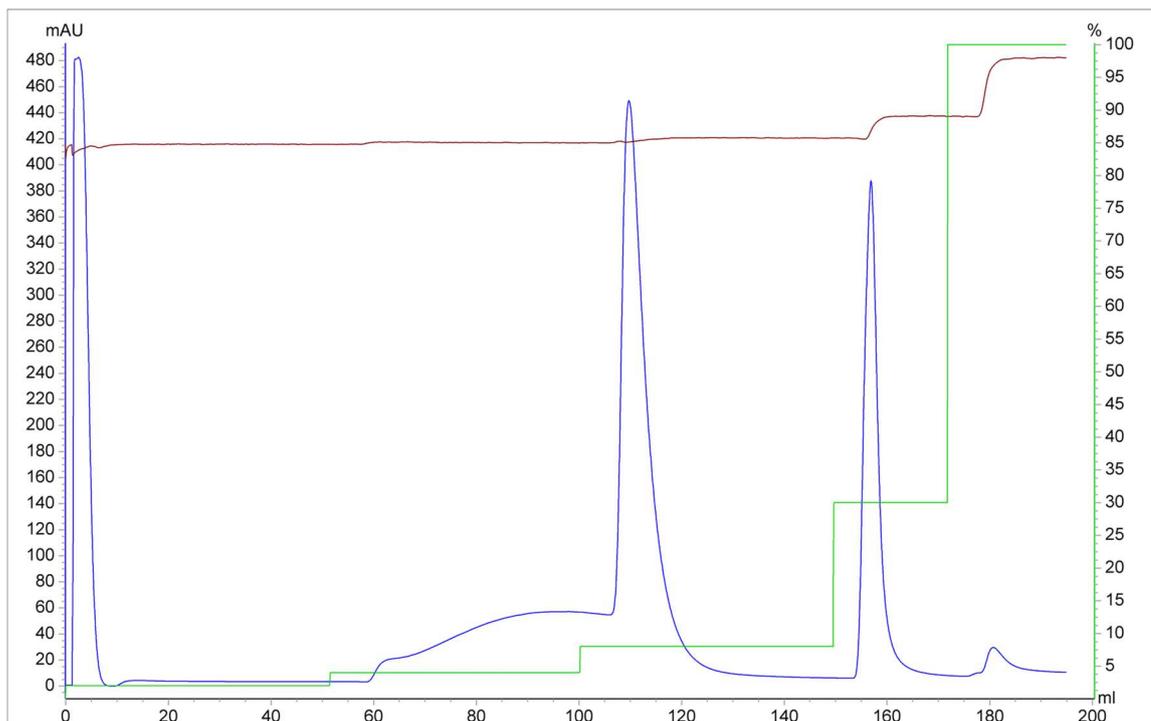
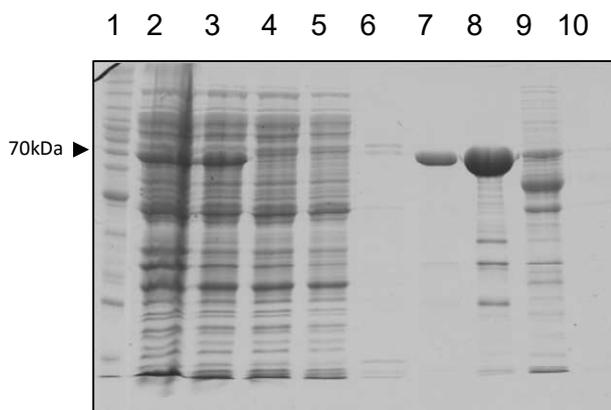
**A****B**

Figura 20. **Estabelecimento das condições de escalonamento para IMAC.**

A- Cromatograma relativo a IMAC testando as condições de escalonamento. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 10  $\mu$ L de cada fração da cromatografia, a seguir: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder), 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- fração solúvel após adsorção a resina, 5- lavagem com tampão Tris-HCl 20 mM, 6- lavagem com tampão Tris-HCl 20 mM, 7- lavagem com tampão contendo 40 mM de Imidazol, 8- eluição com lavagem com tampão contendo 80 mM de Imidazol, 9- lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol, 10- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol

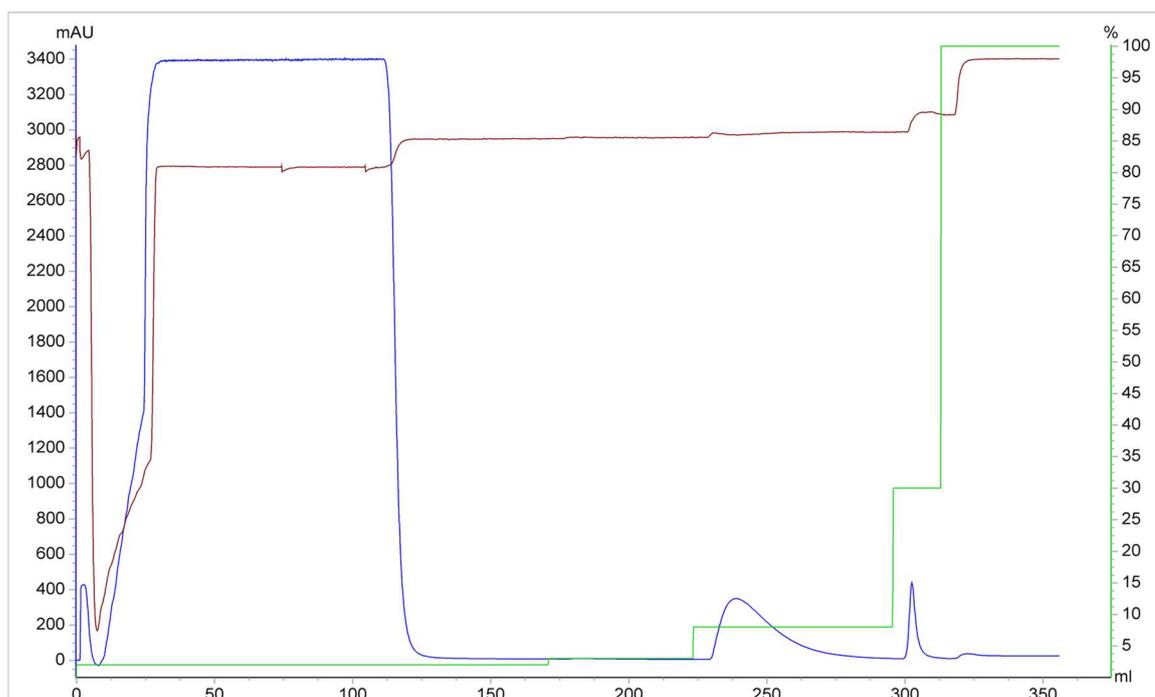
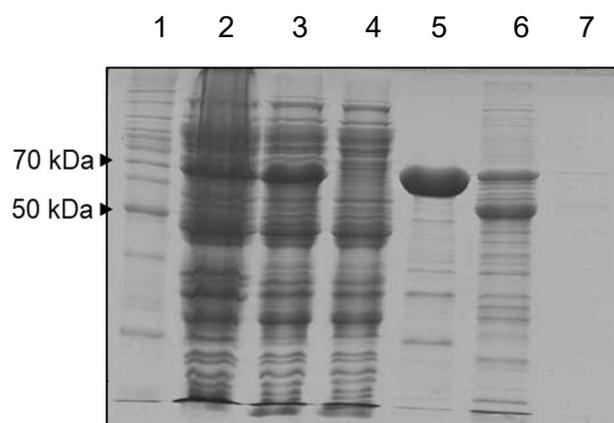
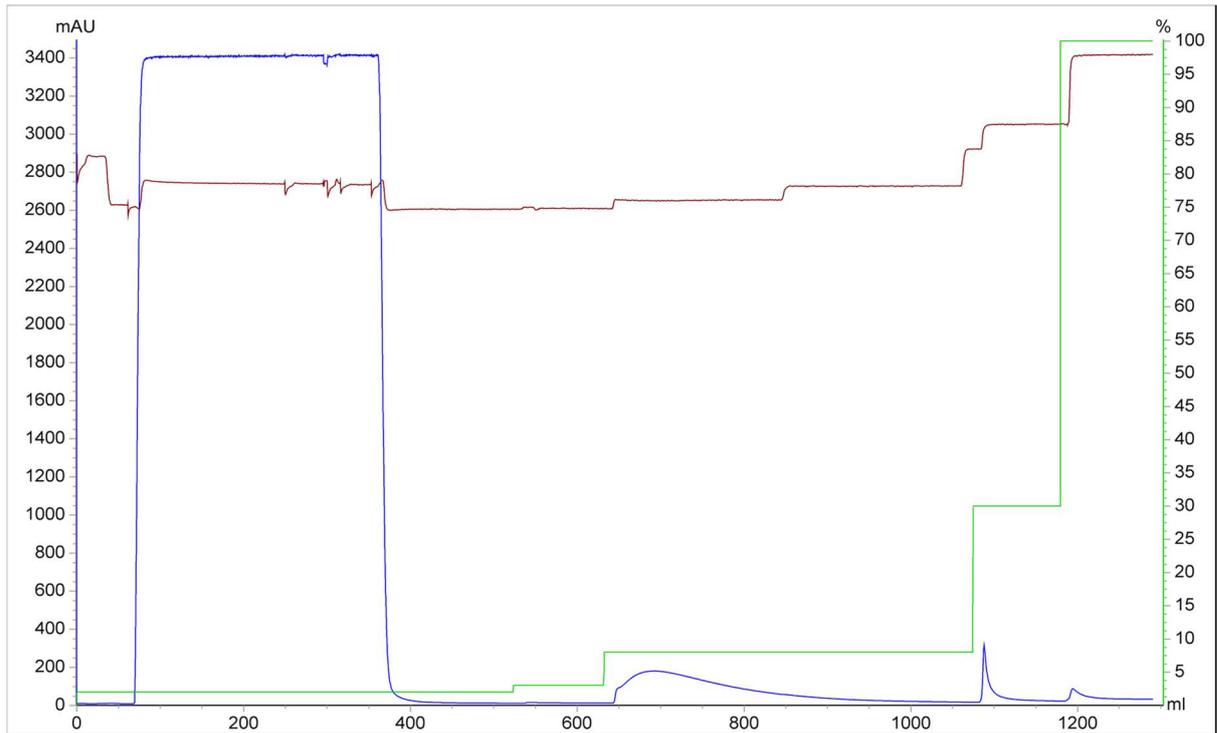
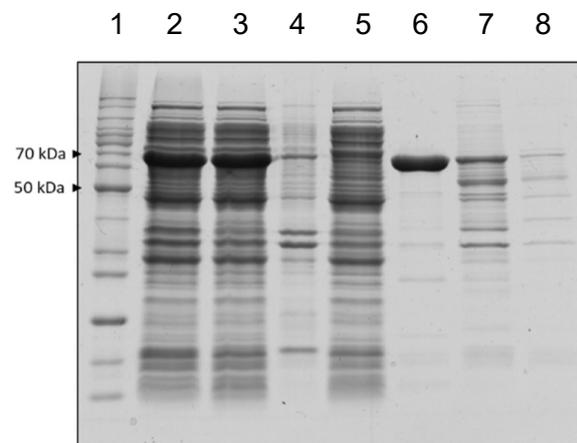
**A****B**

Figura 21. **Ajuste da etapa de lavagem para padronização da metodologia de escalonamento para IMAC**

A- Cromatograma relativo a IMAC com etapa de lavagem com tampão contendo 30mM de Imidazol. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 10  $\mu$ L de cada fração da cromatografia, a seguir: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder), 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- fração após adsorção a resina, 5- eluição com tampão contendo 80 mM de Imidazol, 6- lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol, 7- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol.

**A****B**

**Figura 22. Demonstração da reprodutibilidade da ruptura celular em homogeneizador e escalonamento da IMAC**

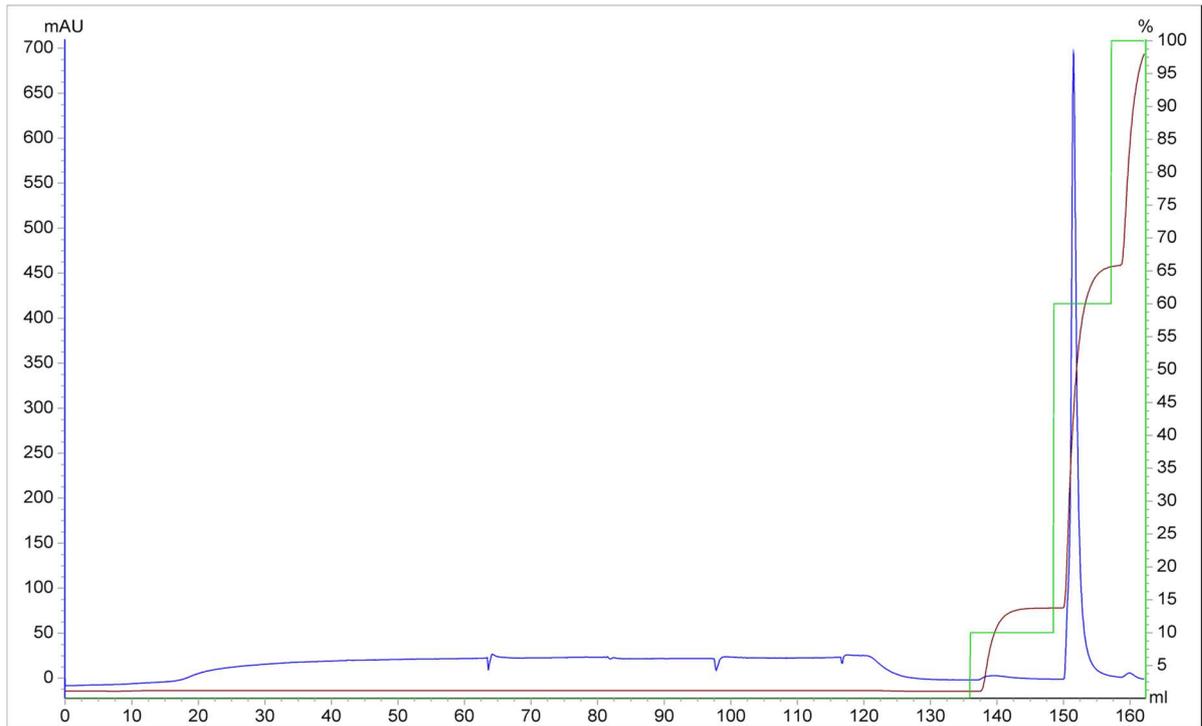
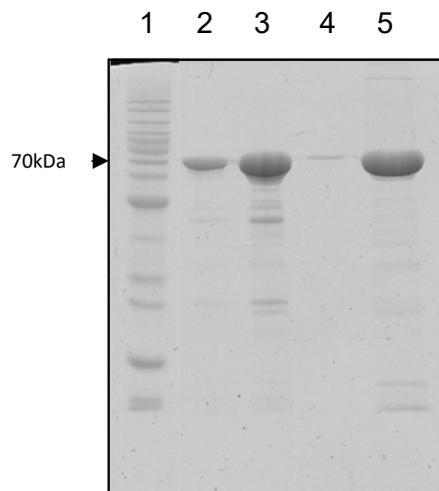
A- Cromatograma relativo a IMAC a partir de 20 g de massa úmida lisado em homogeneizador. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% onde foram aplicados 10  $\mu$ L de cada fração da cromatografia, a seguir: 1- marcador de peso molecular, 2- extrato total, 3- fração solúvel, 4- fração insolúvel 5- fração solúvel após adsorção a resina, 6- eluição com tampão contendo 80 mM de Imidazol, 7- lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol, 8- lavagem com tampão contendo 1 M de Imidazol.

#### 4.3.7 Definição da metodologia para cromatografia de troca iônica para o processo de produção da proteína recombinante LigANI:

As resinas HiTrap SP FF e Q FF apresentaram os melhores resultados e foram selecionadas para serem avaliadas comparativamente em escala maior, contudo, antes da avaliação comparativa entre as metodologias e matrizes cromatográficas de troca aniônica e catiônica, foi verificada a necessidade de avaliar uma nova resina pois existia uma preocupação de a quantidade de proteína aplicada no teste extrapolasse a capacidade da resina, e naquele momento o laboratório não dispunha de coluna de 5 mL de resina Q FF. Foi avaliada a substituição da resina Q FF pela resina Q XL, que possui uma matriz bastante semelhante à da resina Q FF, é um trocador aniônico forte formado por cadeias de dextran acopladas a um rede formada pela agarose, possuindo alta capacidade de ligação e resistir maiores fluxos. Diante da semelhança entre as resinas, era esperado que apresentassem desempenho semelhante, então foi realizada uma avaliação a partir do material processado e purificado pelas metodologias: homogeneizador e IMAC e dessalinização de acordo com os processos estabelecidos acima.

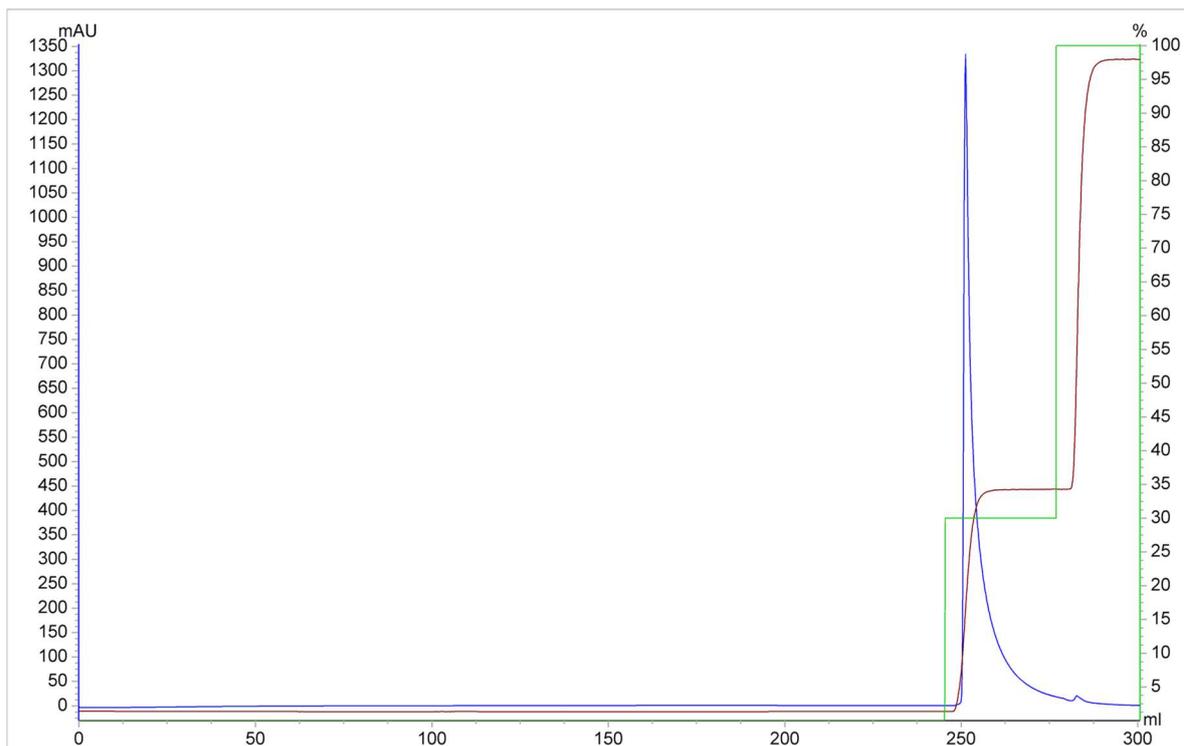
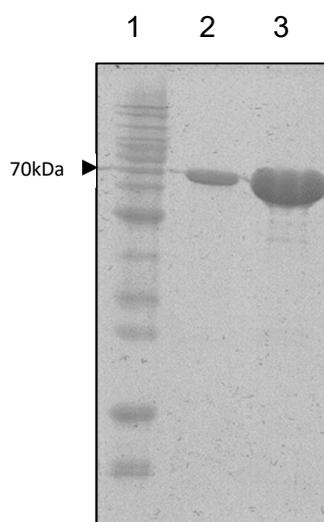
Os resultados obtidos demonstraram um perfil cromatográfico bastante semelhante entre as resinas, e as frações proteicas obtidas foram avaliadas por quantificação por BCA e pureza e recuperação por densitometria. O nível de pureza das proteínas foi de 99,7% obtido a partir de 53,4 mg de proteína da gel filtração. A recuperação foi de 22,7 mg de LigANI a partir da troca iônica em Q FF e 21,9 mg de LigANI na matriz Q XL. Os resultados, demonstram que ambas as resinas podem ser utilizadas no processo de polimento da proteína LigANI.

As resinas SP FF e Q XL foram analisadas e comparadas usando a mesma estratégia anterior, considerando as etapas estabelecidas para o escalonamento. A fração eluída na IMAC contendo a proteína recombinante LigANI foi dessalinizada por gel filtração e o volume obtido na concentração de 266,2 mg de proteína total foi dividido igualmente e utilizado para avaliação do protocolo de purificação da proteína recombinante LigANI com as resinas SP FF e Q XL. O cromatograma e o SDS-PAGE referentes a cada uma delas pode ser visualizado nas figuras 23 e 24.

**A****B**

**Figura 23. Desempenho da resina SP FF em estudo comparativo entre as resinas de troca iônica**

A- Cromatograma relativo a troca catiônica com a resina SP FF. Em azul- densidade ótica a 280nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS). B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent, onde foram aplicados 10  $\mu$ L das amostras a seguir: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder); 2- amostra aplicada na SP FF, 3- amostra não ligada a resina SP FF, 4- lavagem com 100 mM de NaCl, 5- eluição com 600 mM de NaCl.

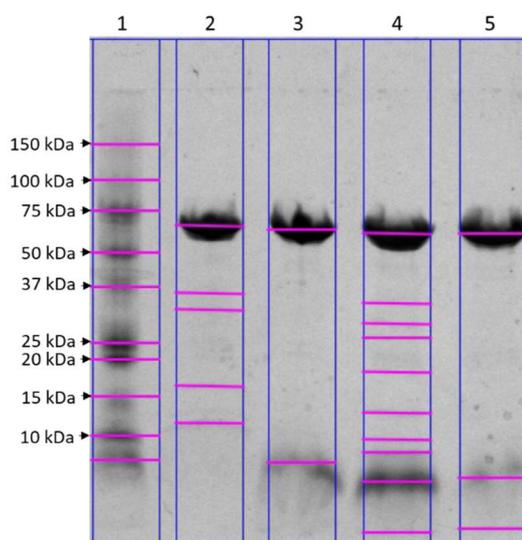
**A****B**

**Figura 24. Desempenho da resina Q XL em estudo comparativo entre as resinas de troca iônica**

A- Cromatograma relativo a cromatografia de troca aniônica com a resina Q XL. Em azul- densidade ótica a 280 nm, verde- concentração do tampão de eluição, marrom – condutividade (mS) B- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent, onde foram aplicados 10  $\mu$ L das amostras a seguir: 1- marcador de peso molecular (Bench mark protein ladder); 2- amostra aplicada na Q XL, 3- eluição com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8/NaCl 300 mM

Os resultados foram satisfatórios, entretanto cabe ressaltar que o resultado com a resina Q XL foi melhor do que o da resina SP FF, uma vez que com esta resina parte do material não foi adsorvido, talvez pelo fato de a quantidade de material aplicado ter excedido a capacidade da mesma. De qualquer forma, foi dada continuidade às avaliações de rendimento e pureza das amostras.

Para análise da homogeneidade, as frações eluídas oriundas da purificação em SP FF e Q XL foram dessalinizadas nos tampões Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e Fosfato 50 mM pH 8,0 foram avaliadas na presença ou não de DTT 20 mM através de eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida 4-12%, e os resultados obtidos podem ser observados na figura 25 e na tabela 7:



**Figura 25. Eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida 4-12% para determinação da pureza de LigANI purificada em Q XL e SP FF.**

Em 1: Padrão dual color; 2: LigANI relativa a SP FF sem adição de DTT; 3: LigANI Q XL sem adição de DTT; 4: LigANI SP FF com adição de DTT; 5: LigANI Q XL com adição de DTT.

**Tabela 7. Análise densitométrica das bandas eletroforéticas oriundas da eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida das amostras LigANI SP FF e LigANI Q XL.**

AUSÊNCIA DE DTT						PRESENÇA DE DTT					
SPFF			QXL			SPFF			QXL		
MM	Rf	% Banda	MM	Rf	% Banda	MM	Rf	% Banda	MM	Rf	% Banda
67,2	0,37	94,8	64,93	0,378	96,3	62,74	0,385	68,2	62,74	0,385	98,1
36,63	0,504	0,2	7,99	0,839	3,7	33,42	0,524	0,6	6,96	0,869	0,9
31,56	0,537	0,9				27,82	0,564	0,8	4,4	0,97	1
15,88	0,688	1,8				24,53	0,592	0,1			
11,39	0,761	2,3				18,01	0,66	0,5			
						12,48	0,741	1,4			
						9,81	0,793	0,6			
						8,75	0,819	0,9			
						6,73	0,877	26,2			
						4,25	0,977	0,7			

De acordo com os resultados acima, foi possível constatar que a proteína purificada a partir da resina Q XL se mostrou mais homogênea quando comparada a amostra obtida da cromatografia com a resina SP FF. O grau de pureza foi avaliado por densitometria e o resultado obtido foi de 99,45% contra 99,02%. Estes dados foram cruciais para optar pelo uso da resina Q XL na escolha dessa estratégia nesta etapa do processo de purificação da proteína LigANI. Outro dado que reforça a escolha da matriz cromatográfica Q XL é a recuperação da proteína ao final do processo, considerando os dados de quantificação de proteínas totais para duas estratégias foram obtidos 185,2 mg a partir da resina Q XL e 27,8 mg a partir da SP FF.

#### 4.4 Estabelecimento dos lotes de consistência e rendimento do processo:

Após a determinação de todos os parâmetros e etapas do processo, foram realizados 3 cultivos em fermentador de 2 litros em dias diferentes e parte destes foi processada de acordo com as etapas do *downstream processing* demonstradas na figura 26. Cada etapa foi monitorada quanto a concentração de proteínas totais e determinação da pureza para determinação do rendimento ao longo do processo (tabela 8).

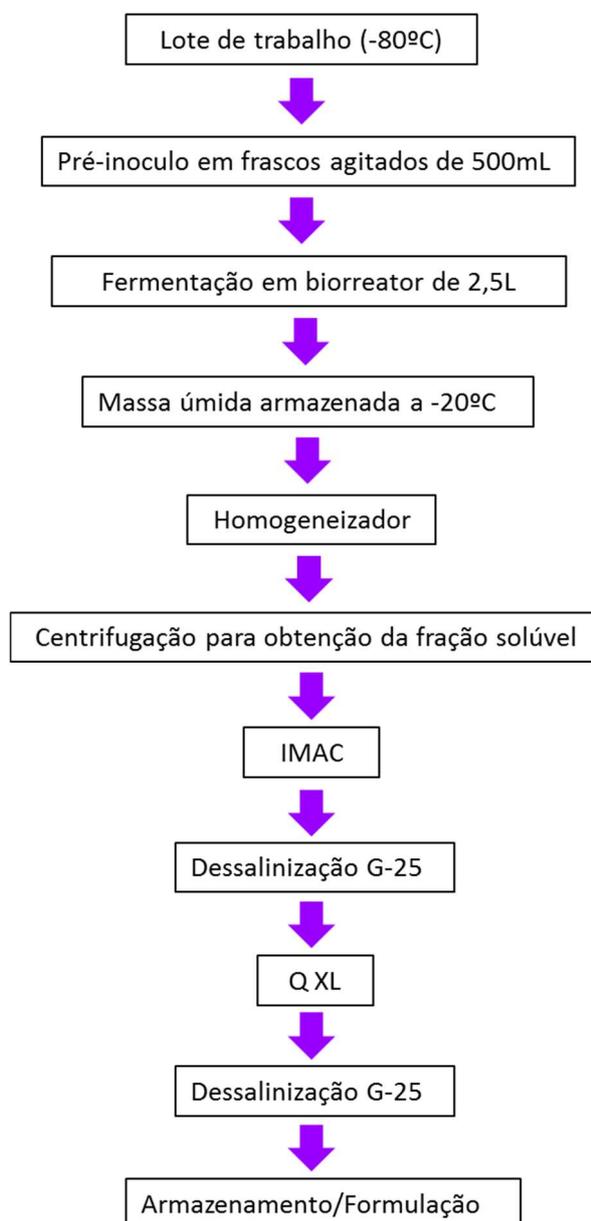


Figura 26. Fluxograma representativo das etapas de separação e purificação da proteína recombinante LigANI.

A biomassa úmida de  $53,3 \pm 3,47$  g foi obtida a partir da centrifugação do cultivo de *E. coli* expressando a proteína recombinante LigANI realizado em fermentador de 2,5 litros. A ruptura da biomassa em homogeneizador permitiu a obtenção do extrato total com concentração de  $2295,03 \pm 538,19$  mg de proteínas totais. Após a centrifugação do extrato total, a fração solúvel foi mensurada e foi obtido a concentração de  $1992,88 \pm 500,49$  mg de proteínas solúveis, onde  $48,61 \pm 11,98$  % destas corresponde a rLigANI. Em seguida, a fração solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade, e o rendimento desta etapa foi de 341,05 mg da proteína purificada com grau de pureza de  $98,69 \pm 0,83$  %. A concentração de LigANI foi calculada através da correlação entre o percentual de LigANI em relação a

concentração da proteína total. A proteína de interesse foi isolada das demais e utilizada nas etapas subsequentes, onde é importante ressaltar que na etapa de gel filtração a recuperação de LigANI é menor, uma vez que este método dilui a amostra e é difícil quantificar a proteína com precisão, uma vez que a faixa de sensibilidade do método de BCA é de 20-2000 µg/mL.

Ao final de todas as etapas de purificação foi obtido 219,52 mg da proteína rLigANI, que corresponde a 20,75 % do extrato total e com um grau de pureza de 99,70 ± 0,24% a partir de 1 litro de cultivo em fermentador.

Tabela 8. Purificação da proteína rLigANI

	Proteína total (mg/L)	rLigANI (mg/L)	rLigANI (%)	Rendimento (%)
Extrato total	2295,03 ± 538,19	1058,0	46,41 ± 8,10	100,00
Fração solúvel	1992,88 ± 500,49	679,72	48,61 ± 11,98	64,25
IMAC	345,58 ± 68,95	341,05	98,69 ± 0,83	32,24
GF	262,74 ± 89,63	259,32	98,70 ± 0,79	24,51
IEX	254,74 ± 88,37	252,96	99,34 ± 0,16	23,91
LigANI	220,18 ± 68,71	219,52	99,70 ± 0,24	20,75

#### 4.5 Reatividade cruzada entre a proteína LigANI de diferentes sorovares e espécies

Esta avaliação teve o intuito de demonstrar a reatividade cruzada entre as proteínas LigANI de diferentes sorovares e espécies e o soro policlonal anti-LigANI produzido em camundongos a partir da imunização com a proteína recombinante LigANI desenvolvida neste trabalho (a partir de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni), sugerindo que uma vacina de subunidade produzida a partir da proteína recombinante LigANI desenvolvida neste trabalho tenha a capacidade de conferir proteção cruzada.

#### 4.5.1 Avaliação do título dos soros policlonais anti-LigANI produzidos em camundongo:

Inicialmente, os soros policlonais foram avaliados individualmente por *dot blot* para determinação do título de anticorpos. A avaliação de todos os animais gerou um título médio acima de 1:32.000, com exceção de um dos animais. Foi montado um *pool* de soros, e o soro deste animal foi excluído. Em seguida, o *pool* foi titulado por *imunoblotting* e definido em 1:64.000 para garantir seu reconhecimento mesmo em menores concentrações da proteína recombinante. Na figura 27, podem ser observadas as diluições testadas e o reconhecimento da proteína LigANI recombinante.

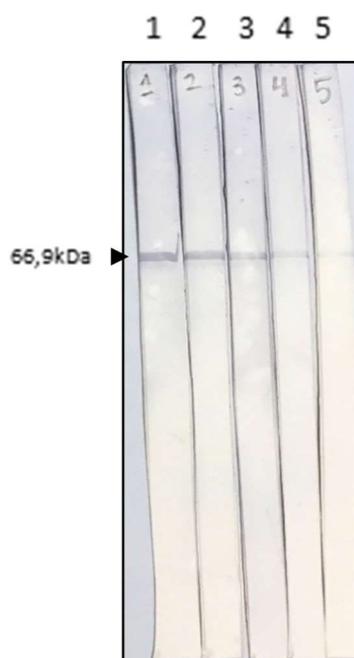


Figura 27. **Imunoblotting da titulação do pool de soros de camundongo anti-LigANI.** *Imunoblotting* representativo da titulação do *pool* de soros anti-LigANI produzido em camundongos a partir da proteína recombinante purificada até a etapa de troca aniônica. Em 1- diluição de 1:16.000, 2- 1:32.000, 3- 1:64.000, 4- 1:128.000 e 5- 1:256.000.

#### 4.5.2 Ensaio de antigenicidade contra antígenos recombinantes de diferentes espécies e sorovares:

O *immunoblotting* demonstrou que o soro anti-LigANI produzido em camundongos foi capaz de reconhecer todas as proteínas LigANI de diferentes sorovares de *Leptospiras* patogênicos como pode ser observado na figura 28.

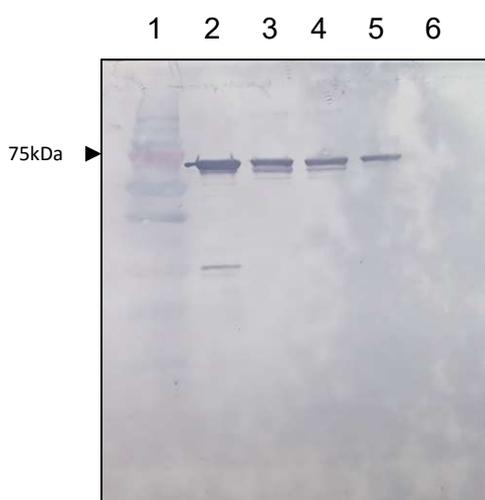


Figura 28. **Imunoblotting do reconhecimento das proteínas recombinantes LigANI de diferentes espécies e sorovares pelo anti-soro anti-LigANI.**

1- padrão de peso molecular Dual color (Bio-rad), proteínas recombinantes de: 2- *L. interrogans* Autumnalis, 3- *L. interrogans* Canicola, 4- *L. interrogans* Pomona, 5- *L. interrogans* Copenhageni, 6- Controle negativo - proteína PsaA (*Streptococcus pneumoniae*)

#### 4.5.3 Avaliação da adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz extracelular

A proteína recombinante LigANI foi avaliada quanto a capacidade de adesão às proteínas de matriz: Colágeno, Fibrinogênio, Fibronectina e Laminina, característica das Ligs já reportada em alguns trabalhos (Lin et al, 2010; Castiblanco-Valencia et al., 2016; Fernandes et al., 2016; Evangelista et al., 2017).

Para o estabelecimento do ensaio, inicialmente foram testadas diferentes concentrações de LigANI e da proteína de matriz Fibronectina, e em seguida avaliados os melhores títulos dos anticorpos primário e secundário. O anticorpo primário (anti-Histidina - SIGMA) foi testado nas diluições de 1:3.000 (indicada pelo fabricante) e 1:1.500, contudo o melhor sinal foi na diluição de 1:1.500, ficando assim estabelecido esse título. Enquanto, que para o anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG camundongo marcado com peroxidase – SIGMA) foram avaliadas as diluições 1:15.000, 1:20.000 e 1:30.000, o título foi estabelecido na concentração de 1:15.000 (Figuras 29 e 30).

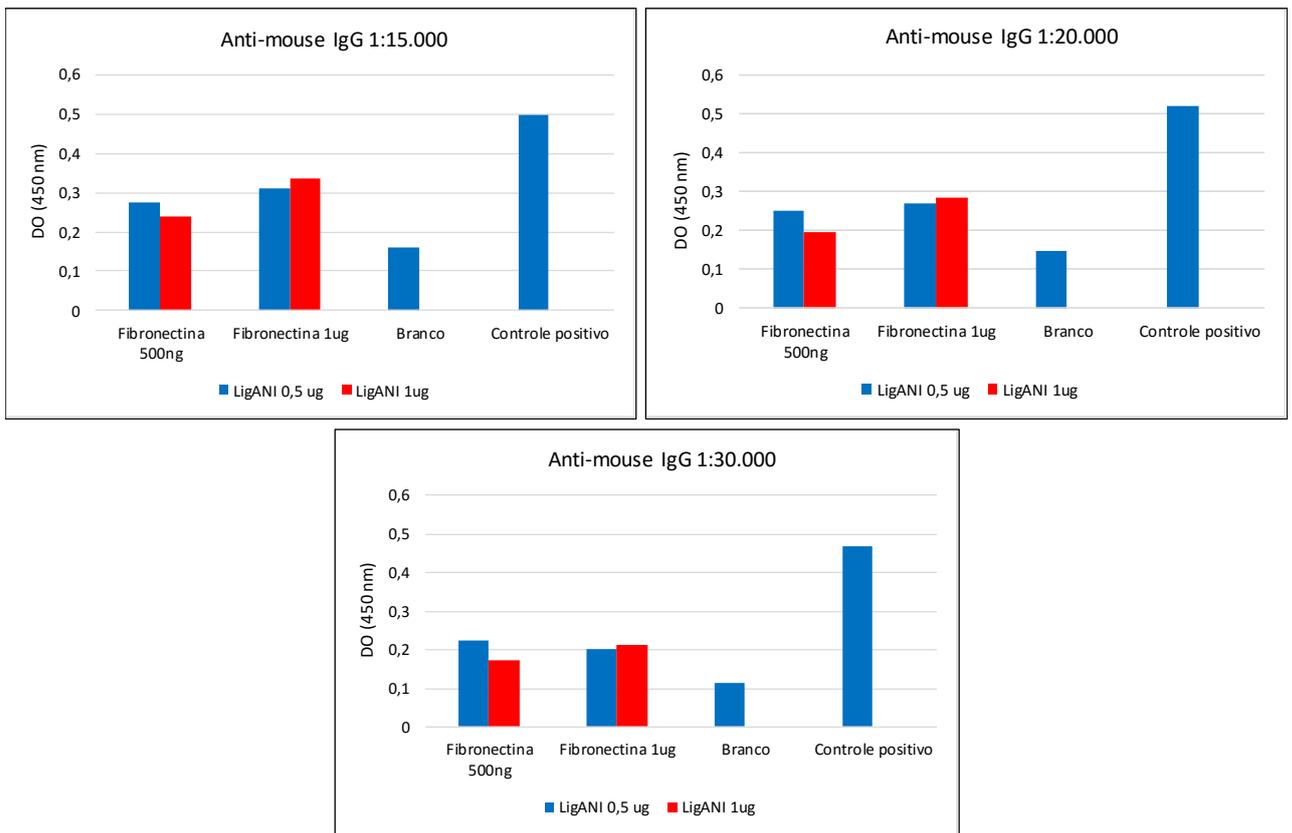


Figura 29. Comparação do desempenho das diluições do anticorpo secundário (anti-mouse IgG peroxidase – SIGMA) em relação a diluição 1:1.1500 do anticorpo anti-Histidina (SIGMA)

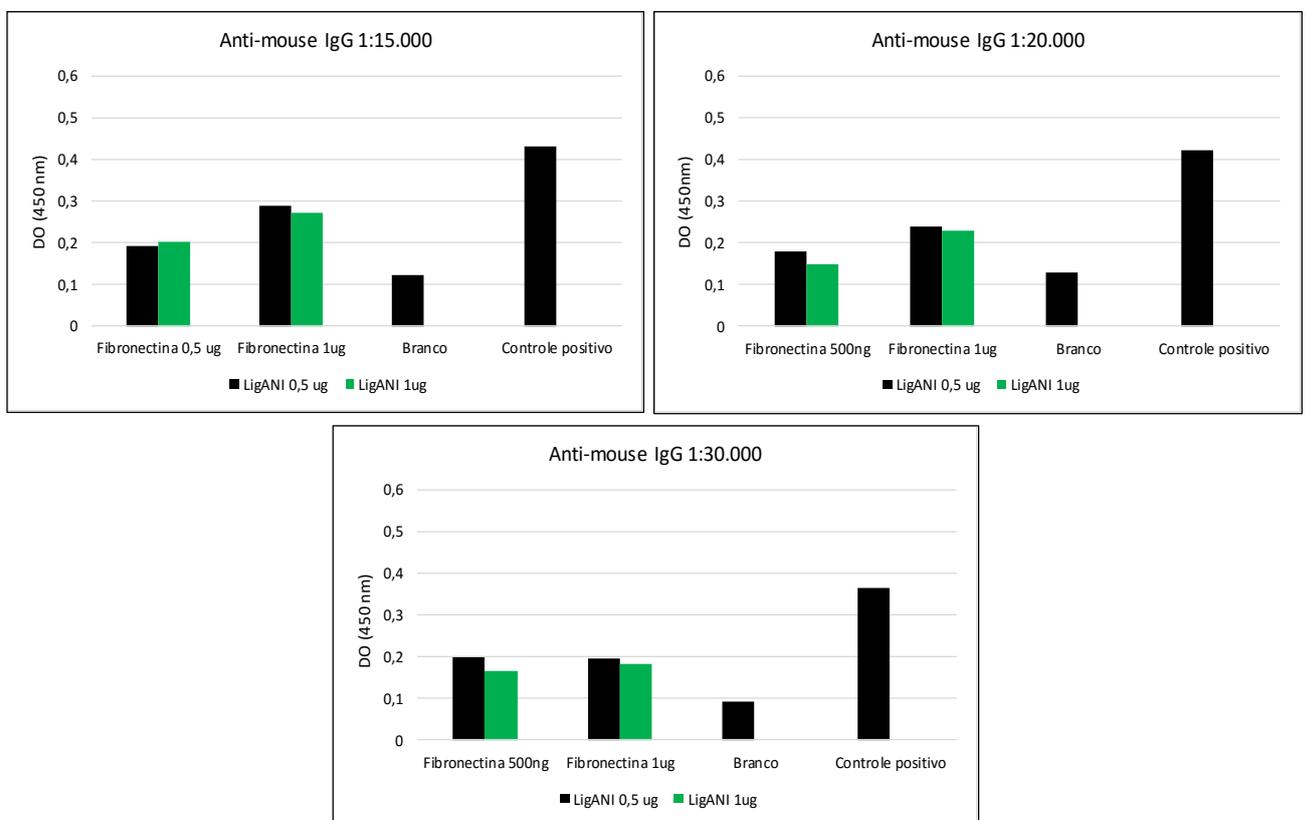


Figura 30. Comparação do desempenho das diluições do anticorpo secundário (anti-mouse IgG peroxidase – SIGMA) em relação a diluição 1:3.000 do anticorpo anti-Histidina (SIGMA)

Em seguida, foram estabelecidas a concentração das proteínas de matriz e da proteína LigANI para o ensaio de adesão. Foram avaliadas diferentes concentrações de Colágeno, Fibrinogênio, Fibronectina e Laminina que variaram entre 1 e 10  $\mu\text{g}$ , entretanto a diferença não foi significativa entre a menor (1 $\mu\text{g}$ ) e a maior concentração (10 $\mu\text{g}$ ) (Figura 31) e as concentrações de LigANI que variaram entre: 0,25 e 2  $\mu\text{M}$ . Diante dessa observação, para as avaliações comparativas entre as diferentes proteínas de matriz, foi determinada a concentração de 1  $\mu\text{g}$  para todas as avaliações.

Após a padronização do ensaio, foram realizados três experimentos independentes com as proteínas de matriz Colágeno, Fibrinogênio, Fibronectina e Laminina para demonstrar a reprodutibilidade do método, e pôde ser observado o mesmo padrão de ligação em todos eles, sendo possível demonstrar a capacidade de adesão da proteína recombinante LigANI produzida nesse trabalho nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2  $\mu\text{M}$  das proteínas de matriz avaliadas, frente os controles: a proteína LigB7-11 (controle positivo) e PsaA (controle negativo) (Figura 32).

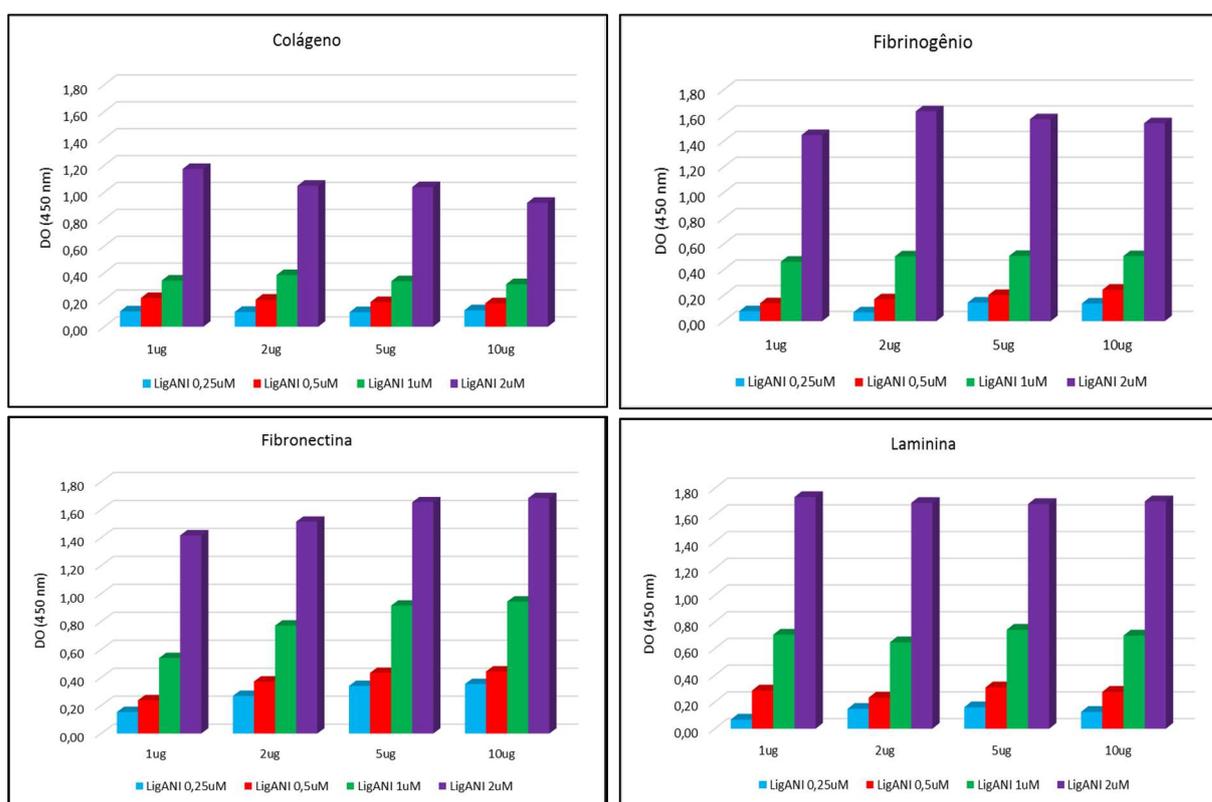
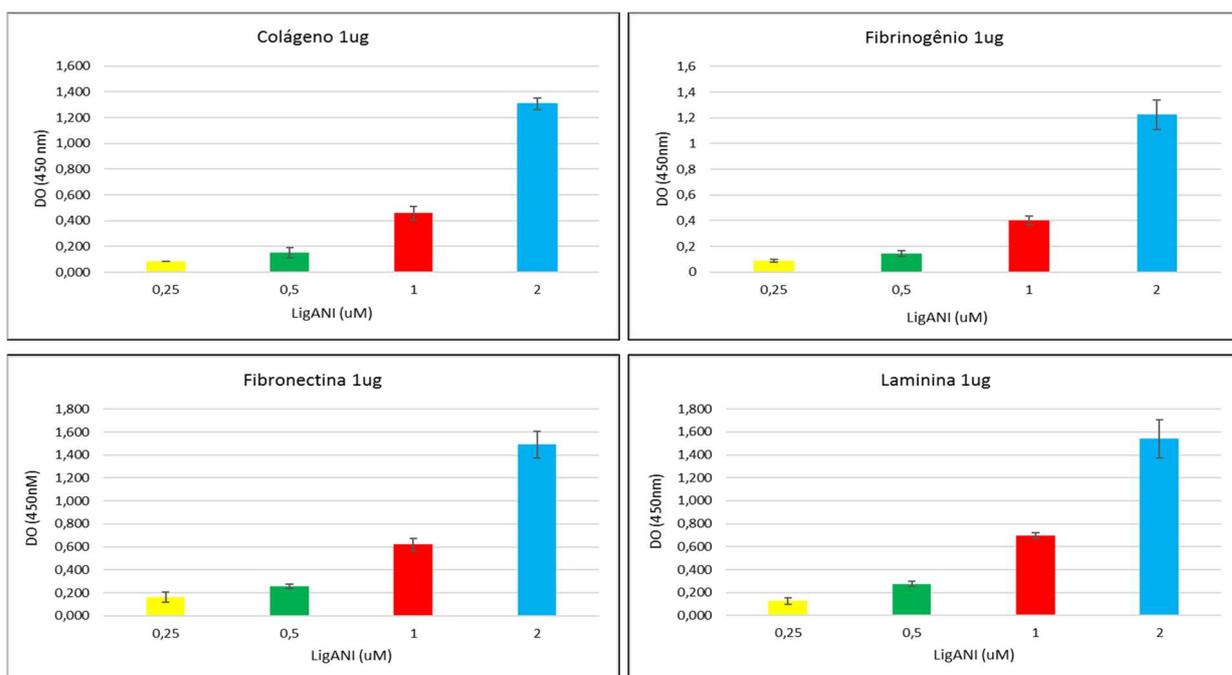


Figura 31. Quadro com a relação entre concentração das proteínas de matriz extracelular e de LigANI.



**Figura 32. Quadro demonstrativo da reprodutibilidade dos ensaios de adesão.** Gráficos de barras demonstrativos dos ensaios com as diluições da proteína LigANI de 0,25 μM a 2 μM a partir de 1 μg de cada proteína de matriz extracelular.

Os resultados obtidos indicaram que os experimentos de adesão foram reprodutíveis e que é necessário que seja utilizado uma concentração de 2 μM da proteína recombinante LigANI para demonstrar a adesão às proteínas de matriz testadas.

Após a padronização da metodologia com a proteína de matriz Fibronectina, foram realizadas as avaliações da adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz extracelular: Fibrinogênio, Laminina e Colágeno. Em uma avaliação comparativa, os resultados indicam que a proteína recombinante LigANI tem a capacidade de aderir a todas as proteínas de matriz testadas, contudo foi observado uma maior capacidade de adesão a Laminina (Figura 33).

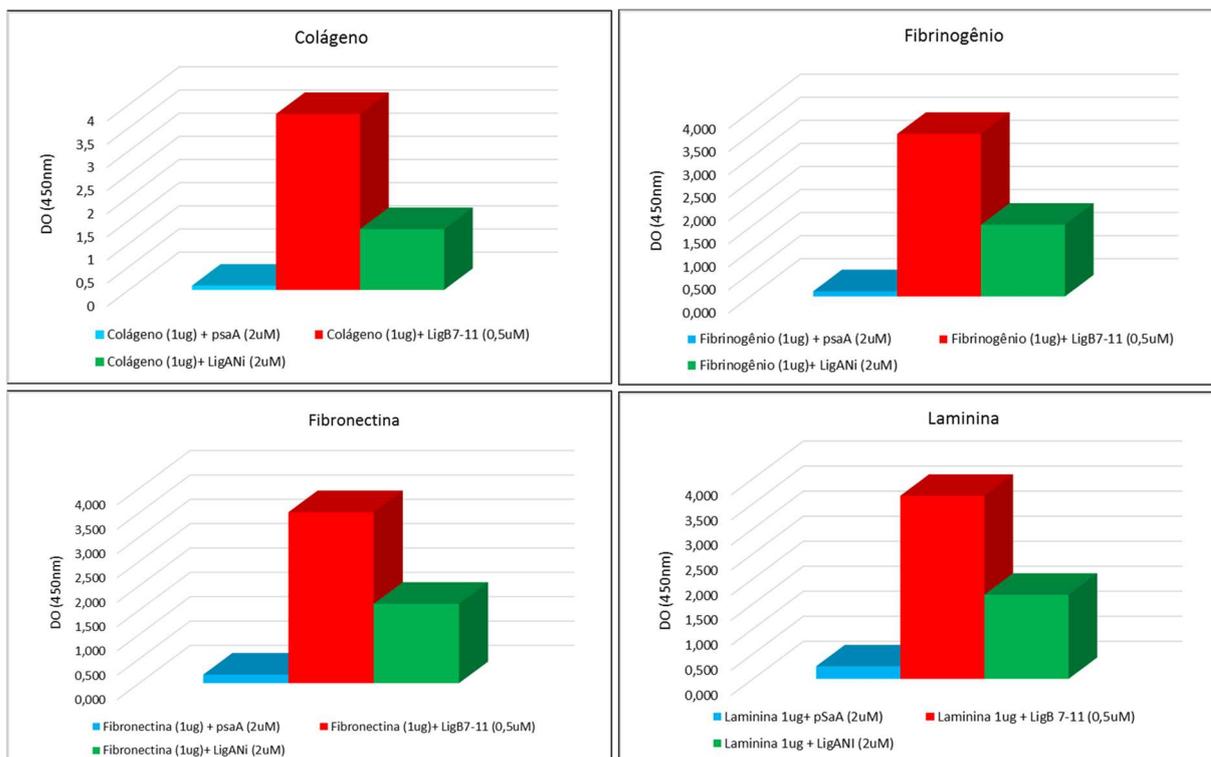


Figura 33. Quadro comparativo do ensaio de adesão de LigANI às diferentes proteínas de matriz extracelular

Gráfico de barras comparando a absorvância obtida a partir da adesão da proteína recombinante LigANI às proteínas de matriz Colágeno, Fibrinogênio, Fibronectina e Laminina e sua comparação com os controles: proteína recombinante LigB7-11 (controle positivo) e PsaA (controle negativo).

#### 4.6 Caracterização físico-química da proteína recombinante LigANI

##### 4.6.1 Avaliação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico é definido como o valor de pH onde uma molécula, por exemplo, um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. É uma avaliação que está diretamente ligada ao diferencial de cargas que a proteína apresenta em uma dada solução, o que interfere diretamente na sua solubilidade. A avaliação preditiva do pi foi realizada previamente através dos programas de Bioinformática Expasy e Prot pi (Gasteiger et al., 2005; Bjellqvist et al., 1993; Bjellqvist et al., 1994) sendo importante ressaltar que o pi preditivo é calculado baseado na estrutura primária da proteína.

Avaliamos o pi experimental por IEF-PAGE em gradiente de pH 3 a 9 observou-se que as amostras de LigANI SP FF e LigANI Q XL apresentaram ponto isoelétrico de 6,94. O valor experimental foi próximo ao obtido a partir da análise preditiva fornecida pelos programas computacionais Expasy e Prot pi, onde o ponto isoelétrico da proteína LigANI informado foi de 6,77 e 6,85, respectivamente.

Os valores de pI foram estimados a partir da curva de calibração curva linear semi-log:  $y = -0,401*x + 0,936$ ,  $R^2 = 0.946269$ . Na figura 34, pode-se visualizar o gel para determinação do ponto isoelétrico e na figura 35, a análise por densitometria do mesmo.

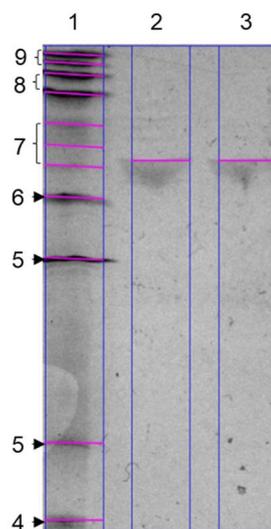


Figura 34 **Focalização isoelétrica de LigANI.**

Em 1- Padrão 3-10 Gold (GE Healthcare), 2- LigANI obtida a partir da purificação em SP FF, 3- LigANI obtida a partir da purificação em Q XL.

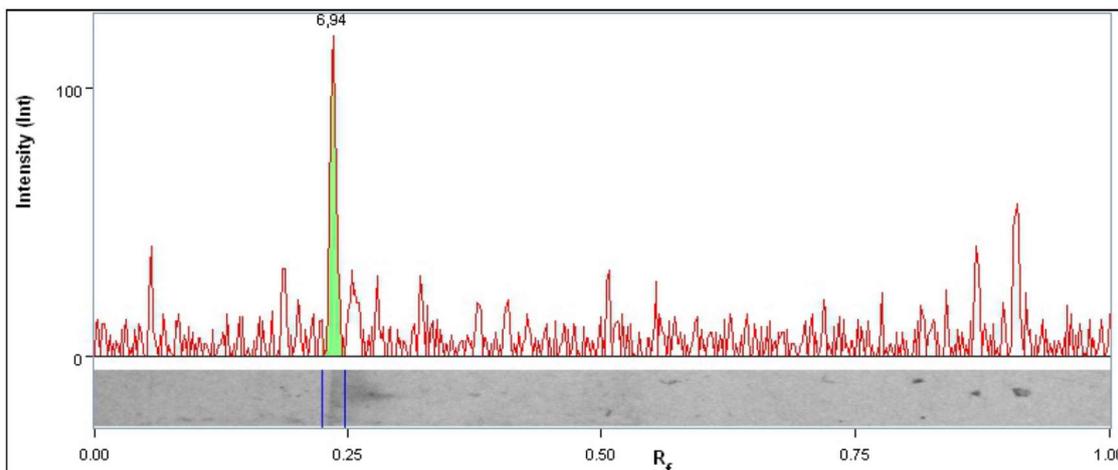


Figura 35. **Densitometria do IEF-PAGE da proteína LigANI purificada em coluna de troca aniônica Q XL**

#### 4.6.2 Determinação da estrutura secundária da proteína recombinante LigANI por dicroísmo circular (DC):

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica extensivamente usada para estudar conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições, como por exemplo, temperatura, força iônica, pH, presença de solutos e/ou pequenas

moléculas. Esta técnica pode fornecer informações quanto a estrutura secundária e terciária sendo bastante versátil em biologia estrutural.

Foram feitas análises de dicroísmo circular da proteína LigANI a partir de diferentes lotes de proteína produzidos em experimentos independentes como mostra a figura 36. O resultado indica que a proteína possui uma estrutura secundária randômica composta predominante por folha Beta. De acordo com o programa Dichroweb (Whitmore e Wallace, 2004; Whitmore e Wallace, 2008; Sreerama e Woody, 2000) que realiza a análise de resultados de dicroísmo circular, LigANI possui em sua constituição 33,5% de folha  $\beta$ , sendo o tipo de estrutura secundária majoritária observada na composição da proteína LigANI. Esses dados corroboram as análises preditivas realizadas por programas computacionais como o Psipred (Jones, 1999; Buchan et al., 2013) e Phyre2 (Kelley et al., 2015), como pode ser observado nos anexos 2 e 3.

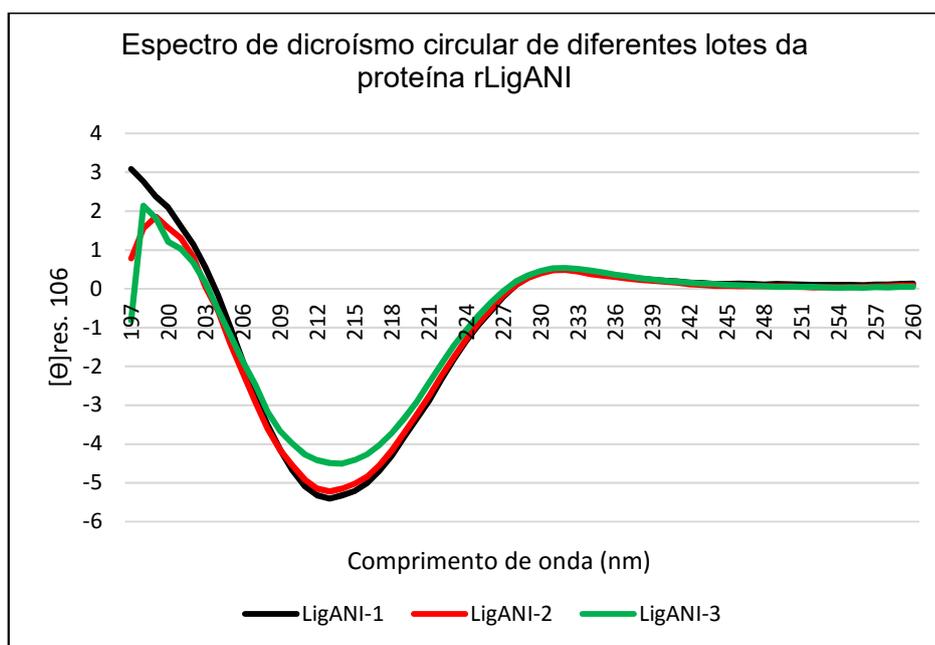


Figura 36. **Espectros de dicroísmo circular da proteína recombinante LigANI.** 1, 2, e 3 são os espectros obtidos a partir de amostras de três experimentos diferentes.

#### 4.6.3 Determinação da massa molecular da proteína LigANI:

A verificação da massa molecular da proteína LigANI foi realizada a partir de três diferentes técnicas, sendo elas: a cromatografia de exclusão molecular (SEC), eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida 8-25% e espectrometria de massas.

Através da cromatografia de exclusão molecular não foi possível confirmar o peso molecular preditivo da proteína recombinante de 66,9 kDa, sendo encontrado um peso

molecular de 109 kDa (Figura 37). Contudo na eletroforese em gel gradiente de poli-acrilamida foi encontrado o tamanho esperado de 66,9 kDa da proteína recombinante LigANI (Figura 38).

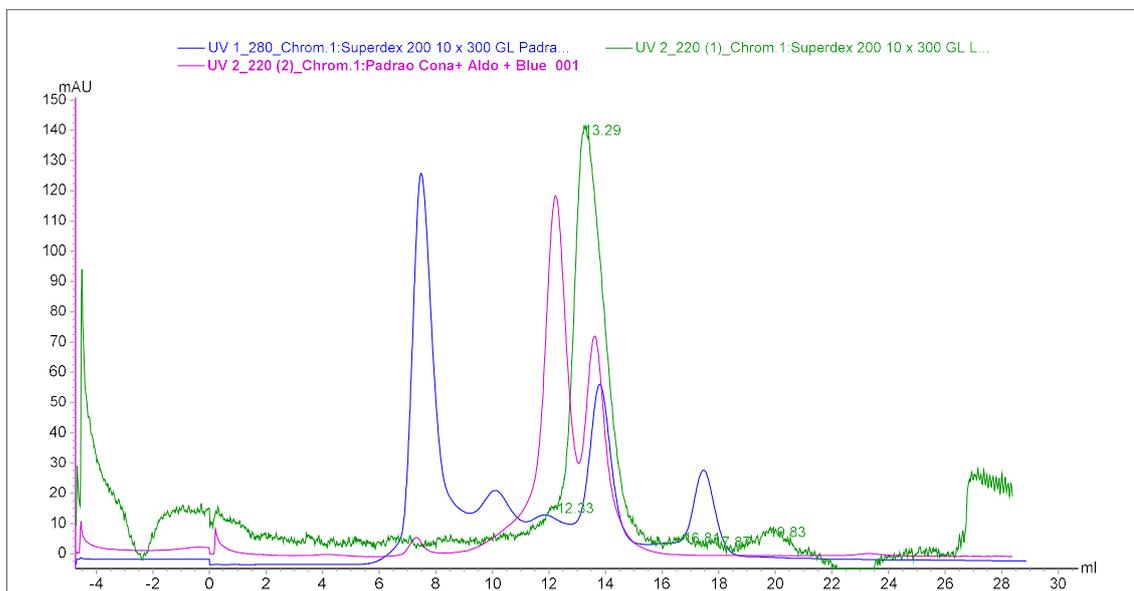


Figura 37. **Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de SEC.**

Perfil cromatográfico de LigANI Q XL, em coluna Superdex 200 (10/30) para determinação de massa molecular. Absorbância a 220 nm e 280 nm. Em azul, perfil da densidade ótica de 280 nm, com calibração com os padrões: Blue Dextran (2000 kDa), Aldolase (150 kDa), Conalbumina (75 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa), em ciano, perfil da densidade ótica a 220 nm, com calibração com os padrões e em verde, perfil da densidade ótica a 220 nm de LigANI.

A cromatografia de exclusão molecular utilizou padrões de massa molecular conhecidos, na qual obtivemos a curva de calibração  $y = -2,4888x + 2,7869$ ,  $R^2 = 0,9995$ , conforme mostra a figura acima. A massa da amostra foi estimada em 109,7 kDa. Este peso molecular obtido, maior do que o esperado, pode ser atribuído ao fato de a proteína poder apresentar uma estrutura mais alongada do que globular. Esta informação foi obtida a partir da análise da sequência preditiva da proteína LigANI a partir do programa Phyre 2, onde a região de homologia compreende do aminoácido 266 ao 627. Foram alinhados 358 resíduos com 13% de identidade e 99,21% de confiança. Os modelos gerados pelo programa referente a esta região podem ser visualizados nas figuras 39 e 40.

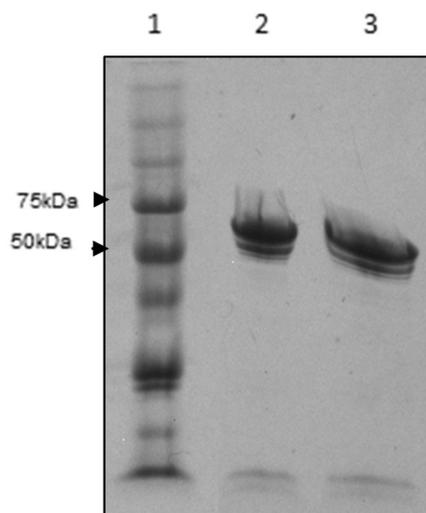


Figura 38. **Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de gel gradiente de poliacrilamida**

Perfil eletroforético obtido a partir do gel gradiente de poliacrilamida 8-25% para confirmação do peso molecular preditivo da proteína LigANI. Em 1- padrão de peso molecular Dual Color (Bio-rad), 2- LigANI, 3- LigANI na presença de DTT 10 mM.

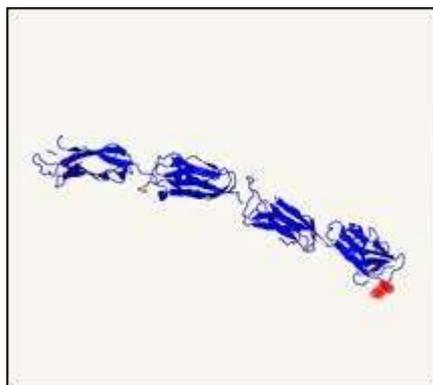


Figura 39 . **Modelo gerado pelo programa Phyre 2 relativo a região de homologia com Invasina.**



Figura 40. **Modelo de estrutura terciária para a proteína LigANI**

Imagem gerada pelo programa Phyre2 sugerindo uma estrutura terciária para proteína LigANI baseada na sua identidade com as proteínas de estrutura conhecida e já disponibilizada nas bases de dados.

Na espectrometria de massa também determinamos a massa molecular real da proteína recombinante LigANI de 66,9 kDa onde devem ser considerados os picos de maior massa obtidos acima de 5,000 m/z. A partir da análise do resultado, é possível a observação de três picos com relativa abundância onde verificamos as espécies de LigANI obtidas com uma, duas e três cargas (Figura 41).

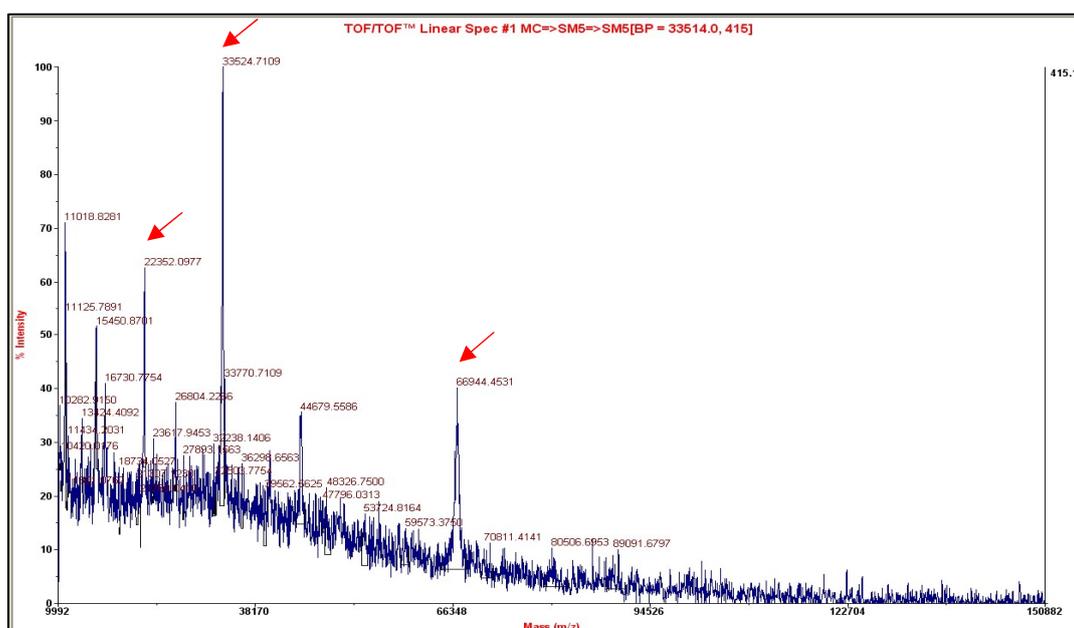


Figura 41. **Determinação da massa molecular da proteína LigANI através de espectrometria de massa.**

Análise de massas MALDI-TOF da proteína recombinante purificada LigANI, onde as setas representam as espécies de uma, duas e três cargas.

## 4.7 Controle de processo durante e ao final da purificação

### 4.7.1 Avaliação da presença de agregados nas amostras de proteína LigANI recombinante ao final do processo

#### 4.7.1.1 Avaliação por Espectroscopia de Fluorescência

Inicialmente, achava-se que a massa molecular mais alta da proteína LigANI observada na cromatografia de exclusão, fosse devido a possível presença de agregados na amostra proteica, dessa forma foram realizados ensaios de espectrofluorescência para avaliar essa hipótese como pode ser observado nas figuras 42 e 43.

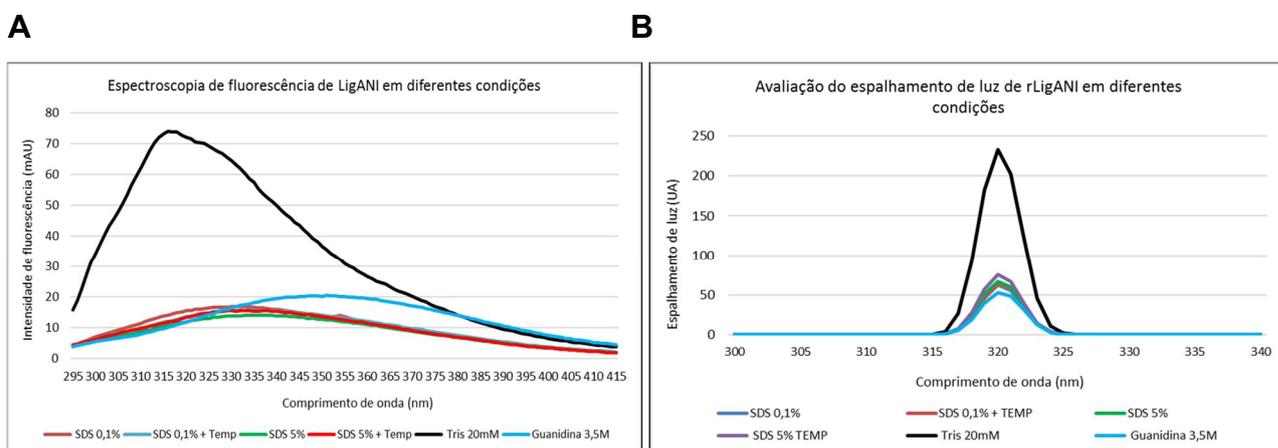


Figura 42. **Espectros de fluorescência da amostra LigANI Q XL em diferentes condições.** Espectros de fluorescência da amostra LigANI Q XL em diferentes concentrações de SDS, Guanidina e aumento de temperatura. A- Espectro de intensidade de fluorescência. B- Espalhamento de luz.

De acordo com os resultados acima, é possível afirmar que a proteína é susceptível a ação de detergentes e aumento de temperatura, uma vez que é observado um aumento do comprimento de onda no gráfico A. Em relação, a presença de agregados, de acordo com o gráfico B é possível verificar que houve uma diminuição do espalhamento de luz em relação ao controle, entretanto não houve deslocamento do centro de massa, o que indica a inexistência de agregados.

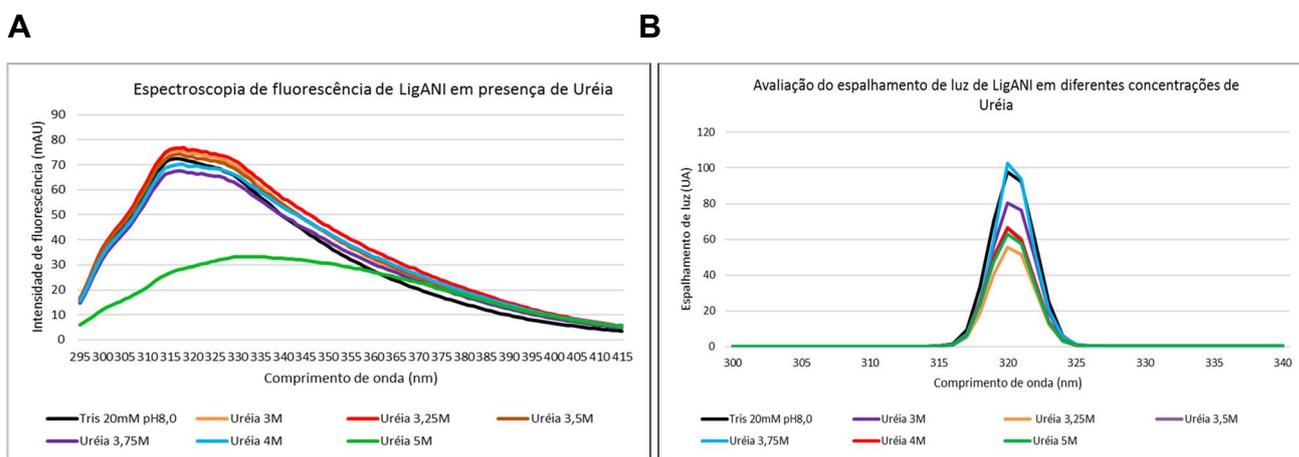


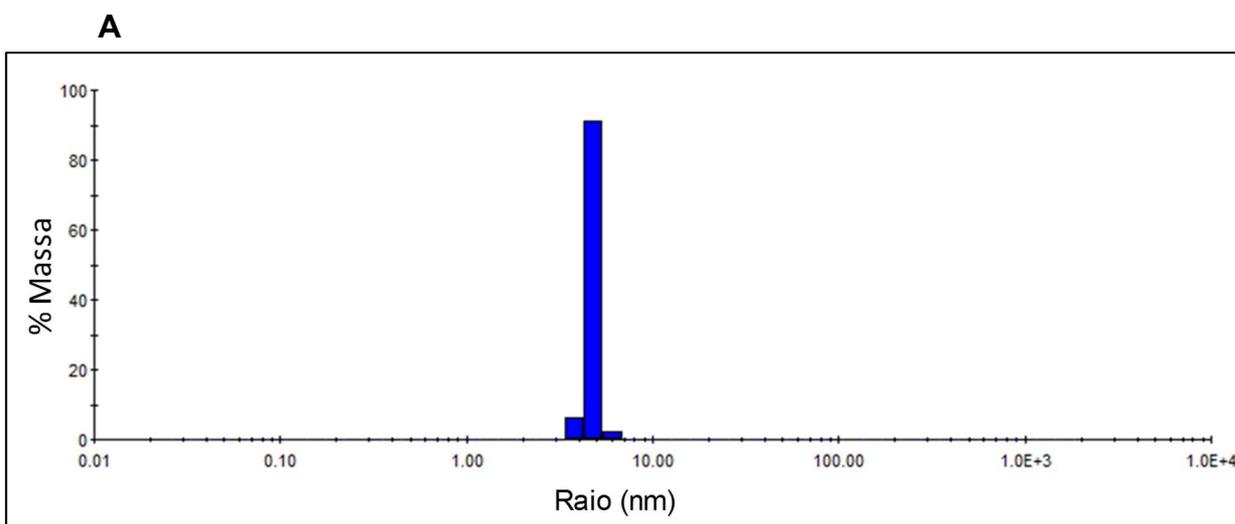
Figura 43. **Espectros de fluorescência da amostra LigANI Q XL em diferentes concentrações de uréia.**

A- Espectro de intensidade de fluorescência. B- Espalhamento de luz.

Os resultados acima indicam que a proteína recombinante LigANI se mostrou muito estável nas diferentes condições uma vez que se observa mudança no perfil da proteína somente a partir da condição de Uréia 5 M, e de acordo com o espalhamento de luz, não foi observada diferença no perfil da proteína e os valores (em unidades arbitrárias) do espalhamento de luz não foram altos (acima de 250 UA), o que é um indicativo da ausência de agregados nas amostras proteicas avaliadas. É importante ressaltar que a proteína demonstrou ser estável, pois só foi possível visualizar modificações na estrutura em presença de altas concentrações de Uréia e Guanidina (agentes caotrópicos desnaturantes)

#### 4.7.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (dynamic light scattering - DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (em inglês DLS, *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica de caracterização físico-química que mede a distribuição do tamanho de pequenas partículas e moléculas em solução líquida, sendo precisa e rápida para medir a distribuição de tamanho de partículas com mesmo tamanho, mas não sendo tão precisa para diferenças de tamanho de moléculas muito grandes. Dessa forma, é uma técnica bastante eficiente em determinar o tamanho das partículas em uma solução, e assim indiretamente verificar também a presença de possíveis agregados. A figura 44 mostra o espectro obtido a partir de 1,4 mg da proteína recombinante LigANI em solução tampão PBS / Triton 0,001%.



**B**

Raio (nm)	% Pd	PM (kDa)	% Intensidade	% Massa
4,809	6,7	133	94,8	99,8

Figura 44. **Espectro de DLS da proteína LigANI**

A- Espectro de DLS da proteína recombinante LigANI, mostrando uma única barra predominante do sinal obtido. B- tabela com as informações obtidas a partir da análise de DLS, como raio da partícula, índice de polidispersividade (Pd), peso molecular (PM), intensidade do pico total e massa analisada.

As análises realizadas através da técnica de DLS demonstraram que não foi possível visualizar a presença de agregados nas amostras de proteína LigANI. Este resultado corrobora com os dados obtidos através da espectroscopia de fluorescência, onde o perfil da proteína não foi alterado na presença de agentes caotrópicos ou detergentes. Os índices de polidispersividade, em média, variaram entre 24-28%, e o tamanho das partículas avaliadas foi menor que 5 nm, não sendo observadas partículas de tamanhos maiores, confirmando a homogeneidade da amostra.

#### 4.7.2 Quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) residual através de fluorescência

O monitoramento da concentração de ácido nucleico durante e ao final do processo de purificação de imunobiológico com finalidade terapêutica é uma etapa importante no desenvolvimento de um processo. Os resultados obtidos em nosso estudo durante as etapas de purificação podem ser verificados na tabela 9, onde é possível observar redução da quantidade de DNA residual ao longo do processo,

entretanto a concentração de DNA na amostra final ficou acima dos limites recomendados pelas agências regulatórias.

**Tabela 9. Concentração de DNA total obtida através da metodologia de fluorescência (Qubit) em cada uma das etapas do processo para obtenção da proteína recombinante LigANI.**

<b>Etapas do processo</b>	<b>Quantificação DNA total (ng/<math>\mu</math>L)</b>
Extrato total	45200 $\pm$ 2262
Fração solúvel	54800 $\pm$ 10748
IMAC	5,33 $\pm$ 1,644
Gel filtração	1
IEX	1,85 $\pm$ 0,009
LigANI	1,4 $\pm$ 0,283

#### 4.7.3 Quantificação de endotoxinas

A quantidade de endotoxinas numa vacina é um fator extremamente importante uma vez que o LPS deve ser encontrado em quantidades em que não seja capaz de causar reatogenicidade, uma vez que dentre os vários componentes de uma vacina, vários podem causar reações adversas. É importante afirmar que cada vacina comercializada tem o seu limite próprio estabelecido, e as agências regulatórias apenas fazem recomendações quanto às quantidades de endotoxina apropriadas para vacinas (Brito e Singh, 2011).

As amostras de proteínas totais de três experimentos independentes foram avaliadas tanto pelo teste cinético cromogênico quanto pelo Teste de LAL no equipamento PTS-Endosafe.

Os resultados obtidos através do teste cinético cromogênico podem ser visualizados na tabela 10 e todas as amostras foram recuperadas com percentual menor do que 200% (valor estabelecido pelo teste).

Tabela 10. **Quantificação de endotoxinas pelo teste cromogênico de cada etapa do processo de purificação da proteína LigANI.**

<b>Etapas</b>	<b>UE/<math>\mu</math>g/mL</b>
Extrato total	$3,85 \times 10^4$
Fração solúvel	$4,87 \times 10^2$
IMAC	$1,46 \times 10^2$
Gel filtração	$1,4 \times 10^{-2}$
IEX	$2,9 \times 10^2$
LigANI final	$1,2 \times 10^2$

As amostras do final da purificação obtidos pelo teste PTS-Endosafe foram obtidas a partir de triplicatas de experimentos diferentes e tiveram valor de  $130 \pm 17,35$  UE/mg/mL.

As quantidades de endotoxinas obtidas nas amostras de cada etapa foram consideradas com valores altos, o que pode ser explicado pela etapa do processo equivalente, como por exemplo quando se observa a quantidade de endotoxinas no extrato total, o valor obtido de  $3,85 \times 10^7$  UE/mL em 1mg de proteína. Esses valores altos podem ser explicados pois estamos nos referindo ao lisado total da amostra de um produto oriundo de uma bactéria gram negativa. Entretanto, pode se observar pela tabela acima a redução da carga de endoxinas ao longo do processo de purificação, ao final a concentração foi de  $1,2 \times 10^2$  UE/mL.

O método cromogênico é um método bastante sensível, e além disso, a fim de obter dados mais próximos da realidade seria necessário o tratamento das vidrarias e plásticos utilizados durante o processo, ou a utilização de material descartável apirogênico, o que não foi feito. A avaliação das amostras de rLigANI ao final do processo feita pelo método PTS-Endosafe demonstra que a quantidade de LPS está dentro dos valores aceitáveis pela FDA e USP.

#### 4.8 Estudo da estabilidade da proteína LigANI

##### 4.8.1 Avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Este experimento teve como objetivo avaliar a estabilidade da proteína e sua capacidade de resistência a ciclos de congelamento e descongelamento contínuos que configuram situação de extremo estresse para o material. As alíquotas obtidas a

cada ciclo de descongelamento foram avaliadas por SDS-PAGE 12,5%, *imunoblotting* com soro de pacientes e difração circular como mostram as figuras 45 e 46.

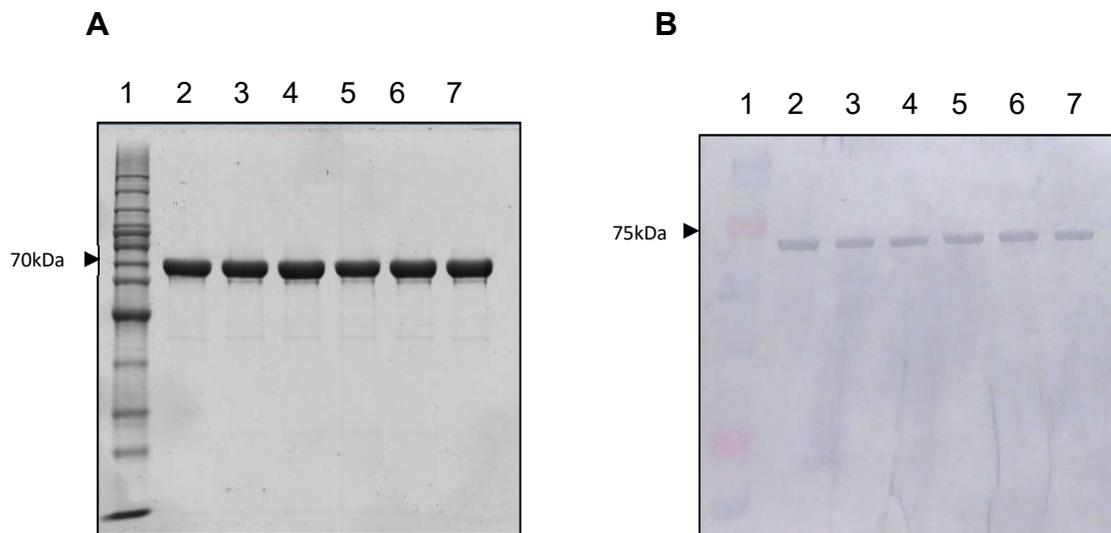


Figura 45. **Análise da proteína recombinante LigANI submetida a ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1  $\mu$ g por poço da proteína recombinante LigANI das amostras relativas aos ciclos de congelamento e descongelamento. 1- padrão de peso molecular (Bench Mark protein ladder), 2- LigANI controle armazenada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , 3- 1 $^{\circ}$  ciclo de descongelamento, 4- 2 $^{\circ}$  ciclo de descongelamento, 5- 3 $^{\circ}$  ciclo de descongelamento, 6- 4 $^{\circ}$  ciclo de descongelamento, 7- 5 $^{\circ}$  ciclo de descongelamento. B- *Imunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. 1- padrão de massa molecular pré-corado (Dual color (Bio-rad), 2 a 7- idem a ordem da figura B.

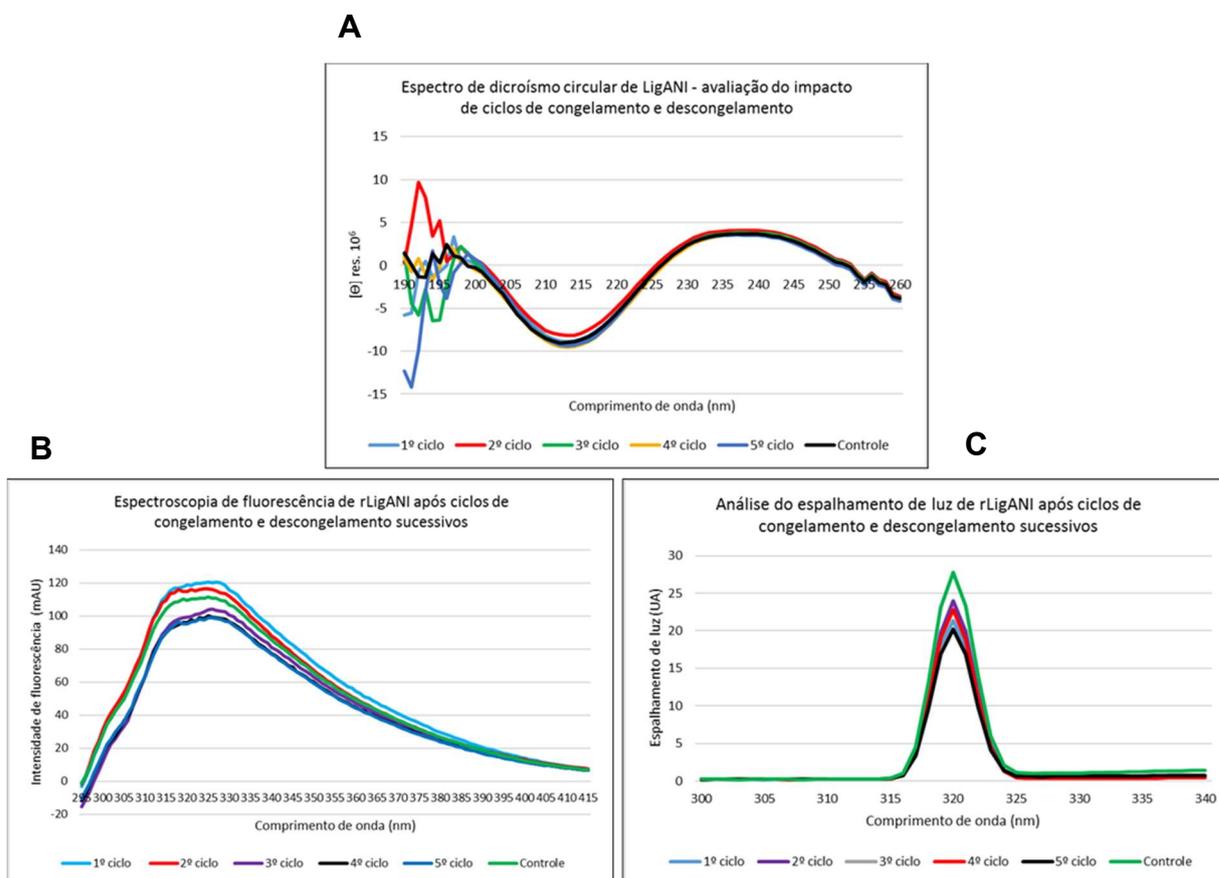


Figura 46. **Análise estrutural da proteína LigANI após cinco ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.**

A- Dicroísmo circular. B- Espectro de fluorescência, C- Espalhamento de luz. O controle é a proteína rLigANI estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas demonstram que a proteína apresenta o mesmo perfil após cinco ciclos de descongelamento, o que indica que a proteína é estável, e não foi detectada formação de agregados através das técnicas utilizadas. No SDS-PAGE e no *imunoblotting* foi possível visualizar uma banda única referente a proteína LigANI, e as análises de dicroísmo circular e espectrofluorescência mostraram que a proteína permaneceu íntegra e manteve sua estrutura secundária, mostrando perfil semelhante ao do controle.

#### 4.8.2 Estabilidade acelerada de curto período (*Short term accelerated stability*)

Este estudo foi conduzido no intuito de verificar o comportamento da proteína por um curto período de tempo a temperatura ambiente, a fim de verificar sua estabilidade nesta condição e os resultados podem ser verificados nas figuras 47 e 48.

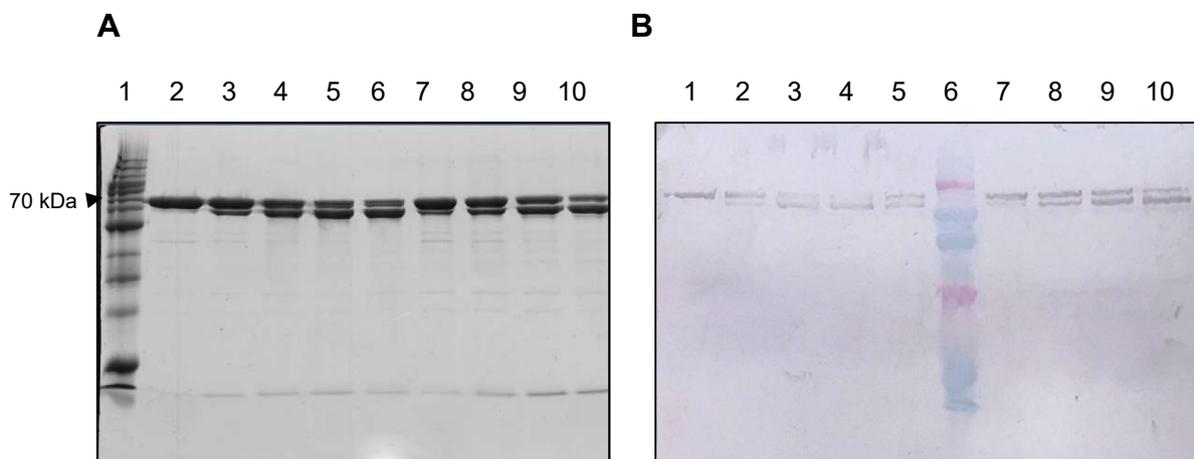
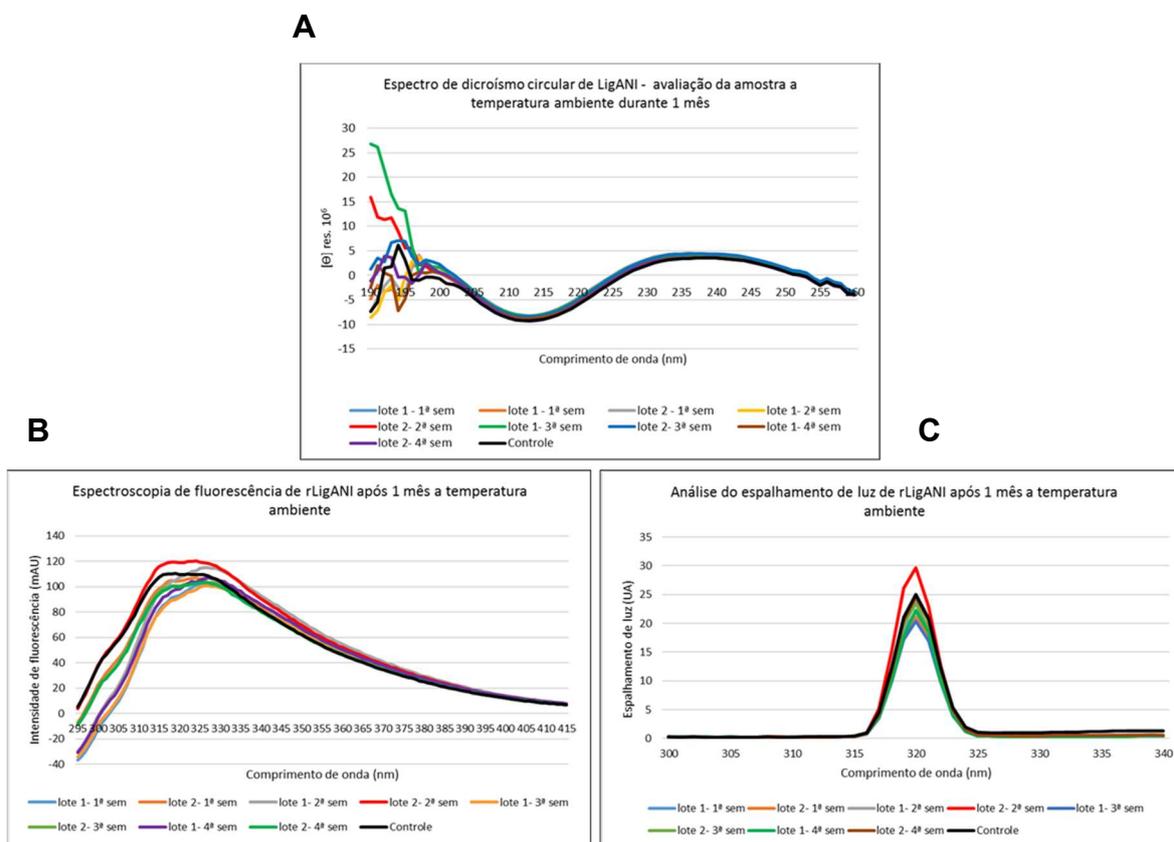


Figura 47. **Análise da proteína LigANI mantida um mês a temperatura ambiente.**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1 µg da proteína recombinante LigANI por poço. 1- padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen), 2 e 6- LigANI controle armazenada em freezer -80°C, 3 e 7- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 1 semana a temperatura ambiente, 4 e 8- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 2 semanas a temperatura ambiente, 5 e 9- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 3 semanas a temperatura ambiente, 6 e 10- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 4 semanas a temperatura ambiente. B- *Immunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. 1- LigANI controle armazenada em freezer -80°C, 2 e 7- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 1 semana a temperatura ambiente, 3 e 8- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 2 semanas a temperatura ambiente, 4 e 9- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 3 semanas a temperatura ambiente, 5 e 10- lotes 1 e 2 da proteína LigANI após 4 semanas a temperatura ambiente.

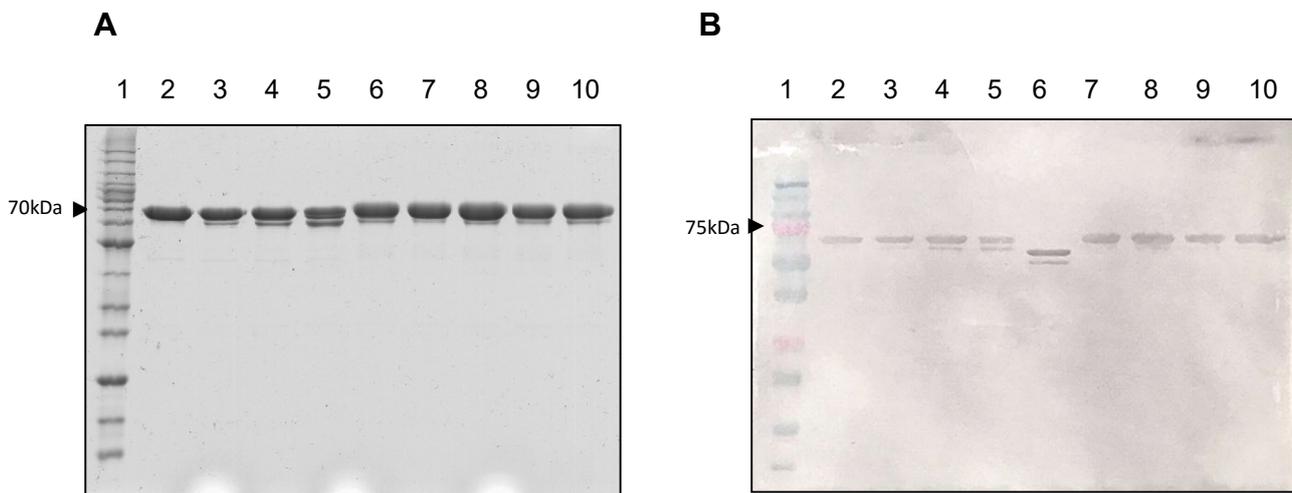


**Figura 48. Análises estruturais da proteína LigANI mantida a temperatura ambiente durante 1 mês**

A- Análise de dicroísmo circular da proteína LigANI na avaliação de estabilidade a temperatura ambiente, onde controle equivale a LigANI estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (lote1), e os espectros de dicroísmo circular da proteína rLigANI obtidos semanalmente. B- Espectroscopia de fluorescência, C- Análise da intensidade de luz.

Os resultados obtidos a partir do SDS-PAGE e do *imunoblotting* indicam degradação da proteína recombinante LigANI ao longo da estocagem a temperatura ambiente, contudo nas análises de dicroísmo circular e fluorescência não podemos observar alteração da qualidade da proteína, uma vez que o perfil dos espectros obtidos se mantém semelhante ao da amostra controle, não havendo alteração da estrutura secundária.

Diante dos resultados obtidos acima, foi feita nova avaliação com a adição de inibidor de proteases e o resultado pode ser visualizado na figura 49. De acordo com o resultado observado no SDS-PAGE, após a adição do inibidor de protease, a proteína LigANI permaneceu estável por mais tempo e o índice de degradação foi menor quando comparado a avaliação sem a adição de inibidor de proteases. Através do *imunoblotting* é possível visualizar uma banda única referente a proteína LigANI.



**Figura 49 Análises da proteína LigANI após 1 mês a temperatura ambiente com e sem adição do inibidor de proteases.**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1 µg da proteína recombinante LigANI por poço. 1- padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen), 2- LigANI controle armazenada em freezer -80°C, 3- LigANI após 1 semana a temperatura ambiente, 4- LigANI após 2 semanas a temperatura ambiente, 5- LigANI após 3 semanas a temperatura ambiente, 6- LigANI após 4 semanas a temperatura ambiente, 7- LigANI com adição do inibidor de protease, após 1 semana a temperatura ambiente, 8- LigANI com adição do inibidor de protease, após 2 semanas a temperatura ambiente, 9- LigANI com adição do inibidor de protease, após 3 semanas a temperatura ambiente, 10- LigANI com adição do inibidor de protease, após 3 semanas a temperatura ambiente. B- *Imunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. 1- padrão de peso molecular Dual color (Bio-rad), 2 a 10- idem a imagem A.

Nos estudos para avaliação da estabilidade da proteína LigANI, seja o experimento onde foram realizados ciclos de congelamento e descongelamento da proteína LigANI ou a avaliação após 1 mês a temperatura ambiente, foi possível observar que não houve mudança a nível de estrutura secundária pois não houve alteração do perfil em relação ao controle nas avaliações por difração circular e espectroscopia de fluorescência (Figuras 46 e 48).

A partir deste estudo foi possível demonstrar que a proteína rLigANI em solução tampão PBS sofre degradação quando mantida a temperatura ambiente como pode ser observado nos resultados com presença de duas bandas no SDS-PAGE, entretanto quando houve a adição do inibidor de protease a degradação foi reduzida consideravelmente, dessa forma podemos sugerir que o processo de degradação tem o envolvimento de proteases presente na solução proteica.

#### 4.8.3 Avaliação das condições de armazenamento da proteína LigANI:

Este tipo de estudo é importante para determinar a estabilidade ao longo do tempo da estocagem da proteína e com isso verificar o período e as condições nas quais a proteína se mantém íntegra durante ao armazenamento. Outro ponto importante que vale destacar é que este tipo de estudo permite identificar a temperatura ideal, tampão adequado, apresentação líquida ou liofilizada para estocagem da proteína. Os parâmetros avaliados neste estudo foram: formulação (líquida ou liofilizada), temperatura de estocagem (temperatura ambiente, 2-8°C, -20°C e -80°C), e diferentes tampões de armazenamento (HEPES 50 mM pH 6,8, Fosfato de Sódio pH 7,4 e PBS pH 7,4).

O acompanhamento destas amostras foi realizado a cada 30 dias até 120 dias de estocagem através de SDS-PAGE 12,5%, *imunoblotting* com pool de soro de pacientes e capacidade de adesão as proteínas de matriz extracelular, como pode ser observado nas figuras 50, 51, 52 e 53. Previamente às análises, as amostras da proteína LigANI foram quantificadas por BCA, e apresentaram as seguintes concentrações: PBS pH 7,4: 1,85 mg/mL; Fosfato de Sódio pH 7,4: 1,5 mg/mL e HEPES 50 mM pH 6,8: 0,56 mg/mL. Não foram observadas diferenças em relação a quantificação no tempo inicial (t0) e a concentração utilizada nas avaliações foi de 5µg para SDS-PAGE, 1 µg para *imunoblotting* e 2 µM para ensaio de adesão.

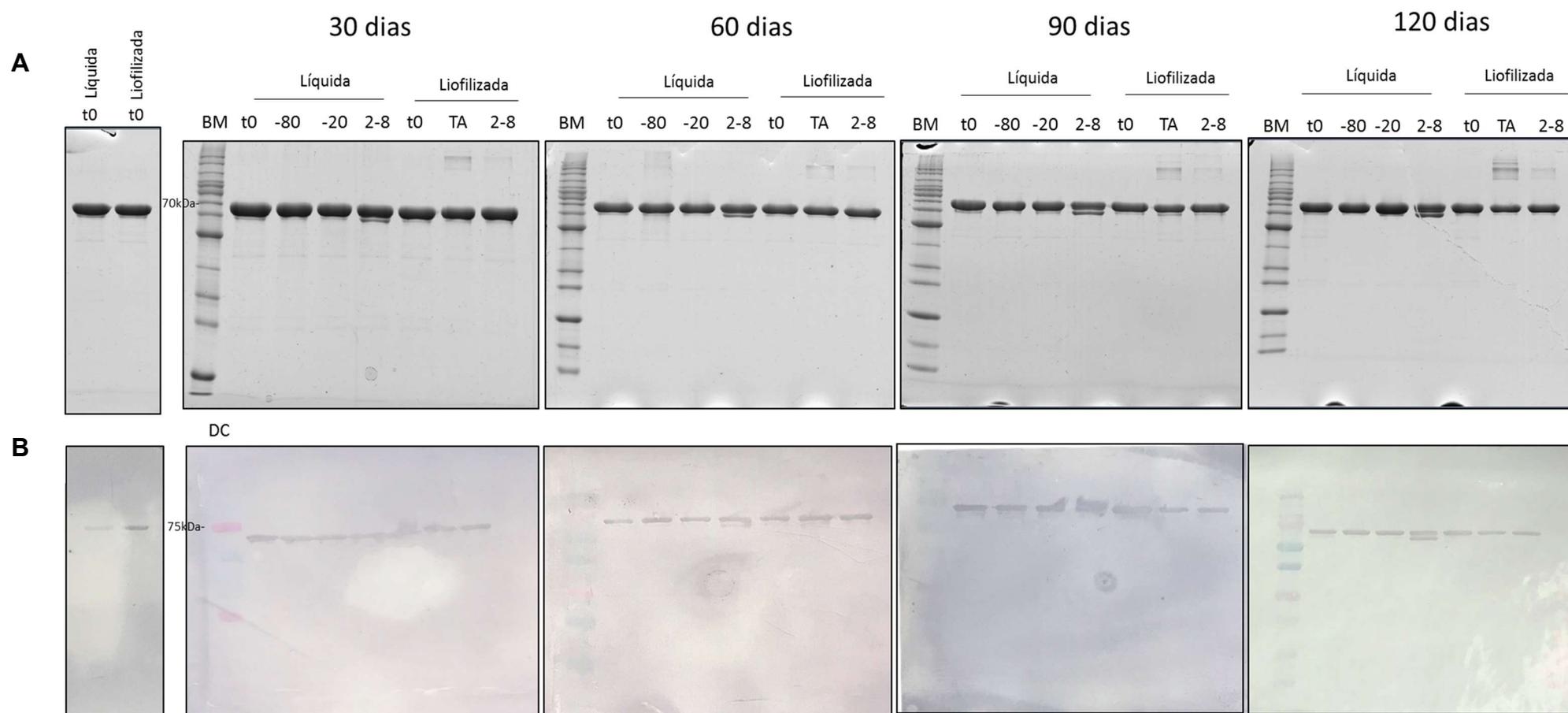


Figura 50. **Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão Fosfato de Sódio.**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1  $\mu$ g da proteína recombinante LigANI por poço. B- *Imunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. BM- marcador de peso molecular (Bench Mark protein ladder (Thermo Fischer Scientific), DC- padrão de peso molecular pré-corado Dual color (Bio-rad).

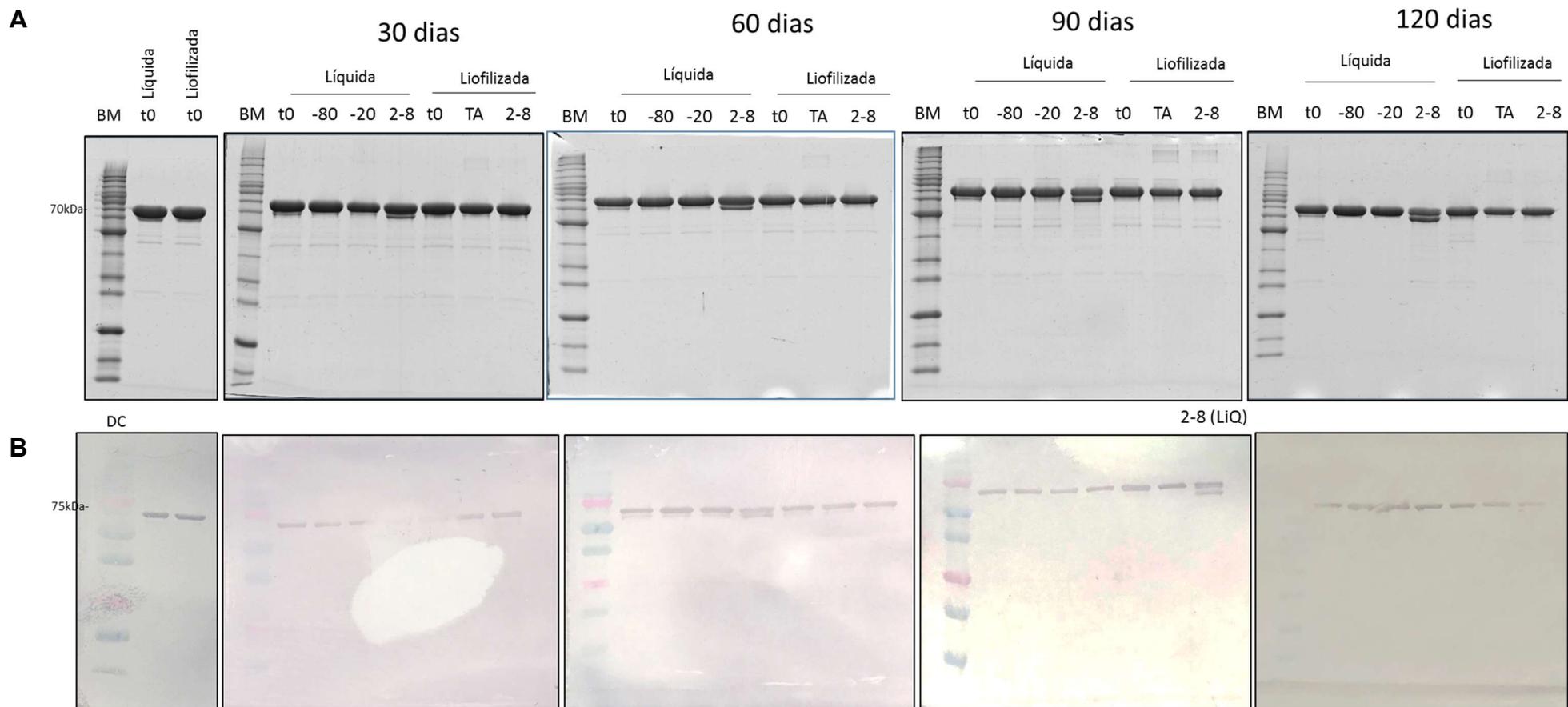


Figura 51. **Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão HEPES 50 mM pH 6.8.**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1  $\mu$ g da proteína recombinante LigANI por poço. B- *Imunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. BM- marcador de peso molecular (Bench Mark protein ladder (Thermo Fischer Scientific), DC- padrão de peso molecular pré-corado Dual color (Bio-rad).

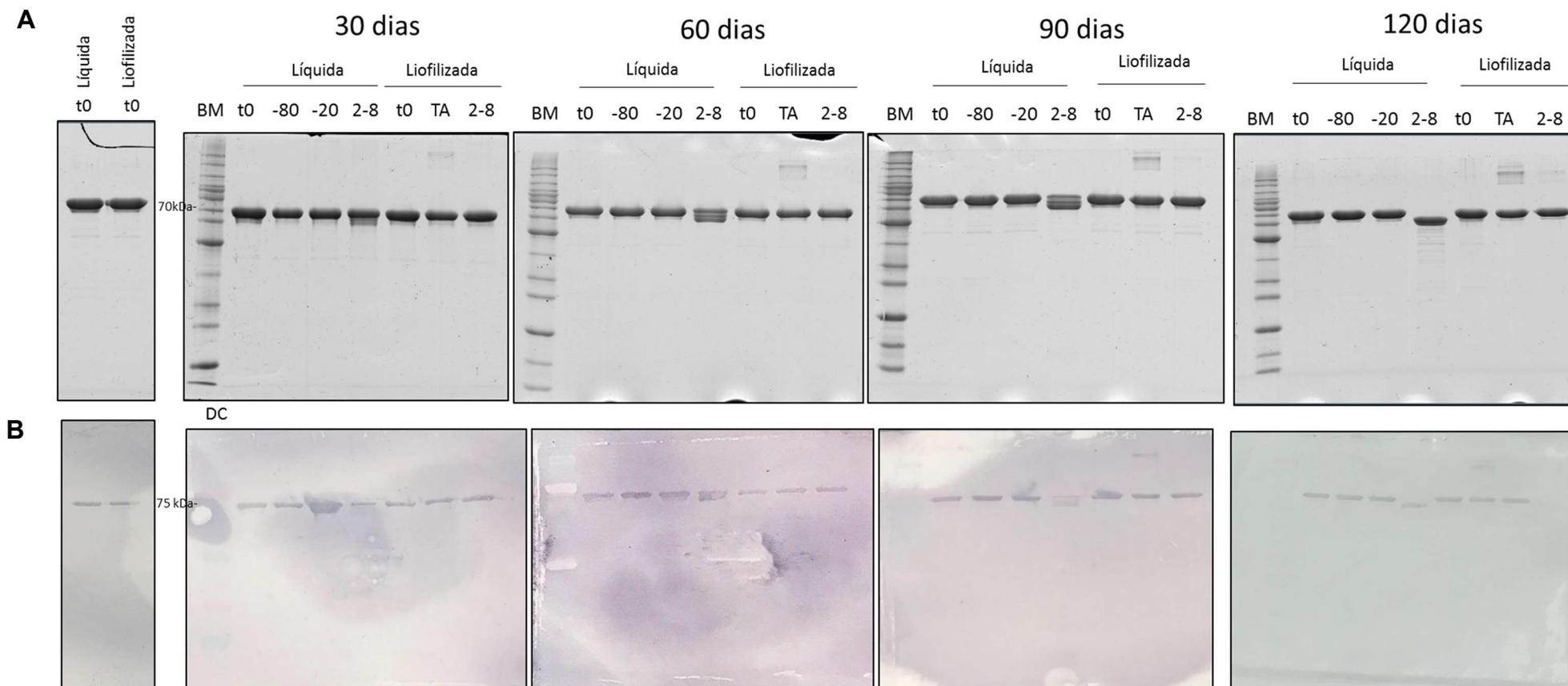


Figura 52 **Estabilidade da proteína LigANI armazenada em tampão PBS.**

A- SDS-PAGE 12,5% corado com Gel code blue stain reagent onde foram aplicados 1 µg da proteína recombinante LigANI por poço. B- *Imunoblotting* contra pool de soro de pacientes 1:500 contendo 500 ng da proteína recombinante LigANI por poço. BM- marcador de peso molecular (Bench Mark protein ladder (Thermo Fischer Scientific), DC- padrão de peso molecular pré-corado Dual color (Bio-rad)

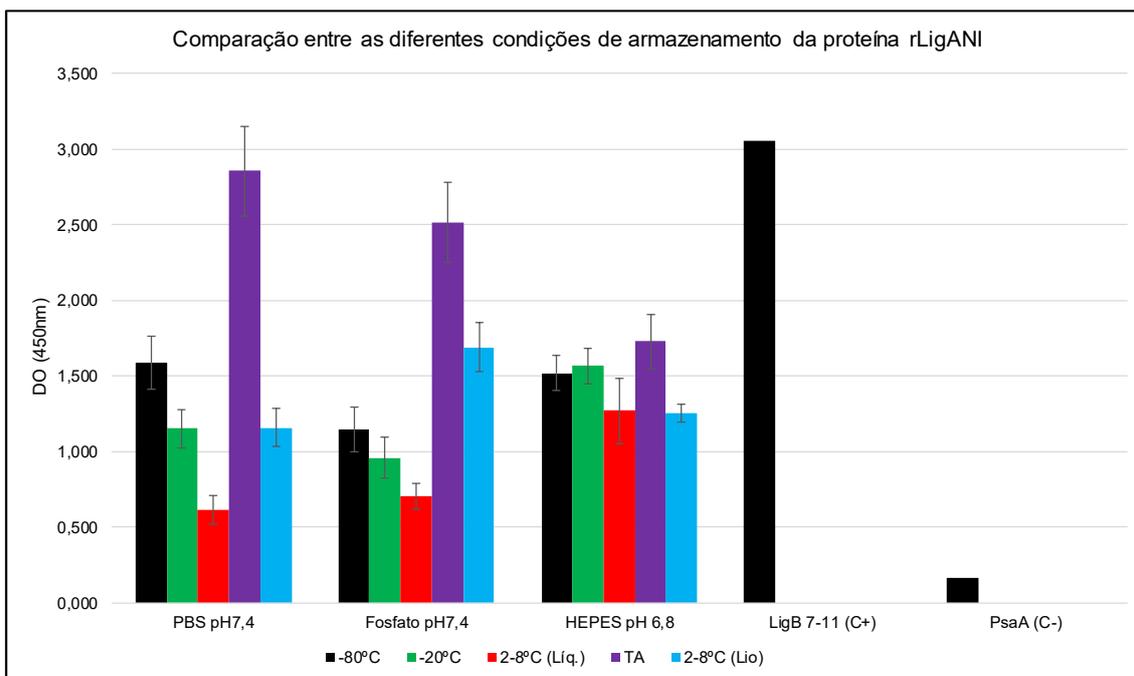


Figura 53. Ensaio de adesão de LigANI às proteínas de matriz extracelular a partir da proteína armazenada em diferentes condições.

Gráfico demonstrando a comparação entre os tampões PBS pH 7,4, Fosfato de Sódio pH 7,4 e HEPES pH 6,8 e o respectivo comportamento nas temperaturas -80°C, -20°C, 2-8°C (em vermelho: formulação líquida e azul: formulação liofilizada) e temperatura ambiente.

As avaliações indicam que tanto a formulação líquida quanto a liofilizada apresentaram resultados satisfatórios de integridade quando avaliados por SDS-PAGE e *imunoblotting*, mostrando que as amostras se mantiveram estáveis de uma forma geral, com exceção da formulação líquida estocada a temperatura de 2-8°C que apresentou diferentes níveis de degradação, onde se pode observar uma maior degradação quando a proteína foi mantida em tampão PBS.

Quando se comparam os resultados de estocagem entre as temperaturas -80°C e -20°C nos diferentes tampões, não observamos diferenças em relação ao perfil das proteínas estocadas nessas condições. A condição ideal para segurança do material no armazenamento por longos períodos é a temperatura de -80°C. Não observamos diferenças no perfil das amostras liofilizadas estocadas a 2-8°C por SDS-PAGE e *imunoblotting*. As amostras proteicas estocadas nas diferentes condições e tampões foram avaliadas quanto a sua funcionalidade pelo ensaio de adesão. Os resultados apresentados no gráfico para cada condição é a média das D.O. de experimentos independentes que avaliaram os tempos 0, 30, 60 e 120 dias. Os resultados do ensaio de adesão das amostras da proteína LigANI liofilizada mantida a temperatura ambiente e 2-8°C demonstrou funcionalidade quanto a capacidade de adesão quando

comparada às outras condições. A exceção foi quando essas amostras foram diluídas em tampão HEPES pH 6,8. Outro dado observado foi que a proteína liofilizada apresentou uma maior capacidade de adesão quando estocada a temperatura ambiente do que quando mantida a 2-8°C.

Com relação a formulação liofilizada, o armazenamento a temperatura ambiente se destaca em todos os tampões avaliados, sendo que o melhor desempenho pode ser observado com a proteína armazenada em PBS.

## 5 DISCUSSÃO

A potencial utilização da proteína LigANI como componente de uma formulação vacinal, bem como para ferramenta para o diagnóstico sorológico da leptospirose já foi demonstrada em vários estudos publicados e patentes (Bacelo et al., 2014; Hartwig et al., 2014; Kitashoji et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Silva et al., 2007). Contudo, até o momento essas avaliações foram realizadas com diferentes metodologias de expressão e purificação do antígeno não escalonáveis. Pensando nisso, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias de expressão (*upstream*) e purificação (*downstream*) escalonáveis da proteína visando sua obtenção com altos níveis de produtividade, pureza, homogeneidade e integridade bem como caracterização do antígeno através do conhecimento das suas características, tais como: ponto isoelétrico real, determinação da estrutura secundária, confirmação da massa molecular, integridade, estabilidade e demonstração da sua atividade biológica através da avaliação da sua capacidade de adesão a proteínas de matriz. Esses estudos foram realizados com o objetivo de uma melhor caracterização do antígeno e justificar o seu potencial de utilização como candidato a um componente de uma vacina para leptospirose.

A bactéria *E. coli* é o sistema de expressão procariótico mais empregado para a obtenção de proteínas recombinantes, uma vez que é bem caracterizado geneticamente, cresce rapidamente e em meios de cultivos simples, o que é uma vantagem para sua utilização na indústria, é facilmente escalonável e as proteínas produzidas são obtidas em grandes quantidades e com alto grau de qualidade (Huang et al., 2012; Sanchez-Garcia et al., 2016). Diante deste grande número de vantagens, diversos autores vêm utilizando este sistema de expressão visando a obtenção de proteínas recombinantes para uso terapêutico, vacina e diagnóstico (Alves et al., 2016; Li et al., 2015; Salavatifar et al., 2015; Yang et al., 2017). As metodologias para expressão e purificação são as mais variadas e geralmente envolvem o melhoramento da expressão da proteína de interesse, mas ainda assim a proteína pode ser expressa formando corpos de inclusão o que dificulta a obtenção da mesma pois é necessário o renovelamento adequado da mesma e demonstração da sua atividade biológica.

Tripathi e colaboradores (2012) estabeleceram um processo piloto para expressão e purificação de um candidato vacinal para encefalite japonesa, onde

foram utilizadas três etapas cromatográficas intercaladas por diafiltração para obtenção da proteína de interesse, e ao final do processo foram recuperados 124,2 mg/L da proteína, o que equivale a somente 6,6% do total. Em contraste com este resultado, Babu e colaboradores (2000) descreveram o processo para obtenção de Interferon  $\alpha$  a partir de corpos de inclusão onde o rendimento final foi de 4 g/L de produto final (Babu et al., 2000). A avaliação da viabilidade técnica e econômica de um candidato a uma aplicação ao desenvolvimento de produto biológico é determinante e para tal foram realizados experimentos com o intuito de aumentar o rendimento de produção dessas proteínas e estabelecer metodologias de purificação com boa recuperação e alto grau de pureza da proteína. Sendo assim, neste estudo foi realizada a otimização das condições de expressão para aumento do rendimento final e obtenção da proteína LigANI em sua forma solúvel. Os estabelecimentos das metodologias de purificação foram monitorados quantitativamente buscando sempre minimizar o número de etapas e redução das perdas durante o processo.

Choi e colaboradores (2006) publicaram uma revisão sobre a obtenção de proteínas recombinantes a partir de cultivos de alta densidade, onde afirmam que a aplicação do produto determina a pureza e os custos de produção associados. Um exemplo citado é o de uma enzima usada no processamento do amido, o mercado exige que ela seja produzida em grandes quantidades, com baixo grau de pureza, enquanto que uma proteína para uso terapêutico pode ser produzida em pequenas quantidades, mas deve atender a critérios rígidos de pureza e integridade. Dessa forma, cada proteína recombinante produzida vai adequar seu desenvolvimento de processo de acordo com a exigência requerida. Ainda neste trabalho, os autores sumarizaram diversos produtos terapêuticos obtidos a partir de proteínas recombinantes em *E. coli* e a produtividade de cada um dos biofármacos pode ser encontrada numa faixa bem ampla, chegando a variar de 180  $\mu\text{g/L}$  para o ativador de plasminogênio humano a 9,6 g/L para o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2 (Choi et al., 2006). Diversos autores vêm publicando trabalhos com o objetivo de obter proteínas recombinantes em *E. coli* com aplicação terapêutica, Yang e colaboradores (2007) expressaram, purificaram e caracterizaram Interleucina-24, que foi obtida a partir de corpos de inclusão com grau de pureza de 98% e rendimento de 128 mg/L. Relatos sobre a Interleucina-8 demonstraram sua obtenção com grau de pureza de 95,3% e rendimento final de 14,3 mg/L (Hou et al., 2005). Wang e

colaboradores (2014) descreveram o processo para obtenção do Fator neuronotrópico ciliar humano, e este foi obtido com grau de pureza de 95,2 % e rendimento final de 260 mg/L em frascos agitados (Wang et al., 2014). Em 2009, Zhong e colaboradores descreveram a produção em escala piloto da Estafiloquinase obtida a partir de cultivo em biorreator de 40 L, e a enzima foi obtida com pureza acima de 99 % e rendimento de 1,1 g/L. Hartwig e colaboradores em 2010 expressaram a proteína LigANI em *Picchia pastoris* e obtiveram um rendimento bruto de 276 mg/L em processo fermentativo de 196 horas, enquanto em nosso estudo obtivemos um rendimento bruto de 1058 mg por litro de cultivo em um processo fermentativo de 8-9 horas. Embora o custo de fermentação não seja o de maior impacto em um processo produtivo esse fator deve ser levado em conta na definição de uma plataforma de produção. Comparando os dados de rendimento e pureza citados acima, é possível afirmar que o rendimento final de 219,52 mg de LigANI/litro de cultivo e grau de pureza de  $99,70 \pm 0,24\%$  da proteína recombinante LigANI obtidos neste trabalho estão de acordo com o que vem sendo descrito na literatura no que diz respeito a produção de proteínas recombinantes para utilização como biofármacos, vacinas e reagente para diagnóstico. Eventuais discordâncias na concentração da proteína LigANI podem ser atribuídas a diferentes metodologias de quantificação. Para tentar minimizar esse tipo de variação, adotamos também a quantificação por massa seca também a fim de minimizar possíveis erros associados.

Neste trabalho, a produção de proteínas solúveis e bioativas sem necessidade de reenovelamento, foi obtida através da otimização das condições de cultivo de *E. coli*, através da diminuição da temperatura de crescimento, o que consequentemente reduz a taxa de síntese protéica e também a agregação de proteínas através da redução das interações hidrofóbicas inter e intramoleculares que facilitam a formação dos corpos de inclusão, que foi o principal problema do nosso grupo no início (Larentis et al., 2011). O tempo de pré-indução foi uma variável significativa, pois o tempo de crescimento de 133 minutos a 37°C antes da indução de IPTG teve impacto na produtividade no final do processo, favorecendo o crescimento da biomassa. A indução com IPTG afeta o metabolismo celular, estimulando uma carga metabólica elevada nas células resultando na formação de agregados inativos da proteína alvo recombinante, conhecidos como corpos de inclusão (Wurm et al., 2016). As

células induzidas têm um aumento no gasto de energia e devem necessariamente reduzir seu metabolismo de crescimento para produzir melhor a proteína heteróloga. Os dados obtidos a partir de planejamento experimental demonstraram que o composto de influência negativa para concentrações elevadas de IPTG poderia ser reduzido para esta produção, confirmando achados anteriores (Durrani et al., 2015; Islam et al., 2007; Larentis et al., 2014; Shin et al., 1997; Sohoni et al., 2015). A redução do IPTG também é financeiramente relevante, pois pode afetar o custo do processo de produção quando usado em grandes quantidades (Choi et al., 2006). A otimização das condições de indução para a concentração, temperatura e tempo de IPTG nos levou a estabelecer a condição de indução de expressão da proteína recombinante a 28°C por 4 horas com IPTG 0,1 mM em meio TB para obter condições economicamente viáveis. Sob as condições otimizadas, os níveis de expressão de LigANI em *E. coli* BL21 (DE3) star e indução com IPTG foram obtidos na faixa de 0,5 g/L de meio de cultura, que está na gama dos maiores rendimentos de proteínas recombinantes em culturas de células de alta densidade de *E. coli*, como descrito anteriormente (Choi et al., 2006).

O estabelecimento das metodologias de purificação de proteínas visando sua potencial aplicação na indústria biofarmacêutica é uma etapa crítica no desenvolvimento do processo produtivo, uma vez que o método de purificação precisa ser robusto, reproduzível, facilmente escalonável e com custos que não inviabilizem o uso do produto (Jozala et al., 2016). As etapas de purificação que foram estabelecidas neste trabalho obedecem aos critérios de criticidade acima. No processo de escalonamento, uma das etapas de *downstream* que pode apresentar dificuldades no desenvolvimento do processo é a etapa de gel filtração, uma vez que essa metodologia de purificação possui algumas limitações, tais como: o volume de amostra aplicado, o que conseqüentemente torna necessário a utilização de colunas muito grandes. Entretanto, este fato não chega a ser impeditivo para a realização do processo de escalonamento quando essa é alternativa com maior custo benefício (Saraswat et al., 2013).

A cromatografia de afinidade é uma metodologia utilizada com muita frequência, pois possibilita uma rápida purificação de proteínas recombinantes para avaliações preliminares quanto ao seu potencial de aplicação, uma vez que a cauda de histidina facilita o isolamento destas proteínas das demais do extrato bruto celular. Em 2007, Silva e colaboradores demonstraram a potencial

aplicação das proteínas Ligs através de experimento de imunogenicidade utilizando material purificado por cromatografia de afinidade, entretanto melhorias para utilização destas proteínas em testes animais e para diagnóstico precisaram ser estabelecidas, principalmente com relação a expressão, extração e purificação o que resultou na obtenção da proteína em sua forma solúvel, íntegra e com enovelamento correto. Tripathi e colaboradores (2012) e Salavatifar e colaboradores (2014) também utilizaram a cromatografia de afinidade em seu desenvolvimento de processo para a produção de antígenos vacinais para encefalite japonesa e malária respectivamente. O estudo para determinação da concentração de NaCl ideal para esta purificação foi fundamental para a obtenção da proteína LigANI recombinante mais pura e quase que isoladamente dos demais contaminantes. Nossos resultados demonstraram que a proteína LigANI foi obtida com grau de pureza de 98% na IMAC. A adição de NaCl nos tampões de lise e da purificação por afinidade teve o intuito de minimizar as interações iônicas entre as proteínas e a resina, e também de diminuir as ligações inespecíficas (Cheung et al., 2012), o que acarretou na diminuição da interação da proteína LigANI com a resina, visto que a mesma eluiu com menor concentração de Imidazol e os contaminantes permaneceram ligados.

As proteínas Ligs são expressas na superfície da bactéria, como foi descrito por Matsunaga e colaboradores em 2003, capazes de se ligar à proteínas de matriz extracelular (do inglês *extracellular matrix* ECM). Essas evidências levaram a especular que essas proteínas parecem ter associação com a ligação da bactéria ao tecido do hospedeiro e conseqüentemente sua colonização (Evangelista et al., 2017). Os dados de atividade biológica apresentados neste estudo, corroboram estudos encontrados na literatura desenvolvidos por Choy e colaboradores (2007) e Lin e colaboradores de 2010 (Choy et al., 2007; Lin et al., 2010). A proteína recombinante LigANI purificada neste trabalho demonstrou sua capacidade de se ligar às proteínas de matriz extracelular através do ensaio de adesão com as proteínas: Colágeno tipo IV, Fibronectina, Fibrinogênio e Laminina, esses dados reforçam o envolvimento desta proteína na adesão, destacando-a como potencial antígeno vacinal no bloqueio da colonização por *Leptospiras* patogênicas. A região purificada e avaliada neste estudo corresponde aos aminoácidos de 625 a 1224, que contém alguns aminoácidos da porção repetitiva, enquanto Choy e colaboradores (2007)

e Lin e colaboradores de 2010 utilizaram a região não idêntica de LigA que corresponde aos aminoácidos 631 a 1224. Os resultados encontrados, quando analisados comparativamente, demonstraram a adesão da proteína LigANI às proteínas de ECM, sendo observado que Fibronectina e Laminina apresentaram maior adesão quando comparadas ao Colágeno tipo I e IV e Fibrinogênio, enquanto que Choy e colaboradores demonstraram que LigANI se liga fortemente à Fibronectina e menos intensamente ao Colágeno e a Laminina.

De acordo com os guias da FDA e outras agências regulatórias, a caracterização físico-química e biológica de um produto terapêutico é essencial para desenvolvimento e produção de imunobiológicos. Dentre as análises para caracterizar o antígeno empregado neste trabalho, estão o SDS-PAGE, DC, DLS, e focalização isoelétrica (FDA, 1999; RDC 55/2010). A proteína recombinante LigANI obtida a partir do estabelecimento das metodologias de purificação desenvolvidas neste trabalho teve sua identidade e antigenicidade avaliadas através de ensaios de *immunoblotting*, com soro de pacientes com leptospirose e soro policlonal de camundongos anti-LigANI (obtido a partir da proteína purificada a partir das metodologias desenvolvidas neste trabalho). Os resultados demonstram a confirmação da identidade e antigenicidade da proteína de interesse. É importante ressaltar, que embora os dados obtidos sejam de baixa complexidade, são caracterizações biológicas requeridas pelas agências regulatórias como FDA e ANVISA (USFDA, 1999; RDC 55/2010). Li e colaboradores em 2015 descreveram o desenvolvimento da vacina recombinante para Hepatite E com antígenos produzidos em *E. coli*, e neste trabalho apresentam todas as análises realizadas para caracterização físico-química e imunológica da proteína recombinante componente desta vacina que são utilizadas como controle de qualidade da vacina.

O potencial envolvimento da proteína de superfície LigA na patogenicidade da *Leptospira* já foi descrito em diversos trabalhos (Castiblanco-Valencia et al., 2016; Matsunaga et al., 2003; Adler, 2015; Matsunaga et al., 2005), o que reforça o potencial desse antígeno candidato vacinal. Neste trabalho foi avaliada a reatividade cruzada desta proteína recombinante nas diferentes amostras de leptospirosas patogênicas a partir de *immunoblotting*. Os fragmentos LigANI de diferentes espécies e sorovares demonstraram reatividade cruzada frente ao soro policlonal anti-LigANI preparado a partir da proteína LigANI produzida neste estudo e gerado a partir da amostra de *Leptospira*

*interrogans* sorovar copenhageni – L1.130. Dessa forma, os dados de reatividade cruzada entre o fragmento de LigANI de diferentes leptospiros patogênicas e os dados publicados por Medeiros e colaboradores (2005) e McBride e colaboradores (2009), que demonstraram a presença do gene *ligA* em cinco espécies (*L. interrogans Copenhageni*, *L. interrogans Canicola*, *L. interrogans Pomona* e *L. kirshneri*) com um grau de identidade comparativa de  $88,9 \pm 6,8\%$  de aminoácidos, reforçam a hipótese de que uma vacina baseada no antígeno LigANI possa induzir uma proteção cruzada contra diferentes amostras de leptospiros patogênicas.

A estabilidade de uma proteína produzida para utilização no desenvolvimento e/ou produção de produtos com fins terapêuticos é de extrema relevância, pois demonstra que a mesma pode ser empregada, uma vez que mantém suas características físico-químicas e biológicas íntegras e conseqüentemente a sua funcionalidade (Faber et al., 2016; Hu et al., 2013; Kahn et al., 2017; WHO, 2011). Ao longo deste trabalho, a estabilidade e funcionalidade da proteína LigANI foi acompanhada e demonstrada durante o processo de purificação e seu armazenamento. Ao final das etapas de purificação, a proteína foi avaliada com resultados satisfatórios quanto a sua alteração de estrutura secundária, estabilidade, identidade, degradação e antigenicidade.

Um conjunto de técnicas foram utilizadas para monitorar a estabilidade da proteína durante o processo de armazenamento e submetidas a condições de estresse. As metodologias de SDS-PAGE, *imunoblotting* com soro de pacientes com leptospirose, DC e análises de fluorescência demonstraram que a proteína produzida neste estudo se manteve estável e íntegra após cinco ciclos de congelamento e descongelamento, mas quando mantida em condições de armazenamento desfavorável a temperatura ambiente, demonstrou degradação na primeira semana de estocagem quando avaliada pelo SDS-PAGE e *imunoblotting*. Contudo, essas mesmas amostras quando analisadas por DC e fluorescência não demonstraram variação a nível de estrutura secundária que pudesse ser detectada. Os resultados sugerem que a contaminação com proteases na amostra pode ter induzido a degradação, já que quando foi adicionado o coquetel com inibidores de protease não foi observada degradação até a terceira semana. De acordo com Wingfield (2015), a escolha de cepas de *E. coli* deficientes em proteases e a adição de inibidores de protease aos

tampões de lise e purificação são estratégias para minimizar e/ou impedir a ação destas enzimas (Wingfield, 2015). No nosso caso, a cepa utilizada para expressão da proteína LigANI foi BL21 (DE3) star que não expressa as proteases *lon* e *OmpT*, dessa forma a adição do inibidor de proteases pode ser incorporada às etapas iniciais do processo a fim de garantir a estabilidade da proteína LigANI por um período maior.

O estudo de estabilidade dos componentes de uma formulação vacinal é muito importante uma vez que auxiliam na determinação do tempo de prateleira dos imunobiológicos, e evitam imprevistos durante o armazenamento do produto. Através desses estudos é possível afirmar se este pode ser utilizado ou não, o que afeta diretamente nos custos do processo. Além disso, se não houver necessidade de refrigeração a baixa temperatura do produto (-20°C ou -30°C) os custos associados a estocagem do produto são menores (WHO, 2011). A avaliação da melhor condição de estocagem da proteína LigANI foi monitorada utilizando diferentes condições de armazenamento, como: a faixa de temperatura (que variou desde 25°C a -80°C), a solução (diferentes tampões de solubilização) e a apresentação (líquida e liofilizada). As amostras foram avaliadas inicialmente por dicroísmo circular e fluorescência, mas como foi citado acima nos experimentos em que foram avaliadas as amostras submetidas a estresse, essas metodologias não foram capazes de identificar alterações na estrutura que pudessem comprometer a integridade da proteína, sendo assim optamos em adicionar um ensaio de atividade biológica, além do ensaios de visualização do padrão eletroforético em SDS-PAGE e *imunoblotting* com soro de pacientes com leptospirose.

A partir deste estudo de termoestabilidade da proteína recombinante LigANI quando a mesma foi estocada e monitorada até 120 dias nas condições de armazenamento na forma líquida a 2-8°C e congelamento (-80°C e -20°C) e liofilização (estocadas a TA e 2-8°C), foi possível indicar as condições ideais para estocagem da proteína. Os dados obtidos neste estudo permitem dizer que tanto a proteína estocada na forma líquida a -80°C e -20°C ou liofilizada (TA e 2-8°C) demonstraram resultados satisfatórios de integridade e na sua capacidade de aderir às proteínas de matriz extracelular. A única exceção foi a proteína estocada na forma líquida a temperatura de 2-8°C que apresentou diferentes níveis de degradação. As observações acima corroboram parcialmente com os dados publicados pelo grupo em 2011 onde foi demonstrada a termoestabilidade

da proteína recombinante PsaA de *Streptococcus pneumoniae* e a sua estabilidade por três anos quando estocada as temperaturas de -80 e 4°C (Larentis et al., 2011). No caso da proteína recombinante LigANI não foi observada essa estabilidade quando a proteína foi armazenada a 2-8°C.

Os resultados através da avaliação do ensaio de adesão foram conduzidos a fim de verificar a perda da funcionalidade das proteínas estocadas nas diferentes condições e tampões. A conclusão dos experimentos é que a proteína LigANI liofilizada e estocada a temperatura ambiente foi a condição que demonstrou a maior capacidade de adesão às proteínas de matriz extracelular quando comparadas às outras condições. Contudo, não conseguimos formular uma tese do motivo pelo qual a proteína liofilizada e estocada a temperatura ambiente possa demonstrar uma maior adesão à proteína de matriz, já que o esperado seria um resultado no máximo equivalente ao da proteína liofilizada estocada 2-8°C. Menores níveis de ligação foram observados quando as proteínas foram diluídas em tampão HEPES 50 mM pH 6,8. Contudo, um fator que deve se levar em conta nas análises deste tipo de ensaio com diferentes tampões é que as condições de sal e pH ideal são necessárias e que esses dados podem não refletir a estabilidade da proteína em solução e sim a interferência por uma condição sub ótima. Outro ponto importante a ser levado em consideração é a concentração de proteína no armazenamento. A concentração da proteína LigANI armazenada em tampão HEPES foi de 0,56 mg/mL, e apesar de a proteína ter demonstrado estabilidade mesmo em altas concentrações (como quando armazenada em PBS e Fosfato), existe uma tendência de que quanto maior a concentração de proteína, maior a tendência para a formação de agregados, o que pode influenciar na atividade da proteína (Treuheit et al., 2002). Desta forma, para avaliações futuras é importante estabelecer o limite de concentração para armazenamento desta proteína.

Os dados de antigenicidade, estabilidade (degradação e estrutural) da proteína armazenada na forma liofilizada corroboram indiretamente com vários estudos e produtos no mercado. Faber e colaboradores (2016) analisaram diferentes condições de armazenamento do antígeno candidato a uma vacina contra malária, que foi liofilizado na presença de diversos excipientes e teve sua termoestabilidade avaliada e apresentou ótimos resultados em testes para avaliação da potência em ratos, sendo observada soroconversão com doses de 1 µg de antígeno. As vacinas disponíveis no mercado não disponibilizam muitas

informações acerca de estudos de estabilidade, mas um documento da PATH, uma organização não governamental, organizou um documento sobre dados de estabilidade das vacinas licenciadas. Neste documento alguns dados se destacam, como por exemplo, a maioria das formulações vacinais são líquidas e tem um tempo de prateleira (2-8°C) que varia de 18 semanas a 48 meses, outro ponto importante é que a maioria das vacinas apresentam algum tipo de dano quando congeladas, algumas são resistentes a ciclos de descongelamento, outras não apresentam nenhum tipo de observação. De acordo com Morefield (2011), uma vez que vacinas são muito complexas, de alto custo e tem alto risco associado ao seu desenvolvimento, é necessário o desenvolvimento de uma formulação bem-sucedida rapidamente, e para alcançar este objetivo é fundamental a caracterização do antígeno, sua interação com diferentes adjuvantes, e monitoramento da estabilidade em tempo real e em condições aceleradas a fim de dinamizar o processo e evitar futuros problemas (Morefield 2011). É importante destacar que estes estudos de pré-formulação são preliminares e análises físico-químicas e biológicas mais complexas sobre o antígeno e suas possíveis formulações são requeridas para estudos clínicos, como por exemplo nos estudos de Faber e colaboradores (2016), Fox e colaboradores (2013) e Hu e colaboradores (2012) (Faber et al., 2016; Fox et al., 2013; Hu et al., 2013). Entretanto, é também importante destacar que os resultados demonstrados são bastante promissores e indicam que a proteína é estável em diferentes temperaturas e condições de estocagem.

A estrutura secundária de LigANI foi determinada experimentalmente neste trabalho e os dados confirmaram a predominância de estrutura do tipo folha  $\beta$ , que pôde ser visualizada através do espectro característico a 215 nm. Esse resultado corrobora com o descrito por Palaniappan e colaboradores em 2002 e 2004 que haviam sugerido que a proteína LigA tinha uma estrutura folha  $\beta$  a partir da análise preditiva de aminoácidos. Lin e colaboradores (2010) sugeriram a mesma estrutura do tipo folha  $\beta$  para a região que corresponde a sequência de aminoácidos de 631 a 1140, não sendo equivalente a totalidade da sequência de LigANI empregada neste trabalho que é de 625 a 1224 aminoácidos. De acordo com a análise preditiva realizada pelo programa Phyre, foi demonstrado que 65% da estrutura de LigANI é formada por folha  $\beta$ , enquanto que as análises realizadas a partir dos nossos resultados determinaram que a proteína possui 33,5% de sua estrutura composta por folha  $\beta$ . Apesar do

percentual menor encontrado nos dados experimentais que os encontrados a partir da análise preditiva, ainda assim a estrutura  $\beta$  pregueada constitui a conformação predominante da proteína.

A partir da eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida 8-25% foi possível determinar a massa molecular da proteína e os dados da focalização isoelétrica permitiram determinar seu ponto isoelétrico real. A massa molecular e ponto isoelétrico experimental da proteína LigANI foram de 66,9 kDa de 6,94. As análises preditivas através dos programas ExPasy e Prot pi determinaram o ponto isoelétrico de 6,77 e 6,85, respectivamente. Esses dados são um pouco diferentes do observado experimentalmente, que foi de 6,94. Essa diferença pode ser explicada pelo tipo de algoritmo utilizado pelos programas computacionais, que podem ser diferentes entre eles e também devido a diferenças que podem ser observadas na distribuição de cargas da proteína em solução, que não é levada em consideração quando a análise é preditiva, e que considera somente a estrutura primária da proteína. Quanto a massa molecular, foi possível correlacionar os dados obtidos de forma preditiva com os dados experimentais. Além da caracterização da proteína, essas informações são essenciais para escolha das metodologias de purificação empregadas, entretanto como os dados *in silico* não foram significativamente diferentes, não houve impacto nas análises realizadas e na escolha dos métodos cromatográficos apropriados para a purificação de LigANI. Para complementarmos a caracterização, a cromatografia de exclusão molecular (SEC) foi empregada para determinar a massa molecular e homogeneidade das preparações. A massa encontrada foi de 109 kDa, maior do que o esperado, baseado nos dados da eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida 8-25% e análises preditivas. A hipótese levantada para explicar maior massa molecular obtida através da SEC, foi que a proteína não possui uma estrutura globular como a maioria dos padrões comerciais utilizados para determinar a massa molecular que são normalmente empregados na SEC. Lin e colaboradores (2010) sugeriram em seu estudo que as proteínas Ligs não possuem estrutura globular. Sendo assim, a proteína LigANI por apresentar uma estrutura mais alongada, a metodologia de SEC demonstrou essa limitação para determinação da massa. Dessa forma, a fim de confirmar os resultados preditivo e experimental, foi realizada a espectrometria de massa que confirmou a massa molecular de 66,9 kDa. Inicialmente, nossa hipótese era que a massa molecular

obtida a partir da SEC era devido a presença de isoformas da proteína, mas esta foi descartada a partir da realização dos ensaios e análises dos dados de DLS, onde foi observada a presença de estruturas com raio na faixa de 5 nm. Essa conclusão é baseada em que uma vez que se as proteínas apresentassem agregação o tamanho das partículas seria maior, e nenhuma outra população foi observada acima de 10 nm (Ratanji et al., 2014).

A homogeneidade é mandatória em uma amostra proteica que visa o desenvolvimento de um imunobiológico, a presença de agregados de qualquer tipo numa amostra proteica para utilização terapêutica é indesejável uma vez que estes podem causar reação imunogênica indesejável (um exemplo: reação anafilática) ou podem causar eventos adversos no momento da administração, podendo formar partículas (Cromwell et al., 2006; Ratanji et al., 2014). Dessa forma, como a massa molecular da proteína LigANI obtida de 109 kDa a partir da SEC foi maior do que a esperada, avaliamos a possibilidade de que a proteína pudesse estar formando agregados. A proteína foi tratada com diferentes agentes caotrópicos, detergentes e aumento de temperatura, entretanto não foi possível observar diferenças no perfil da proteína sob as condições de estresse avaliadas neste estudo. Contudo, no conjunto dos resultados avaliados por diferentes metodologias, podemos concluir que a preparação proteica na escala utilizada não induz a formação de isoformas. É importante ressaltar, que este resultado é um indicativo favorável na produção da proteína recombinante LigANI em escala industrial e sua aplicação no desenvolvimento de um imunobiológico.

Os métodos cromatográficos como a IMAC e principalmente a cromatografia de troca aniônica, auxiliam na redução da quantidade de endotoxinas derivadas de *E. coli*, que possuem carga neutra negativa em solução, e DNA residual da preparação proteica, uma vez que o DNA por ser carregado negativamente se liga a resina carregada positivamente (Hernández et al., 2016). Neste trabalho, a concentração de endotoxinas foi monitorada durante todo o processo, entretanto os dados não demonstram a concentração real uma vez que o trabalho foi realizado em escala laboratorial e cuidados como utilização de água apirogênica para preparo de meios e tampões para cromatografia não foram tomados como é exigido numa escala industrial (Carta e Jungbauer, 2010). Foram utilizadas duas metodologias para determinação da quantidade de endotoxinas nas amostras: o teste cinético cromogênico e o

sistema PTS-Endosafe. O primeiro é um teste bastante sensível com limite de detecção de 0,001 UE/mL, enquanto que o PTS detecta entre 0,005 e 10 UE/mL. Este último foi licenciado pela FDA em 2006 para liberação de produto final e como controle de qualidade em processo e apresentou os melhores resultados no nosso trabalho, onde ao final das metodologias de purificação, a proteína apresentou  $130 \pm 17,35$  UE/mL, o que corresponde a aproximadamente 90 UE/mL por miligrama de proteína. Levando em consideração, essa quantidade de endotoxinas na preparação proteica, se fossemos extrapolar este cálculo considerando que a vacina seria utilizada com uma dose de imunização de 20 µg, a quantidade de endotoxina administrada seria de 1.8 UE/mL. Dessa forma, os resultados obtidos corroboram os dados de Tripathi e colaboradores (2012), que utilizaram uma quantidade inferior a 5 UE/mL considerando uma dose de 25 µg de proteína em suas formulações para avaliação da resposta imune humoral em camundongos. É importante ressaltar que a quantidade de endotoxinas numa preparação proteica deve ser avaliada caso a caso, de acordo com Brito e Singh, 2011. A concentração de endotoxinas recomendada pela FDA para vacinas recombinantes é inferior a 20 UE/mL, entretanto de acordo com o documento da OMS com recomendações para garantir a qualidade, segurança e eficácia da vacina recombinante contra Hepatite B, a vacina deve ser testada quanto a sua atividade pirogênica e ter sua quantidade de endotoxinas mensurada através da inoculação intravenosa em coelhos ou por um teste de LAL (do inglês: *Limulus amoebocyte assay*). Para ser aceitável, o conteúdo de endotoxinas deve ser consistente com os níveis encontrados em lotes de vacina utilizados em ensaios clínicos e aprovados pelas agências regulatórias (WHO, 2013).

Devido ao potencial efeito negativo, as autoridades regulatórias lançaram diversos documentos de orientação sobre tipos e níveis de impurezas aceitáveis. O DNA residual em produtos a granel finais deve ser geralmente inferior a 100 pg por dose terapêutica (Wolter e Richter, 2005; Mehta e Keer, 2007; Lotfipour e Halladj-Nezhadi, 2012). O DNA residual da célula hospedeira é um contaminante indesejável e crítico na preparação de proteínas recombinantes terapêuticas para uso humano em termos de segurança e tolerância. De acordo com Carta e Jungbauer (2010) e o guia da OMS com recomendações para garantir a qualidade, segurança e eficácia da vacina recombinante contra Hepatite B (WHO, 2013) foi recomendado um limite de 10 pg/dose. Os dados desse estudo

demonstraram quantidade residual de DNA em torno de 28 ng/dose nas preparações proteicas ao final da purificação acima dos limites aceitáveis. Sendo assim, caso seja necessário a redução da concentração de DNA residual, é necessário avaliar metodologias para redução do DNA na amostra proteica, tais como tratamento com nuclease na etapa de extração da proteína. Entretanto até o momento, a Anvisa ainda não definiu um limite para a quantidade de DNA residual de produtos derivados de biotecnologia, mas a agência solicita às indústrias que essa quantidade seja a mínima possível e as mesmas levem em conta os valores mínimos definidos pelas autoridades internacionais.

O desenvolvimento de um processo para obtenção de uma proteína recombinante para utilização como candidata vacinal e reagente para kit diagnóstico deve considerar vários critérios, entre eles ser viável técnica e economicamente. O antígeno deve ser expresso em quantidades razoáveis (dependendo da quantidade necessária) e purificado com alto grau de pureza, e atender aos critérios de qualidade recomendados e exigidos pelas agências regulatórias. Neste estudo foi possível demonstrar que a proteína LigANI pode ser produzida atendendo a maioria destas exigências, e é importante a realização de mais estudos de caracterização a fim de fornecer um número maior de informações a respeito da proteína LigANI.

## 6 CONCLUSÕES

- As condições de fermentação foram otimizadas através de planejamento experimental: tempo de pré-indução e concentração de IPTG em microbioreator. O rendimento final do processo foi de 219,52 mg/L de LigANI.
- A condição de cultivo otimizada no microfermentador foi escalonada em 25 vezes e validada em três experimentos independentes com um aumento de produtividade da proteína LigANI de 42% em fermentador de 2,5 L.
- A estabilidade genética do DNA plasmidial da construção de LigANI obtida a partir do banco semente, trabalho e dos cultivos em fermentador de 2.5 litros de três experimentos independentes demonstrou 100% de identidade com a sequência molde.
- Foi possível estabelecer com sucesso a estratégia de *downstream process* da proteína LigANI com altos níveis de recuperação e de pureza (219,52 mg/L e  $99,70 \pm 0,24\%$ ).
- As metodologias de purificação estabelecidas no estudo são reproduzíveis e escalonáveis.
- Os ensaios de caracterização da proteína LigANI forneceram informações a respeito de características importantes, tais como: massa molecular e ponto isoelétrico real, determinação da estrutura secundária, termoestabilidade, homogeneidade, antigenicidade e atividade biológica. Informações essenciais na cadeia de desenvolvimento de imunobiológicos e mandatórias no dossiê requerido pelas agências regulatórias para autorização para estudos clínicos de fase I, II, III e registro de produto.
- Foi possível evidenciar que a proteína LigANI teve sua estabilidade conservada ao longo de todo o processo para sua obtenção, o que foi

confirmado através das avaliações de dicróismo circular e análises de fluorescência, que demonstraram consistência e reprodutibilidade.

- O soro policlonal anti-LigANI, produzido a partir da proteína purificada obtida de acordo com as metodologias desenvolvidas neste trabalho, foi capaz de reconhecer a proteína LigANI de diferentes sorovares de leptospira, demonstrando assim sua reatividade cruzada.
- Foi demonstrada a adesão da proteína LigANI às proteínas de matriz extracelular: Fibronectina, Colágeno do tipo IV, Fibrinogênio e Laminina, confirmando a hipótese de seu possível envolvimento na colonização das leptospiros durante a invasão ao hospedeiro.
- Os resultados de atividade de adesão destacam a hipótese do envolvimento da proteína LigANI e seu potencial como imunógeno vacinal no bloqueio da colonização das Leptospiras.
- Os ensaios de estabilidade proteica demonstraram que a proteína é estável durante a estocagem tanto em formulação líquida quanto liofilizada no período de 120 dias.
- A estabilidade da proteína LigANI na forma liofilizada é um ótimo indicativo de que uma potencial vacina pode ser formulada e armazenada desta forma, o que proporcionaria vantagens tais como: maior período de tempo de estocagem, termoestabilidade, e redução de custos associados com refrigeração e distribuição.

## 7 PERSPECTIVAS

- Realizar avaliação da imunoproteção conferida pela proteína LigANI (purificada a partir das metodologias estabelecidas neste trabalho) em hamsters e ensaio de desafio heterólogo.
- Realizar estudos para determinação da estrutura terciária da proteína LigANI por cristalografia ou RMN.
- Realizar estudos de estabilidade da proteína LigANI utilizando diferentes estabilizantes de diferentes constituições: açúcares, álcoois e aminoácidos.
- Realizar estudos de estabilidade térmica de longa duração a partir das condições avaliadas neste estudo e avaliar a apresentação liofilizada de forma mais completa, com avaliação de diferentes ciclos de congelamento e análise do pó líófilo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287-96.

Adler, B. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis.* New York: Springer; 2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC - Nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União* de 17/12/2010 (nº 241, Seção 1, pág. 110).

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4. ed. New York: Garland Science; 2002.

Alves RP, Pereira LR, Fabris DL, Salvador FS, Santos RA, Zanotto PM, Romano CM, Amorim JH, Ferreira LC. Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(6):460-9.

Azevedo AM, Rosa PA, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends Biotechnol.* 2009;27(4):240-7.

Babu KR, Swaminathan S, Marten S, Khanna N, Rinas U. Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;53(6):655-60.

Bacelo KL, Hartwig DD, Seixas FK, Schuch R, Moreira AaS, Amaral M, Collares T, Vendrusculo CT, McBride AJ, Dellagostin OA. Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:636491.

Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):803-9.

Balasundaram B, Harrison S, Bracewell DG. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends Biotechnol.* 2009;27(8):477-85.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71.

Bjellqvist B, Hughes, GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser DF. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis.* 1993;14:1023-1031.

Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*. 1994;15:529-539.

Brito LA, Singh M. Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During Preclinical Research. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100:34-37.

Buchan, DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nuc Ac Res*. 2013;41 (Web service issue):W349-W357.

Carta G, Jungbauer A. *Protein Chromatography: process development and scale-up*. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH; 2010.

Cameron CE. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:21-41.

Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Pagotto AH, Serrano SM, Abreu PA, Barbosa AS, Isaac L. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiology*. 2016;221(5):679-89.

Chang YF, Chen CS, Palaniappan RU, He H, McDonough SP, Barr SC, Yan W, Faisal SM, Pan MJ, Chang CF. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine*. 2007;25(48):8190-7.

Cheung RC, Wong JH, Ng TB. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96(6):1411-20.

Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*. 2006;61: 876-885.

Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007;75(5):2441-50.

Conrad NL, Cruz McBride FW, Souza JD, Silveira MM, Félix S, Mendonça KS, Santos CS, Athanazio DA, Medeiros MA, Reis MG, Dellagostin OA, McBride AJA. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(3):e0005441.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003898.

Cromwell MEM, Hilario E, Jacobson F. *Protein Aggregation and Bioprocessing*. The AAPS Journal. 2006;8(3):572-579.

de Carvalho JC, Medeiros ABP, Kimev PCS, Soccol CR. Cell Disruption and Isolation of Intracellular Products. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products. E Elsevier; 2017 p. 807-822.

Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Félix SR, Silva E, McBride AJ. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*. 2011;7(11):1215-24.

Dellagostin OA, Felix SR, Jorge S. Recombinant veterinary vaccines. In: Pandey VSA, Resende, R. Current developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and animal health applications. Elsevier; 2016. p. 439-458.

Durrani FG, Gul R, Sadaf S, Akhtar MW. Expression and rapid purification of recombinant biologically active ovine growth hormone with DsbA targeting to Escherichia coli inner membrane. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(16):6791-801.

Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010;5(9):1413-25.

Evangelista KV, Lourdault K, Matsunaga J, Haake DA. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180004.

Faber BW, Hellwig S, Houard S, Havelange N, Drossard J, Mertens H, Croon A, Kastilan R, Byrne R, van der Werff N et al. Production, Quality Control, Stability and Pharmacotoxicity of a Malaria Vaccine Comprising Three Highly Similar PfAMA1 Protein Molecules to Overcome Antigenic Variation. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164053.

Faria MT, Calderwood MS, Athanzio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*. 2008;108(1):1-5.

Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guillarme D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;113:43-55.

Fernandes LG, Siqueira GH, Teixeira AR, Silva LP, Figueredo JM, Cosate MR, Vieira ML, Nascimento AL. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;176:50-7.

Fernandes LG, Teixeira AF, Filho AF, Souza GO, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Romero EC, Nascimento AL. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *Int J Infect Dis*. 2017;57:61-69.

Fields C, Li P, O'Mahony JJ, Lee GU. Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials for biomagnetic separation. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(1):11-25.

Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, Bacelo KL, Amaral M, Hartleben CP, Dellagostin OA. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(5):725-31.

Fox CB, Kramer RM, Barnes V L, Dowling QM, Vedvick TS. Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants. *Ther Adv Vaccines.* 2013;1(1):7-20.

Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol.* 2011;73(5):408-19.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker. *The Proteomics Protocols Handbook.* New Jersey, United States: Humana Press; 2005. p. 571-607.

GE Healthcare. Strategies for protein purification, 2010. Acesso em: 27 de novembro de 2017. Disponível em: <https://www.gelifesciences.com/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-handbooks>.

Goris MG, Leeflang MM, Loden M, Wagenaar JF, Klatser PR, Hartskeerl RA, Boer KR. Prospective evaluation of three rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2290.

Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, Santos AC, Salgado K, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):505-8.

Gronemeyer P, Ditz R, Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering (Basel).* 2014;1(4):188-212.

Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:65-97.

Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 1999;67(12):6572-82.

Hartwig DD, Bacelo KL, Oliveira PD, Oliveira TL, Seixas FK, Amaral MG, Hartleben CP, McBride AJ, Dellagostin OA. Mannosylated LigANI produced in *Pichia pastoris* protects hamsters against leptospirosis. *Curr Microbiol.* 2014;68(4):524-30.

Hartwig DD, Oliveira TL, Seixas FK, Forster KM, Rizzi C, Hartleben CP, McBride AJ, Dellagostin OA. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2010;9:98.

Helmerhorst HJ, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, Hovius JW. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med*. 2012;70(5):215-21.

Hernández L, Rodríguez A, Peña V, Zumalacárregui L, Amaro D. DNA removal on different chromatography supports used for EPO purification by spike studies, *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2016;39:16,762-767

Hou D, Yan Z, Shi J, Han W, Zhang Y. Expression and one-step ion-exchange purification of (AAR)IL-8 (human IL-8 receptor antagonist). *Protein Expr Purif*. 2005;44(2):104-9.

Houde, DJ, Berkowitz SA. The Complexity of Protein Structure and the Challenges it Poses in Developing Biopharmaceuticals. In: *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2015. p. 1-21.

Hu L, Joshi SB, Liyanage MR, Pansalawatta M, Alderson MR, Tate A, Robertson G, Maisonneuve J, Volkin DB, Middaugh CR. Physical characterization and formulation development of a recombinant pneumolysoid protein-based pneumococcal vaccine. *J Pharm Sci*. 2013;102(2):387-400.

Huang C, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39:383–399.

Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design. *Biotechnol Prog*. 2007;23(4):785-93.

Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*. 1999;292:195-202.

Jozala AF, Gerald DC, Tundisi LL, Feitosa VA, Breyer CA, Cardoso SL, Mazzola PG, Oliveira-Nascimento L, Rangel-Yagui CO, Magalhães PO et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Braz J Microbiol*. 2016;47 Suppl 1:51-63.

Kahn M, LaRue N, Zhu C, Pal S, Mo JS, Barrett LK, Hewitt SN, Dumais M, Hemmington S, Walker A et al. Recombinant human G6PD for quality control and quality assurance of novel point-of-care diagnostics for G6PD deficiency. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177885.

Kelley, LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for modelin, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015;10:845-858.

Khan M, Dhanwani R, Rao PV, Parida M. Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of Chikungunya virus elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus Res*. 2012;167(2):236-46.

Kitashoji E, Koizumi N, Lacuesta TL, Usuda D, Ribo MR, Tria ES, Go WS, Kojiro M, Parry CM, Dimaano EM et al. Diagnostic Accuracy of Recombinant

Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003879.

Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW; Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*. 1999;354(9181):820-5.

Ko AI, Galvão Reis M, Croda JHR, Siqueira IC, Haake DA, James Matsunaga J, Riley LW, Barocchi M, Young TA, inventores. US Department of Veterans Affairs, University of California, Cornell Research Foundation, Fundacao Oswaldo Cruz, depositantes. Proteins with repetitive bacterial-Ig-like (Big) domains present in leptospira species. US patente 8802835 B2. 2002 Mai 17.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.

Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004;22(11-12):1545-52.

Larentis AL, Argondizzo AP, Esteves GS, Jessouron E, Galler R, Medeiros MA. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr Purif*. 2011;78(1):38-47.

Larentis AL, Nicolau JF, Esteves GS, Vareschini DT, de Almeida FV, dos Reis MG, Galler R, Medeiros MA. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Res Notes*. 2014;7:671.

Lessa-Aquino C, Borges Rodrigues C, Pablo J, Sasaki R, Jasinskas A, Liang L, Wunder EA, Ribeiro GS, Vigil A, Galler R et al. Identification of seroreactive proteins of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* using a high-density protein microarray approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2499.

Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:11-20.

Levett PN, Branch SL. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):745-8.

Li SW, Zhao Q, Wu T, Chen S, Zhang J, Xia NS. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(4):908-14.

Lin YP, McDonough SP, Sharma Y, Chang YF. The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *PLoS One*. 2010;5(6):e11301.

Lin X, Xiao G, Luo D, Chen X, Sun D, Yan J. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiology*. 2016; 16:241

Loftipour F, Hallaj-Nezhadi S. Microbial quality concerns for Biopharmaceuticals. In: Latest research into quality control. Isin Akyar (Ed.). Disponível em: Available from: <https://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/microbial-quality-concerns-for-biopharmaceuticals>

Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TC, Pessoa A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10(3):388-404.

Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajn bok J, Seguro AC. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1561-3.

Mathias DK, Plieskatt JL, Armistead JS, Bethony JM, Abdul-Majid KB, McMillan A, Angov E, Aryee MJ, Zhan B, Gillespie P et al. Expression, immunogenicity, histopathology, and potency of a mosquito-based malaria transmission-blocking recombinant vaccine. *Infect Immun.* 2012;80(4):1606-14.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol.* 2003;49(4):929-45.

Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun.* 2005;73(1):70-8.

Medeiros, A. M. Dos R Mitemayer G, Da Séf, McBride AJA, Croda JHR, Ramos JGR, Dellagostin AO, inventores. Fundação Oswaldo Cruz, depositante. Proteínas LigA e LigB (*Leptospiral* Ig-like (Lig) domains) para vacinação e diagnóstico. BR patente PI0505529-6. 2005 Dez 19.

Mehta S, Keer JT. Performance Characteristics of Host-Cell DNA Quantification Methods. In: *Bioprocess Technical.* disponível em: [http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/bpi-content/070509ar06\\_76445a.pdf](http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/bpi-content/070509ar06_76445a.pdf)

McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, Haake DA, Ko AI, Dellagostin OA. Genetic diversity of the *Leptospiral* immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol.* 2009;9(2):196-205.

McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med.* 1984;100(5):696-8.

Mills JR. Mechanical disruption of cells. In: Elliot Goldberg. *Handbook of downstream processing.* New York: Chapman & Hall; 1997.

Morefield GL. A rational, systematic approach for the development of vaccine formulations. *AAPS J.* 2011;13(2):191-200.

Murray GL, Lo M, Bulach DM, Srikrum A, Seemann T, Quinsey NS, Sermswan RW, Allen A, Adler B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii*

serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*. 2013;31(3):495-9.

Nabity SA, Ribeiro GS, Aquino CL, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AH, Miranda-Filho DB, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1878.

Naranjo M, Suárez M, Fernández C, Amador N, González M, Batista N, González I, Valdés Y, Infante JF, Sierra G. Study of a Leptospirosis Outbreak in Honduras Following Hurricane Mitch and Prophylactic Protection of the vax-SPIRAL® Vaccine. *MEDICC Rev*. 2008;10(3):38-42.

Nascimento IP, Leite LC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1102-11.

United Nations. The challenge of slums: global report on human settlements. Geneva: UN-HABITAT; 2003.

Nehete JY, Bhambar RS, Narkhede MR, Gawali SR. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacogn Ver*. 2013;7(14):107-16.

Neves LCM. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Fermentação] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2003.

Oliveira TL, Bacelo KL, Schuch RA, Seixas FK, Collares T, Rodrigues OE, Vargas J, Nascimento RO, Dellagostin OA, Hartwig DD. Immune response in hamsters immunised with a recombinant fragment of LigA from *Leptospira interrogans*, associated with carrier molecules. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(11):712-716.

Oliveira MAA, Leal EA, Correia MA, Serufo Filho JC, Dias RS, Serufo JC. Human leptospirosis: occurrence of serovars of *Leptospira* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. *Braz J Microbiol*. 2017;48:483-488.

Ongkudon CM, Hodges E, Murphy K, Danquah MK. Removal of endotoxins from plasmid DNA: analysis of aggregative interaction of mobile divalent metal cations with endotoxins and plasmid DNA. *J Sep Sci*. 2012;35(22):3208-16.

Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P et al. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 10):975-84.

Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2002;70(11):5924-30.

Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(3):284-92.

Particle Sciences [homepage na internet]. Protein Structure, volume 8 [acesso em 05 dez 2017. Disponível em: [http://www.particlesciences.com/docs/technical\\_briefs/TB\\_8.pdf](http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_8.pdf).

Patel KA, Sethi R, Dhara AR, Roy I. 2017. Challenges with osmolytes as inhibitors of protein aggregation: Can nucleic acid aptamers provide an answer? *Int J Biol Macromol* 100:75-88.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1-9.

Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol*. 2014;11(2):99-109.

Rathore AS, Kapoor G. Application of process analytical technology for downstream purification of biotherapeutics. *Chem Tecol Biotechnol*. 2015; 90(2): 228-236.

Rosa PA, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *J Chromatogr*. 2010;A 1217(16):2296-305.

Salavatifar M, Zakeri S, Hayati Roodbari N, Djadid ND. High-Level Expression, Purification and Characterization of a Recombinant Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1: Implication for vivax Malaria Vaccine Development. *Cell J*. 2015;17(3):520-31.

Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact*. 2016;15:33.

Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *Biomed Res Int*. 2013;2013:312709.

Schimidell W, Lima U de A, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Brazil:Blucher; 2001.

Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Luo H, Xie X, Medeiros DBA, Wakamiya M, Tesh RB, Barrett AD, Wang T et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat Med*. 2017;23(6):763-767.

Sharma K, Gupta P, Kumar Singh A, Gopalan N, Kumar Dhaked R, Lakshmana Rao PV. Development of a simple fed-batch process for the high-yield production of recombinant shiga toxin B-chain protein. *Protein Pept Lett*. 2012;19(2):228-37.

Shin CS, Hong MS, Bae CS, Lee J. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol Prog*. 1997;13(3):249-57.

Signorini ML, Lottersberger J, Tarabla HD, Vanasco NB. Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. *Epidemiol Infect.* 2013;141(1):22-32.

Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine.* 2007;25(33):6277-86.

Smits HL, Chee HD, Eapen CK, Kuriakose M, Sugathan S, Gasem MH, Yersin C, Sakasi D, Lai-A-Fat RF, Hartskeerl RA et al. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Trop Med Int Health.* 2001a;6(2):114-8.

Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, Sasaki D, Pujianto B, Vestering M, Abdoel TH et al. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001b;8(1):166-9.

Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1272-5.

Sohoni SV, Nelapati D, Sathe S, Javadekar-Subhedar V, Gaikawai RP, Wangikar PP. Optimization of high cell density fermentation process for recombinant nitrilase production in *E. coli*. *Bioresour Technol.* 2015;188:202-8.

Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem.* 2000;287(2):252-60.

Srimanote P, Wongdeethai N, Jieanampunkul P, Samonkiert S, Leepiyasakulchai C, Kalambaheti T, Prachayasittikul V. Recombinant LigA for leptospirosis diagnosis and ligA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. *J Microbiol Methods.* 2008; 72, 73–81.

Treuheit MJ, Kosky AA, Brems DN. Inverse relationship of protein concentration and aggregation. *Pharm Res.* 2002;19(4):511-6.

Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ et al. . 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178(5):1457-63.

Tripathi NK, Shrivastava A, Biswal KC, Rao PV. 2012. Development of a pilot-scale production process and characterization of a recombinant Japanese encephalitis virus envelope domain III protein expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 95(5):1179-89.

Turner LH. Leptospirosis. II. Serology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1968;62(6):880-99.

Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol.* 2006;24(11):1377-83.

United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment Description Information for a Vaccine or Related Product. Vaccine and product related guidance. 1999. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM092272.pdf>

United States Food and Drug Administration. Guidance for industry - for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for a therapeutic recombinant DNA-derived product or a monoclonal antibody product for in vivo use. 1996. CMC (Chemistry, manufacturing and controls) and GMP (Good manufacturing practices) Guidances. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/General/UCM173477.pdf>

Vedadi M, Arrowsmith CH, Allali-Hassani A, Senisterra G, Wasney GA. Biophysical characterization of recombinant proteins: a key to higher structural genomics success. *J Struct Biol.* 2010;172(1):107-19.

Verma R, Khanna P, Chawla S. Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(4):763-5.

Wang K, Zhou F, Zhu L, Zhu X, Zhang K. High level soluble expression, purification, and characterization of human ciliary neuronotrophic factor in *Escherichia coli* by single protein production system. *Protein Expr Purif.* 2014;96:8-13.

Wang M, Jiang S, Wang Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered.* 2016;7(3):155-65.

Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation-pathways and influencing factors. *Int J Pharm.* 2010;390(2):89-99.

Watson DW. Hydrophobic Interaction Chromatography for Biopharmaceutical Analysis. 2017;35(4):278. [acesso em 10 jan 2018]. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com/hydrophobic-interaction-hromatography-biopharmaceutical-analysis>.

Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, Figueroa CA, Pessoa A, Farías JG. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol.* 2013;44(4):1043-1048.

Wheelwright SM. The design of downstream processes for large-scale protein purification. *J Biotechnol.* 1989;11(2-3):89-102.

Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers.* 2008;89: 392-400.

Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nuc Acids Res.* 2004;32: W668-673

Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci.* 2015;80:6.1.1-35.

Wolter T, Richter A. Assays for Controlling Host-Cell Impurities in Biopharmaceuticals. In: *Bioprocess Tehnical*. Disponível em: [http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/2014/05/0302ar06\\_77171a.pdf](http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/2014/05/0302ar06_77171a.pdf)

World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland: WHO; 2002.

World Health Organization. Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.

World Health Organization. Guidelines on stability evaluation of vaccines. Geneva, Switzerland: WHO; 2011. Technical Report No. 962.

World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines. Geneva, Switzerland: WHO; 2013. Technical Report No. 786.

Wurm DJ, Veiter L, Ulonska S, Eggenreich B, Herwig C, Spadiut O. The E. coli pET expression system revisited-mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(20):8721-9.

Yang J, Zhang W, Liu K, Jing S, Guo G, Luo P, Zou Q. Expression, purification, and characterization of recombinant human interleukin 24 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2007;3(2):339-345.

Yang M, Dent M, Lai H, Sun H, Chen Q. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine.* 2017;35(33):4287-4294.

Zhong G, Aiping Y, Bingxing S, Yang L, Chutse W. Pilot-scale production and purification of a staphylokinase-based fusion protein over-expressed in *Escherichia coli*. *Front. Biol China.* 2009;4(1):75–81.

## 9 ANEXOS

1. Sequenciamento nucleotídico de *ligANI*
2. Avaliação preditiva da estrutura secundária de LigANI através do programa Psipred
3. Avaliação preditiva da estrutura secundária de LigANI através do programa Phyre 2

## Project: LigANI.sqd Contig 1

10 20 30 40 50 60 70

GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCTCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → tcctctaatacggatattcttaccgtttccaacacaa

Trabalho.seq(1>1803) → TCCTCTAATACGGATATTCTTACCGTTTCCAACACAA

80 90 100 110 120 130 140 150

ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → acgccaaacgcgggttaggttccactttaaaacaaggaaccgttaaagttaccgcttctatgggtggaatcgaagat

Trabalho.seq(1>1803) → ACGCCAAACGCGGGTTAGGTTCCACTTTAAAACAAGGAACCGTTAAAGTTACCGCTTCTATGGGTGGAATCGAAGAT

160 170 180 190 200 210 220 230

TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → tctgtagatTTTaccgTcAcAcagGCAactTTgactTCgATcGAAGTctctCCAactcGcgctTCgATTGCAAAagg

Trabalho.seq(1>1803) → TCTGTAGATTTTACCGTCACACAGGCAACTTTGACTTCGATCGAAGTCTCTCCAACCTCGCGCTTCGATTGCAAAAGG

240 250 260 270 280 290 300

AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

## Project: LigANI.sqd Contig 1

240 250 260 270 280 290 300

AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → aatgactcaaaaatttacggctacaggtatTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

Trabalho.seq(1>1803) → AATGACTCAAAAATTTACGGCTACAGGTATTTTTACGGATCATTCTAAGAAGAACATTACAGAGCAAGTCACCTGGA

310 320 330 340 350 360 370 380

AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → agtcttcttcgaaagcattaagtatgttgaatgcacctggTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

Trabalho.seq(1>1803) → AGTCTTCTTCGAAAGCATTAAAGTATGTTGAATGCACCTGGTGAAGAAGGAACAGGTAAGGCGATTGCAGTCGGGAAA

390 400 410 420 430 440 450 460

ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → acgactattactgcaaccttagaaaaactttccgggaaaactgatattaccgTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

Trabalho.seq(1>1803) → ACGACTATTACTGCAACCTTAGAAAACTTTCCGGGAAAACCTGATATTACCGTTACTCCCCTGTTCTTACTTCAAT

470 480 490 500 510 520 530

TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA

## Project: LigANI.sqd Contig 1

		470	480	490	500	510	520	530		
		TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA								
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA								
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	tcaaatcagtcctgtaaaacattctcttgtaaaagggttaacagaaaaatTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA								
Trabalho.seq(1>1803)	→	TCAAATCAGTCCTGTAAAACATTCTCTTGTAAGGGTTAACAGAAAAATTTTCTGCTACAGGTATCTACTCTGATA								
		540	550	560	570	580	590	600	610	
		ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	attccaacaaagacattacttcctccgttacgtggcatttcgtccaacaactctgTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
Trabalho.seq(1>1803)	→	ATTCCAACAAAGACATTACTTCCTCCGTTACGTGGCATTTCGTCCAACAACCTCTGTTGCAACGATCTCAAACACAAAA								
		620	630	640	650	660	670	680	690	
		GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	ggttaccaaggacaagcttacggaaccggtacaggaacagtgaatattaagcgacattgggaaatgtaagcagcca								
Trabalho.seq(1>1803)	→	GGTTACCAAGGACAAGCTTACGGAACCGGTACAGGAACAGTGAATATTTAAAGCGACATTGGGAAATGTAAGCAGCCA								
		700	710	720	730	740	750	760	770	
		GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	ggtttccaaattatccgttaccgcagcggaaacttactgagattgtgctaaatcccacttcatctcacaagccaagg								
Trabalho.seq(1>1803)	→	GGTTTCCAAATTATCCGTTACCGCAGCGGAACTTACTGAGATTGTGCTAAATCCCAC TTCATCTCACAAAGCCAAGG								

## Project: LigANI.sqd Contig 1

780 790 800 810 820 830 840

GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → gacttactgaaaatTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

Trabalho.seq(1>1803) → GACTTACTGAAAATTTTAAAGCGACCGGCGTATTTACGGACAATTTCGACAAAAGATATTACCGACCAGGTTACTTGG

850 860 870 880 890 900 910 920

AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → aaatcttccaatgcagcctacgcaaaaatTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

Trabalho.seq(1>1803) → AAATCTTCCAATGCAGCCTACGCAAAAATTTCAAACGCAACTGGAAGTAAAGGGGTTGTTAATGCACTCTCGAAGGG

930 940 950 960 970 980 990 1000

AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → aacgagccacatctccgctaccttaggtttcgatttcaagtgcaaatgcgacattccaagttactccggcaagaatag

Trabalho.seq(1>1803) → AACGAGCCACATCTCCGCTACCTTAGGTTTCGATTTCAAGTGCAAATGCGACATTCCAAGTTACTCCGGCAAGAATAG

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070

CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

## Project: LigANI.sqd Contig 1

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070

CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → cttcaatcgaagtaacaccaaataatTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

Trabalho.seq(1>1803) → CTTCAATCGAAGTAACACCAAATAATTTCTTCTTGATCAAAGGACTTAGTCATCCATTTAAAGCAATTGGAATCTAT

1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150

ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → acggataatacaagacagacattacaaaacaagTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

Trabalho.seq(1>1803) → ACGGATAATACAAAGACAGACATTACAAAACAAGTTTCTGCTTCTCTGATCCGAATGTTGCATCGATCGATAA

1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230

CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → cacatTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

Trabalho.seq(1>1803) → CACATTTTCATTGGCTGGCTCAGCTACCGCAATCGATGATGGAAAAACGAACATCACTGCAACGTTATCTGATTCTA

1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG

## Project: LigANI.sqd Contig 1

		1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
		TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG							
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG							
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	tgtccgcttctactaccttgtatgtcacttctgctgtccttattgacatagaagtcaagcctagtatTTTCGTCCTG							
Trabalho.seq(1>1803)	→	TGTCCGCTTCTACTACCTTGTATGTCACCTTCTGCTGTCCTTATTGACATAGAAGTCAAGCCTAGTATTTTCGTCCTG							
		1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380
		AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	agcgaaggtcttactactacaactaaccgctactggcatctattccgatcactctacccatgatttgactcaggttgt							
Trabalho.seq(1>1803)	→	AGCGAAGGTCTTACTACTACAACCTAACCCTACTGGCATCTATTCCGATCACTCTACCCATGATTTGACTCAGGTTGT							
		1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460
		ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	acagtggacttccagcaagccatccaacattgcaatcgaaaatacagccggtaaaaaaggtaaagtaacggctcttg							
Trabalho.seq(1>1803)	→	ACAGTGGACTTCCAGCAAGCCATCCAACATTGCAATCGAAAATACAGCCGGTAAAAAAGGTAAAGTAACGGCTCTTG							
		1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
		CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 23_8_17 NI.seq(1>2006)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 17_8_17 NI.seq(1>2361)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 13_9_17 IND.seq(1>2234)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 13_9_17 NI.seq(1>2364)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 23_8_17 IND.seq(1>2240)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI 17_8_17 IND.seq(1>1881)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
LigANI L1-130 vector.seq(1>1803)	→	catttggagattcagaatTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							
Trabalho.seq(1>1803)	→	CATTTGGAGATTCAGAATTTACGGCAACCTACGATTCTATTAAAAGTAATCGAGCCTGGATATTTCGTCAATGACGAG							

## Project: LigANI.sqd Contig 1

1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610

AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → aaattagtaaacataaccattagttcttcccaagTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

Trabalho.seq(1>1803) → AAATTAGTAAACATAACCATTAGTTCTTCCCAAGTTTTGACAGATAAGGGGTTCGGCTCAACAATTCAAGGCAATCGG

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690

AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → aactttccaaggaggtagccaacttgaccttaccggatcttgtgacctggaagtcctctgattctaaggtagtttcta

Trabalho.seq(1>1803) → AACTTTCCAAGGAGGTAGCCAACCTTGACCTTACGGATCTTGTGACCTGGAAGTCCTCTGATTCTAAGGTAGTTTCTA

1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770

TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 13\_9\_17 IND.seq(1>2234) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 13\_9\_17 NI.seq(1>2364) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 23\_8\_17 IND.seq(1>2240) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI 17\_8\_17 IND.seq(1>1881) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

LigANI L1-130 vector.seq(1>1803) → tcagtaactctaataatgatgacagaggtttaacaacagcgcttctgtaggttccctctaaaatttctgcgatttacggg

Trabalho.seq(1>1803) → TCAGTAACTCTAATGATGACAGAGGTTTAAACAACAGCGCTTCTGTAGGTTCCCTCTAAAATTTCTGCGATTTACGGT

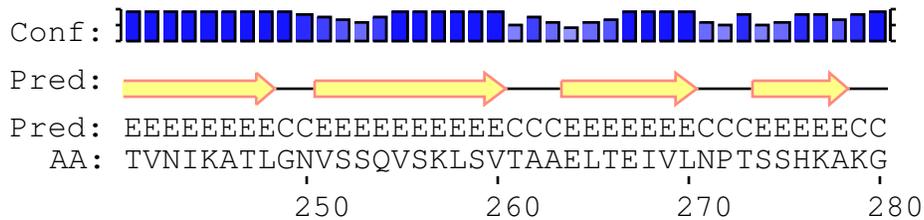
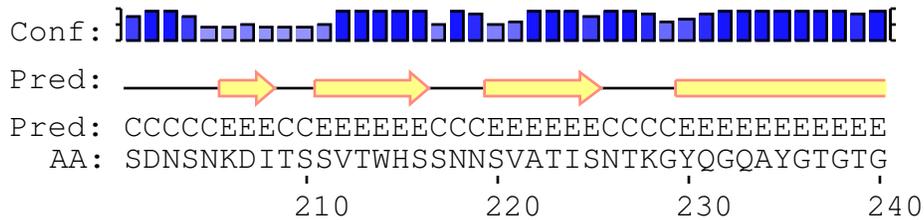
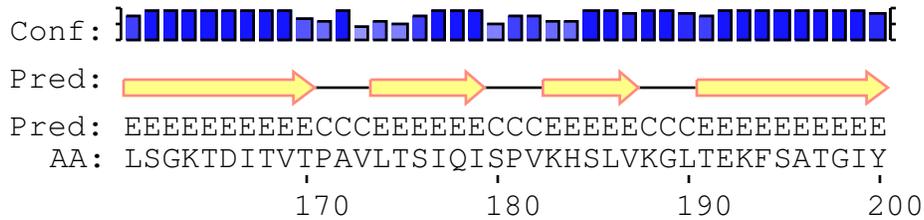
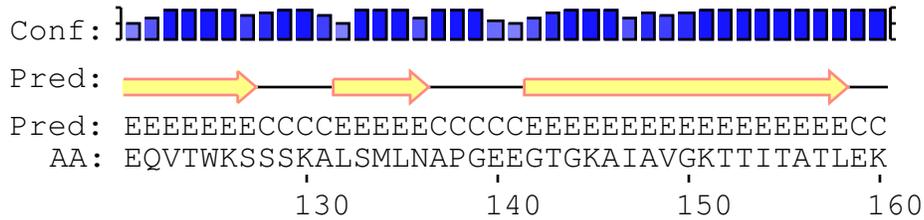
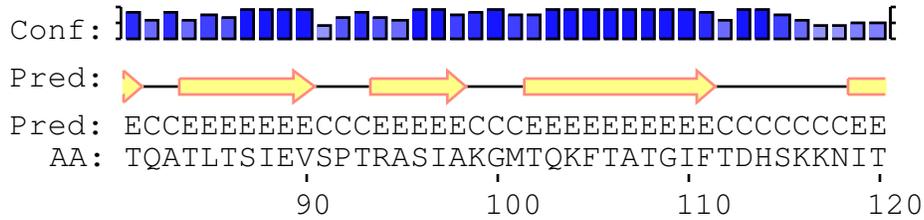
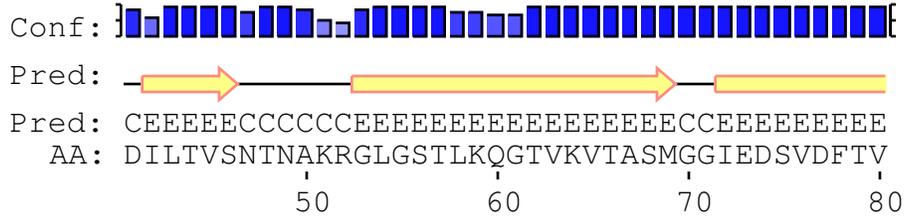
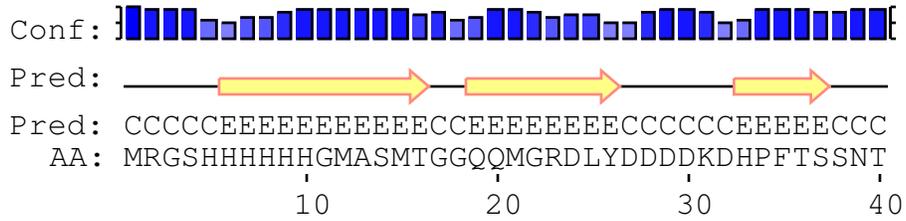
1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

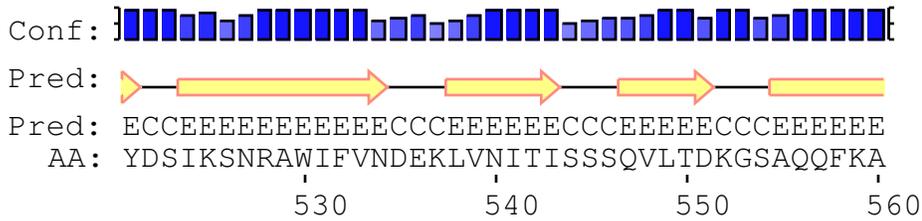
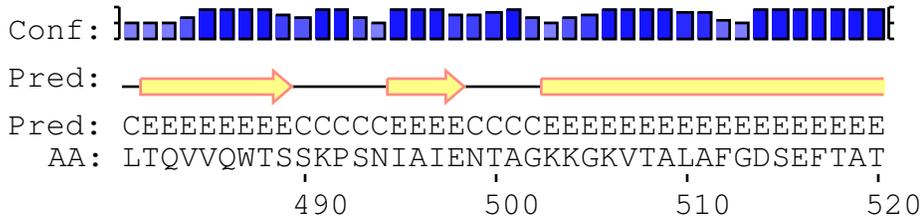
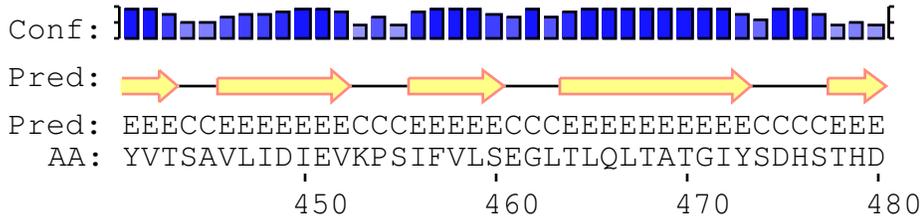
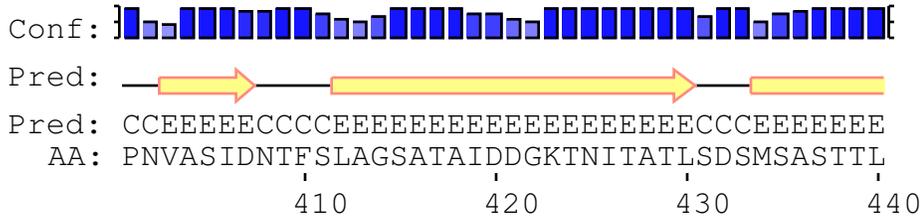
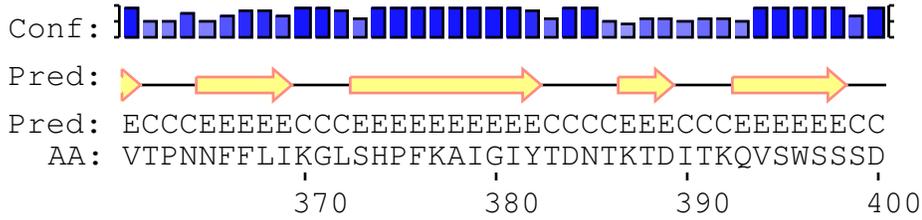
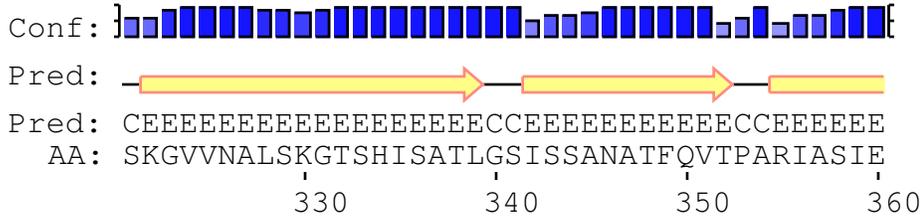
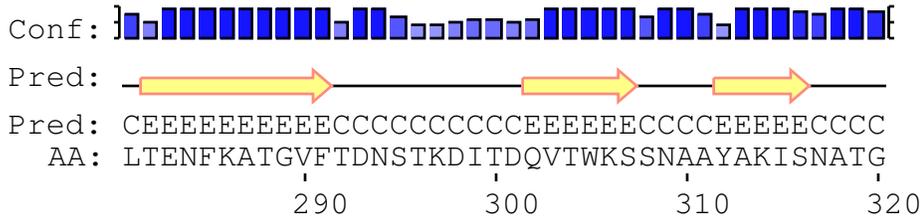
TCTATCCATAGTGACTCTATCGATTTTGAAGTAACTCCAGAAATATTAGCCTCTATTAAAACGGAGCCATAATCTAG

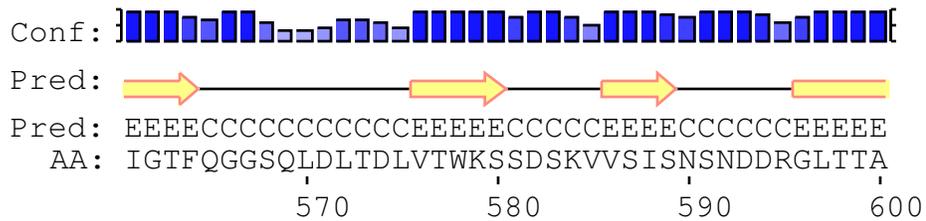
LigANI 23\_8\_17 NI.seq(1>2006) → TCTATCCATAGTGACTCTATCGATTTTGAAGTAACTCCAGAAATATTAGCCTCTATTAAAACGGAGCCATAATCTAG

LigANI 17\_8\_17 NI.seq(1>2361) → TCTATCCATAGTGACTCTATCGATTTTGAAGTAACTCCAGAAATATTAGCCTCTATTAAAACGGAGCCATAATCTAG









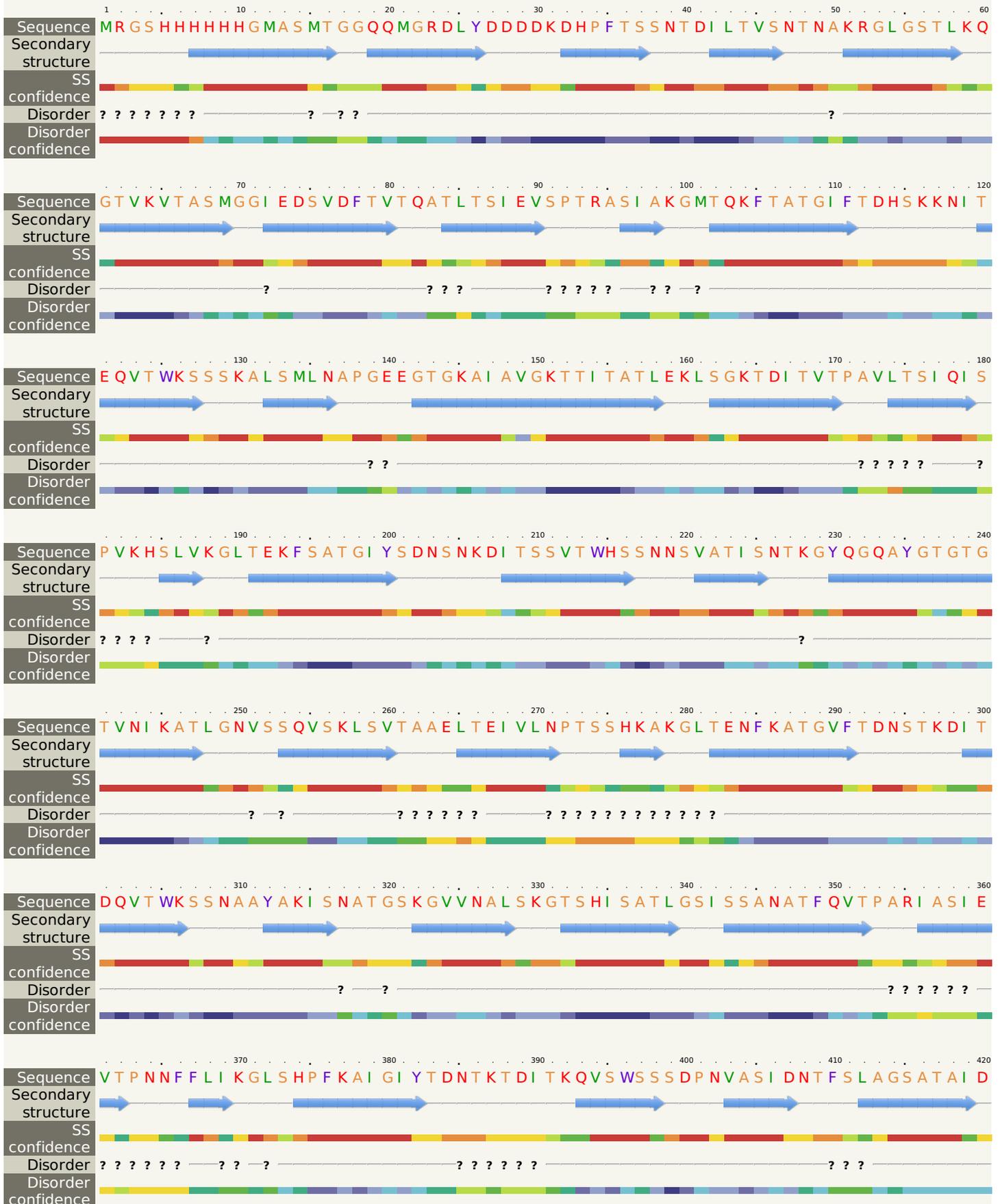
Legend:

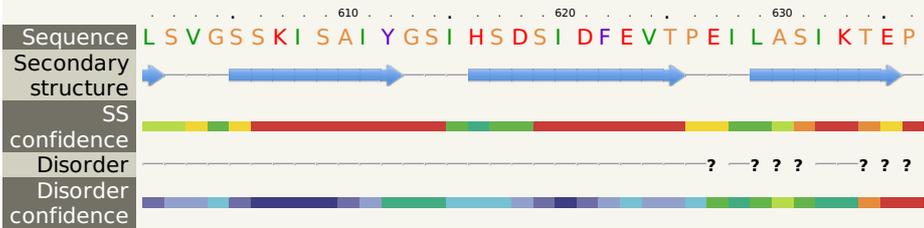
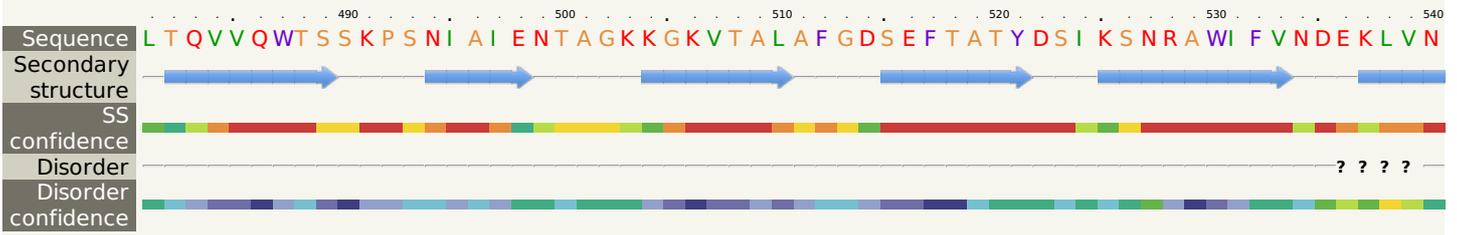
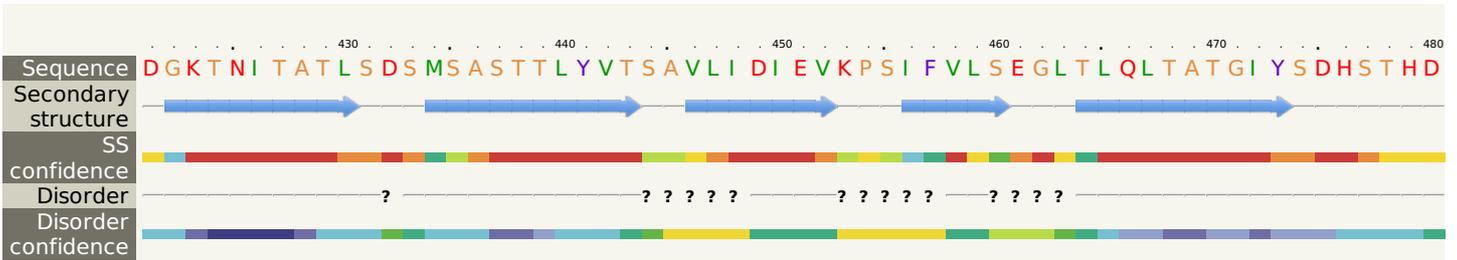
	= helix	Conf: 	= confidence of prediction
	= strand	Pred: - +	Pred: predicted secondary structure
	= coil	AA:	target sequence

# Phyre2

Email	gsesteves@hotmail.com
Description	LigANI__
Date	Thu Sep 28 00:06:49 BST 2017
Unique Job ID	e04de51e2831ab70

## Secondary structure and disorder prediction





Confidence Key

High(9) Low (0)

? Disordered ( 20%)

Alpha helix ( 0%)

Beta strand ( 65%)