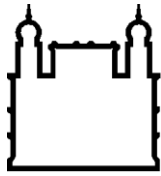


INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

BRUNA EVELYN ROCHA CAMPOS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA GENÉTICA PARA
SUPEREXPRESSION HETERÓLOGA EM CÉLULAS CHO**

CURITIBA
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

BRUNA EVELYN ROCHA CAMPOS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA GENÉTICA PARA
SUPEREXPRESSIONE HETERÓLOGA EM CÉLULAS CHO**

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fabrício Klerinton Marchini

Co-orientadora: Dra. Mariana Serpeloni

CURITIBA
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Campos, Bruna Evelyn Rocha.

Desenvolvimento de uma plataforma genética para superexpressão heteróloga em células CHO / Bruna Evelyn Rocha Campos. - Curitiba, 2021. xx, 135 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Fabrício Klerinton Marchini.

Co-orientadora: Mariana Serpeloni.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. proteínas terapêuticas. 2. fed-batch. 3. biofármacos. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aos **31 dia do mês de maio de dois mil e vinte e um, às 09:00 horas, através de teleconferência pelo link <https://us02web.zoom.us/j/5953384663>**, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: **Dra. Letusa Albrecht, Dra. Patrícia Shigunov e Dra. Leda dos Reis Castilho**, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Bruna Evelyn Rocha Campos** intitulada: **“Desenvolvimento de uma plataforma de superexpressão heteróloga em células CHO”**, sob a orientação de **Dr. Fabrício Klerinton Marchini e coorientação Dra. Mariana Serpeloni**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela Presidente **Dra. Letusa Albrecht**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

(X) Aprovação da dissertação por unanimidade

() Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (nãosuperior a noventa dias).

() Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 31 de maio de 2021

Dra. Letusa Albrecht – ICC/FIOCRUZ

Dra. Patrícia Shigunov – ICC/FIOCRUZ

Dra. Leda dos Reis Castilho - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Candidato(a): Bruna Evelyn Rocha Campos

Dedico essa dissertação aos meus pais, pois são luz na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Celia e meu pai João, pelo apoio em minhas decisões e me incentivarem com todo amor e carinho, dando o máximo sempre, comemorando as minhas conquistas, mesmo que mínimas, me ensinando que devemos sempre valorizar os pequenos passos da vida para assim, conquistar os nossos sonhos. Ao meu irmão João Pedro, por ser um irmão maravilhoso e compreensível, me orgulhando cada dia mais e tornando assim os meus dias mais felizes. Sei que sem a ajuda deles eu não estaria hoje realizando um sonho traçado há 10 anos.

Ao Dr. Rafael Luis Kessler por ter confiado em mim ao me trazer para o Instituto Carlos Chagas e posteriormente ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, tive grandes aprendizados e construções, que levarei para o resto da minha vida, com muito carinho. À Dra. Mariana Serpeloni por estar ao meu lado me orientando diariamente, assiduamente, com toda energia e disposição, sendo muito compreensiva em muitos momentos em que precisei, muitas vezes onde nem eu sabia que precisava. Ambos foram e são pessoas maravilhosas e que levarei junto comigo como referência de bons orientadores, profissionais e amigos.

Ao Dr. Fabrício K. Marchini por ter aceitado me colocar em um projeto de importância para o instituto, o que abrirá muitas portas em minha caminhada.

Agradecer aos meus amigos externos em especial à Bruna Silveira, Bruna Sabatke e Jackeline Anjos, que sempre me incentivaram e me ajudaram quando necessário, sendo pessoas maravilhosas que estiveram sempre ao meu lado. Aos amigos de laboratório, gostaria de agradecer à Divandrea Matioski, laboratorista do Hospital de Clínicas, grande amiga, que me instruiu no início das minhas atividades com biologia molecular e, ao Dr. Gabriel Meissner onde pude contar diariamente com a sua presença ilustre, uma pessoa maravilhosa com quem construí uma amizade, o que tornou os dias no laboratório muito mais animados.

Ao grupo LacTas e DT, pois são pessoas maravilhosas, que me ajudaram sempre que precisei. À toda instituição, tanto ICC quanto IBMP, pois as pessoas presentes sempre facilitaram as atividades diárias, tornando possível a execução do projeto.

À todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho e estiveram torcendo por mim.

Por vezes sentimos que o que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

- Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Visando monitorar o comportamento celular durante a seleção, clonagem celular e análise de produtividade para elaboração de bancos de células altamente produtoras de proteínas recombinantes, foi desenvolvida uma plataforma de expressão heteróloga denominada Sistema Ingresso. Esse sistema se baseia em manipulação genética de células eucarióticas baseada em integração no genoma por transposase e seleção celular por marcador fluorescente, traduzido a partir de mRNA bicistrônico. A partir desse sistema, o objetivo deste trabalho foi realizar adaptações para aumentar os níveis de expressão do gene referente à proteína terapêutica de interesse Pró-Trombina de forma a otimizar o processo de produção, obtendo assim as versões Sistema Ingresso 1.0 e 2.0. Para isso, testes de quantificação da proteína terapêutica de interesse Pró-Trombina foram realizados na presença de uma sequência 5'UTR (populações e clones - Sistema Ingresso 1.0), uma sequência 3'UTR e enhancers de promotores (populações - Sistema Ingresso 2.0) em cultivo Fed-batch de células ExpiCHO. A presença da sequência 5'UTR resultou em aumento da expressão de Pró-Trombina em testes iniciais de expressão em populações obtidas por enriquecimento por *cell sorting* para o marcador de seleção. Essa sequência 5'UTR foi então utilizada para a análise de expressão de Pró-Trombina em clones submetidos a cultivo Fed-batch em erlenmeyers e em biorreatores Ambr15. Esta população proveniente do Sistema Ingresso 1.0 apresentou títulos de Pró-Trombina de 0,24g/L em cultivo Fed-batch em erlenmeyers. Nesse mesmo experimento foram identificados clones promissores que apresentaram níveis maiores de proteína no final do experimento: 0,40g/L, 0,35g/L e 0,33g/L para os clones #28, #4 e #15, respectivamente. Em cultivo Fed-batch em biorreator Ambr15 foi possível observar que ambos os clones #28 e #4 também se apresentaram promissores, apresentando viabilidade acima de 80% no final do experimento e títulos de 0,27g/L e 0,13g/L, respectivamente. Quando utilizada a sequência 3'UTR em conjunto com a sequência 5'UTR foi possível observar a tendência do aumento da expressão de Pró-trombina nas populações obtidas, possivelmente incrementada na presença de sequências de enhancers de promotores. Novos testes devem ser realizados para fins de cálculos estatísticos e validação dos resultados encontrados, além de análises de integração e genômica e novas adaptações como alterações em meios de cultivo para a continuação desse trabalho.

Palavras chave: proteínas terapêuticas; batelada alimentada; biofármacos.

ABSTRACT

To monitor cell behavior during selection, cell cloning, and productivity analysis for highly therapeutic proteins productive cell banks development, a protein expression platform was developed, named Sistema Ingresso. This system consists of eukaryotic cells genetic manipulation based on genome integration by transposase and cell selection by fluorescent marker, translated from a bicistronic mRNA. The objective of this work was to make improvements to increase Pro-Thrombin, therapeutic protein of interest, expression levels in populations and clones enriched by fluorescent selection marker named here as Sistema Ingresso 1.0 e 2.0. Productivity analysis related to 5'UTR sequence (cell populations and clones – Sistema Ingresso 1.0), a 3'UTR sequence, and enhancers (cell populations – Sistema Ingresso 2.0) were analyzed in ExpiCHO cells. All experiments were performed in Fed-batch cultivation in Erlenmeyers or Ambr15 microbiorreactors. Initial 5'UTR analysis resulted in increased expression in enriched Sistema Ingresso 1.0 cell populations for fluorescent selection marker. Pro-thrombin production during Fed-batch cultivation in Erlenmeyers was 0.24g/L for this cell population and some promising clones were identified, reaching 0.40g/L, 0.35g/L, and 0.33g/L, clones 28, 4, and 15 respectively. Clones 28 and 4 were also promising in Pro-thrombin production during Fed-batch cultivation in Ambr15 microbiorreactors, which maintained high cell viability during the experiment and reached 0.27g/L and 0.13g/L final titles, respectively. It was observed a slightly Pro-thrombin increased expression in 5'UTR combined with 3'UTR and enhancers sequences in initial experiments for Sistema 2.0 cell populations. Future analyses will be necessary for statistical calculations and validation, as well as genomic integration analyses and culture optimization, to improve Pro-Thrombin expression.

Key words: therapeutic proteins; fed-batch cultivation; biopharmaceuticals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Método TRL - Processo de desenvolvimento de um novo produto biológico.....	23
Figura 1.2. A origem da célula CHO.....	26
Figura 1.3. Representação das sublinhagens geradas a partir da CHO-ori.....	26
Figura 1.4. Figura esquemática de plasmídeo de expressão gênica.....	32
Figura 1.5. <i>Enhancers</i> e o controle de expressão gênica.....	36
Figura 1.6. Organização da unidade de transcrição de mRNA de adenovírus humano na fase tardia do ciclo de infecção/replicação e seu mecanismo de tradução.....	37
Figura 1.7. <i>Batch</i> , <i>Fed-batch</i> e Perusão.....	39
Figura 1.8. Plataforma do Sistema Ingresso.....	41
Figura 1.9. Ativação de Pró-trombina por Fator X ativado ou Ecarina para a formação de Trombina (α -Trombina).....	42
Figura 1.10. Experimentos de Pró-Trombina realizados pelo grupo de Desenvolvimento do IBMP, utilizando α -Trombina comercial (HTI) como controle positivo.....	44
Figura 3.1. Representação dos cassetes de integração utilizados nesse trabalho e as respectivas atualizações do Sistema Ingresso.....	47
Figura 3.2. Sistema Ingresso: construções e objetivos.....	48
Figura 3.3. Fluxograma da metodologia empregada para avaliação do Sistema Ingresso para a expressão de genes que codificam para proteínas heterólogas.....	49
Figura 3.4. Plasmídeo CMV_mCherry_IRES_copGFP – Sistema Ingresso.....	55
Figura 3.5. Plasmídeo CMV_5'UTR_mCherry_IRES_copGFP – Sistema Ingresso 1.0.....	56

Figura 3.6. Plasmídeos Sistema Ingresso e Ingresso 1.0 para Pró-Trombina.....	57
Figura 3.7. Seleção de <i>gate</i> para <i>cell sorting</i> : obtenção de populações altamente enriquecidas para copGFP.....	59
Figura 3.8. Triagem dos clones enriquecidos para GFP, após a separação por Namocell, em um sistema HTS (<i>high throughput screening</i>).....	61
Figura 3.9. Definições estabelecidas para análise de fluorescência por microscopia (Operetta – Perkin Elmer)	63
Figura 3.10. Microbiorreator Ambr15 – Sartorius.....	65
Figura 3.11. Plasmídeos para teste de sequência 3'UTR – Sistema Ingresso 2.0.....	68
Figura 3.12. Plasmídeos para teste de <i>Enhancers</i> – Sistema Ingresso 2.0.....	69
Figura 4.1. Avaliação da expressão de mCherry em células CHO utilizando sequência 5'UTR.....	77
Figura 4.2. Análise da quantidade de Pró-trombina entre as populações obtidas para Sistema Ingresso 1.0 enriquecidas para copGFP.....	80
Figura 4.3. Análise de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina por microscopia de fluorescência - baixa intensidade de fluorescência.....	83
Figura 4.4. Análise de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina por microscopia de fluorescência - alta intensidade de fluorescência	84
Figura 4.5. Análise qualitativa da presença de Pró-trombina em sobrenadante de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina – <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers – Dot Blot.....	85
Figura 4.6. Análise quantitativa de Pró-trombina em sobrenadante de culturas de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 – <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers – ELISA.....	86

Figura 4.7. Análise de produção de Pró-trombina e Intensidade de fluorescência – <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers.....	88
Figura 4.8. Crescimento e viabilidade celular de população e clones do Sistema Ingresso 1.0 em <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers.....	89
Figura 4.9. Crescimento e viabilidade celular de populações e clones de alta produção e baixa produção de Pró-trombina em <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers – Sistema Ingresso 1.0.....	91
Figura 4.10. Análise de clones produtores do Sistema Ingresso para Pró-Trombina - <i>Fed-batch</i> em microbiorreator Ambr15.....	93
Figura 4.11. Título de Pró-trombina após cultivo em <i>Fed-batch</i> em microbiorreator Ambr15.....	94
Figura 4.12. Análise de produção de Pró-trombina e intensidade de fluorescência – <i>Fed-batch</i> em microbiorreator Ambr15.....	96
Figura 4.13. Comportamento do crescimento de clones produtores de Pró-trombina – <i>Fed-batch</i> em microbiorreator Ambr15.....	98
Figura 4.14. Comparação entre título final e crescimento de clones altamente produtores – <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers e em microbiorreator Ambr15.....	101
Figura 4.15. Representação gráfica em formato de <i>Heatmap</i> dos valores quantitativos obtidos dos experimentos realizados com linhagem ExpiCHO controle, da população enriquecida para copGFP do Sistema Ingresso 1.0 que codifica para a proteína Trombina (Pop. S. Ingresso 1.0 copGFP) e de clones obtidos a partir dessa população.....	105
Figura 4.16. Confirmação de clonagem do gene referente à proteína Pró-trombina - Sistema Ingresso 2.0_copGFP.....	106
Figura 4.17. Confirmação de plasmídeo nocaute para sequência 3'UTR.....	107
Figura 4.18. Confirmação dos plasmídeos constituintes do Sistema Ingresso 1.0 e 2.0.....	110

Figura 4.19. Teste de 3'UTR e <i>Enhancers</i> na expressão de Pró-trombina.....	111
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Parcerias de desenvolvimento produtivo em biofármacos.....	22
Tabela 1.2.	Células produtoras e seus respectivos produtos.....	24
Tabela 1.3.	Biofármacos aprovados produzidos em células CHO.....	27
Tabela 1.4.	Promotores de transcrição utilizados comercialmente para expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos.....	34
Tabela 3.1.	Combinação de enzimas de restrição utilizadas para as construções dos plasmídeos doadores de cassete de integração utilizados para transfecção em células ExpiCHO.....	52
Tabela 3.2.	Iniciadores utilizados para confirmação por sequenciamento da presença do fragmento de interesse em plasmídeo doador de cassete de integração no genoma de ExpiCHO.....	54
Tabela 3.3.	Filtros utilizados e seus respectivos marcadores de seleção detectados para análise por microscopia de fluorescência.....	63
Tabela 3.4.	Filtros utilizados e seus respectivos marcadores de seleção detectados para análise por citometria de fluxo.....	64
Tabela 3.5.	Concentrações de Pró-trombina para curva de ELISA: quantificação do título em sobrenadantes de culturas em <i>Fed-batch</i> utilizando Kit Human Total Factor II (Prothrombin) ELISA Kit (Innovative Research, Inc.).....	73
Tabela 3.6.	Produtividade específica de Pró-trombina em clones cultivados em Microbiorreator Ambr15 (Sartorius) - dia 12 em relação ao dia 11.....	100
Tabela 3.7.	Título final de Pró-trombina de clone #28 altamente produtor após <i>Fed-batch</i> em erlenmeyers (dia 6) e microbiorreator Ambr15 (dia 12).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitros
AmpR	<i>Ampicilin Resistance</i> (resistência à ampicilina)
AU	<i>Fluorescent Arbitrary Unit</i> (unidade de fluorescência arbitrária)
AUGs	códons de iniciação da tradução
CaPi	<i>Calcium Phosphate</i> (fosfato de cálcio)
CHO	<i>Cells Hamster Ovary</i> (células de ovário de hamster)
CMV	Citomegalovírus
copGFP	<i>copepod Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente de copépode)
CTLA4	<i>Citotoxic t-lifocyte-associated 4</i>
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxiribonucleico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico)
eIF4E	<i>Eukariotic translation initiation factor 4E</i> (fator de iniciação da tradução eucariótica 4E)
eIF4G	<i>Eukariotic translation initiation fator 4G</i> (fator de iniciação da tradução eucariótica 4G)
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> (Separação de células fluorescente ativadas)
g	Gramas
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2)
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
Ins1	<i>Insulator 1</i> (insulador 1)
Introns	<i>Intragenic regions</i> (regiões intragênicas)
ITRs	<i>Internal Translated Regions</i> (regiões internas traduzidas)
L	Litros
LB	Luria Bertani
LCRs	<i>Locus Control Region</i> (região de controle de Locus)
mAB	<i>Monoclonal AntiBody</i> (anticorpo monoclonal)
MARs	<i>Matriz Attachment Regions</i> (regiões de anexo da matriz)
mL	mililitros
mRNAs	<i>Messenger Ribonucleic Acids</i> (ácidos ribonucleicos mensageiros)
MTX	Metotrexato
noc	nocaute
ORFs	<i>Open Reading Frame</i> (fase de leitura aberta)
Ori	Origem de replicação
PCR	(reação em cadeia da polimerase)
PEI	Polietilinaimina
pH	Potencial hidrogênico
pMol	picomol

PoliA	Poli-Adenilação
PTMs	<i>Post-transdutional Modifications</i> (modificações pós-traducionais)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
rpm	rotação por minuto
STARs	<i>Stabilizing Anti-Repressor</i> (regiões anti-repressoras estabilizadoras)
SV40	<i>Síimian vacuolating virus 40</i>
THR	Pró-trombina / Trombina
TIRs	<i>Terminal inverted repeats</i> (repetições terminais invertidas)
TPE	<i>Tripartite Element</i> (elemento tripartido)
U	unidade
UCOE _s	<i>Ubiquious Chrometin-opening Elements</i> (elementos de abertura de cromatina onipresente)
UTRs	<i>Untraslated Region</i> (região de não-tradução)
V	Volts
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element</i> (elemento regulatório pos-transcricional do vírus da hepatite da marmota)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Biotecnologia e a sua economia no Brasil e no Mundo.....	21
1.2. Produção de Biofármacos.....	23
1.2.1. Linhagens celulares utilizadas na produção de biofármacos.....	24
1.2.1.1. Células CHO (<i>Chinese Hamster Ovary</i>).....	25
1.2.2. Transgenia.....	30
1.2.2.1. Vetores plasmidiais.....	31
1.2.2.2. Elementos regulatórios.....	32
1.2.3. Processos de produção.....	38
1.2.4. Avaliação da produção.....	39
1.3. Sistema Ingresso (Patente Submetida – BR 10 2017 001876 8).....	40
1.3.1. Plasmídeo de expressão gênica em células eucarióticas.....	40
1.4. Pró-trombina e α -Trombina.....	42
1.4.1. Desenvolvimento de Pró-trombina pelo grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP.....	43
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. METODOLOGIA.....	46
3.1. Reagentes e Soluções.....	50
3.2. Obtenção de sequências de DNA sintetizadas.....	51
3.3. Obtenção de plasmídeos.....	51
3.3.1. Clonagens por enzimas de restrição.....	52
3.4. Sistema Ingresso 1.0 – Análise da expressão da proteína mCherry na ausência do elemento 5'UTR.....	54
3.5. Sistema Ingresso 1.0 – Análise da expressão da proteína mCherry na presença do elemento 5'UTR.....	55
3.5.1. Análise da expressão da proteína Pró-trombina em sobrenadante de cultura de células.....	56
3.5.1.1. Obtenção de população de células e linhagens clonais de ExpiCHO enriquecidas para copGFP.....	57
3.5.1.1.1. Transfecção em células ExpiCHO.....	57

3.5.1.1.2.	Enriquecimento de células contendo copGFP por citometria de fluxo – <i>cell sorting</i>	58
3.5.1.1.3.	Obtenção dos clones a partir de população enriquecida para copGFP.....	60
3.5.1.1.4.	Análise da intensidade de fluorescência por microscopia de fluorescência.....	62
3.5.1.2.	Análise da fluorescência por citometria de fluxo – S3 Biorad.....	64
3.5.1.3.	Cultivo em bateladas retroalimentadas (<i>Fed-batch</i>).....	64
3.5.1.3.1.	<i>Fed-batch</i> em erlenmeyers.....	64
3.5.1.3.2.	<i>Fed-batch</i> em microbiorreator Ambr15.....	65
3.6.	Sistema Ingresso 2.0.....	67
3.6.1.	Análise da expressão de Pró-trombina na presença dos elementos 5'UTR e 3'UTR.....	67
3.6.1.1.	Construção de plasmídeo contendo 3'UTR e gene referente a Pró-Trombina.....	67
3.6.2.	Análise de expressão de Pró-trombina na presença de <i>Enhancers</i>	68
3.6.2.1.	Construção de plasmídeos de transfecção com <i>Enhancer I</i> e <i>Enhancer II</i>	68
3.6.2.2.	Transfecção de ExpiCHO para análise de expressão transiente.....	69
3.7.	Análise Qualitativa.....	70
3.7.1.	<i>Dot Blot</i>	70
3.8.	Análise Quantitativa.....	71
3.8.1.	<i>Western Blot</i>	71
3.8.2.	ELISA.....	72
3.9.	Contagem de células e viabilidade.....	73
3.10.	Produtividade específica – Análise de Qp.....	74
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.1.	Sistema Ingresso 1.0.....	75
4.1.1.	Análise de quantidade de mCherry produzida na presença de 5'UTR.....	75
4.1.2.	Análise de quantidade de proteína Pró-trombina produzida na presença de 5'UTR.....	79
4.1.3.	Análise de quantidade de proteína Pró-trombina por clones de células provenientes de população Sistema Ingresso 1.0.....	81

4.1.4. Análise de expressão de Pró-trombina por clones do Sistema Ingresso 1.0 – Microbiorreator.....	92
4.2. Sistema Ingresso 2.0.....	106
4.2.1. Construção de plasmídeos.....	106
4.2.1.1. Plasmídeos 3'UTR e 3'UTR ^{noc}	106
4.2.1.2. Plasmídeos <i>Enhancer</i> I e <i>Enhancer</i> II.....	107
4.2.1.3. Plasmídeos finais Sistema Ingresso 1.0 e 2.0.....	108
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	114
6. REFERÊNCIAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biotecnologia e a sua economia no Brasil e no mundo

A Biotecnologia é uma ciência definida como “aplicação tecnológica de sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”, termo esse definido pela Convenção sobre Diversidade Biológica em 1992 e assumido pela República Federativa Brasileira pelo Decreto 2.519 (BRASIL, 1998).

Devido a Biotecnologia estar presente em diferentes áreas de estudo, o seu uso resulta em atividades econômicas importantes para o desenvolvimento econômico do país, tanto que institui uma política de desenvolvimento nacional, sancionada desde 2007, com setores que são priorizados na Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, sendo eles os setores da saúde humana, agropecuária, industrial e ambiental (Brasil, 2007). Dentre os setores mencionados, o setor da saúde humana apresenta uma área com maior destaque econômico mundial, a farmacêutica (IFPMA, 2017), que se deve ao constante crescimento dessas indústrias, apresentando cerca de 2% ao ano desde 2014, com expectativa de alcançar \$20 bi em 2020, com um investimento econômico crescendo em média 3% até 2024 (EVALUATE, 2019; Dalgaard *et al.*, 2013).

Além das políticas públicas mencionadas, a demanda por medicamentos inovadores de melhor qualidade gera a necessidade de desenvolvimento dos mesmos. Os produtos farmacêuticos podem ser divididos em medicamentos químicos sintéticos e biofármacos onde este último, se baseia no uso de fontes biológicas para a produção (Rader, 2008). Há uma crescente demanda no mundo de biofármacos, cerca de 1% ao ano, gerando uma expectativa de consumo igual aos produtos convencionais para 2024 (EVALUATE, 2019).

De acordo com o relatório Conta Satélite de Saúde Brasil 2010-2015, os gastos com saúde no Brasil corresponderam mais de R\$ 546 bilhões; desse valor, 60% representam medicamentos biológicos, mostrando que o país apresenta alta demanda de consumo. O país produz medicamentos para tratamentos de 7 diferentes indicações farmacêuticas, porém essa produção é provinda de transferência de tecnologias implementadas por políticas públicas (Tabela 1.1), demonstrando que o desenvolvimento tecnológico nacional ainda é escasso (Salerno *et al.*, 2018). Com

isso, surge a necessidade de domínio tecnológico para desenvolvimento de novos produtos, desenvolvendo assim novas tecnologias nacionais na área de biofármacos, visto que é uma área de crescente desenvolvimento econômico nacional.

Tabela 1.1. Parcerias de desenvolvimento produtivo em biofármacos.

Indicação	Produto	Parceiros Públicos	Parceiros privados
Oncológico	Trastuzumabe	Bahiafarma, IVB, Biomanguinhos	Libbs, Mabxience, Orygen, PharmaPraxis
	Cetuximabe	IVB, Biomanguinhos, Butantan	Bionovis, Maxience, Libbs
	L-asparaginase	Fiocruz	NT Pharma, United Biotec
Oncológico/Artrite Reumatóide	Filgrastima	Biomanguinhos	Eurofarma
	Rituximabe	IVB, Biomanguinhos, Butantan	Bionovis, Mabxience, Libbs
Artrite Reumatóide	Adalimumabe	Biomanguinhos, Bahiafarma, IVB	Orygen, PharmaPraxis, Mabxience, Alteogen, Libbs
	Certolizumabe	Biomanguinhos	UCB Pharma, Meizler
	Etarnecepte	IVB, Biomanguinhos, Butantan, Bahiafarma	Bionovis, Mabxience, Alteogen, Libbs, Orygen
Diabetes	Infliximabe	IVB, Biomanguinhos	Bionovis
Hormônio de Crescimento	Insulina	Farmanguinhos	Biommm, Indar
Oncológico/Degeneração macular relacionado à idade	Somatropina	Biomanguinhos, Funed	Cristália, Pfizer
Imunoterapia	Bevacizumabe	Tecpar, Biomanguinhos, IVB, Butantan	Biocad, Mabxience, Alteogen, Bionovis, Libbs, Orygen
	Vacina Alergênica	Bahiafarma	Biocen. Salundinvest
Total		7	17

Fonte: Salerno *et al.*, 2018. Adaptado.

1.2. Produção de biofármacos

A comercialização de um novo medicamento depende de diferentes fases de desenvolvimento. Essas fases são normalmente conhecidas como pesquisa, desenvolvimento e aprovação (IFPMA, 2017). O nível de amadurecimento de um projeto de desenvolvimento tecnológico também pode ser avaliado pela métrica TRL (*technology readiness levels*), um sistema de medida que indica o nível de maturidade de qualquer tecnologia em desenvolvimento. A métrica TRL foi originalmente concebida na NASA (National Aeronautics and Space Administration - EUA) em 1974 e formalmente definida em 1989. A métrica TRL apresenta 9 diferentes níveis de maturidade, sendo possível observar e acompanhar o desempenho do desenvolvimento do produto de uma forma mais ampla e que pode ser aplicado em diferentes áreas de desenvolvimento tecnológico (EARTO, 2014). A Figura 1.1 mostra o consenso atual das fases de TRL para produtos biológicos.

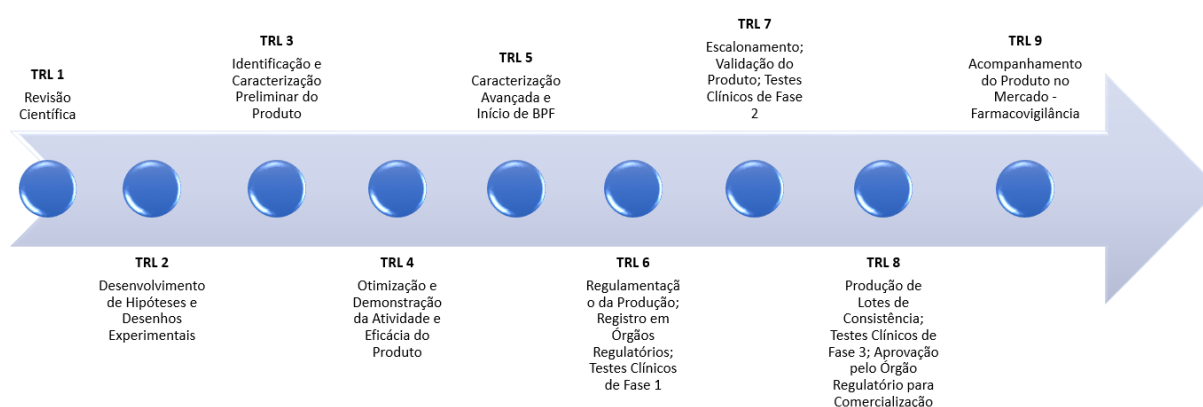


Figura 1.1. Método TRL - Processo de desenvolvimento de um novo produto biológico. Fonte: EARTO, 2014.

Quando se é utilizada uma metodologia que permite o rastreamento do desenvolvimento de um produto desde a sua pesquisa até a sua finalização, é possível identificar, compreender e adaptar diferentes situações utilizando estratégias que permitam que o produto seja produzido e comercializado de forma segura. No desenvolvimento de um biofármaco, cerca de 65% do investimento é gasto no desenvolvimento do produto, constituído de fases clínicas, que são primordiais para a validação da eficácia do produto e consequente liberação para venda (IFPMA, 2017). A redução de custos pode ser realizada na fase de Pesquisa, por exemplo, no

desenvolvimento da linhagem celular utilizada levando em consideração alterações genéticas das células produtoras, estabilidade do transcrito, escolha do promotor utilizado e diferentes alterações pós-traducionais com o intuito de obter uma plataforma estável e altamente produtora (Davy *et al.*, 2017).

1.2.1. Linhagens celulares utilizadas na produção de biofármacos

Diferentes linhagens celulares podem ser utilizadas para produzir o biofármaco de interesse (Tabela 1.2), na qual a engenharia genética é utilizada para a obtenção de células produtoras de medicamento específico (Salerno *et al.*, 2018).

Tabela 1.2. Células produtoras e seus respectivos produtos.

Produto	Organismo/Espécies	Referência
Bioativos	<i>E. coli</i> ; <i>S. cerevisiae</i> ; bactérias; fungos; leveduras; actinomicetos;	Chemier <i>et al.</i> , 2009; Pickens <i>et al.</i> , 2011; Siddiqui <i>et al.</i> , 2012; Baltz, 2016.
Pequenas moléculas	<i>E. coli</i>	Lee <i>et al.</i> , 2012.
Proteínas e biofármacos	Bactéria, fungos, leveduras, <i>E. coli</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>P. pastoris</i> , células de Mamíferos	Liu <i>et al.</i> , 2013; Rosano e Ceccarelli, 2014; Schroder, 2008; Ward, 2011; Celik e Calik, 2011; Damsceno <i>et al.</i> , 2012; Andersen <i>et al.</i> , 2011; Hossler, 2012; Hossler <i>et al.</i> , 2009; Mattanovich <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Davy, Kidegaard e Andersen, 2017. Adaptado.

As bactérias, organismos procarióticos como *E. coli*, podem ser utilizadas para a produção de enzimas e biofármacos simples (Waegeman e Soetaer, 2011) e constituiu a primeira plataforma para produção de insulina e hormônio de crescimento humano (GH) (Dingermman, 2008). Fungos e leveduras podem ser utilizados na produção de proteínas um pouco mais complexas em sua conformação (Ward, 2012), porém podem induzir a formação de anticorpos e desencadear resposta imune devido

aos padrões de N-glicosilação encontrados nesse microrganismo serem diferentes do encontrados em mamíferos, tornando-as inviáveis para a produção de determinadas moléculas terapêuticas, embora ainda sejam o hospedeiro padrão para a produção de insulina humana e glucagon (Dingermman, 2008). As células de mamíferos são as células mais utilizadas atualmente na produção de biofármacos, devido os seus padrões de modificações pós-traducionais serem mais compatíveis com os padrões de glicosilação de proteínas humanas, influenciando assim na atividade e aumentando o potencial de eficiência do biofármaco (Bandaranayake e Almo, 2014).

As modificações pós-traducionais (PTMs) são de extrema importância para a aplicação terapêutica de proteínas. A modificação mais comumente encontrada é a glicosilação (mais especificamente N-glicosilação), sendo encontrada em aproximadamente 50% das proteínas humanas, o que interfere diretamente na atividade biológica e, no caso de proteínas terapêuticas, na antigenicidade e farmacocinética (Wong, 2005). PTMs adicionais que também são encontradas são carboxilação, hidroxilação, sulfatação e amidação (Walsh, 2006). Com isso, a escolha da linhagem celular hospedeira é de extrema importância para o desenvolvimento e produção de biomoléculas, sendo o sistema de cultura de células de mamíferos mais comumente usado para o desenvolvimento e produção de biofármacos as células CHO (Brooks, 2004; Bandanarayake e Almo, 2014).

1.2.1.1. Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*)

O uso de células CHO se iniciou em 1957 com estudos de genética clássica e o surgimento do interesse em aplicação industrial iniciou-se apenas em 1985. Elas foram estabelecidas pelo Dr. Puck em 1958, geradas a partir de ovários de hamster chinês onde a recorrente tripsinização e mutações espontâneas geraram células com capacidade de crescimento em cultura na presença de SFB (10-20%) (Figura 1.2), linhagem denominada CHO-ori (Wurm, 2013).

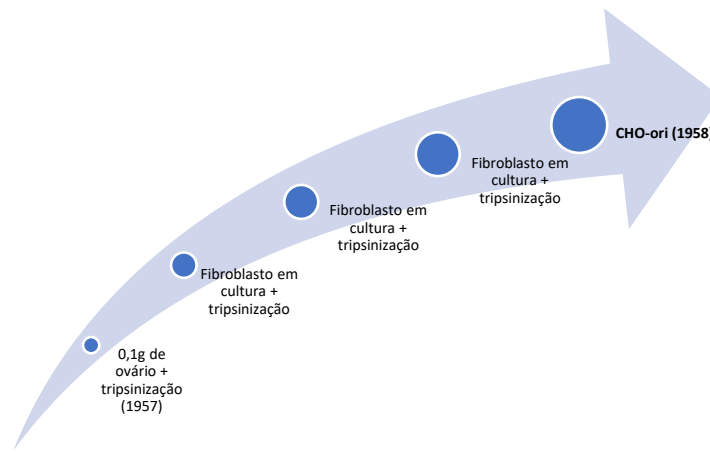


Figura 1.2. A origem da célula CHO. Fonte: Wurm, 2013. Adaptado.

Duas sublinhagens foram geradas a partir de células CHO isoladas pelo Dr. Puck, CHO-pro3, mais conhecida como CHO-Toronto e, CHO-K1. A CHO-pro3 foi adaptada ao cultivo em suspensão gerando a sublinhagem CHO-S e estudos realizados com o intuito de compreender a atividade de dihidrofolato redutase (DHFR), fez com que a sublinhagem CHO-DG44 fosse criada, sendo caracterizada pela completa ausência de DHFR. As células CHO-K1 foram amplamente utilizadas em pesquisa e desenvolvimento, sendo muito conhecida pelos laboratórios; uma sublinhagem com deleção de apenas um alelo para DHFR, denominada CHO-DUXB11, também foi criada. A partir da CHO-K1 foi gerado também a CHO-K1 SV, sublinhagem que possui como característica crescimento em meio livre de SFB em cultura de suspensão (Wurm, 2013) (Figura 1.3).

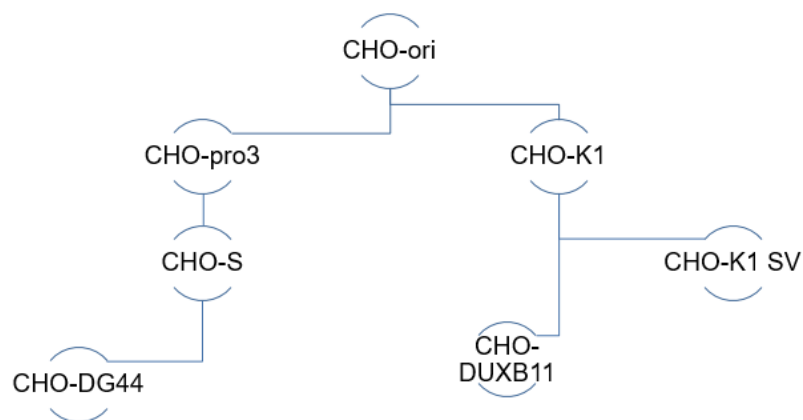


Figura 1.3. Representação das sublinhagens geradas a partir da CHO-ori. Fonte: Wurm, 2013. Adaptado.

As células CHO, com um histórico de aproximadamente 30 anos na produção de biofármacos, são responsáveis pela produção de 70% das proteínas recombinantes aprovadas até 2016 (Dahodwala e Lee, 2019) e são consideradas padrão ouro para a produção de proteínas terapêuticas (Wurm, 2013), sendo constituintes de kits que prometem alta produtividade do biofármaco de interesse como por exemplo o Kit ExpiCHO-S™, sublinhagem que foi gerada a partir da CHO-S, pela ThermoFisher Scientific. Essa célula tem tendência mínima a formar agregados celulares, possui crescimento em suspensão em maior densidade (Wurm, 2013).

O uso das células CHO facilita a aprovação do biofármaco pelo órgão regulador devido ao grande número de registros anteriores apresentados (Tabela 1.3). Além disso, as células CHO também podem demonstrar alta produtividade quando comparadas com outras células de mamíferos, podendo chegar até 13g/L (Dahodwala e Lee, 2019). Os padrões de glicosilação das proteínas produzidas são próximos aos padrões de glicosilação de proteínas humanas (Bertolini *et al.*, 2016). Em geral, produzidas em células CHO apresentam isoformas contendo ácido siálico quando comparado com produção em células HEK-293, influenciando na atividade da proteína e tempo de meia-vida (Crosset *et al.*, 2012).

Tabela 1.3. Biofármacos aprovados produzidos em células CHO.

Proteína terapêutica recombinante	Indicação Terapêutica	Ano de aprovação
Antígeno da Glicoproteína E da superfície do vírus varicela-zoster	Prevenção de Herpes	2018 (UE)
IgG2 humano alvo de calcitonina	Enxaqueca	2018 (EUA e UE)
Anticorpo IgG1 para fator de crescimento de fibroblastos	Hipofosfotemia ligada ao X	2018 (EUA e UE)
IgG1 humano e fucosilado da subunidade a do receptor de IL-5 humano	Asma	2018 (UE)
Anti-TNF IgG	Inflamação mediada por TNF	2018 (UE)
Biespecífico IgG4 capaz de ligação em fator IXa e fator X	Hemofilia A	2018 (UE)
Eritropoetina - EPO	Anemia	2018 (EUA)

Fator Xa	Para uso em tratamentos que resultam em sangramento descontrolado	2018 (UE)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	2017 (EUA E UE)
Antígeno da Glicoproteína E da superfície do vírus varicela-zoster	Prevenção de Herpes	2017 (EUA)
IgG1 humano e fucosilado da subunidade do receptor de IL-5 humano	Asma	2017 (EUA)
Biespecífico IgG4 capaz de ligação em fator IXa e fator X	Hemofilia A	2017 (EUA)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	2017 (UE); 2016 (EUA)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	2016 (EUA E UE)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	2015 (EUA)
Fator de von Willebrand	Doença de von Willebrand	2015 (EUA)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	2014 (UE)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	2014 (EUA e UE)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	2014 (UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	2013 (UE)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	2013 (EUA)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	2013 (EUA e UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	2010 (UE)
Eritropoetina - EPO	Anemia	2009 (UE)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	2009 (EUA)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	2009 (UE)
Fator IIa	Controle de sangramento durante procedimentos cirúrgicos	2008 (EUA)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	2008 (EUA)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	2008 (EUA)
Eritropoetina - EPO	Anemia associada com falência renal	2007 (EU e EUA)
Eritropoetina - EPO	Anemia	2007 (UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	2007 (UE)
Hormônio Luterizante	Algumas formas de infertilidade	2004 (EUA)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	2004 (UE)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	2003 (EUA)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	2002 (EUA)
Eritropoetina - EPO	Anemia	2001 (UE e EUA)
Gonadotropina coriônica	Técnica de Reprodução Assistida	2000 (EUA)
Ativador do Plasminogênio Tecidual modificado - tPA	Infarto do Miocárdio	2000 (EUA)

Hormônio Estimulante da Tireóide - TSH	Câncer de Tireóide	2000 (UE)
Hormônio Luteinizante	Algumas formas de infertilidade	2000 (UE)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	1998 (UE)
Hormônio Estimulante da Tireóide - TSH	Câncer de Tireóide	1998 (EUA)
Eritropoetina - EPO	Anemia	1997 (UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	1997 (EUA)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	1997 (UE)
Fator IX de coagulação	Hemofilia B	1997 (EUA e UE)
Interferon-B-1a	Esclerose Múltipla	1996 (UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	1996 (UE)
Hormônio Folículo Estimulante - FSH	Infertilidade	1995 (UE)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	1993 (UE)
Fator VIII de coagulação	Hemofilia A	1992 (UE)
Eritropoetina - EPO	Anemia	1990 (EUA)
Eritropoetina - EPO	Anemia	1989 (EUA)
Ativador do Plasmogênio Tecidual - tPA	Infarto Agudo do Miocárdio	1987 (EUA)

*UE: União Européia; EUA: Estados Unidos da América. Fonte: Walsh, 2018. Adaptado.

As células CHO se adaptam facilmente a culturas com alta densidade celular, grandes volumes, ausência de soro fetal bovino e possui baixa probabilidade de infecção viral quando comparada com outras linhagens de mamíferos (Hansen *et al.*, 2017). Porém, um fator limitante para o uso de células CHO é a sua alta taxa de mutação, gerando instabilidade genômica que pode alterar a produtividade de uma proteína de interesse. Os fatores que influenciam na sua instabilidade podem ser: plasticidade no genoma celular, organização do arranjo cromossômico, efeitos posicionais, perda do número de cópias, silenciamento do transgene, remodelamento de cromatina, alterações epigenéticas e fenotípicas (Dahodwala e Lee, 2019).

Sabe-se também que as células CHO possuem uma taxa de crescimento elevado, duplicando-se em menos de 24h, tendo então suas alterações rapidamente fixadas. Com isso, ao longo do cultivo e duplicação, as células podem apresentar o genoma diferente das células iniciais descongeladas do banco de células. É aconselhável que as empresas invistam em desenvolvimento de clonagem celular para que haja uma padronização rigorosa do processo de produção (Wurm, 2013), estando alinhado com processos regulares de liberação do biofármaco por agências

regulatórias, tornando o método uma das prioridades ao construir uma linhagem produtora de biofármacos (Welch e Arden, 2019).

1.2.2. Transgenia

A produção de proteína recombinante é comumente realizada por meio de expressão transiente ou pela integração do cassete de expressão no genoma da célula de interesse. A obtenção de transfectantes estáveis geralmente ocorre através de mecanismos de infecção viral, atividades de transposases, recombinases ou CRISPR/CAS9 (Kaufman *et al.*, 2008; Matasci *et al.*, 2011 Balasubramanian *et al.*, 2015; Hacker *et al.*, 2016).

Para o uso da maquinaria viral como meio de entrega do gene recombinante ao genoma da célula hospedeira, *Semliki Forest Virus* (SFV), *Baculovirus* e *Vaccinia* são os vírus habitualmente utilizados para transdução (Baldi *et al.*, 2007). Primeiramente faz-se necessário a propagação deles, o isolamento e determinação do título para posteriormente transfectar as células de interesse. Após 48-72 horas, há a produção de proteína heteróloga de interesse, sendo necessárias novas transduções devido ao decaimento de produção, podendo resultar em produtividade não homogênea (Mancia *et al.*, 2004).

A transfecção, diferentemente da transdução, não utiliza vetores virais; baseia-se na entrega de plasmídeos contendo o cassete de expressão gênica a partir do uso de agentes químicos catiônicos como Polietilaminina (PEI) ou Fosfato de Cálcio (CaPi). Esses processos são normalmente utilizados para gerar linhagens de expressão estáveis, porém os processos de entrega variam de acordo com a célula e plasmídeo utilizado (Baldi *et al.*, 2007). Embora a produção de transfectantes estáveis seja mais demorada, há o aumento da capacidade de reprodutibilidade e produção constante de proteína recombinante (Mancia *et al.*, 2004), além da possibilidade de selecionar clones celulares que possuam equilíbrio entre alta titulação comparabilidade reprodutibilidade do produto (Dahodwala e Lee, 2019).

A forma de seleção comumente utilizada para a obtenção de populações estáveis é através de amplificação gênica por MTX, porém tem sido observado que esse método pode estar relacionado a rearranjos cromossômicos severos resultando em variabilidade clonal em relação ao crescimento e conseqüentemente perda de

produtividade celular. Além disso, em casos de amplificação gênica há indícios de perda das multicópias de transgenes bem como do silenciamento gênico induzido por repetição através das repetições em *tandem*, resultando em perda de atividade transcricional (Betts *et al.*, 2015; Chusainow *et al.*, 2009).

Uma outra maneira de obtenção de transfectantes estáveis é a seleção e enriquecimento de populações de células por *cell sorting* de modo indireto, através da co-expressão de repórteres de superfície (CD20, CD90, etc.) ou fluorescentes (GFP, RFP, etc) (Mancia *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2012).

1.2.2.1. Vetores plasmidiais

Os vetores plasmidiais utilizados para transfecção e construção de uma plataforma de produção de proteínas recombinantes (Figura 1.4) devem ser constituídos, minimamente, dos seguintes elementos: uma sequência promotora de transcrição, a sequência do gene que codifica para a proteína de interesse, uma sequência terminadora de transcrição, uma sequência bacteriana de resistência a antibiótico para transformação e seleção e a origem de replicação bacteriana denominada Ori (Baldi *et al.*, 2007). É possível obter o aumento dos níveis de expressão do gene de interesse ou a estabilidade do seu transcrito utilizando promotores fortes e sequências 5' e 3' UTRs específicas reguladoras (Cao *et al.*, 2020). Paralelamente, é possível evitar que estruturas complexas de cromatina silenciem a expressão do transgene pelo uso de sequências insuladoras (Maksimenko *et al.*, 2006), LCRs (*Locus Control Regions*) (Liang *et al.*, 2008), UCOEs (*Ubiquitous Chromatin Opening Elements*) (Neville *et al.*, 2017), ou modificações como metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação (Barnes *et al.*, 2002; Romanova e Noll, 2017).

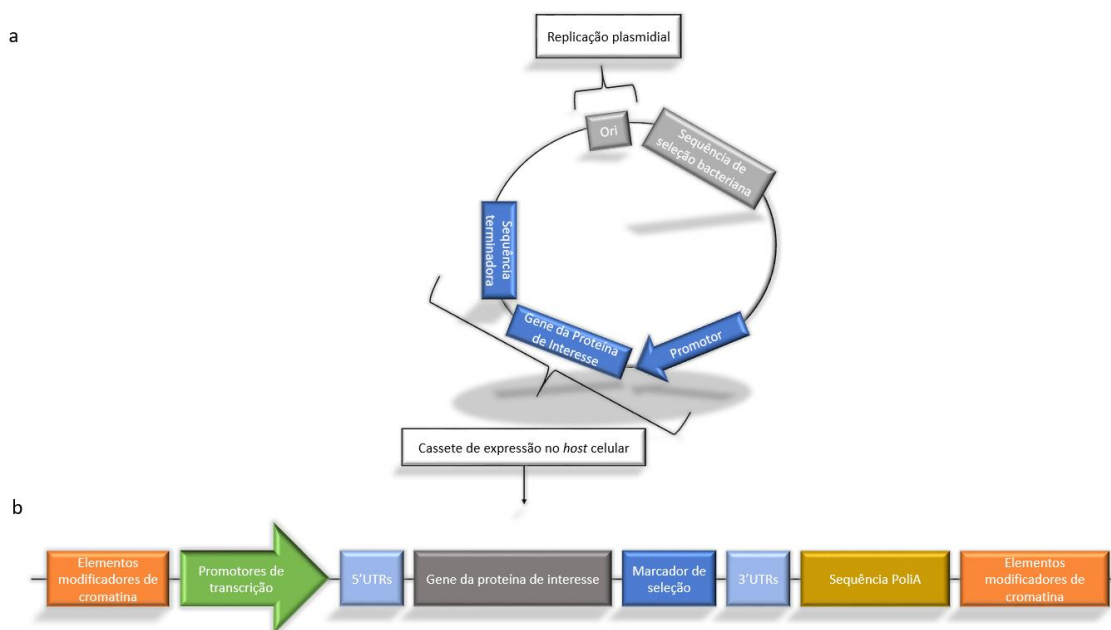


Figura 1.4. Figura esquemática de plasmídeo de expressão gênica. Esquema de (a) plasmídeo contendo seqüências mínimas para transformação e seleção em bactérias bem como transfecção e expressão gênica em uma linhagem celular eucariótica e (b) seu respectivo cassete de expressão contendo regiões reguladoras que podem ser utilizadas, modificadas e/ou eliminadas para alterar os níveis de expressão referentes à proteína heteróloga de interesse. Fonte: Barnes, 2003. Adaptado.

1.2.2.2. Elementos regulatórios

Há diferentes regiões que possuem a função de regular tanto a transcrição quanto a tradução de mRNAs. As regiões reguladoras da tradução como 5'UTRs não traduzidas de mRNAs podem codificar elementos *cis*-reguladores, incluindo estrutura cap 5' (Mitchell *et al.*, 2010) e motivos de iniciação de tradução (Kozak, 1986; Gingold e Pilpel, 2011; Dikstein, 2012); AUGs (uAUGs). Geralmente a tradução de mRNAs de eucariotos é dependente da ligação inicial do ribossomo ao cap5' para o escaneamento ao longo da molécula de mRNA até o local do início da tradução, majoritariamente o primeiro códon AUG. Há exceções como a tradução na família dos picornavirus (demonstrado em *encephalomyocarditis virus* - EMCV) que produzem mRNAs sem cap5' de 600 a 1200 nucleotídeos não transcritos, múltiplos AUGs e seqüências específicas denominadas IRES, relacionados à eficiência da tradução (Mountford *et al.*, 1995). Essa última característica pode ser utilizada em mRNAs bicistrônicos para genes reporteres e marcadores de drogas de seleção, em que é de interesse que esses genes sejam menos expressos que o gene de interesse (Mizuguchi *et al.*, 2000).

As regiões isoladoras (do inglês *insulators*), podem agir como barreiras independente do sítio de integração no genoma, impedindo o avanço da cromatina condensada para a proximidade do cassete de expressão e assim inibindo o silenciamento gênico (Philips-Cremins e Corces, 2013). O *insulator* melhor caracterizado é o cHS4 do locus de β -globina de galinha, que possui 1,2 kb de comprimento e age diferentemente dependendo do tipo celular, tendo efeito considerado moderado em células CHO, o que pode ser explicado pela origem heteróloga da sequência (Majocchi *et al.*, 2014; Chetverina *et al.*, 2014; Romanova e Tool, 2017). O cHS4 protege apenas parcialmente o promotor CMV do silenciamento epigenético (Izumi *et al.*, 1999). Em células CHO foram identificados insuladores endógenos em motivos REN_20 e MIT_LM2 que protegem parcialmente o transgene de silenciamento epigenético e permitem a expressão deste em tempos prolongados de cultivo (Takagi *et al.*, 2017).

É possível observar que é também utilizado diferentes promotores de transcrição gênica para a expressão de proteínas heterólogas em eucariotos (Tabela 1.4), porém os promotores virais como o promotor de Citomegalovírus (CMV) (Xia *et al.*, 2005) e o promotor de Vírus Vaculante Símio 40 (SV40) são os mais utilizados para a expressão em células de mamíferos (Costa *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2008; Deer *et al.*, 2004). O promotor CMV apresenta maior atividade em células CHO, mas é mais suscetível a silenciamento por metilação, resultando em diminuição da produtividade ao longo do tempo de cultura (Dorai *et al.*, 2012, Osterlehne *et al.*, 2011, Mariati *et al.*, 2010). O risco de silenciamento pode ser reduzido pela incorporação de região associada à matriz (*Matriz Attachment Regions* - MARs), elemento de abertura de cromatina de ação ubíqua (UCOE) ou outros elementos no plasmídeo de expressão como insuladores e elementos estabilizadores e anti-repressores (*Stabilizing Anti-Repressor* - STARS) (Haarraghy *et al.*, 2015).

Tabela 1.4. Promotores de transcrição utilizados comercialmente para expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos.

Promotor	Exemplo de vetor	Comentários
	pRc	Promotor / potenciador CMV2 aprimorado e sinal de poliadenilação (pAn) do hormônio de crescimento bovino (BGH)
	pcDNA3.3 - TOPO	Promotor / intensificador de CMV nativo (672 bp)
Citomegalovírus humano hCMV	pCI	potenciador / promotor de hCMV, íntron quimérico β -globina / IgG e SV40 pAn
	gWiz pHCMV	HCMV otimizado seguido pelo íntron A
	pAdCMV5	Vetor de adenovírus com um CMV quimérico mostrando expressão aprimorada em comparação com o CMV natural
Vírus Simian SV40	pGL2	O vetor básico contém apenas o promotor SV40E, mas nenhum intensificador
	PSF - SV40	Potenciador / promotor SV40 e pAn
Vírus do sarcoma de Rous RSV	pRSV (5,2 kb)	Potenciador / promotor RSV e BGH pAn
	pRC-RSV	Promotor RSV, potenciador SV40 e pAn
PGK	pDRIVE5-SEAP-mPGK	Vetor com promotor PGK e proteína repórter de fosfatase alcalina embrionária (SEAP) secretada
Homo Sapiens Ubiquitina C UBC	pUB-GFP	-
	pUb6 / V5 His C	Promotor UBC para expressão do transgene e SV40E controlando o marcador de resistência
hEF - 1 α	pDRIVE5 - GFP - 1	Sequências compostas de promotor / intensificador de hEF-1 e repórter GFP
CHEF - 1 α	Vários vetores com diferentes marcadores	CHEF1® Expression Platform para desenvolvimento de linha celular para produção de proteína GMP

	pSF - CHEF1 - Fluc	Promotor / potenciador CHEF-1 e gene repórter da luciferase do pirilampo
	pAdenoVator - CMV5 (CuO) - IRES - GFP (AES2041)	O plasmídeo contém o promotor CMV5 híbrido e o operador cumate (CuO) em combinação com células QBI-HEK 293CymR
Plasmídeos com promotores induzíveis	pAdTR5	-
	Tet-On / Tet-Off	Dois sistemas de vetores para expressão regulada por tetraciclina
	Tet-On	Sistema de vetor único para expressão induzível por tetraciclina

Fonte: Romanova e Tool, 2017. Adaptado.

Os estimuladores da transcrição (*Enhancers*) são regiões de reconhecimento de fatores de transcrição que, quando possuem seus motivos de ligações acessíveis através da reorganização da cromatina, são capazes de interagir com o promotor, resultando no aumento da expressão do gene que ele regula (Hoo e Tee, 2017). Eles possuem regiões de reconhecimento de fatores de transcrição, que recrutam mediadores da transcrição (Small e Arnosti, 2020), conforme apresentado na Figura 1.5. Porém, esse reconhecimento é seletivo pois atua diretamente em promotores específicos, resultando em aumento de transcrição de forma seletiva (Blackwood e Kadonaga, 1998). Esse aumento da expressão pelo *enhancer* (Pfeiffer *et al.*, 2013) pode ser avaliado através de diferentes construções com as sequências específicas de reconhecimento dos fatores de transcrição e aplicado para o aumento da expressão de proteínas heterólogas (Brown *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015).

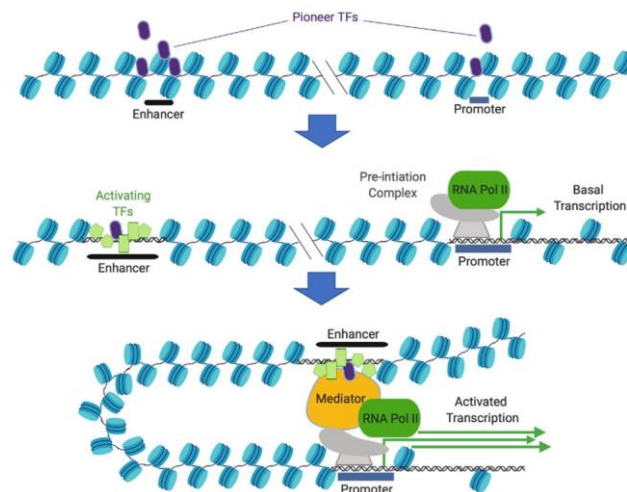


Figura 1.5. Enhancers e o controle de expressão gênica. Fatores de transcrição tornam *enhancers* e promotores disponíveis para atividade em que, quando em ligação com mediadores, os *enhancers* podem desencadear a formação do complexo de iniciação da transcrição. Fonte: Small e Arnosti, 2020.

A presença de regiões 5'UTRs também podem influenciar na expressão da proteína de interesse. Os Adenovirus humanos, vírus de DNA dupla fita, não envelopado, se agrupam em sete espécies (A-G ou 1-7), cuja expressão de genes é classificada em inicial, intermediária e tardia, dependendo do ciclo de replicação/infecção em que se encontra. Na etapa tardia, todos os genes estão sob controle de promotor MLP (*major late promoter*) e são transcritos em uma única fita de pré-mRNA de 28.000 nucleotídeos sendo processados por *splicing* alternativo para gerar múltiplos mRNAs maduros. Outra peculiaridade é que os RNAs maduros apresentam uma sequência 5'UTR, apresentada na Figura 1.6a, denominada elemento tripartido (TPE – *Tripartite element*) ou elemento líder (TPL – *Tripartite leader*) (Ramke *et al.*, 2017), que possui função de direcionar a tradução de modo independente da estrutura de um cap5' e de complexos de início de tradução como o eIF4F, (Dolph *et al.*, 1990), desencadeando um processo denominado de *ribosome shunting* (Figura 1.6b), cujo recrutamento da maquinaria até o códon de iniciação da tradução acontece pela interação molecular da subunidade 18S (da subunidade menor 40S) com as estruturas secundárias formadas dentro dos elementos tripartidos (Yueh & Schneider, 1990). Esse processo de salto do ribossomo diminui a dependência de mRNA pelo complexo eIF4F, por diminuir a necessidade de proteínas que desfaçam estruturas secundárias (Flint *et al.*, 2015). Essa característica viral pode ser utilizada na expressão de proteínas recombinantes, resultando em aumentos nos níveis de expressão (Mariati *et al.*, 2010).

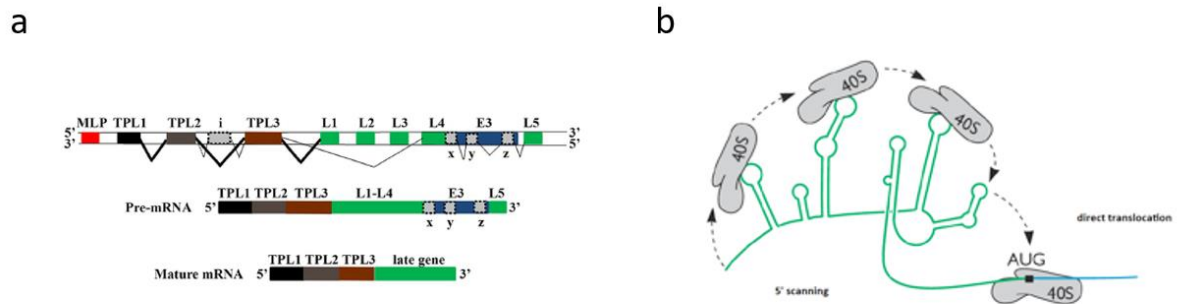


Figura 1.6. Organização da unidade de transcrição de mRNA de adenovírus humano na fase tardia do ciclo de infecção/replicação e seu mecanismo de tradução. (a) Representação esquemática da unidade transcricional onde, (b) a subunidade 40S do ribossomo liga-se a estrutura secundária do elemento tripartido e pode ser translocado até alcançar o primeiro códon de iniciação AUG (*ribosome shunting*). Fonte: Ramke *et al.*, 2017. Adaptado.

As sequências 3'UTRs também possuem funcionalidade que podem resultar em aumentos dos níveis de expressão da proteína de interesse e podem ser utilizadas como ferramentas de alta expressão em células de mamíferos (Mariati *et al.*, 2010). Esse mecanismo é compreendido através de sistemas bacterianos e de leveduras, que possuem regiões terminadoras 3'UTRs e são bem estabelecidas para a garantia da melhor expressão nos transcritos (Pfleger *et al.*, 2006; Cambray *et al.*, 2013; Curran *et al.*, 2013).

O WPRE é um exemplo de elemento regulador pós-transcricional de estrutura terciária que promove acúmulo citoplasmático de RNAs do vírus da hepatite e aumento da expressão de genes virais (Donello *et al.*, 1998). A atividade pode estar relacionada a capacidade de atuar em conjunto com a via de CRM1 (Popa *et al.*, 2002). A presença desse elemento na região 3'UTR de cassete de expressão de genes de mamíferos pode aumentar significativamente a estabilidade do mRNA e o rendimento da proteína, como já observado em células HEK293, linhagem primária de fibroblastos humanos, células hematopoiéticas humanas e células CHO-K1 (Loeb *et al.*, 1999; Ramezani *et al.*, 2000; Moreau-Gaudry *et al.*, 2001; Johansen *et al.*, 2003; Mariati *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020), sendo assim utilizado em sistemas de expressão de proteínas heterólogas (Mitrophanous *et al.*, 2008) com o intuito de aumentar os níveis de expressão (Hope *et al.*, 2000).

1.2.3. Processos de Produção

Após a definição da linhagem celular utilizada para a produção de proteínas heterólogas, faz-se necessário a definição do método de cultivo utilizado para o processo de produção. O processo pode ser definido como: batelada simples (*batch*), batelada alimentada (*Fed-batch*) ou processo contínuo (Perfusão) tendo diferenças, com vantagens e desvantagens em cada uma delas (Murad, 2015).

A batelada simples (Figura 1.7a) é definida por ser uma técnica de cultivo simples, sem adição de suplementos de cultivo tendo apenas controle de pH e oxigênio dissolvido durante o processo. É normalmente utilizado para testes de bancadas ou em biorreatores de pequeno e médio volume (Silva, 2012). O fato de ser uma cultura sem alimentação faz com que o tempo de cultivo seja curto, porém o método fornece menor chances de contaminação da cultura e maior controle do lote de produção do produto (Guidini, 2013).

A batelada alimentada (Figura 1.7b) já proporciona maior tempo de cultivo e maior título final do produto de interesse quando comparada com a batelada simples. Ela permite a adição de nutrientes (*Feed*) durante o processo, prolongando o tempo de cultivo e conseqüentemente permitindo o aumento do título final do produto, podendo alcançar títulos próximos a 10g/L (Smelko *et al.*, 2011). Essa adição de nutrientes pode resultar em novos desafios, pois aumenta as chances de contaminação do meio de cultivo, exigindo processos mais rígidos de controle da produção (Silva, 2012; Guidini, 2013; Rodrigues, 2018).

O processo de cultivo contínuo, conhecido como Perfusão (Figura 1.7c) constitui de troca contínua de meio de cultivo, proporcionando o aumento da produção do produto de interesse, com cultivos extremamente longos que podem durar meses. Além do aumento de produtividade, é possível obter o produto sem degradação devido constante retirada do meio de cultivo. Devido a constante troca de meio, geralmente próximo a um volume de biorreator por dia, e efeito mínimo na viabilidade celular, a perfusão é considerado o método mais complexo de cultivo, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas de retenção celular que se adapte a diferentes condições de processos de produção (Bettinardi, 2016; Bettinardi *et al.*, 2020).

Ambos os processos são utilizados e adaptados para a obtenção de maior produção da biomolécula de interesse e essa avaliação pode ser realizada utilizando

apenas o título quantificado ou através da análise de produto produzido por célula viável no bioprocesso, sendo esse denominado qP, (produtividade específica da célula) (Berthold, 1995).

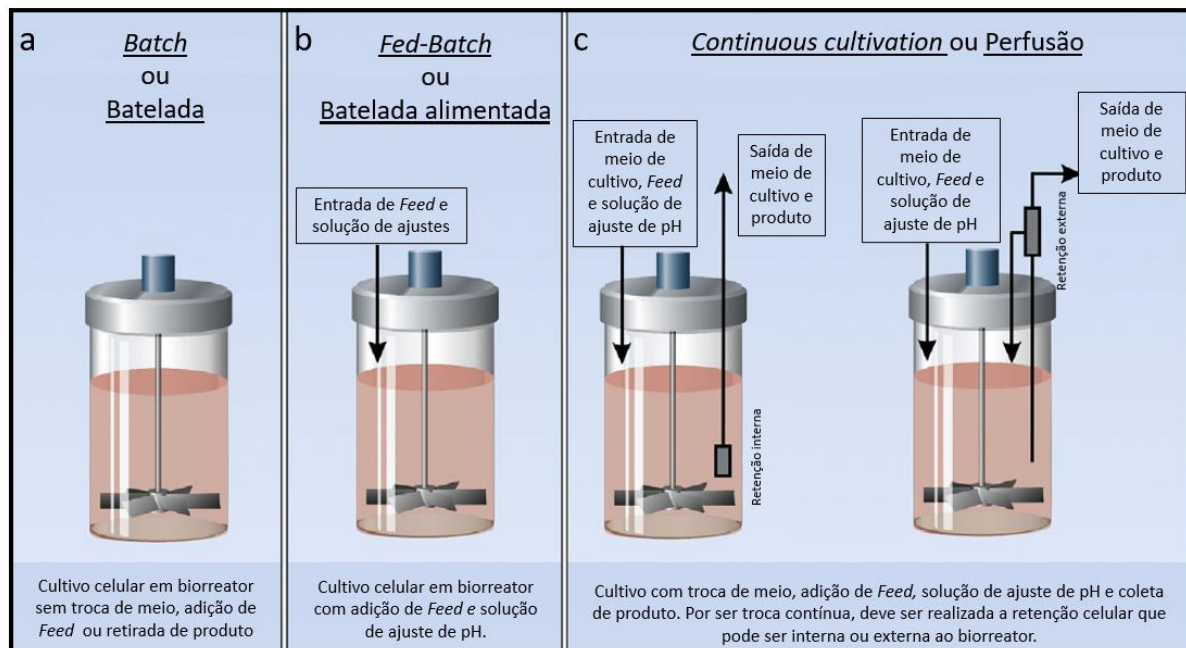


Figura 1.7. Batch, Fed-batch e Perfusão. Desenho simples de métodos de cultivo em bioprocessos se baseando no fluxo de entrada de nutrientes (*Feed*) e saída de sobrenadante/produto gerado. Fonte: Kropp *et al.*, 2016. Adaptado.

1.2.4. Avaliação da produção

Diferentes são as formas de quantificação da proteína de interesse em um sistema de produção de biofármacos, podendo ser realizado com métodos que variam desde o uso de métodos mais simples com o ELISA (Sreenivasan *et al.*, 2020) até formas mais sensíveis de avaliação e quantificação, como espectrometria de massas associado a cromatografia líquida de alta resolução (Regl *et al.*, 2017). Após a quantificação é possível calcular a produtividade volumétrica específica do produto, valor expresso em gramas de produto por litro de cultivo por hora, unidade comumente utilizada para cálculo de produção para cultivo em perfusão (Dragone *et al.*, 2007). Outra forma de avaliar a produção é o cálculo de produtividade específica por célula, conhecida como qP, expressa em picogramas por célula por dia de cultivo, muito utilizada para mensurar a proteína de interesse em períodos de 24 horas. É

amplamente utilizado como um parâmetro para avaliação de diferentes alternativas de formas de produção (Baush *et al.*, 2019), adaptações de meios de cultivo (Kim *et al.*, 2020) e realizar o acompanhamento da produção de acordo com a passagem celular (Sunley *et al.*, 2008). Normalmente, clones altamente produtores de uma proteína terapêutica de interesse podem apresentar valores de qP acima de 40pg/cel/dia (Du *et al.*, 2015).

1.3. Sistema Ingresso (Patente Submetida - BR 10 2017 001876 8)

Visando aumentar a capacidade de monitoramento em tempo real dos níveis de expressão em células individualizadas, assim como aumentar a estabilidade destes níveis de expressão em diferentes ciclos de replicação celular, o IBMP desenvolveu um sistema de manipulação genética de células eucarióticas, composto de linhagens celulares proprietárias, associados a um sistema de transformação genética composto por 3 características críticas: i) sistema de integração, baseado em transposons, ii) sistema de regulação de expressão epigenética por insuladores, iii) co-expressão de um gene repórter através de um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES, mRNA bi-cistrônico). Juntamente com o desenvolvimento de linhagens de células CHO modificadas para aumento de produtividade proteica, foi criada uma plataforma para expressão heteróloga associada à seleção de células altamente produtoras de proteínas por enriquecimento da população e posterior *screening* celular.

1.3.1. Plasmídeo de expressão gênica em células eucarióticas

O plasmídeo de expressão gênica permite a transfecção de células Expi-CHO e a inserção genômica mediada por transposase, através do reconhecimento de transposons que possuem repetições terminais invertidas (TIRs – *terminal inverted repeats*) de tamanho variável, garantindo a incorporação do cassete íntegro no genoma da célula alvo (Wicker *et al.*, 2007). Os plasmídeos de integração para expressão estável do transgene em células eucarióticas, resumidamente, consistem em:

- Permitir alta taxa de integração do cassete de expressão no cromossomo da

célula hospedeira, mediada por transposase.

- Isoladores e 5'UTR (TPE), este último logo após promotor CMV, que permitem a cromatina disponível para transcrição e aumento da tradução, respectivamente, independentemente do sítio de integração cromossômica.
- Co-expressão do gene repórter que permite monitoramento da expressão em tempo real e seleção de clones ou populações homogêneas altamente produtoras, independente de seleção por antibióticos. A seleção de células altamente produtoras da proteína de interesse é realizada por *fluorescence-activated cell sorter* (FACS).

O cassete de expressão consiste em um promotor viral, que promove a expressão do gene de interesse, e possui um IRES (Mountford *et al.*, 1995), que permite a tradução do gene repórter, normalmente proteínas fluorescentes; o conjunto todo é flanqueado por dois isoladores. A omissão de antibióticos para isolamento de linhagens celulares possibilita maior homogeneidade e estabilidade de expressão do transgene (Mancia *et al.*, 2004; Kaufman, 2008). Um resumo desse sistema pode ser visualizado na Figura 1.8.

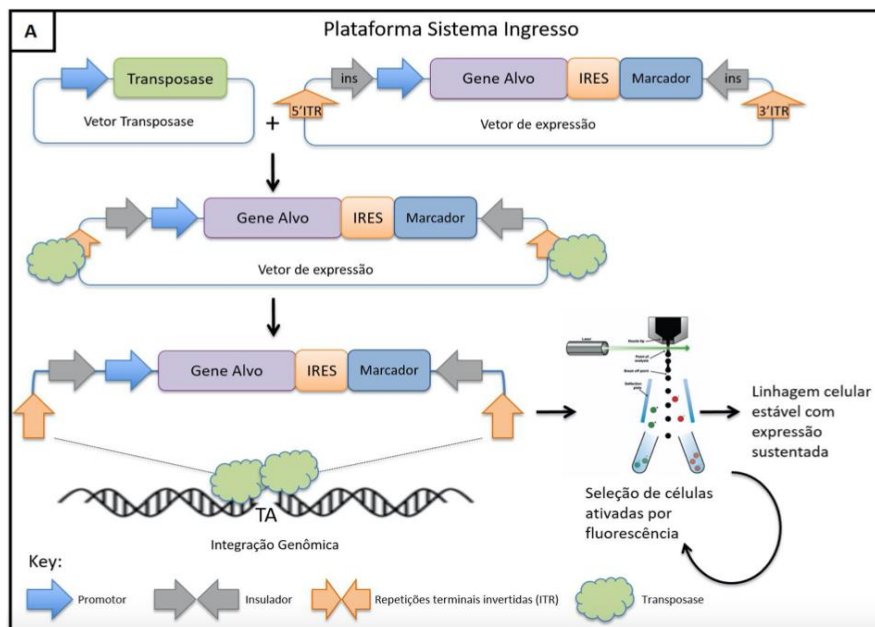


Figura 1.8. Plataforma do Sistema Ingresso. Sistema de integração de um gene alvo no genoma de uma célula, utilizando-se de um plasmídeo com transposase e um plasmídeo de expressão contendo o gene alvo. A transposases reconhecem sítios ITR e são capazes de integrar o gene alvo no genoma de uma célula. A seleção das células integradas é feita por Citometria de Fluxo com seleção celular por fluorescência do gene repórter que codifica para uma proteína fluorescente (Marcador) GFP.

1.4. Pró-Trombina e α -Trombina

A Pró-trombina (Fator II), precursor de α -Trombina, é sintetizada principalmente no fígado e circula no plasma como zimogênio em concentração de 1–2 μ M (Jenny e Mann, 2001). A α -trombina (Fator IIa) é uma serina protease produzida pela clivagem proteolítica de Pró-trombina na presença de Fator X ativado (Xa) ou Ecarina (Figura 1.9) e que possui propriedades pró-coagulantes: cliva o fibrinogênio, proteína solúvel plasmática, em monômeros insolúveis de fibrina e assim há a formação de rede de fibras elásticas que consolidam o tampão plaquetário e o transformam em tampão hemostático. O Fator XIIIa, uma transglutaminase plasmática ativada pela alfa-Trombina, faz ligações cruzadas entre fibrinas promovendo estabilidade ao agregado de plaquetas previamente formado permitindo assim a hemostasia (Coughlin *et al.*, 2005).

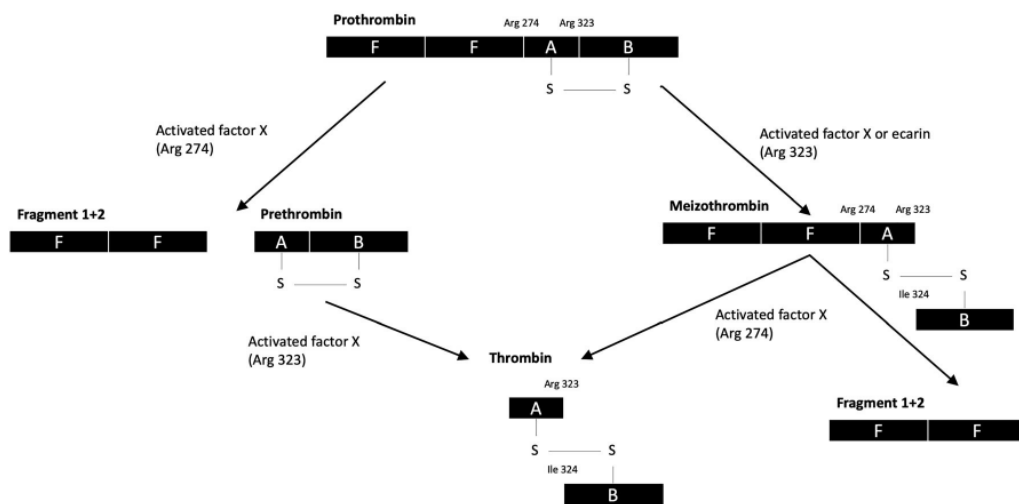


Figura 1.9. Ativação de Pró-trombina por Fator X ativado ou Ecarina para a formação de Trombina (α -Trombina). Fonte: Gosselin e Douxfills, 2020.

O conhecimento sobre cascata de coagulação direcionou o desenvolvimento de hemoderivados voltados ao tratamento de hemorragias. Produtos conhecidos como selantes de fibrina ou cola de fibrina baseiam-se na aplicação local de moléculas de fibrinogênio e alfa-trombina (podendo conter fator XIII) para a formação de um selante biológico, sendo usados há mais de 20 anos como hemostáticos cirúrgicos ou agentes selantes (Dhillon, 2011).

Existem também no mercado alguns selantes de trombina onde a alfa-trombina é aplicada com spray ou em esponjas hemostáticas, que são indicados para auxílio à hemostasia em cirurgias vasculares, de ressecção do fígado, pseudoaneurismas (extravasamento de sangue contido por estruturas circunvizinhas de uma artéria), deficiências raras do fator II (que geram sangramento excessivo ou prolongado após um ferimento ou cirurgia), ou na presença de anticoagulantes e procedimentos cirúrgicos como *bypass* cardiopulmonar, que alteram o sistema de coagulação do paciente. Dos selantes de trombinas comercializados no Brasil, a maioria é proveniente de plasma humano (Evithrom[®], Floseal[®] e Surgiflo[®]) ou bovino (Thrombin-JMI) sendo esse último com alto potencial imunogênico, podendo promover sangramento e complicações trombóticas (Heffernan *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2005; Chapman *et al.* 2007)

Uma das maiores preocupações em utilizar produtos hemoderivados é que apesar dos cuidados de seleção criteriosa de doadores de sangue bem como a triagem de testes para doenças infecciosas, há o risco de presença de príons bem como de transmissão de patógenos como o vírus da Hepatite B, de imunodeficiência humana, ou até mesmo relacionados a doenças ainda não conhecidas. Além disso, existe a possibilidade de resposta de hipersensibilidade (choque anafilático), devido à presença de proteínas plasmáticas de vários doadores

Existe no mercado internacional atualmente a opção da proteína alfa-Trombina recombinante, produzida em células CHO (Recothrom[®] Thrombin topical), que não é comercializada no Brasil. Recothrom tem baixo potencial imunogênico, tem concentração definida e pode ser aplicado com esponja de gelatina absorvível, bomba de spray ou pulverizador de ponta de seringa. É indicado para uso tópico para auxiliar na hemostasia em capilares e pequenas vênulas quando o controle do sangramento por técnicas cirúrgicas padrão (sutura, ligadura ou cauterização) for ineficaz ou impraticável em populações adultas e pediátricas com idade igual ou superior a um mês (Bula Recothrom, 2019; (Heffernan *et al.*, 2007; Greenhalgh *et al.*, 2009; Singla *et al.*, 2009; Singla *et al.*, 2011).

1.4.1. Desenvolvimento de Pró-Trombina e α -Trombina pelo grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP

Nesse contexto o desenvolvimento tecnológico nacional de Trombina recombinante demonstra ser um nicho científico e comercial importante a ser explorado. O estabelecimento de bioprocessos para a obtenção de culturas de células ExpiCHO produtoras de Pró-Trombina e Ecarina de modo recombinante, o desenvolvimento do Sistema Ingresso, bem como a purificação e obtenção de α -Trombina para ensaios *in vitro* foram iniciados pelo grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP. Os resultados são promissores e atualmente o projeto caminha para a etapa de ensaios não clínicos para posterior registro na Anvisa. Os resultados *in vitro* obtidos até o momento podem ser observados na Figura 1.10.

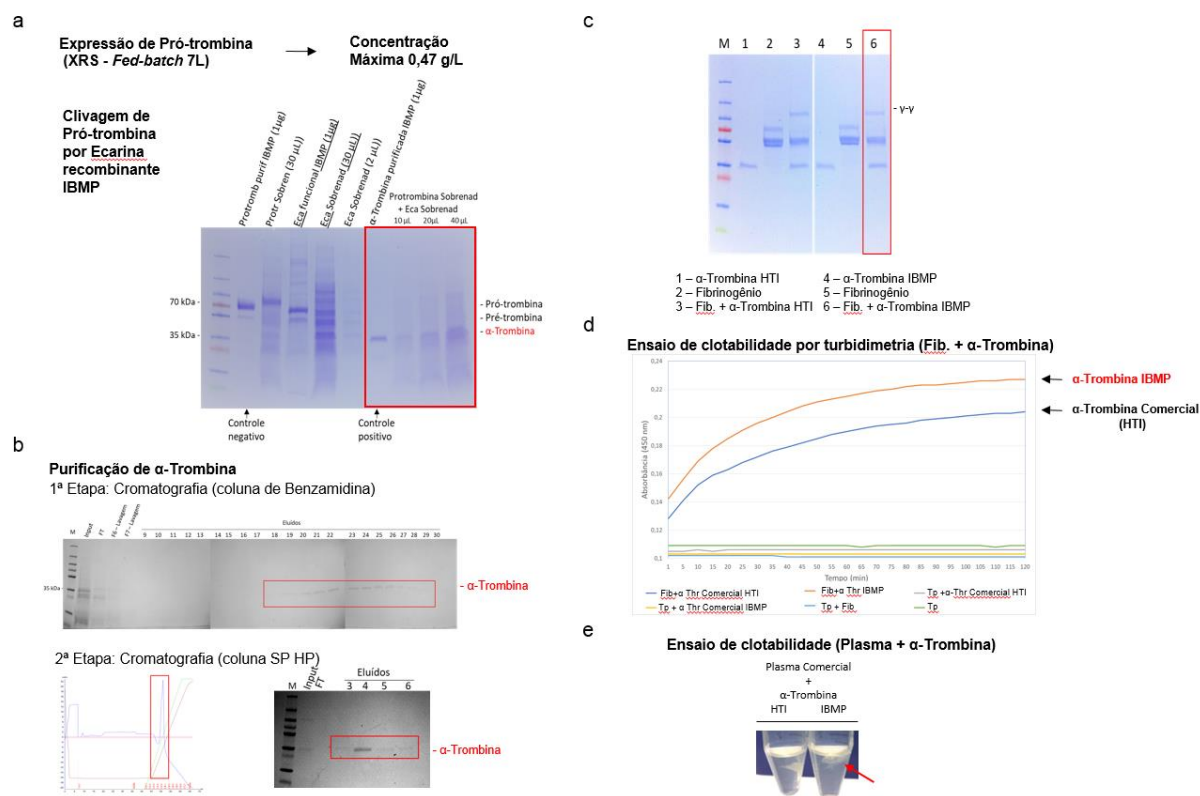


Figura 1.10. Experimentos de Pró-Trombina realizados pelo grupo de Desenvolvimento do IBMP, utilizando α -Trombina comercial (HTI) como controle positivo. (a) Obtenção de Pró-Trombina recombinante em população referente ao Sistema Ingresso (Pop. Ingresso 1.0 - enriquecida para GFP após 4 *cell sortings*) em *Fed-batch* de volume inicial de 5L em biorreator Allegro™ XRS 25 Bioreactor System – Pall. Após a obtenção de Ecarina recombinante, desenvolvida pelo grupo, esta foi utilizada para a clivagem de Pró-Trombina e obtenção de α -Trombina. **(b)** Obtenção de α -Trombina purificada em duas etapas de cromatografia: afinidade e troca-iônica, respectivamente. **(c)** Análise de clivagem de fibrinogênio por α -Trombina IBMP. **(d)** Ensaio de clotabilidade por turbidimetria: Medição de absorbância ao longo do tempo durante a formação do coágulo *in vitro* em solução. Thr: α -Trombina. Fib: Fibrinogênio comercial. Tp: Tampão de reação. **(e)** Ensaio de clotabilidade *in vitro* utilizando plasma comercial (Siemens).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse estudo faz parte de um projeto da área de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP para estudos de um sistema de expressão estável e de alta eficiência para proteínas recombinantes em células de mamíferos. A proteína recombinante utilizada nesse estudo foi Pró-trombina humana/Trombina, que apresenta análises *in vitro* promissoras em relação à coagulação de sangue e plasma humanos. A médio prazo esse sistema poderá ser utilizado como plataforma de alta produtividade de proteínas recombinantes em células de mamíferos de interesse ao IBMP.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Analisar se há aumento de expressão gênica referente a proteína recombinante Pró-trombina na presença de sequências regulatórias:
 - i. 5'UTR (TPE);
 - ii. 3'UTR (WPRE);
 - iii. *Enhancers* de promotor CMV
- b) Identificar se a intensidade de fluorescência de GFP pode ser utilizado para identificação de células altamente produtoras de Pró-Trombina no Sistema Ingresso 1.0.
- c) Analisar comportamento celular e produtividade de clones provenientes do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina.

3. METODOLOGIA

Para a construção de uma plataforma de produção estável foram realizados: construção de plasmídeos de expressão, transfecção de células ExpiCHO, seleção e enriquecimento de células transfectantes por *cell sorting* e clonagem de células em meio semi-sólido.

Os cassetes de integração ao genoma das células ExpiCHO utilizados nesse trabalho estão representados na Figura 3.1. Todos os cassetes de integração ao genoma apresentam sequências ITRs e Insuladoras, que serão omitidas dos desenhos para facilitar a visualização das regiões alteradas mediante clonagem.

Avaliamos a expressão da proteína de interesse e do marcador fluorescente utilizando três metodologias:

(a) expressão estável em populações utilizando plasmídeo “donor” e “helper-Transposase SB11”, ambos do Sistema Ingresso;

(b) obtenção de linhagens celulares clonais (clones) a partir dessas populações de células que apresentam expressão estável da proteína de interesse;

(c) expressão gênica transiente do gene que codifica para a proteína de interesse, utilizando plasmídeo “donor” do Sistema Ingresso.

Para as avaliações entre a expressão da proteína heteróloga de interesse e crescimento celular foram obtidas populações de células e clones de células a partir do Sistema Ingresso. As avaliações realizadas e seus respectivos objetivos específicos podem ser visualizados na Figura 3.2 e os procedimentos gerais realizados para a construção desse trabalho estão apresentados na Figura 3.3.

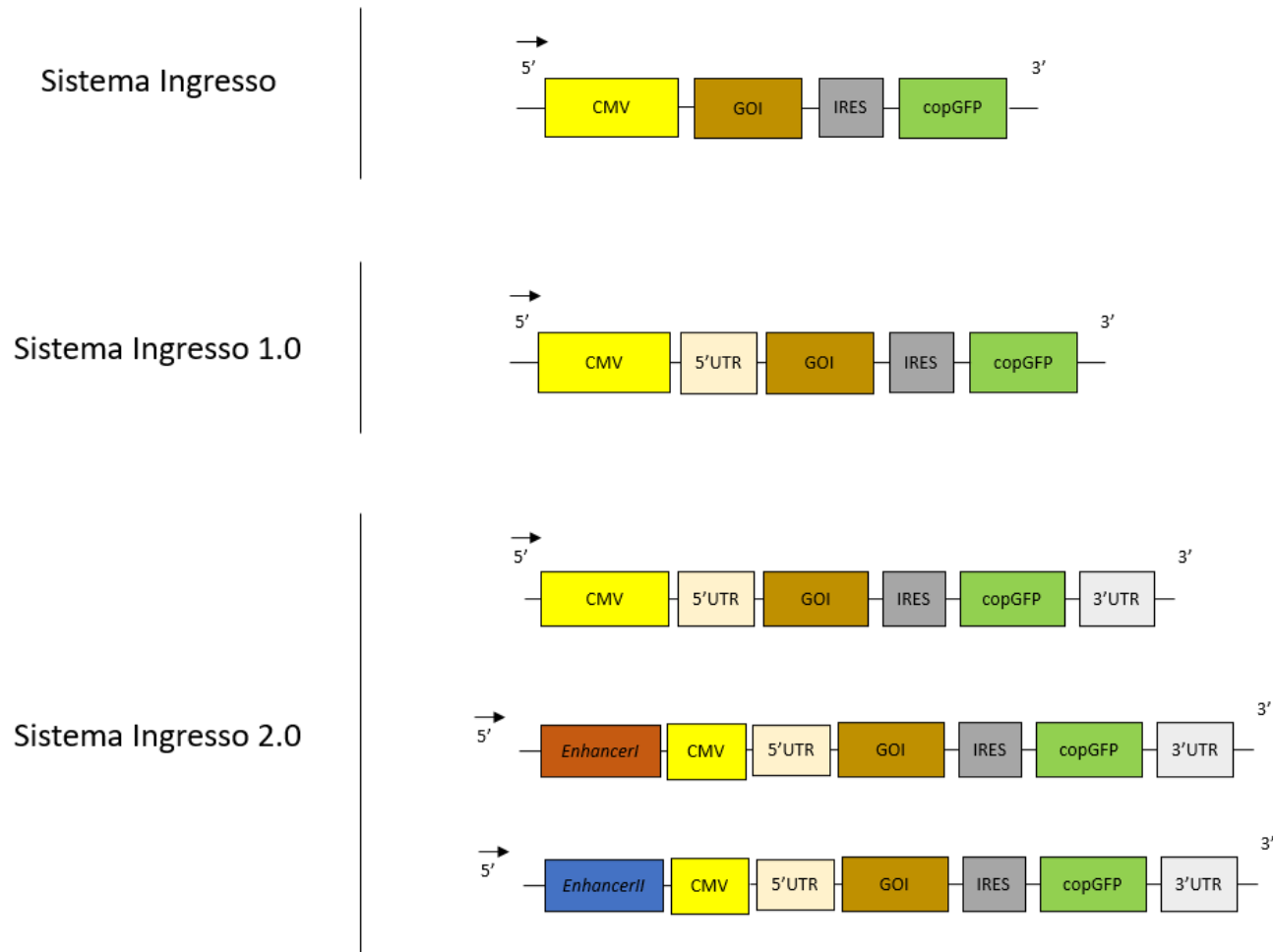


Figura 3.1. Representação dos cassetes de integração utilizados nesse trabalho e as respectivas atualizações do Sistema Ingresso. CMV Promoter: Promotor de Citomegalovírus; **GOI:** *Gene of interest*; **5'UTR:** elemento 5'UTR; **Enhancer I:** sequência I de *enhancer* de CMV escolhida; **Enhancer II:** sequência de *enhancer* de CMV escolhida; **IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*; **CoGFP:** gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP; **3'UTR:** sequência 3'UTR. Sequências ITRs e Insuladoras omitidas para simplificar a imagem.

Sistema Ingresso	Construções	Objetivo Específico	Expressão
Ingresso	<ul style="list-style-type: none"> mCherry_copGFP 	- Comparativo entre a expressão do gene referente à proteína de interesse vs gene do marcador de seleção	Estável
Ingresso 1.0	<ul style="list-style-type: none"> 5'UTR_mCherry_copGFP 	- Avaliar a expressão do gene referente à proteína de interesse com adição de 5'UTR	Estável
Ingresso vs Ingresso 1.0	<ul style="list-style-type: none"> Thr_copGFP 5'UTR_Thr_copGFP 	- Avaliar a expressão do gene referente à proteína de interesse com adição de 5'UTR (validação com proteína terapêutica)	Estável
Ingresso 1.0	<ul style="list-style-type: none"> 5'UTR_Thr_copGFP 	<ul style="list-style-type: none"> - Avaliar a expressão do gene referente à proteína de interesse com adição de 5'UTR (validação com proteína terapêutica); - Comparativo entre a expressão de Pró-trombina entre as populações e clones; - Avaliação de clones com relação ao comportamento celular (crescimento, viabilidade e intensidade de fluorescência) 	Estável
Ingresso 1.0 vs Ingresso 2.0	<ul style="list-style-type: none"> 5'UTR_Thr_copGFP 5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR 	- Avaliar a expressão do gene referente à proteína de interesse com adição de 3'UTR	Transiente
Ingresso 2.0	<ul style="list-style-type: none"> <i>EnhancerI</i>_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR <i>EnhancerII</i>_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR 	- Avaliar a expressão do gene referente à proteína de interesse com adição de <i>Enhancers</i> de promotor CMV.	Transiente

Figura 3.2. Sistema Ingresso: construções e objetivos. Descrição resumida das avaliações realizadas em sistemas de expressão de proteínas heterólogas em células ExpiCHO com alterações em seqüências reguladoras da expressão gênica. Sistema Ingresso é utilizado para a construção de linhagens celulares baseando-se no uso de seqüências específicas de reconhecimento por transposases para inclusão do cassete de expressão no genoma da linhagem celular. A adição de uma seqüência 5'UTR (TPE) deu origem ao Sistema Ingresso 1.0. A adição de seqüências *enhancers* de promotor CMV e 3'UTR resultou no Sistema Ingresso 2.0.

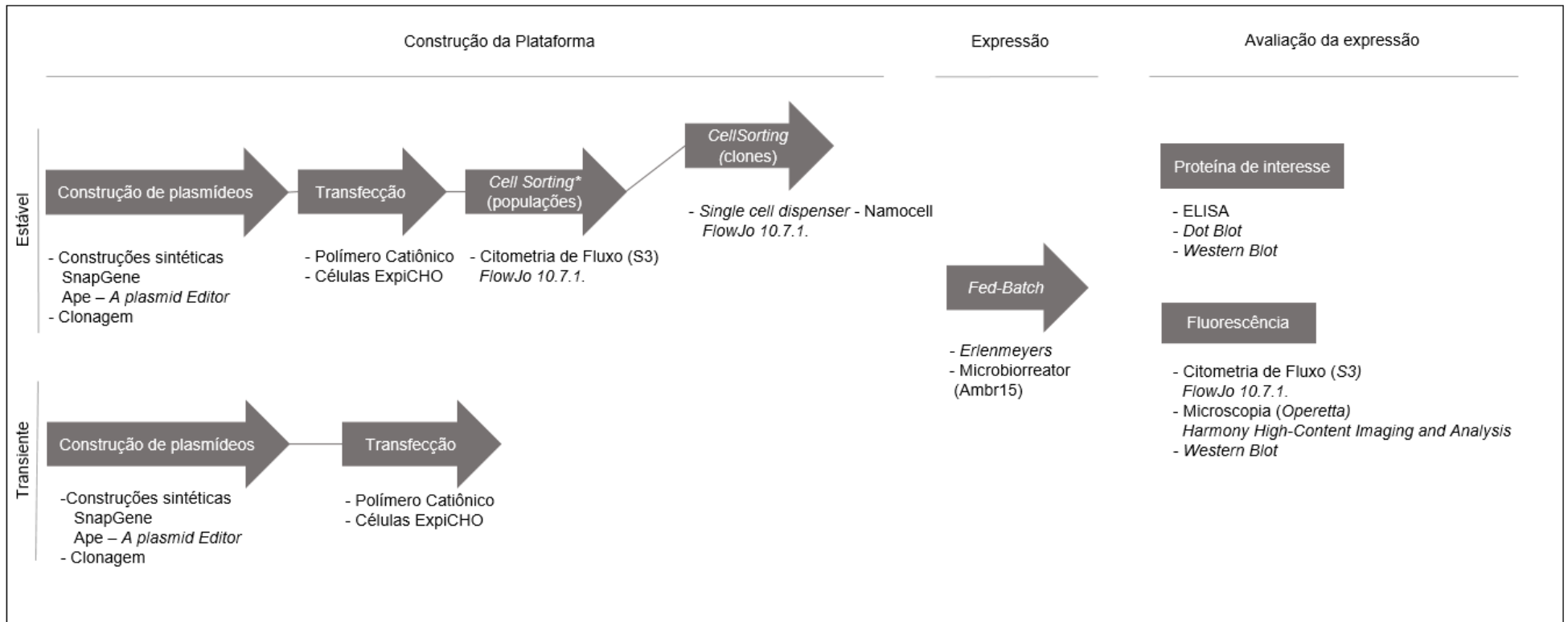


Figura 3.3. Fluxograma da metodologia empregada para avaliação do Sistema Ingresso para a expressão de genes que codificam para proteínas heterólogas. *Obtenção da população de células enriquecida para o marcador de seleção.

3.1. Reagentes e soluções

Para a realização dos experimentos seguinte foi necessário uso dos reagentes e soluções descritos a seguir:

Acetato de Sódio [SLCC] - Sigma-Aldrich

Agarose [SLCC7931] - Sigma-Aldrich

Ampicilina [BCBZ9179] - Sigma-Aldrich

Anticorpo Anti-alfa-thrombin – Green Mountain Antibody

Anticorpo Anti-beta-actina [#ab8226] – Abcam Antibodies

Anticorpo Anti-mCherry [EPR20579 #ab213511) – Abcam Antibodies

Anticorpo Anti-mouse IGG Peroxidase produzido em coelho [A9044] – Sigma-Aldrich

Anticorpo Anti-rabbit IGG (H+L), horseradish peroxidase [G21234] – Invitrogen

Anticorpo Anti-turboGFP [PA5-22688] - Thermo Fisher Scientific

Antifoam SE-15 [A8582] – Sigma-Aldrich

Anza™ DNA and Repair Enzima Mix [VGN2504] – Invitrogen

Azul de Bromofenol [BCCB2617] - Sigma-Aldrich

BSA (“Bovine Serum Albumin”) [SLBZ5304] - Sigma-Aldrich

CD EfficientFeed™ C AGT™ Nutrient Supplement [A1327504] - Thermo Fisher Scientific

ClonaCell™-CHO CD Medium - Stem Cell Technologies

DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) [REF14190-136] - GIBCO

Enzima de restrição *BspEI* [R0540S] – New England Biolabs

Enzima de restrição *EcoRI*-HF [R3101S] - New England Biolabs

Enzima de restrição *NdeI* [R0111S] - New England Biolabs

Enzima de restrição *NotI*-HF [R3189L] - New England Biolabs

Enzima de restrição *SalI*-HF [R3188S] - New England Biolabs

Enzima de restrição *SphI* [R01825] - New England Biolabs

Etanol [K48244883634] - Merck

Fatty Acid Supplement [SLBX4903] – Sigma-Aldrich

Human Pro-thrombin HTJ 1µg/µL [HCP0010] – Haematologic Technologies

NaCl (Cloreto de Sódio) [SBHG6984V] - Sigma-Aldrich

OPTI-MEM® I (Reduced Serum Medium) [31985062] – GIBCO

Ponceau S [SHBL9129] - Sigma-Aldrich

Solução de Bloqueio: PBS/Tween 0,01%+5%Leite

Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescet Substrate [34580] – Thermo Fisher Scientific

Synth-a-freeze® CTS [A1371301] - GIBCO

Synthecol® NS0 Supplement [SLBW9609] - Sigma-Aldrich

T4 DNA ligase [M0202L] - New England Biolabs

Tampão de amostra 4X para proteínas: Tris-HCl 1 M pH 6,8 6,4 mL 40 mM; SDS 10% 16 mL 1 %; β-mercaptoetanol (14,7M) 4 mL 2.5 %; Glicerol 9,6 mL 6 %; Azul de bromofenol ~8 mg 0,005 %.

Tampão de Transferência para *western blot*: Tris-base (P.M.121.1) 30 g 3 g 25 mM; Glicina (P.M.75.07) 144 g 14,4 g 192 mM; Metanol - 200 mL 20 %.

3.2. Obtenção de sequências de DNA sintetizadas

As sequências de DNA referentes aos elementos regulatórios utilizadas para a construção dos plasmídeos para a transfecção em células ExpiCHO foram desenhadas já contendo as sequências de reconhecimento pelas enzimas de restrição de interesse para cada fragmento, para clonagem molecular em vetores do Sistema Ingresso. As sequências foram sintetizadas pela empresa Genscript.

3.3. Obtenção de plasmídeos

Os plasmídeos utilizados para transfecção em células ExpiCHO foram construídos utilizando os seguintes passos: digestão do fragmento de interesse (proveniente de sequência sintetizada) e plasmídeo de transfecção (Sistema Ingresso) com enzimas de restrição sítio específicas; ligação dos fragmentos e plasmídeos digeridos; transformação em *E. coli* e cultivo em meio seletivo para amplificação dos plasmídeos construídos; confirmação das colônias positivas para os plasmídeos gerados (digestão com enzimas de restrição sítio específicas) e checagem das sequências por sequenciamento (Macrogen).

3.3.1. Clonagens por enzimas de restrição

As digestões enzimáticas realizadas para as construções dos plasmídeos doadores de cassete de integração em células ExpiCHO foram realizadas utilizando 6 µg do plasmídeo de inserção e 6 µg inserto de interesse em uma reação com volume final de 150 µL, seguindo o protocolo da fabricante. A relação de microgramas de DNA por unidade de enzima de restrição pode ser encontrada na Tabela 3.1.

As reações foram incubadas a 37 °C por 16 horas e então aplicadas em gel de agarose 0,8% para eletroforese (90V – 1 hora). O gel de agarose foi corado através da imersão do gel de agarose pós-eletroforese em brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 15 minutos. A banda de DNA correspondente ao tamanho do fragmento desejado foi purificada através do seu recorte do gel de agarose após a eletroforese utilizando o Kit de extração em Gel de Agarose (Qiagen) de acordo com o protocolo da fabricante. As amostras foram quantificadas em Nanodrop (ThermoFisher Scientific).

Tabela 3.1. Combinação de enzimas de restrição utilizadas para as construções dos plasmídeos doadores de cassete de integração utilizados para transfecção em células ExpiCHO.

Clonagem do gene	Enzima I*	Quant./reação		Tampão de reação
		Enzima II*		
<i>Enhancer</i> I e II	<i>NdeI</i>	20U	<i>AgeI</i> – HF 20U	CutSmart
		20U	<i>EcoRI</i> – 20U	
Pró-Trombina	<i>NotI</i> – HF		HF	CutSmart
copGFP	<i>SalI</i> – HF	20U	<i>AccIII</i> 10U	NEBuffer 3.1
3'UTR (WPRE)	<i>SalI</i> – HF	20U	<i>SphI</i> 10U	CutSmart

* As enzimas utilizadas para construção dos plasmídeos descritos são da marca NEB – New England Biolabs Inc. As reações foram realizadas utilizando o software NEBCloner versão 1.6.0 disponibilizado ao público em seu respectivo site. HF – *High Fidelity*.

Para a reação de ligação entre plasmídeo e inserto foi utilizada a relação molar de 1:5 (plasmídeo:inserto). Tanto o inserto quanto o plasmídeo foram previamente digeridos com as enzimas de restrição descritas anteriormente, purificados e ligados com 400U de T4DNA ligase (Biolabs #M0202L) em um volume final de 10 µL de reação. As reações foram submetidas a 16 °C *overnight* e posteriormente inativada, sendo submetidas a 72 °C durante 10 minutos.

As reações de ligação inativadas foram incubadas com 100 µL da suspensão de *E. coli* TOP10 quimio-competentes (preparadas no laboratório previamente) por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posteriormente, foi adicionado 1 mL de meio LB e incubadas sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C durante uma hora.

Após esse tempo, as células foram espalhadas em meio seletivo, LB-ágar contendo ampicilina 100 µg/mL e incubados a 37 °C por 16 horas. As colônias cultivadas nessas condições foram inoculadas individualmente em 50mL de meio seletivo LB contendo antibiótico ampicilina a 100 µg/mL e incubados a 37 °C, 200 rpm, por 16 horas. Após, os plasmídeos foram obtidos de cada inóculo preparado, utilizando o Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN #27106), conforme as recomendações do fabricante.

Para a confirmação dos clones, foram realizadas digestões com as mesmas enzimas de restrições utilizadas para a obtenção do inserto e plasmídeo digeridos, respectivamente. A confirmação da presença do inserto de interesse foi através da liberação do fragmento de DNA de tamanho esperado em gel de agarose 0,8% por eletroforese (90V – 1 hora), após coloração em brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 15 minutos. Os plasmídeos que liberaram o fragmento de DNA de interesse, considerados positivos para a clonagem, foram enviados para sequenciamento (Macrogen) na concentração 100ng/µL em volume final de 10 µL para realização do sequenciamento. Os iniciadores utilizados para a confirmação da clonagem do

fragmento de interesse por sequenciamento estão apresentados a seguir na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Iniciadores utilizados para confirmação por sequenciamento da presença do fragmento de interesse em plasmídeo doador de cassete de integração no genoma de ExpiCHO.

Clonagem	Iniciador	Sequência	TM
<i>Enhancer</i>	Enhancer I F	5' CCGTGCTAGCCATATGGGGACT 3'	62°C
	Enhancer II F	5' CCGTGCTAGCCATATGAGTTCAGGGAC 3'	64°C
Gene de interesse	IRES R3	5' ACATATAGACAAACGCACACCGG 3'	59°C
	Pró-Trombina F	5' GGGGAATTCGCCACCATGGCGCACGTCCGAGGCTTG 3'	76°C
	Pró-Trombina R	5' CCCGCGGCCGCCTACTCTCCAAACTGATCAATGACCTTC 3'	73°C
Marcador de seleção	PoliARI	5' AAGCAATAGCATCACAAATTTTCCAC 3'	54°C
	IRES F2	5' CACGGGGGACGTGTTTTTCC 3'	59°C
3'UTR	PoliARI	5' AAGCAATAGCATCACAAATTTTCCAC 3'	54°C

TM – Temperatura estimada de anelamento dos iniciadores.

3.4. Sistema Ingresso 1.0 – Análise da expressão da proteína mCherry na ausência do elemento 5'UTR

Levando em consideração que o gene de interesse está localizado a jusante do promotor CMV e o gene referente a copGFP, marcador fluorescente para seleção, a jusante de IRES, primeiramente foi avaliado se a taxa da produção de proteína recombinante de interesse está relacionada quantitativamente à quantidade de proteína copGFP. Para isso foram construídos plasmídeos com cassetes de integração contendo dupla fluorescência: gene que codifica para a proteína mCherry, uma proteína citoplasmática, representando a proteína de interesse, e gene que codifica para o marcador de seleção fluorescente copGFP, também citoplasmática.

O plasmídeo utilizado para a transfecção em células ExpiCHO, já obtido e sequenciado pelo grupo anteriormente, possui: (I) promotor CMV, mCherry, IRES e copGFP (Figura 3.4). Após a transfecção das células, estas foram enriquecidas para

copGFP por 3 ciclos de *cell sorting*. A população foi analisada por citometria de fluxo e análise quantitativa das proteínas por *Western blot*.

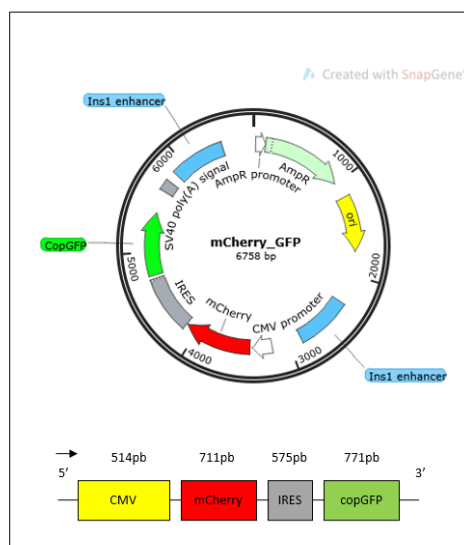


Figura 3.4. Plasmídeo CMV_mCherry_IRES_copGFP – Sistema Ingresso. Plasmídeo utilizado para transfecção em células ExpiCHO contendo **AmpR**: gene que codifica para resistência a ampicilina; **CMV Promoter**: Promotor de Citomegalovírus; **mCherry**: gene que codifica para proteína fluorescente vermelha (GI: 1229406991). **IRES**: *Internal Ribosome Entry Site*; **CopGFP**: gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP, (GI: 375332228). **SV40 poly(A) signal**: Sinal de poliadenilação. **ITR1 e 2**: sítios de reconhecimento por transposase. **Ins1 e Ins2 enhancer**: Regiões insuladoras.

3.5. Sistema Ingresso 1.0 – Análise da expressão de proteína mCherry na presença do elemento 5'UTR

Para o estudo da influência do elemento na região 5'UTR no aumento de expressão gênica da proteína de interesse, foi realizada a inserção desta sequência no cassete de integração no genoma da ExpiCHO, obtendo assim o plasmídeo referente ao Sistema Ingresso 1.0. Esse plasmídeo já tinha sido construído e sequenciado anteriormente pelo grupo, possuindo o cassete de integração com dupla fluorescência, como descrito anteriormente e a adição de sequência 5'UTR (TPE), a *jusante* do promotor no cassete de integração em células ExpiCHO. Esse plasmídeo possui: (I) promotor CMV, TPE, mCherry, IRES e copGFP (Figura 3.5). Após a transfecção das células, estas foram enriquecidas para copGFP por 3 ciclos de *cell sorting*. A população foi analisada por citometria de fluxo e análise quantitativa das proteínas por *Western blot*.

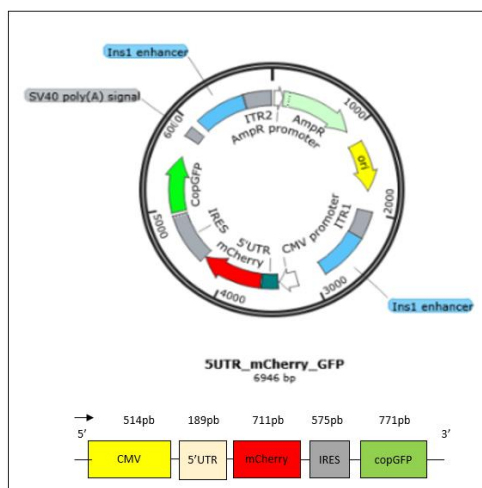


Figura 3.5. Plasmídeo CMV_5'UTR_mCherry_IRES_copGFP – Sistema Ingresso 1.0. Plasmídeo utilizado para transfecção em células ExpiCHO contendo **AmpR**: gene que codifica para resistência a ampicilina; **CMV Promoter**: Promotor de Citomegalovírus; **5'UTR**: elemento 5'UTR (TPE); **mCherry**: gene que codifica para proteína fluorescente vermelha (GI: 1229406991); **IRES**: *Internal Ribosome Entry Site*; **CopGFP**: gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP, GI: 375332228). **SV40 poly(A) signal**: Sinal de poliadenilação. **ITR1 e 2**: sítios de reconhecimento por transposase. **Ins1 e Ins2 enhancer**: Regiões insuladoras.

3.5.1. Análise da expressão da proteína Pró-Trombina em sobrenadante de cultura de células

A análise da expressão da proteína de interesse Pró-Trombina (Trombina), proteína terapêutica modelo escolhida para a realização desse trabalho, foi realizada inicialmente na ausência e na presença da sequência 5'UTR. Esta proteína é secretada para o sobrenadante da cultura de ExpiCHO.

A sequência do gene referente à proteína Pró-trombina foi inserida a *jusante* do promotor CMV e do 5'UTR (quando presente) e o marcador de seleção utilizado foi o copGFP. Os plasmídeos utilizados para a transfecção em células ExpiCHO possuem: (I - Sistema Ingresso) promotor CMV, Pró-Trombina, IRES e copGFP (Figura 3.6a) e (II - Sistema Ingresso 1.0) promotor CMV, 5'UTR, Pró-Trombina, IRES e copGFP (Figura 3.6b).

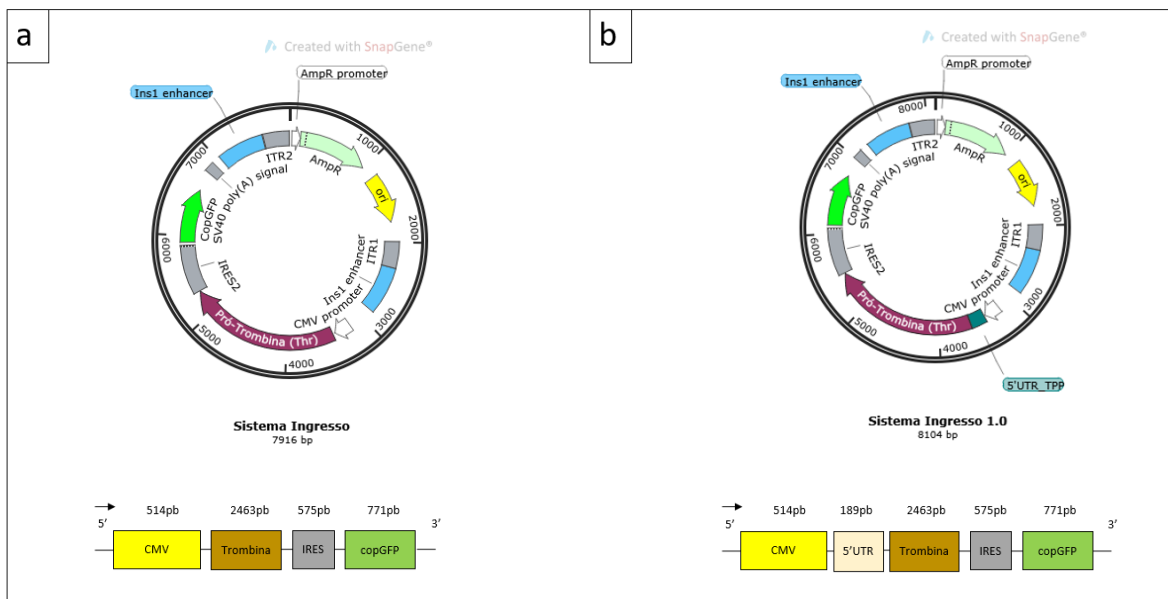


Figura 3.6. Plasmídeos Sistema Ingresso e Ingresso 1.0 para Pró-Trombina. (a) Plasmídeo CMV_Thr_IRES_copGFP – Sistema Ingresso. (b) Plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_IRES_copGFP – Sistema Ingresso 1.0. AmpR: gene que codifica resistência a ampicilina; **CMV Promoter:** Promotor de Citomegalovírus; **5'UTR:** elemento 5'UTR (TPE); **Trombina:** gene que codifica para proteína Pró-trombina; **IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*; **CopGFP:** gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP, GI: 375332228). **SV40 poly(A) signal:** Sinal de poliadenilação. **ITR1 e 2:** sítios de reconhecimento por transposase. **Ins1 e Ins2 enhancer:** Regiões insuladoras.

A obtenção das populações de células enriquecidas para copGFP, as análises por citometria de fluxo, bem como da quantidade de proteína Pró-Trombina em sobrenadante de cultura de células estão descritos posteriormente.

3.5.1.1. Obtenção de população de células e linhagens clonais de ExpiCHO enriquecidas para copGFP

3.5.1.1.1. Transfecção de células Expi-CHO

O protocolo de transfecção de ExpiCHO foi adaptado de Baldi e colaboradores (2012 -Book 1), onde foram utilizados 25µg de DNA/ml e 1x10⁷cel/ml para a transfecção; sendo a relação de 2.5 µg de DNA para cada 10⁶ células, similar a relação usada no protocolo adaptado de Derouazi e colaboradores (2004).

As células foram repicadas 4 dias antes da transfecção em densidade final de 5x10⁵cel/ml com adição de Synthecol (Sigma S5442) na diluição 1:500 e Fatty Acid

na diluição de uso de 1:2000 (Sigma F7050). Após 3 dias do cultivo celular, as células foram repicadas na densidade 1×10^6 cel/ml com adição de Synthecol (Sigma S5442) na diluição 1:500 e Fatty Acid na diluição de uso de 1:2000 (Sigma F7050). No quarto dia da transfecção, a densidade e a viabilidade celular foram checadas. Para cada transfecção foram utilizadas 10^7 células, que foram centrifugadas a 300xg e suspensas em 1ml de meio Optimem (Gibco 31985-070) e transferidas para tubo de ensaio de 25ml.

A quantidade referente a 18,75µg de plasmídeos do Sistema Ingresso 1.0 e 6,25µg de plasmídeo Transposase SB11 foram precipitados com Etanol 100% e 10% Acetato de sódio 3M pH 5.2 por 15 minutos a -80 °C. Após esse período, o DNA foi centrifugado a 13.000xg por 10 minutos, o volume descartado e então suspensos com Etanol 70%. Logo após a adição, foram centrifugados novamente na mesma velocidade e o DNA foi suspenso em 30µl de meio Optimem. O DNA foi então adicionado à cultura, seguido de adição de 50µg de PEI (Polyscience cat#23966-1 - estoque 1mg/ml), sob agitação manual.

As culturas foram incubadas na estufa por 3 horas sob agitação de 180rpm a 8% de CO₂, com o tubo de ensaio quase na horizontal e tampa semiaberta. Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para Erlenmeyer de capacidade 125ml contendo 39ml de meio Dynamis pré-aquecido, sendo a concentração final de células de $2,5 \times 10^5$ células/mL.

3.5.1.1.2. Enriquecimento de células contendo copGFP por citometria de fluxo – *cell sorting*

Após 48 horas da transfecção para expressão estável, as células transfectadas e células ExpiCHO (controle sem marcador de fluorescência, não transfectadas) foram centrifugadas a 300xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi lavado com PBS-BSA 2% (Thermo Fisher Scientific) e então suspenso em 1mL em PBS BSA2 % e Normocin 50mg/mL 1:500 (Invivogen) para a seleção de células positivas para copGFP (488-507nm) por *cell sorting* em equipamento de citometria de fluxo S3 (Biorad). As células ExpiCHO não transfectadas foram utilizadas como controle para a delimitação do *gate* negativo para FL1 (488nm).

As células positivas para copGFP foram coletadas em 500µL de PBS-BSA 2% e Normocin 50mg/mL 1:500 (Invivogen) e, centrifugadas a 300xg durante 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas na concentração final de 5×10^5 células/mL em meio Dynamis contendo Meio Condicionado 20% e Normocin 50mg/mL 1:500.

Para o enriquecimento da população de células positivas para copGFP, foram realizados mais dois *cell sortings*, onde as células foram repicadas com intervalos de uma semana. A concentração inicial de células foi mantida em 5×10^5 células/ml a cada repique

Para a obtenção de populações altamente enriquecidas para GFP, foi realizado o quarto *sorting* selecionando um *gate* correspondendo à extremidade de 5% das células mais fluorescentes, conforme Figura 3.7, sendo que as células encontradas no *gate* de 0,5% mais à direita foram excluídas, pois foi verificado anteriormente pelo grupo que essas células não são viáveis em cultura ao longo do tempo de cultivo. As análises dos procedimentos realizados na citometria de fluxo foram realizadas utilizando o *software* de análise FlowJo 10.7.1.

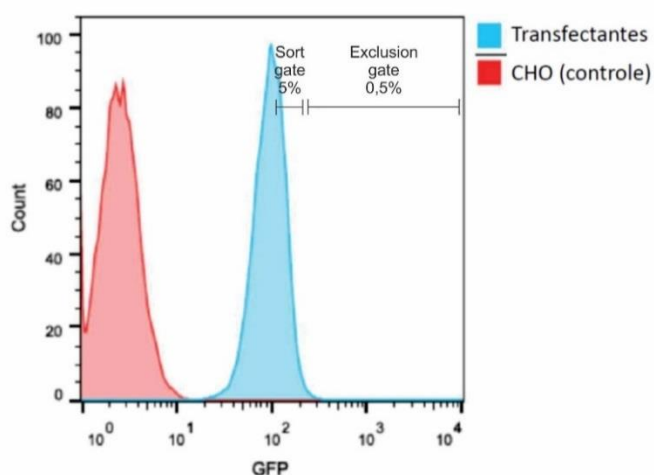


Figura 3.7. Seleção de *gate* para *cell sorting*: obtenção de populações altamente enriquecidas para copGFP. O histograma em vermelho representa o nível basal de autofluorescência de células ExpiCHO controles, enquanto o histograma em azul representa uma população transfectante contendo copGFP como proteína fluorescente repórter. A região selecionada para *cell sorting* (separação celular) corresponde a extremidade contendo 5% das células mais fluorescentes (*Sort gate*). Já a quantidade referente a 0,5% das células presentes na extremidade mais à direita, foram excluídas do enriquecimento celular (*Exclusion gate*).

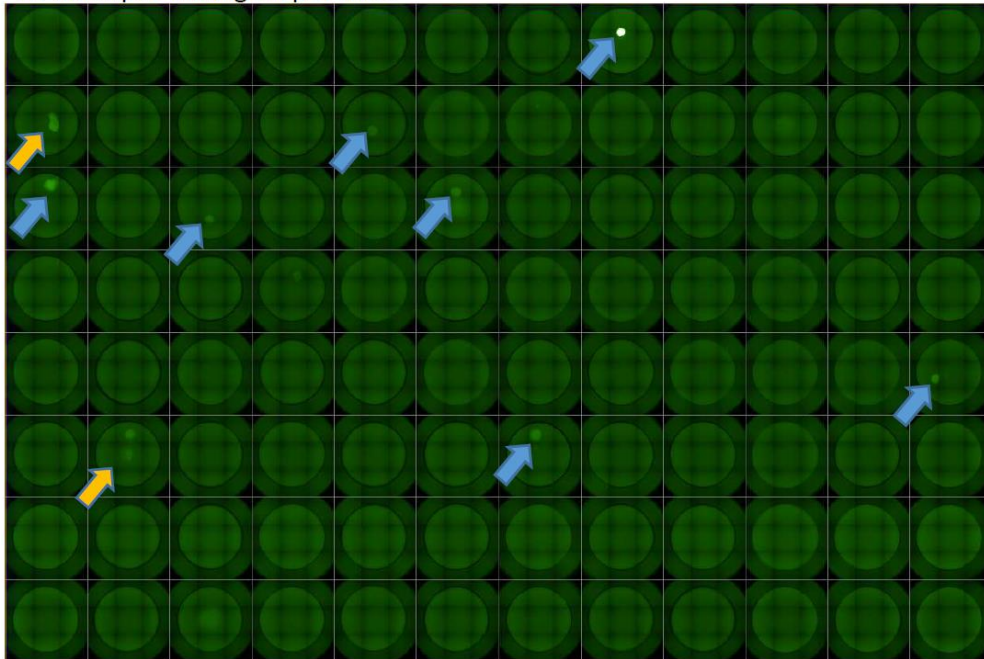
3.5.1.1.3. Obtenção de clones a partir de população de células enriquecida para copGFP

A próxima etapa foi a obtenção de clones para analisar a expressão da proteína Pró-Trombina, a fim de identificar aqueles que apresentassem maior quantidade de proteína expressa para fins comerciais futuros de produção.

Para isso foi realizada a clonagem da população de células enriquecidas para copGFP, contendo 5'UTR (TPE) – Sistema Ingresso 1.0. A obtenção dos clones foi realizada pelo grupo do laboratório de Cultivo de Eucariotos da área de Desenvolvimento Tecnológico – IBMP utilizando o equipamento Namocell Single Cell Dispenser (Namocell), usando cartuchos descartáveis de microfluídica sob baixa pressão (2 psi), utilizando copGFP como marcador de seleção. Células únicas, usando um sort gate similar ao demonstrado na Figura 3.7, foram dispensadas em placas de 96 poços contendo meio semisólido Clonacell (ClonaCell™-CHO CD Medium - Stem Cell Technologies) e aditivos, analisadas semanalmente através de triagem em larga escala usando um microscópio de fluorescência tipo HTS (*high-throughput screening*, Operetta – Perkin Elmer). A visualização semanal das células por HTS permitiu a seleção de poços monoclonais, visto que em meio semisólido os clones podem ser facilmente visualizados como colônias individualizadas. Os resultados podem ser observados na Figura 3.8, parte superior.

Após o período de 20-30 dias da recuperação das células em meio semisólido, colônias com alta fluorescência (maior média de fluorescência dos pixels verdes dentro da colônia) e monoclonais (somente uma colônia esférica visível no poço), foram recuperadas para expansão em placas de 24 poços (Figura 3.8, parte inferior), contendo 500 µL de meio líquido Dynamis (Thermo # A2661501) e aditivos: 1:100 de Glutamax (Gibco #35050-061), 0,1% de Pluronic™ F-68, Non-ionic Surfactant (Gibco #24040-032), 1:2000 de Anti-Clumping Agent (Thermo #001-0057AE), 1:1000 de Trace Elements A e B (Corning #25-021-CI e #25-022-CI, respectivamente). Essa placa foi mantida a 37°C, a 8% de CO₂, a 100 rpm, por aproximadamente 15 dias.

20 dias após clonagem por FACS



↓ Seleção dos top-24 (a partir de 3 placas de 96)

15 dias após passagem para placa de 24 poços

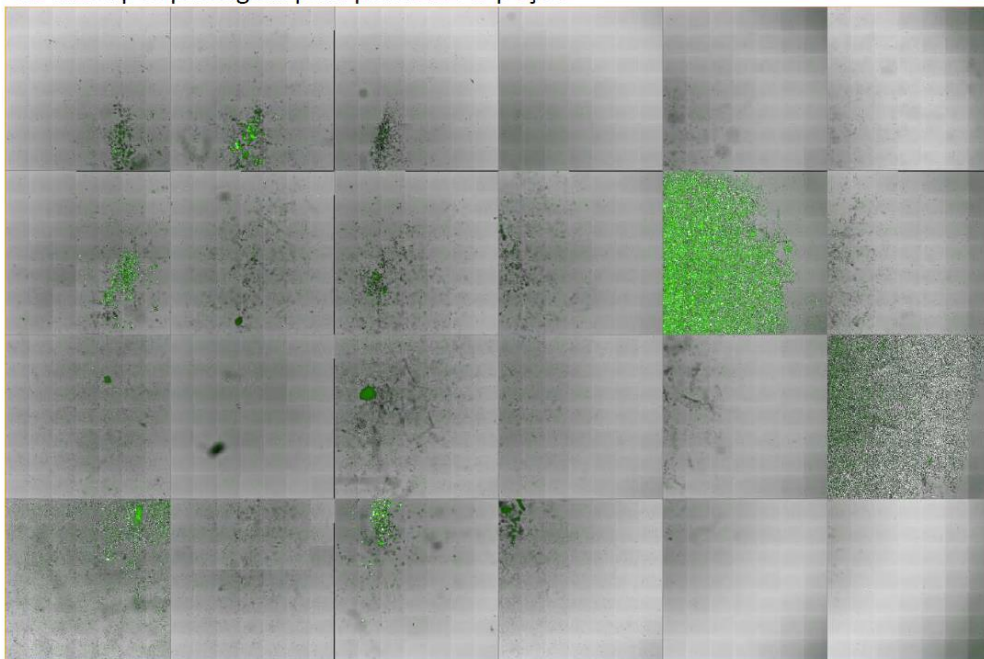


Figura 3.8. Triagem dos clones enriquecidos para GFP, após a separação por Namocell, em um sistema HTS (*high throughput screening*). A imagem superior é uma reconstrução virtual representativa de uma placa completa de clonagem (20 dias após a separação por Namocell), com objetiva de aumento de 5X; as setas azuis indicam poços contendo uma população monoclonal enquanto as setas laranjas indicam poços contendo populações provavelmente não clonais (presença de mais de um ponto verde, originado de células distintas). O acompanhamento do crescimento das colônias, em meio semi-sólido, em microscopia de fluorescência tipo HTS (*high-throughput screening*, Operetta – Perkin Elmer) permite a seleção dos clones mais fluorescentes (possivelmente com maior nível de expressão da proteína de interesse) e exclusão de populações policlonais. A imagem inferior é representativa da expansão dos clones de interesse em meio líquido em placa de 24 poços, com objetiva de aumento de 20X.

Após esse período, os clones que cresceram foram transferidos para uma placa de 12 poços, sendo a densidade inicial de 2×10^5 células/ml em volume final de 1 mL em meio líquido Dynamis (Thermo # A2661501) e os mesmos aditivos. Essa placa foi mantida a 37°C, 8% de CO₂, a 100 rpm, por aproximadamente 15 dias.

Após esse período, as células foram transferidas para Erlenmeyer de capacidade 125ml com volumes de 5 a 30ml de meio de cultura Dynamis em concentração mínima de 2×10^5 células/ml. Após 2 repiques de mesma concentração, 10^7 células foram centrifugadas, suspensas em 1ml de Synth-a-freeze (Thermo Fisher – #A1254201) e congeladas em nitrogênio líquido evitando o envelhecimento das culturas para as análises posteriores.

3.5.1.1.4. Análise de intensidade de fluorescência por microscopia de fluorescência

Foi retirado do cultivo *Fed-batch* 2×10^5 células no segundo dia de cultivo para análise de GFP por microscopia de fluorescência. As células para análise contendo o marcador de seleção e ExpiCHO (controle) foram centrifugadas a 300xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 200uL de PBS (ThermoFisher) e aplicados em placa de 96 poços.

As imagens foram capturadas para análises de fluorescência através de microscópio Operetta HTS High-Content Imaging Screening (Perkin Elmer), objetiva 20X *air*, 100 fotos/poço, 3 planos, CO₂ 5%, 37°C, utilizando o filtro respectivo para cada marcação, como apresentado na Tabela 3.3. A análise das imagens foi realizada com o *software* Harmony High-Content Imaging and Analysis (Perkin Elmer) com definições pré-estabelecidas utilizando a foto apresentada pela captura com *Brightfield* (Figura 3.9a) na seguinte ordem: definição da morfologia celular (Figura 3.9b), exclusão de células com morfologia não circular (Figura 3.9c) e eliminação de células nas bordas da imagem (Figura 3.9d).

Tabela 3.3. Filtros utilizados e respectivos marcadores de seleção detectados para análise por microscopia de fluorescência Operetta HTS High-Content Screening System (Perkin Elmer).

Filtro	Marcador de Seleção
<i>Brightfield</i>	-
mCherry (530-650nm)	mCherry (587nm – 510 nm)
EGFP (460-550nm)	copGFP (488nm – 507nm)

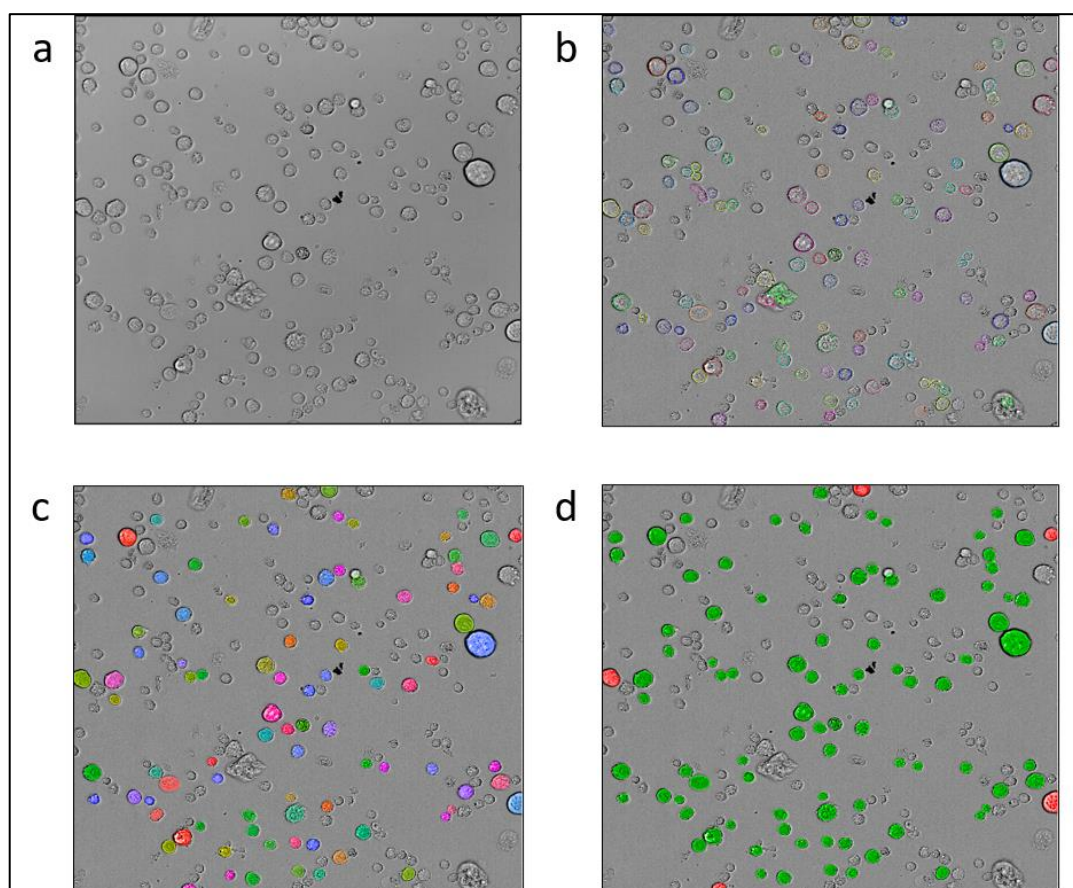


Figura 3.9. Definições estabelecidas para análise de fluorescência por microscopia (Operetta – Perkin Elmer). (a) Imagem utilizada para definição dos parâmetros de análise. (b) Definição dos parâmetros de identificação da população a ser analisada: área e *roundness* celular. As células delineadas em diferentes cores foram consideradas para análise de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos. (c) *Cell roundness*: 0,8. As células apresentadas com preenchimento de diferentes cores foram consideradas para análise de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos. (d) Exclusão de células da borda da imagem para evitar recontagem. As células apresentadas em vermelho foram excluídas por estarem na borda da imagem. As células apresentadas em verde foram consideradas para a análise.

3.5.1.2. Análise da fluorescência por citometria de fluxo – S3 Biorad

As populações de células para análise contendo o marcador de seleção e ExpiCHO (controle) foram centrifugadas a 300xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi suspenso em 1mL de PBS – BSA 2% (Thermo Fisher Scientific) para lavagem, sendo esse procedimento realizado 2 vezes. Após, as células foram suspensas em PBS – BSA 2% (Thermo Fisher Scientific) com Normocin 50mg/mL 1:500 (Invivogen) e analisadas por citometria de fluxo em equipamento S3 (Biorad), utilizando o filtro respectivo para a sua marcação como apresentado na Tabela 3.4. As análises dos procedimentos realizados na citometria de fluxo foram realizadas utilizando o *software* de análise FlowJo 10.7.1. (BD – Biosciences).

Tabela 3.4. Filtros utilizados e seus respectivos marcadores de seleção detectados para análise por citometria de fluxo.

Filtro*	Marcador de Seleção*
FL1 (510-540nm)	copGFP (488nm – 507nm)
FL3 (602-627nm)	mCherry (587nm – 510 nm)

*Informações disponíveis no catálogo do citômetro S3e *Cell Sorter* (488/561nm *lasers*) – Bio-Rad.

3.5.1.3. Cultivo em bateladas alimentadas (*Fed-Batch*)

3.5.1.3.1. *Fed-Batch* em erlenmeyers

Para análise de produção da proteína terapêutica Pró-Trombina foram realizadas bateladas alimentadas (*Fed-Batch*) de 20mL de cultivo de células na concentração inicial de 5×10^6 cel/mL com duração de 6 dias de cultivo a 37°C e rotação a 180 rpm. As coletas das amostras foram realizadas diariamente para as seguintes análises: 10uL para verificação do crescimento e viabilidade das células; 10uL para verificação de pH utilizando fita de pH; e 10uL para verificação de taxa de glicose utilizando o leitor de glicose (Accu Check - Active). A contagem de células foi realizada para o controle de crescimento e viabilidade da cultura. O pH foi ajustado diariamente utilizando Bicarbonato de Sódio/NaOH 5M quando a cultura atingisse pH <6.8 e, HCl 1M quando a cultura atingisse pH >7.4. A glicose foi ajustada diariamente utilizando 5% de *Feed 2X* (v/v) (CD EfficientFeed™ C AGT™ Nutrient Supplement [A1327504] - Thermo Fisher Scientific) quando a cultura estivesse com glicose

<300ng/dL e 10% de *Feed* 2X (v/v) quando a cultura estivesse com glicose <200ng/dL. Nos dias 3 e 6 foram coletadas 100uL de amostra da cultura para análise de produtividade por *Dot Blot* e ELISA. As amostras coletadas para quantificação de Pró-Trombina foram centrifugadas durante 10 minutos a 300xg, o *pellet* descartado e o sobrenadante centrifugado novamente durante 10 minutos a 14000xg. O sobrenadante foi armazenado a -80°C até a data da análise.

3.5.1.3.2. *Fed-Batch* em microbiorreator Ambr15

O Ambr 15 é um biorreator considerado padrão para cultura de células em pequena escala que permite *screening* de linhagens celulares e otimizações de expressão através de painel de meios de cultura e suplementos (*feeds*). Esse equipamento permite a integração de módulos de contagem de células (Vicell XR ou Cedex HiRes) e de análise de Metabólitos (Cedex Bio-HT analyzer), mas que ainda não foram instalados no equipamento.



Figura 3.10. Microbiorreator Ambr15 – Sartorius. (a) Estação de cultivo automatizado para células de mamíferos com capacidade para até 48 microbiorreatores. **(b)** Microbiorreator descartável com volume útil de 10 a 15 mL, presença de *impeller*, região para entrada de gases e sensor óptico para monitoramento de DO e pH.

O experimento de *Fed-Batch* em microbiorreator (Ambr15 – Sartorius) (Figura 3.10) constituiu-se de bateladas com 10-15 mL de cultura na concentração inicial de

4×10^5 cél/mL com duração de 14 dias de cultivo a 37 °C com rotação inicial de 400 rpm por 3 horas, seguido de aumento gradativo de rotação de 500 rpm, 750 e 900 rpm a cada 3 horas. Após alcançar a rotação de 900 rpm, esta rotação foi mantida até o final do experimento. A DO foi mantida a 80% e o pH na faixa de 7,15 a 7,25.

Os ajustes de pH realizados manualmente em *Fed-Batch* em erlenmeyers, foram realizados automaticamente pelo equipamento Ambr15. O pH foi ajustado diariamente pelo ajuste interno do equipamento através da adição de solução básica (v/v) quando $\text{pH} < 7.15$ ou adição do gás CO_2 quando do $\text{pH} > 7.25$. Após as células atingirem a concentração de 10^7 células/ml, a glicose foi ajustada diariamente utilizando 5% de *Feed 2X* (v/v) (CD EfficientFeed™ C AGT™ Nutrient Supplement [A1327504] - Thermo Fisher Scientific) para manter a faixa de glicose de aproximadamente 300ng/dL. É recomendada a utilização de antiespumante (*antifoam*) na cultura para evitar formação de bolhas e garantir o bom funcionamento do Ambr15. Nesse estudo foi utilizado 30ul diário de SE-15 (Sigma- Aldrich # A8582) em concentração final de 0,75%, de acordo com Velugula-Yellela e colaboradores (2017).

As coletas do sobrenadante foram realizadas nos dias 3, 6, 10, 11, 12 e 14 para as seguintes análises: 500uL total onde desta coleta, 10 μL foi utilizado para contagem de células, realizada para o controle de crescimento e viabilidade da cultura e, o restante da coleta (490uL), foi utilizado para quantificação de Pró-Trombina sendo centrifugadas durante 10 minutos à 300xg, o *pellet* descartado e, o sobrenadante centrifugado novamente durante 10 minutos à 14000xg. O sobrenadante foi armazenado a -80 °C até a data da análise para a quantificação de Pró-Trombina por ELISA, utilizando o Human Total Factor II (Pro-Thrombin) Elisa Kit I (Inovative Research, Inc.) e posterior cálculo de produtividade específica (qP).

3.6. Sistema Ingresso 2.0

Para a verificação da relação entre as sequências regulatórias e o aumento da quantidade de Pró-Trombina no sobrenadante das culturas, células ExpiCHO foram transfectadas com plasmídeos para expressão transiente, de acordo com o protocolo descrito posteriormente, não tendo a necessidade de *cell sorting* para enriquecimento da população de células para copGFP. As populações foram analisadas por citometria

de fluxo (S3-Biorad) para análise da intensidade de fluorescência de copGFP 48h após lançadas em *Fed-Batch* em microbiorreator (Ambr 15 - Sartorius). O experimento teve duração de 6 dias e as amostras do sobrenadante foram coletadas nos dias 3, 5 e 6 para a quantificação de Pró-Trombina por ELISA, utilizando o Human Total Factor II (Pro-Thrombin) Elisa Kit I (Inovative Research, Inc.).

3.6.1. Análise da expressão de Pró-trombina na presença dos elementos 5'UTR e 3'UTR

3.6.1.1. Construção de plasmídeo contendo 3'UTR e gene referente a Pró-Trombina

Levando em consideração que o plasmídeo Ingresso 1.0 já possui 5'UTR, a próxima etapa foi avaliar se a presença da região 3'UTR resulta em maior aumento desta proteína no sobrenadante da população. Para isso, foi realizada a construção do gene sintético referente ao plasmídeo Sistema Ingresso 2.0 (CMV_5'UTR_IRES_3'UTR (Figura 3.11a) constituído de sítios de enzimas de restrição específicos para alterações de promotor, sequência do gene que codifica para proteína de interesse, marcador de seleção e 3'UTR utilizando o *software* SnapGene. Esse vetor foi produzido pela empresa GeneScript.

Foi realizada a clonagem das sequências copGFP e Pró-trombina, como descrito anteriormente, nessa ordem, para a obtenção dos plasmídeos para teste de expressão do Sistema Ingresso 2.0, resultando no plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR (Figura 3.11b). Como controle de expressão negativa para a sequência 3'UTR, a sequência foi retirada pela digestão com enzimas de restrição específicas para a região (descrito anteriormente) e, as extremidades reparadas utilizando o Anza™ DNA and Repair kit (ThermoFisher Scientific #IVGN2504), seguido pelo protocolo de ligação com T4 DNA ligase e transformação em *E.coli*. As colônias resultantes da reação foram inoculadas para realização de minipreparação de plasmídeo e os respectivos plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição específicas para a região 3'UTR. Foi enviado para sequenciamento o plasmídeo que não liberou fragmento resultante da digestão, sendo considerado o plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR^{noc}.

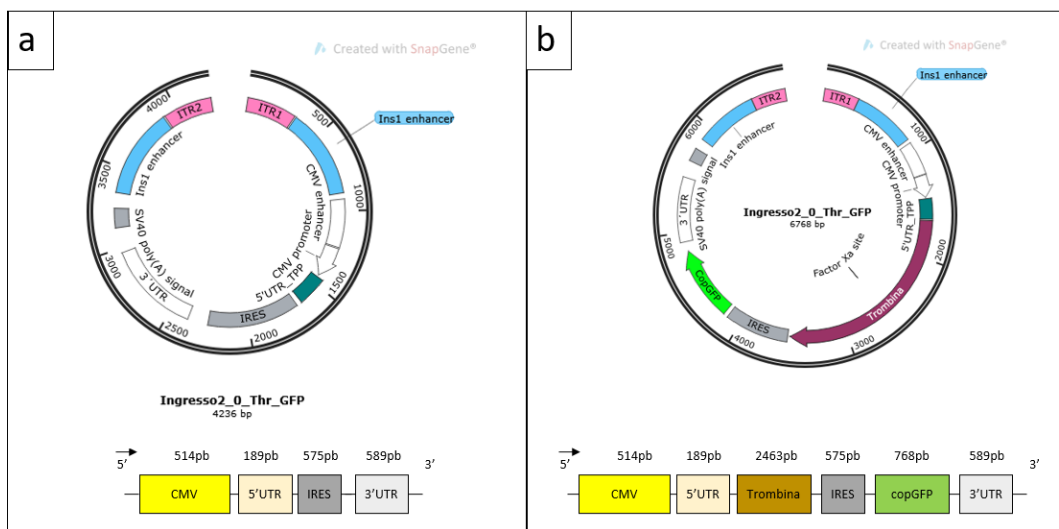


Figura 3.11. Plasmídeos para teste de sequência 3'UTR – Sistema Ingresso 2.0. (a) Plasmídeo CMV_5'UTR_IRES_3'UTR-Genscript. (b) Plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR. **AmpR:** gene que codifica resistência a ampicilina; **CMV Promoter:** Promotor de Citomegalovírus; **5'UTR:** elemento 5'UTR (TPE); **Trombina:** gene que codifica para proteína Pró-trombina.; **IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*; **CoGFP:** gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP, GI: 375332228; **3'UTR:** sequência 3'UTR **SV40 poly(A) signal:** Sinal de poliadenilação. **ITR1 e 2:** sítios de reconhecimento por transposase. **Ins1 e Ins2 enhancer:** Regiões insuladoras.

3.6.2. Análise da expressão de Pró-trombina na presença de *Enhancers*

3.6.2.1. Construção de plasmídeos contendo *Enhancer I* e *Enhancer II*

Além da sequência 3'UTR no Sistema Ingresso 2.0, foram inseridas as sequências escolhidas de *enhancers* de promotor CMV, descritos na literatura (Brown *et al.*, 2015), no cassete de integração. Com isso, testes com dois diferentes *enhancers* de promotor CMV foram realizados para avaliar se há o aumento da expressão do gene referente à proteína terapêutica Pró-Trombina.

A partir do plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR (Figura 3.12b), foram adicionadas as sequências *enhancers* a montante do promotor (CMV). Os plasmídeos utilizados para a transfecção em células ExpiCHO possuem: (I) *Enhancer I*, CMV, 5'UTR, Pró-Trombina, IRES, copGFP e 3'UTR e, (II) *Enhancer II*, CMV, 5'UTR, Pró-Trombina, IRES, copGFP e 3'UTR, conforme apresentado nas Figuras 3.12a/b, respectivamente. Como controle para as análises da quantidade de

Trombina no sobrenadante, foi utilizada a população de células que não possui *enhancers* descrito anteriormente.

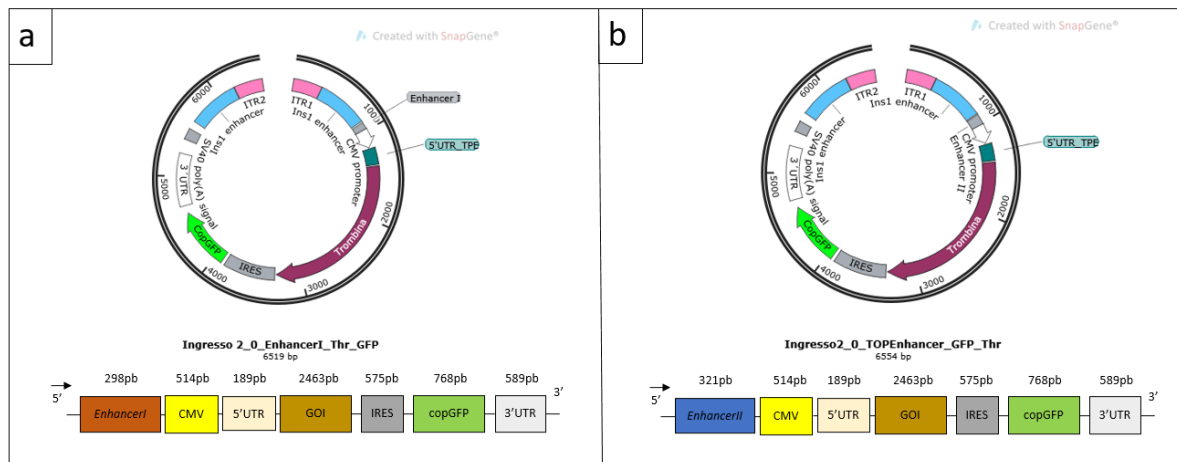


Figura 3.12. Plasmídeos para teste de *Enhancers* – Sistema Ingresso 2.0. (a) Plasmídeo EnhancerI_CMV, 5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR. (b) Plasmídeo EnhancerII_5'UTR_Thr_IRES_copGFP_3'UTR. **AmpR**: gene que codifica resistência a ampicilina; **Enhancer I e Enhancer II**: seqüências de *enhancers* de CMV escolhidas; **CMV Promoter**: Promotor de Citomegalovírus; **5'UTR**: elemento 5'UTR (TPE); **Trombina**: gene que codifica para proteína Pró-trombina.; **IRES**: *Internal Ribosome Entry Site*; **CoGFP**: gene que codifica para proteína fluorescente verde GFP, GI: 375332228); **3'UTR**: seqüência 3'UTR; **SV40 poly(A) signal**: Sinal de poliadenilação. **ITR1 e 2**: sítios de reconhecimento por transposase. **Ins1 e Ins2 enhancer**: Regiões insuladoras.

3.6.2.2. Transfecção de ExpiCHO para análise de expressão transiente

O protocolo de transfecção de ExpiCHO foi adaptado de Rajendra e colaboradores (2017). Foram utilizados 36ug de DNA/ml e 6×10^7 cel/ml para a transfecção. As transfecções foram realizadas em triplicata para cada plasmídeo do Sistema Ingresso 2.0.

As células foram preparadas 4 dias antes da transfecção onde foram repicadas na densidade 5×10^5 /ml com adição de Synthecol (Sigma S5442) na diluição 1:500 e Fatty Acid na diluição de uso de 1:2000 (Sigma F7050). Após 3 dias, as células foram repicadas na densidade 1×10^6 /ml com adição de Synthecol (Sigma S5442) na diluição 1:500 e Fatty Acid na diluição de uso de 1:2000 (Sigma F7050), e foram adicionados os microbiorreatores em Amb15 contendo 8ml de meio Dynamis para checagem de pH, temperatura, quantidade de CO₂ e DO. Para cada transfecção foram utilizadas

6×10^7 células, que foram centrifugadas a 300xg e suspensas em 4ml de meio Dynamis.

A quantidade referente a 36ug de plasmídeos do Sistema Ingresso 2.0 foi precipitada com Etanol 100% e 10% Acetato de sódio 3M pH5.2 por 15 minutos a -80 °C. Após esse período, o DNA foi centrifugado a 13.000xg por 10 minutos, o volume descartado e então suspensos com Etanol 70%. Logo após a adição, foram centrifugados novamente na mesma velocidade e o DNA foi suspenso em 30ul de meio Dynamis. O DNA foi então adicionado a cultura, seguido de adição de PEI (Polysciences, Eppenheim Alemanha - estoque 1mg/ml pH 7.0) na concentração final de 15µg/ml, sob agitação manual.

As culturas foram transferidas para os microbiorreatores que já continham 8ml de Dynamis, com concentração final de 5×10^6 céls/ml. A rotação inicial por 3 horas foi de 400rpm, com aumento gradual de 500rpm, 750 rpm e 900 rpm com intervalo de 3 horas entre elas. A rotação final foi 900rpm.

3.7. Análise Qualitativa

3.7.1. Dot Blot

Para verificar a presença de Pró-Trombina em experimento de *Fed-Batch* em erlenmeyers, foram analisadas as amostras coletadas nos dias 3 e 6. As amostras foram diluídas nas concentrações 1:4 e 0,1:4 em PBS1X+Tampão de Amostra 1X e, para o controle positivo da presença de proteína foi utilizada Human Prothrombin (Bio Conect Life Science cat# HCP-00010) nas diluições de 2µg, 1 µg 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg + 10µL de Tampão de Amostra 1X. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas em membrana utilizando um sistema de 96 poços sob vácuo. Após aplicação, a membrana foi bloqueada com 50mL de Solução de Bloqueio em agitação por 1 hora. Em seguida, o anticorpo *murine Anti-Prothrombin* (Green Mountain Antibodies) foi diluído na concentração 1:100 (v/v) em Solução de Bloqueio e adicionado à membrana. A membrana com o anticorpo primário foi deixada em agitação por 1 hora. Após a incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,01% e incubada com o *goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate* (Invitrogen cat#G21234) na concentração 1:500 diluído em Solução de Bloqueio e incubada sob agitação por 1 hora. Após, a

membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,01% e revelada com solução de revelação Super Signal™ West Pico Plus Chemiluminescent Substrate.

3.8. Análise Quantitativa

3.8.1. Western Blot

Uma outra forma de avaliar a presença e a quantidade das proteínas mCherry e copGFP nas populações contendo dupla fluorescência foi por Western blot. Para isso foi necessária a preparação do extrato de proteínas das duas populações enriquecidas para copGFP. Foram coletadas 6×10^7 células de cada população e então, centrifugadas a 300xg durante 10 minutos e então suspendidas em 400 μ L de PBS1X+Tampão de Amostra de proteínas 1X. Essas amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e acondicionadas à -80°C até a análise.

As amostras foram aplicadas em Precast *protein gels* 7,5% Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-rad) e submetidas a eletroforese por 1 hora a 30 mA. O gel foi submetido à transferência para membrana de nitrocelulose para *western blot* (GE – Life Science), imergindo em tampão de transferência, com a cuba em gelo durante 1 hora a 100V. Após, a membrana foi corada com Ponceau S, durante 10 minutos sob agitação, enxaguado com H₂O 18.2 e as membranas utilizadas para detecção de mCherry e copGFP foram bloqueadas com Solução de Bloqueio sob agitação por 1 hora, já as membranas utilizadas para a detecção de Beta-actina foram bloqueadas com PBS/BSA2% sob agitação por 1 hora, de acordo com o fabricante. Após, a membrana foi lavada com PBS/Tween 0,01% sob agitação por 10 minutos, repetindo 3 vezes o processo.

Para a detecção de mCherry foi utilizado o anticorpo Anti-mCherry [EPR20579 #ab213511), na diluição 1:500 em Solução de Bloqueio. Como normalizador da quantidade de proteína aplicada foi utilizada a proteína Beta-Actina (Torkashvand *et al.*, 2018) utilizando o anticorpo anti-beta Actin [mAbcam 8226 - Loading Control], na diluição 1:1000 em PBS/BSA2%. Ambas as membranas foram submetidas à agitação de 50 rpm com os anticorpos primários anteriormente mencionados durante 1 hora e lavadas com PBS/Tween 0,01% sob agitação por 10 minutos, repetindo 3 vezes o processo.

Após a incubação com anticorpo primário e lavagem das membranas, elas foram incubadas com o anticorpo secundário: para detecção de mCherry e copGFP as membranas foram incubadas com Anticorpo Anti-rabbit IGG (H+L), horseradish peroxidase [G21234] – Invitrogen e para detecção de Beta-actina as membranas foram incubadas com Anticorpo Anti-mouse IGG Peroxidase produzido em coelho [A9044] – Sigma-Aldrich. Ambas as membranas foram submetidas à agitação de 50 rpm com seus respectivos anticorpos secundários durante 1 hora e lavadas com PBS/Tween 0,01% sob agitação por 10 minutos, repetindo 3 vezes o processo. A revelação foi realizada utilizando a solução de revelação Super Signal™ West Pico Plus Chemiluminescent Substrate.

3.8.2. ELISA

Para quantificar a Pró-Trombina em sobrenadante das culturas de *Fed-Batch*, foram coletadas amostras no tempo 3, 5 e 6 para Erlenmeyer e nos tempos 3, 5, 6, 12 e 14 para microbiorreator. As análises foram realizadas em triplicata técnica, repetições de medidas das mesmas amostras, utilizando o Human Total Factor II (Prothrombin) ELISA Kit (Innovative Research, Inc.) seguindo o protocolo da fabricante. O protocolo foi realizado em temperatura ambiente, e cada etapa de agitação foi realizada à 300rpm.

O preparo da curva padrão foi realizado nas concentrações 100ng/mL, 75ng/mL, 50ng/ml, 37,5ng/ml, 25ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1ng/ml, 0,5ng/ml, 0,25ng/ml, 0ng/ml conforme apresentado na Tabela 3.5. As amostras dos clones em *Fed-Batch* e populações estáveis foram diluídas nas proporções 1:100, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:50.000, 1:100.000 (v/v). As amostras das populações de expressão transientes em *Fed-Batch* foram diluídas nas proporções 1:100, 1:500, 1:2500 (v:v).

Tabela 3.5. Concentrações de Pró-trombina para curva de ELISA: quantificação do título em sobrenadantes de culturas em *Fed-batch*, utilizando Kit Human Total Factor II (Prothrombin) ELISA Kit (Innovative Research, Inc.).

Concentração de pró-trombina (ng/mL)	Diluições (BB + Padrão)
100	900uL + 100uL (vial)
75	100uL (100ng/uL) + 100uL (50ng/uL)
50	500uL + 500uL (100ng/uL)
37,5	100uL (50ng/uL) + 100uL (25ng/uL)
25	500uL + 500uL (50ng/uL)
10	600uL + 400uL (25ng/uL)
5	500uL + 500uL (10ng/uL)
2,5	500uL + 500uL (5ng/uL)
1	600uL + 400uL (1ng/mL)
0,5	500uL + 500uL (1ng/uL)
0,25	500uL + 500uL (0,5ng/uL)
0	500uL

BB: *Blocked Buffer* (Tampão de bloqueio)

3.9. Contagem de células e viabilidade

Para o acompanhamento do crescimento e viabilidade, cálculos de transfecção, *cell sorting*, análise por microscopia de fluorescência e cultivos anteriormente descritos, foram realizadas coletas de 10µL das culturas e, diluídas em Trypan Blue (Sigma-Aldrich) na proporção 1:1 (v/v) para contagem, utilizando o equipamento Luna-FL Dual Fluorescence Cell Conter (Logos Biosystems). Ao utilizar o corante para a contagem celular, as células com a membrana celular íntegra não são coradas sendo consideradas células viáveis. As células coradas são consideradas células inviáveis devido a membrana estar danificada o suficiente para que o corante atravessasse a sua membrana.

3.10. Produtividade específica - Análise de qP

O cálculo para analisar a produtividade específica da cultura (qP) foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Aghdam e colaboradores (2019), onde o valor foi expresso em picogramas por célula por dia, utilizando a seguinte fórmula:

$$qP \text{ (pg/cell/dia)} = \left(\frac{T2 - T1}{d2 - d1} \right) \times \text{daily growth rate}$$

Onde:

$$DGR \text{ (daily growth rate)} = \left(\frac{\ln(d2) - \ln(d1)}{t2 - t1} \right) / 24$$

T = Título

d = densidade celular

t = tempo em horas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sistema Ingresso 1.0

4.1.1. Análise de quantidade de mCherry produzida na presença de 5'UTR

A análise do aumento da produção da proteína de interesse mCherry no Sistema Ingresso 1.0 foi realizada em comparação ao Sistema Ingresso original, que não possui a sequência 5'UTR (TPE) a *montante* ao gene de interesse no cassete de integração em células ExpiCHO. Para isso foram obtidas populações com dupla fluorescência (mCherry e copGFP) com vetores do Sistema Ingresso (sequência 5'UTR ausente) e do Sistema Ingresso 1.0 (sequência 5'UTR presente). O enriquecimento das populações de células transfectantes foi realizado por 3 ciclos de *cell sortings* para o marcador de seleção copGFP, com posterior análise da expressão de mCherry por citometria de fluxo e *Western blot*.

Após a compensação automática das fluorescências entre os canais FL1 (para copGFP) e FL3 (para mCherry), realizada no próprio *software* ProSort do equipamento S3-Biorad), foi observada diferença entre as fluorescências de mCherry obtidas para populações do Sistema Ingresso e Sistema Ingresso 1.0, conforme apresentado na Figura 4.1a.

De acordo com os resultados obtidos, foi observada a relação entre as fluorescências para as duas populações:

- Sistema Ingresso (5'UTR ausente): 0,43% mCherry+ e 90,2% copGFP+.
- Sistema Ingresso 1.0 (5'UTR presente): 86,7% mCherry+ e 78,2% copGFP+.

Embora tenha sido observado uma pequena diminuição de fluorescência de copGFP na população do Sistema Ingresso 1.0, provavelmente pela compensação entre as fluorescências, foi observado um aumento significativo de fluorescência de mCherry na população do Sistema Ingresso 1.0. Uma outra forma de avaliar a quantidade de mCherry nas duas populações foi através de *Western blot*, utilizando Beta-Actina como controle de quantidade aplicada por canal de gel SDS-Page Os resultados podem ser observados na Figura 4.1b.

Não foi possível obter a análise da quantidade de copGFP por *western blot* pois o anticorpo não foi promissor, porém foi observado um aumento aproximado de 8 vezes da quantidade de mCherry na população do Sistema Ingresso 1.0 em relação ao Sistema Ingresso. Esses resultados confirmam os dados obtidos por citometria de fluxo, sendo promissor o uso da sequência 5'UTR na expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos no Sistema Ingresso 1.0.

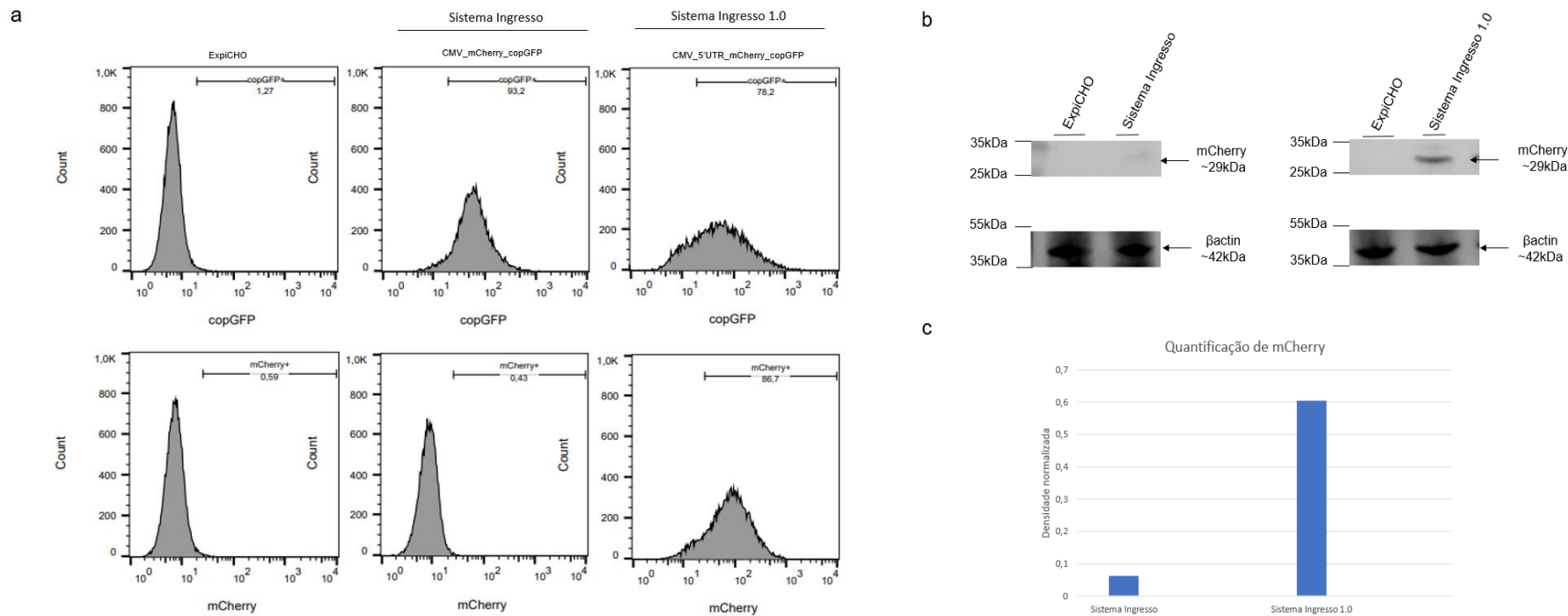


Figura 4.1. Avaliação da expressão de mCherry em células CHO utilizando sequência 5'UTR. (a) Análise de intensidade de fluorescência de populações enriquecidas por citometria de fluxo após transfecção com plasmídeo Sistema Ingresso (ausência de 5'UTR) e Sistema Ingresso 1.0 (presença de 5'UTR) para avaliação da influência da sequência 5'UTR na expressão do gene que codifica para a proteína de interesse através do histograma da intensidade de fluorescência em citometria de fluxo. **(b)** Análise quantitativa de mCherry para avaliação da influência da sequência 5'UTR. Para cada canal foi aplicado o extrato celular referente a 3×10^6 células para detecção de: mCherry, proteína de interesse; Beta-actina, controle de quantidade de proteína aplicada. **(c)** quantificação de proteína mCherry através da densidade normalizada obtida pela divisão da densidade integrada de mCherry pela densidade integrada de Beta-Actina nas populações do Sistema Ingresso e Ingresso 1.0.

As regiões 5'UTRs são sequências que podem apresentar estruturas secundárias de RNAs (RGEs – *RNA Regulation elements*) (Eisenhut *et al.*, 2020) de grande impacto na tradução de mRNAs (Barrett *et al.*, 2012) e, quando suas estruturas são alteradas, influenciam diretamente na expressão do gene localizado a *jusante* da sequência (Dominguéz *et al.*, 1998). Essas sequências podem ser próprias de células eucarióticas que são normalmente ativadas por *stress* celular para a tradução de mRNAs referentes à fatores apoptóticos (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2013; Sherril e Lloyd, 2008) ou, podem ter origem viral com a função de auxiliar na replicação do vírus utilizando a maquinaria da célula hospedeira (Rohll *et al.*, 1994). Conforme apresentado por Li e colaboradores (2019), há três diferentes mecanismos utilizados baseando-se em sequências 5'UTRs para a tradução de mRNAs virais independentes de capeamento 5': *Internal Ribosome Entry Site* – IRES, *-1 Programmed Ribosome Frameshifting* (-1 PRF) e o *Ribosome Shunting*. Dentre os três mecanismos mencionados, o *Ribosome Shunting* é descrito como o mecanismo utilizado na infecção por adenovírus em células de mamíferos (Yueh e Schneider, 1996), onde a tradução do mRNA se baseia no reconhecimento da subunidade 40S do ribossomo à região específica, variando de acordo com a sequência 5'UTR, e salta para a região de recebimento, onde reconhece a sequência AUG iniciadora da tradução (Li, 2019). Essa característica promove o aumento da tradução de mRNAs relacionados à fase tardia da infecção viral (Logan e Shenk, 1984; Ramke *et al.*, 2017).

Assim como as sequências 5'UTRs endógenas podem ser utilizadas para aumentar a expressão de proteínas específicas terapêuticas na própria célula (Asrani *et al.*, 2018), as sequências 5'UTRs virais também podem ser utilizadas para aumentar os níveis de produção de proteínas terapêuticas específicas. Mariati e colaboradores (2010) mostraram que a sequência 5'UTR de adenovírus aumenta mais de 2 vezes a expressão da proteína heteróloga em células CHO, sendo que esse aumento da produção foi confirmado com o resultado apresentado pelo nosso trabalho. Ao avaliar o proteoma das células CHO caracterizadas por alta expressão da produção de proteínas terapêuticas, Yee e colaboradores (2009) observaram que essas populações apresentam baixa expressão de proteínas ribossomais, com exceção das proteínas Rps25 e Rps27 que apresentaram aumento da expressão. Ambas estão presentes na subunidade 40S do ribossomo, subunidade de extrema importância para a tradução mediada por 5'UTR, visto que a sequência 5'UTR de adenovírus é dependente da proteína Rps25 para executar a sua função (Hertz *et al.*, 2013). Essa

característica é resultante de um *stress* celular induzido pela diminuição de temperatura no cultivo celular, técnica habitualmente utilizada para induzir o aumento da expressão das proteínas heterólogas (Kaufmann *et al.*, 1998).

Visto que os níveis de expressão das proteínas próprias das células são diferentes em populações de baixa e alta produção de proteínas heterólogas, tanto no início do como no final do cultivo (Huang e Yoo, 2020), faz-se necessário o acompanhamento de diferentes etapas do cultivo para compreender o comportamento celular durante a expressão de proteínas terapêuticas. Após avaliação, é possível delinear as futuras análises para o aumento dos níveis de expressão do Sistema Ingresso 1.0 utilizando mecanismos da regulação da expressão gênica relacionados a 5'UTR incorporada. A análise futura da expressão de Rps25 pode ser realizada para confirmar se há relação com o aumento da expressão da proteína de interesse com adição da sequência 5'UTR TPE no cassete de integração ou, se a superexpressão dessa proteína ribossomal pode ocasionar diretamente no aumento da expressão de proteínas heterólogas de interesse. Outra alternativa seria utilizar outra característica funcional presente na fase tardia da infecção por adenovírus, a expressão da proteína 100k, pois a fosforilação das tirosinas 365 e 682 da sua estrutura, redireciona os ribossomos para a tradução de mRNAs contendo a sequência 5'UTR do próprio vírus (Xi *et al.*, 2005). Esse mecanismo é uma ótima oportunidade para desenvolvimento de sistemas de expressão regulado para aumento de produção de proteínas terapêuticas; perspectiva essa de desenvolvimento já em implementação pelo grupo do IBMP.

Vale ressaltar que o aumento da expressão da proteína terapêutica de interesse pode variar de acordo com a linhagem celular utilizada e com a proteína de interesse produzida, consonante com a grande complexidade que envolve a regulação da expressão gênica (Mariati *et al.*, 2010).

4.1.2. Análise de quantidade de proteína Pró-trombina produzida na presença de 5'UTR

A próxima etapa foi substituir o gene que codifica para a proteína mCherry pelo gene que codifica para Pró-trombina, uma proteína terapêutica de interesse no grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP, para avaliar o potencial de aplicação em

uma plataforma de produção de proteínas terapêuticas utilizando o Sistema Ingresso 1.0.

Foram obtidas anteriormente pelo grupo populações para o Sistema Ingresso e Ingresso 1.0, utilizando os respectivos plasmídeos (Figura 16a e 16b) e os enriquecimentos foram realizados através de 3 ciclos de *cell sorting* para copGFP. Após a obtenção das populações, foi realizado um último enriquecimento para copGFP, selecionando as células que apresentassem alto grau de fluorescência (5% mais fluorescentes), com o intuito de selecionar populações altamente produtoras para Pró-Trombina. A relação entre fluorescência e quantidade de Pró-Trombina foi posteriormente realizada neste trabalho e será discutida adiante.

Foi realizada a quantificação da proteína Pró-Trombina em sobrenadantes dessas culturas após 6 dias de cultivo celular em Erlenmeyers. A Figura 4.2 mostra que a quantidade de Pró-Trombina produzida pelas populações (3 e 4) do Sistema Ingresso 1.0 apresentou um aumento de aproximadamente 3 vezes em relação às populações controle, ambas enriquecidas para copGFP (CTL e Pop Sistema Ingresso).

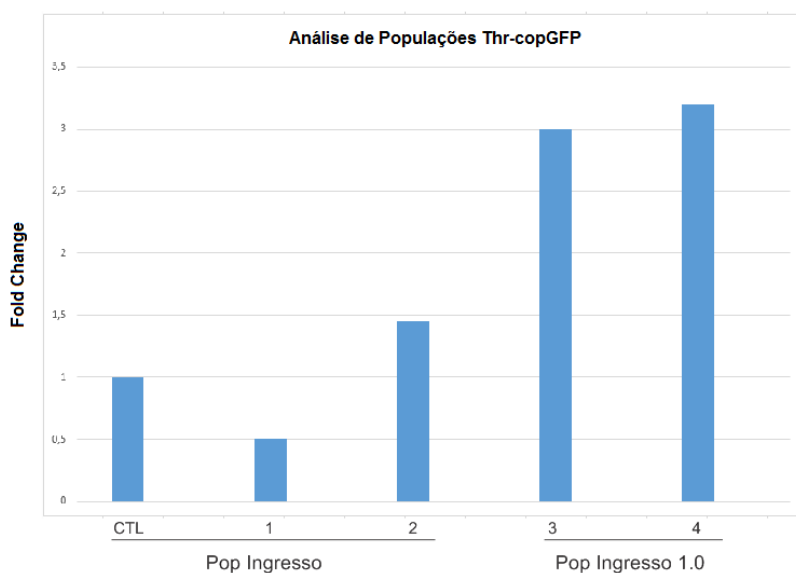


Figura 4.2. Análise da quantidade de Pró-Trombina entre as populações obtidas para Sistema Ingresso e Sistema Ingresso 1.0 enriquecidas para copGFP. Após o terceiro *cell sorting*, as células que apresentaram maior grau de fluorescência de copGFP (em torno de 5% da população) foram selecionadas, gerando populações altamente enriquecidas (quarto *cell sorting*). CTL: População Sistema Ingresso obtida após enriquecimento de copGFP por 3 ciclos de *cell sorting*. **1 e 2.** Populações

Sistema Ingresso altamente enriquecidas para copGFP - quarto *cell sorting*. **3 e 4.** Populações Sistema Ingresso 1.0 (presença de 5'UTR TPE) altamente enriquecidas para copGFP - quarto *cell sorting*.

Foi observado um aumento da quantidade de Pró-trombina nas populações de células transfectadas com vetores do Sistema Ingresso 1.0, quando comparado ao Sistema Ingresso, porém os títulos (analisados por ELISA – Figura 22) foram bem próximos aos estudos de Greene e colaboradores (2020), onde nas mesmas condições de volume e tempo de cultivo, foi possível alcançar ~0,2g/L da proteína terapêutica recombinante. Com o objetivo de verificar possíveis células altamente produtoras dentro desta população enriquecida, foi realizada a clonagem celular da população 4 (Figura 4.2) do Sistema Ingresso 1.0.

4.1.3. Análise de quantidade de proteína Pró-trombina produzida por clones de células provenientes de população Sistema Ingresso 1.0

Os clones celulares provenientes do Sistema Ingresso 1.0. foram obtidos pelo grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP através do isolamento de células únicas da população obtida através da transfecção com plasmídeo referente ao Sistema Ingresso 1.0. As células individuais foram dispensadas em meio semisólido para o crescimento e análise posterior da quantidade de Pró-Trombina produzida. Foram obtidos em torno de 48 clones e desses, foram descongelados 19 clones para a realização deste trabalho. Os clones restantes serão analisados posteriormente.

Em uma primeira análise realizada pelo grupo de Desenvolvimento Tecnológico do IBMP (dados não apresentados) de apenas 5 clones, foi identificado dois clones que apresentaram maior e menor título final de Pró-trombina em *Fed-batch* em cultivo em erlenmeyers, com 0,26g/L e 0,024g/L, sendo eles os clones #5 e #3, respectivamente. O clone de maior produção em erlenmeyer, o clone #5, foi posteriormente cultivado em Biorreator de 5L, atingindo aproximadamente 0,46g/L após 14 dias de produção. A partir desses resultados, esses clones foram utilizados neste projeto como referência interna de um clone com maior e menor produção de Pró-trombina. Assim, foram realizadas comparações de títulos e comportamento celular com o objetivo de encontrar padrões de clones com alta produção.

Após 48 horas do início do experimento de *Fed-Batch*, a fluorescência dos clones foi analisada por microscopia de fluorescência (Operetta). De acordo com as imagens capturadas de alguns clones escolhidos foram observadas diferenças na quantidade de fluorescência emitida quando comparadas com a população Sistema Ingresso 1.0 e entre eles (Figuras 4.3 e 4.4). A média dessa intensidade de fluorescência foi calculada para identificação dessa diferença na intensidade emitida e para a análise de correlação com o título final de Pró-trombina que será discutida adiante.

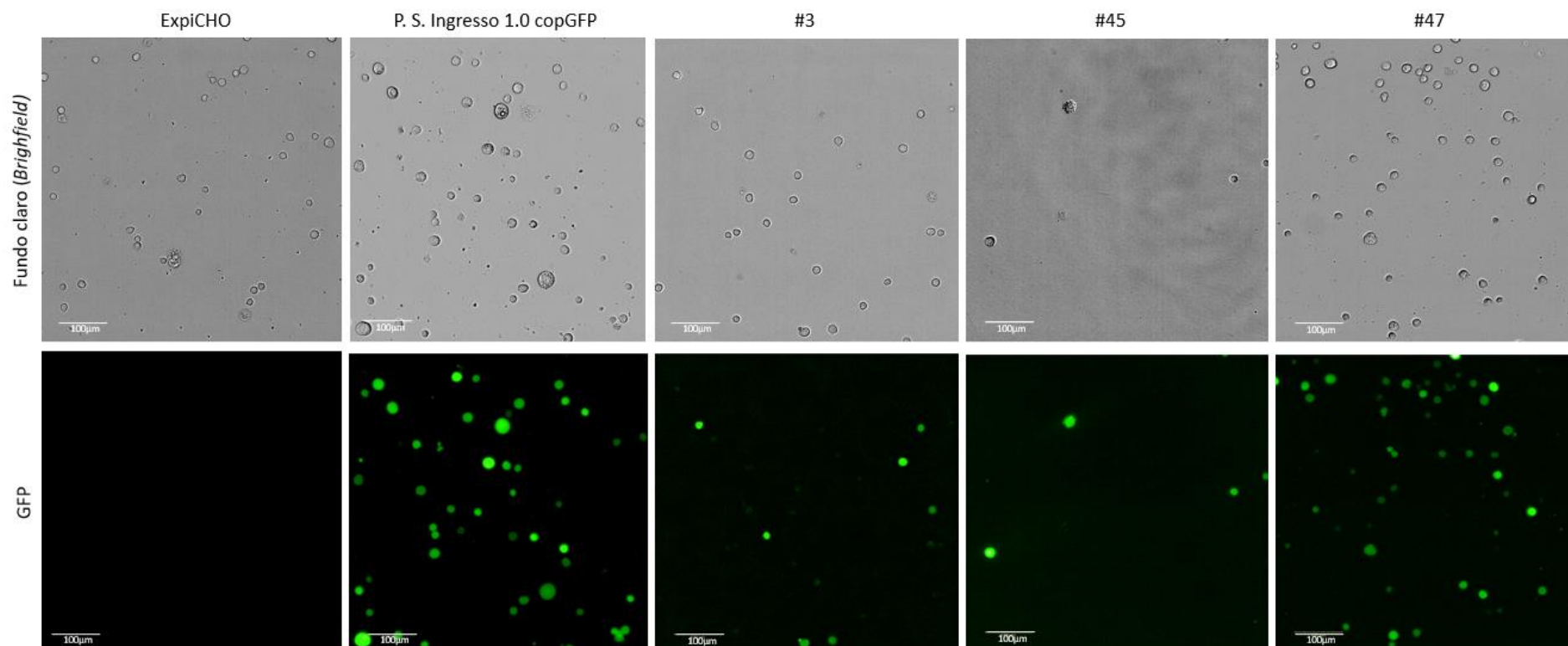


Figura 4.3. Análise de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina por microscopia de fluorescência - baixa intensidade de fluorescência. Imagens capturadas por microscopia de fluorescência (Operetta – Perkin Elmer) para avaliação da intensidade de fluorescência emitida de População Sistema Ingresso 1.0 copGFP e clones Sistema Ingresso 1.0. Clones e populações utilizadas para *Fed-batch* em erlenmeyers e produção de Pró-trombina. Os clones #3, #45 e #47, apresentaram baixa fluorescência emitida quando comparado com fluorescência emitida pela população parental Sistema Ingresso 1.0. O tempo de exposição e potência da fonte luminosa foi o mesmo para todas as imagens; além disso, o brilho e contraste digital também estão na mesma intensidade em todas as imagens representativas, de maneira a permitir a visualização comparativa dos níveis de fluorescência.

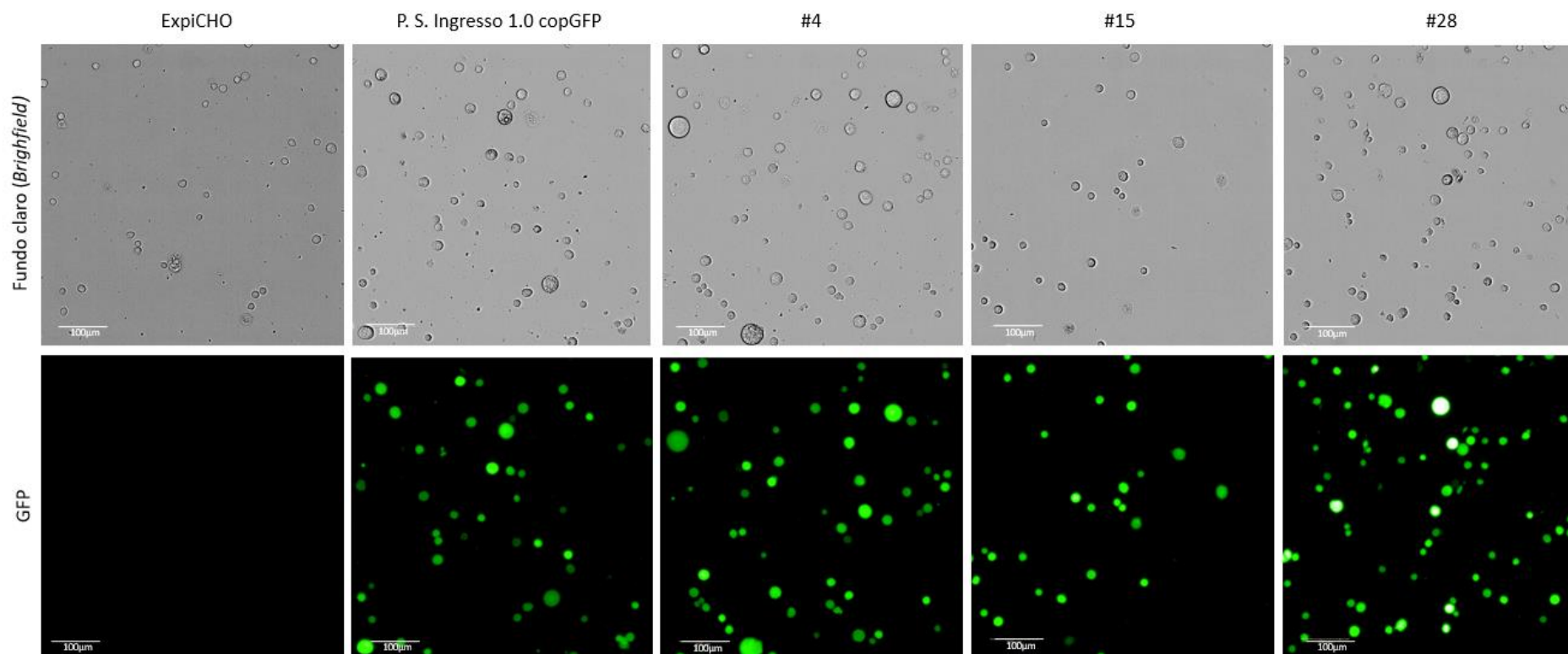


Figura 4.4. Análise de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina por microscopia de fluorescência - alta intensidade de fluorescência. Imagens capturadas por microscopia de fluorescência (Operetta – Perkin Elmer) para avaliação da intensidade de fluorescência emitida de População Sistema Ingresso 1.0 copGFP e clones Sistema Ingresso 1.0. Clones e populações utilizadas para *Fed-batch* em erlenmeyers e produção de Pró-trombina. Os clones #28, #4 e #15, apresentaram fluorescência maior (#28) ou similar (#4 e #15) emitida quando comparado com fluorescência emitida pela população Sistema Ingresso 1.0. O tempo de exposição e potência da fonte luminosa foi o mesmo para todas as imagens; além disso, o brilho e contraste digital também estão na mesma intensidade em todas as imagens representativas.

Para a avaliação da presença de Pró-trombina em sobrenadantes de culturas de células do Sistema Ingresso 1.0 foi realizado o primeiro experimento por *Fed-batch* em Erlenmeyers por 6 dias, sendo a análise por *Dot Blot* realizada apenas no último dia de cultivo. De acordo com a Figura 4.5, os clones celulares #4B, #4, #28 e #15 se mostraram promissores na produção de Pró-trombina quando comparados com os níveis de detecção de proteína da população Ingresso 1.0.

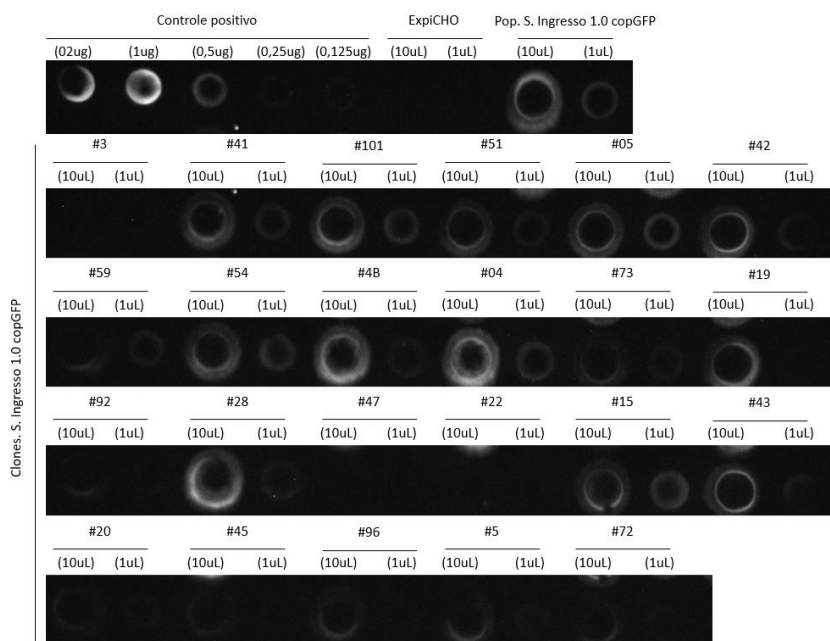


Figura 4.5. Análise qualitativa da presença de Pró-trombina em sobrenadante de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 para Pró-trombina – *Fed-batch* em erlenmeyers – *Dot Blot*. Análise qualitativa de Pró-trombina utilizando murine Anti-Prothrombin (Green Mountain Antibodies) em sobrenadantes do cultivo de população e clones produtores de Pró-trombina após 6 dias de cultivo em erlenmeyers sob retroalimentação com *feed*. Controle positivo: *Human Pro-thrombin* HTJ 1µg/µL [HCP0010] – Haematologic Technologies. Controle negativo: sobrenadante do cultivo de células ExpiCHO. Para melhor resolução da detecção, foram aplicadas 10uL e 1uL do sobrenadante de cada cultura.

Após a confirmação da presença de Pró-Trombina no sobrenadante dos clones, a quantidade de proteína no sobrenadante foi analisada nos dias 3 e 6 deste experimento. A quantificação foi obtida por ELISA para a análise de título entre os clones e a população, como pode ser observado na Figura 4.6.

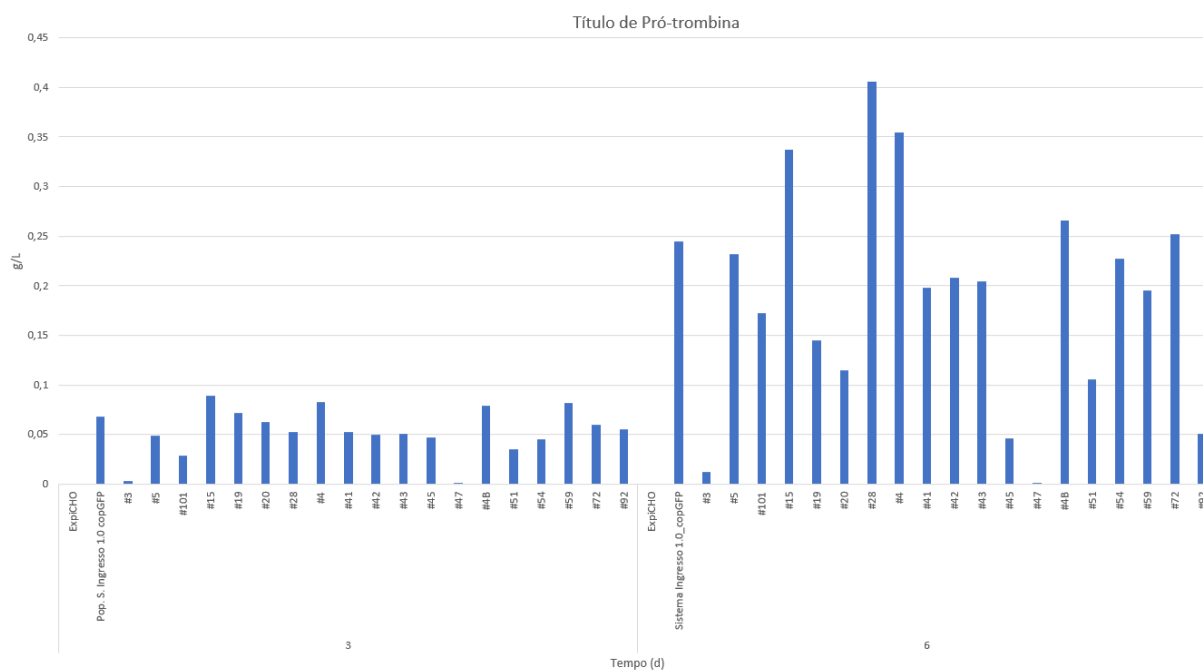


Figura 4.6. Análise quantitativa de Pró-trombina em sobrenadante de culturas de células provenientes de população e linhagens clonais do Sistema Ingresso 1.0 – Fed-batch em erlenmeyers – ELISA. Análise quantitativa de Pró-trombina após 3 e 6 dias de cultivo em erlenmeyers sob retroalimentação com *feed*. Controle positivo: Pró-trombina Human Total Factor II (Prothrombin) ELISA Kit (Innovative Research, Inc.). Controle negativo: sobrenadante do cultivo de células ExpCHO.

Corroborando com o observado no resultado de *Dot Blot*, os clones #15, #28, #4 e #4B apresentaram títulos finais de Pró-trombina maiores em relação aos demais clones e da população do Sistema Ingresso 1.0. Através da análise quantitativa por ELISA, o #28 se destacou com título de Pró-trombina aproximado de 0,4g/L após 6 dias de cultivo. O #5, clone previamente considerado maior produtor e já utilizado para produção em biorreator de 5L, apresentou valores menores que os clones mencionados, apresentando entre 0,2 e 0,25g/L de Pró-trombina nesse mesmo período. Esse resultado mostrou que foi possível identificar clones produtores de proteína recombinante após *screening* celular.

Devido ao método de seleção dos clones ser baseado na intensidade de fluorescência emitida, foi analisada a relação entre intensidade de fluorescência de copGFP apresentada no dia 2 do cultivo (visto que ao analisar no início do processo estaríamos evitando a quantificação do possível acúmulo de GFP durante o crescimento celular) e a quantidade de Pró-Trombina no dia 6 do experimento, último

dia de cultivo, pois o acúmulo gerado da proteína de interesse é o objetivo principal no processo de produção.

Como apresentado na Figura 4.7a, foi possível observar a relação entre a menor taxa de emissão de fluorescência e título nos clones #3, e #47. Já nos clones #15, #28 e #4, que apresentaram taxa de emissão acima de 12000 AU, foi observado maior título (entre 0,35 e 0,4 g/L). As exceções encontradas para essa correlação foram a população Ingresso 1.0, com taxa de emissão similar ao #15, mas de título aproximado de 0,25g/L e, o #4B com taxa de emissão acima de 12.000 AU e título aproximado de 0,25g/L.

Embora tenham sido observadas essas exceções, existe uma correlação entre a intensidade de emissão de fluorescência e o título final da proteína (Figura 4.7b), podendo a fluorescência ser um bom indicador na busca de clones com títulos maiores.

Pôde-se observar que houve diferenças de comportamento celular tanto na expressão do marcador de seleção, onde os clones obtiveram tanto diferentes níveis de AU (*Arbitrary Unit Fluorescence*) para copGFP quanto na viabilidade celular, influenciando no crescimento ao longo do tempo, bem como nas concentrações no título final de Pró-trombina, tanto no dia 3 quanto no dia 6.

O crescimento (Figura 4.8a) e viabilidade celular (Figura 4.8b) foram acompanhados diariamente. Foi possível observar que mesmo provenientes de uma mesma população, houve diferenças não só na intensidade de copGFP, mas também no crescimento celular. Esses resultados mostram que mesmo os clones provenientes de uma mesma população possuem capacidades produtivas diferentes, justificando a necessidade de estudos para a seleção do clone que apresente característica de maior capacidade produtora da proteína de interesse.

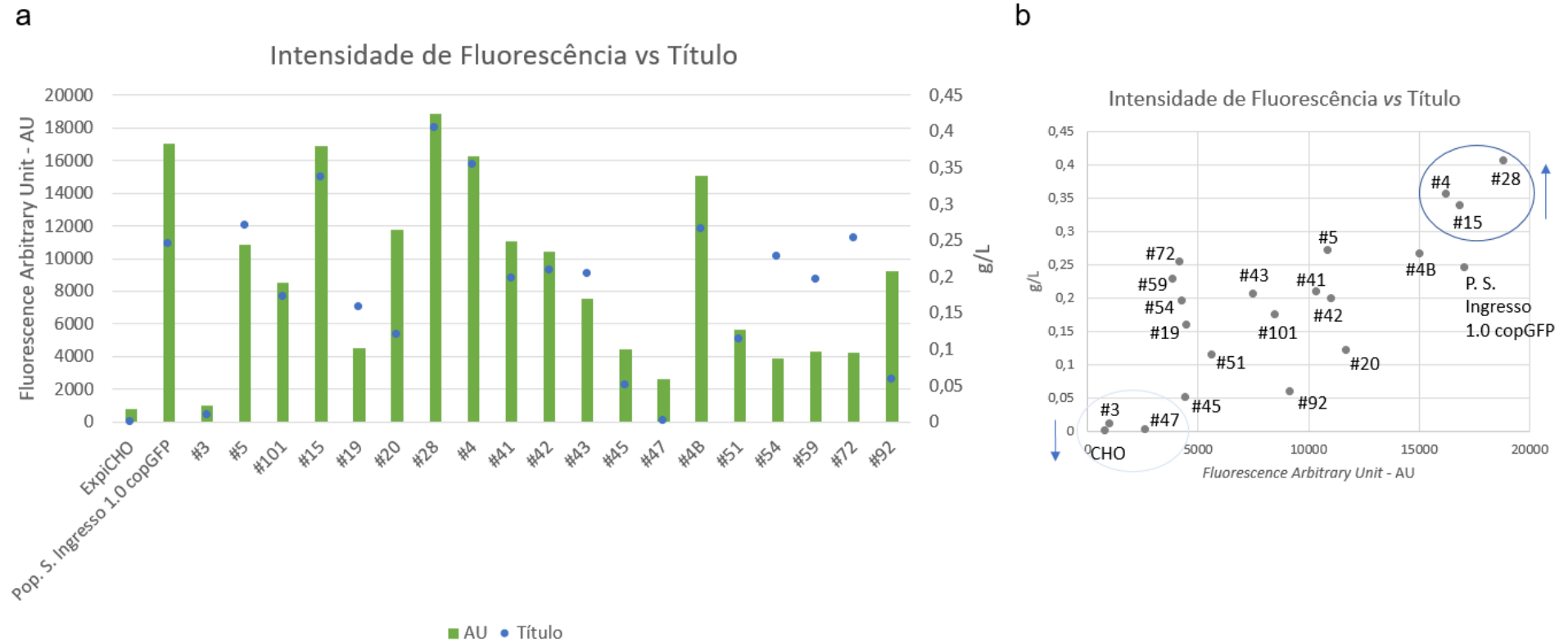
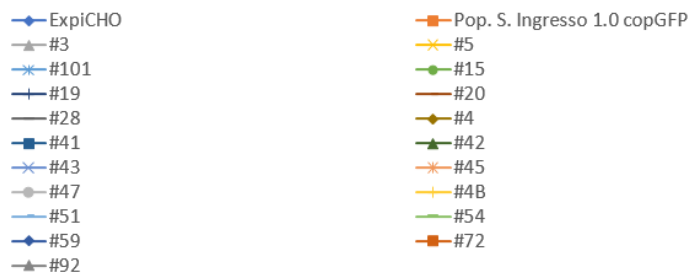
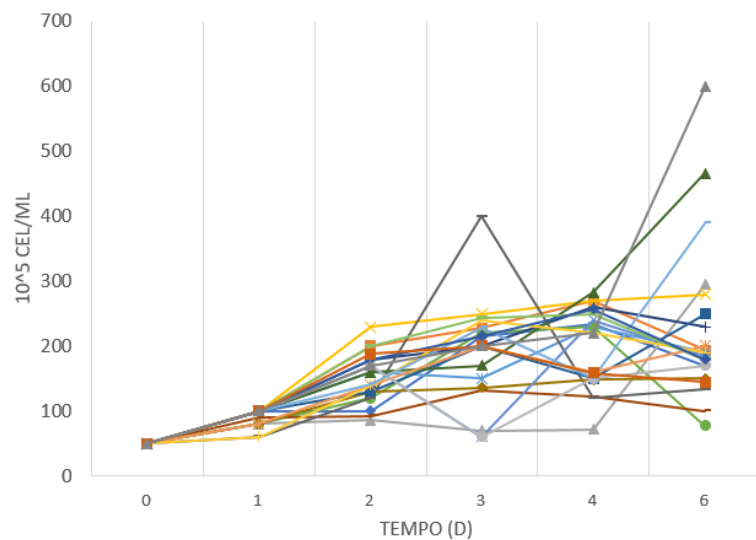


Figura 4.7. Análise de produção de Pró-trombina e intensidade de fluorescência – Fed-batch em erlenmeyers. (a) Intensidade de fluorescência registrado por microscopia de fluorescência (barras verdes) (dia 2) e, título final (dia 6) de Pró-trombina identificado por ELISA (pontos azuis). **(b)** Correlação da intensidade de fluorescência (*Fluorescence Arbitrary Unit* - AU) e título final de Pró-trombina (g/L).

a

DENSIDADE CELULAR



b

VIABILIDADE CELULAR

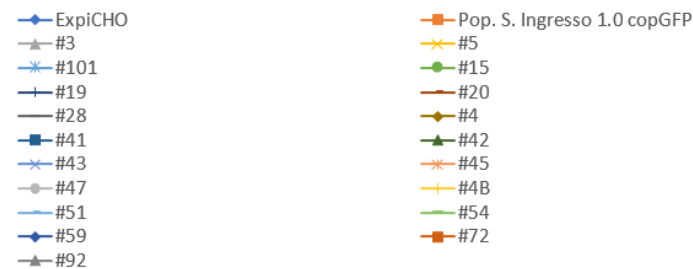
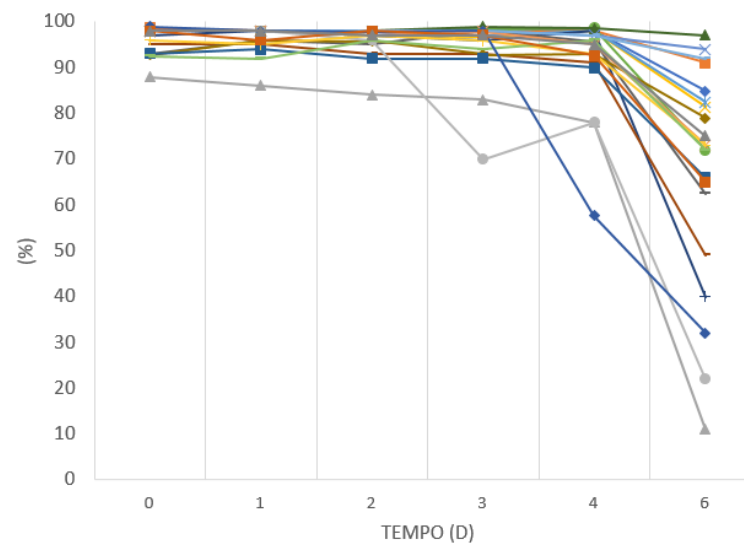


Figura 4.8. Crescimento e viabilidade celular de população e clones do Sistema Ingresso 1.0 em *Fed-batch* em erlenmeyers. (a) densidade celular e (b) viabilidade celular de clones em *Fed-batch* em erlenmeyers durante 6 dias de cultivo para a produção de Pró-trombina. Densidade inicial de 50×10^5 cel/mL para avaliação de crescimento e produção da proteína de interesse.

Dentro de uma mesma população de células produtoras de proteínas recombinantes são encontradas diferentes características no comportamento dos clones selecionados como a viabilidade, o crescimento celular e a produção da proteína de interesse (Gupta *et al.*, 2017) podendo alcançar níveis de expressão acima da própria população utilizada para clonagem (Hu *et al.*, 2017). Mesmo utilizando uma mesma metodologia de seleção e linhagem celular, o tempo necessário para obter o clone produtor e os títulos finais de produção são variáveis para cada proteína terapêutica produzida (Brezinsky *et al.*, 2003). Essas diferenças na estabilidade do comportamento de populações provindas de uma mesma transfecção, podem ser justificadas pela diferença na quantidade de cópias do gene transfectante presentes nas populações avaliadas e, além disso, os clones provenientes da mesma população podem apresentar diferenças na estabilidade de expressão que pode ser justificado pelos diferentes níveis de metilação encontrados em seu gene de interesse (Patel *et al.*, 2018). Com isso, surge a necessidade de avaliar o comportamento genômico de cada população utilizada e seus respectivos clones, porém, este trabalho se baseou apenas nas análises de produtos provindos dos cultivos em *Fed-batch*, deixando a análise genômica de loci de transposição para trabalhos futuros.

Ao analisar os clones com menor título final de Pró-trombina e intensidade de fluorescência, clones #3 e #47, foi possível observar que estes apresentaram decaimento de viabilidade celular (Figura 4.9a) já no início do cultivo, dia 2, sendo que o #3 já inicia o *Fed-batch* em erlenmeyers com taxa de viabilidade menor que 90% e, no dia 4, a viabilidade chega a alcançar valores próximos de 20% apenas. Já os clones com maior título final de Pró-tombina e intensidade de fluorescência, clones #4, #28 e #15, apresentaram viabilidade menor que 90% apenas a partir do dia 4 (Figura 4.9b), tendo um comportamento semelhante à ExpiCHO. Com isso pode-se destacar a importância da viabilidade e crescimento dos clones durante um experimento de cultivo em *Fed-batch*. Esses resultados podem ser observados na Figura 4.9 (a e b).

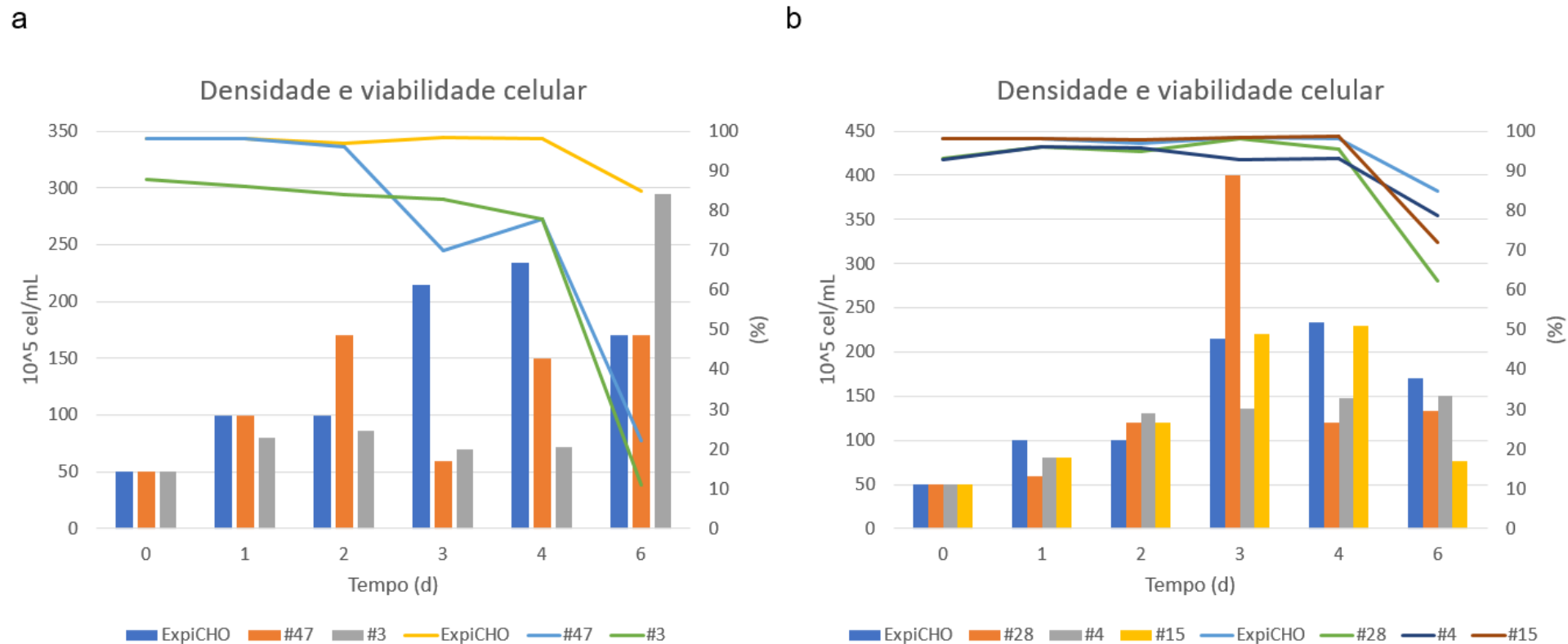


Figura 4.9. Crescimento e viabilidade celular de populações e clones de alta produção e baixa produção de Pró-trombina em *Fed-batch* em erlenmeyers – Sistema Ingresso 1.0. Densidade celular (barras) e viabilidade celular (linhas, em porcentagem) registrados no decorrer do tempo de cultivo em *Fed-batch* em erlenmeyers dos clones que apresentaram **(a)** menor título final de Pró-trombina e, **(b)** maior título de Pró-trombina. As células ExpiCHO (barras e linhas pontilhadas) foram utilizadas como controle ideal de crescimento e viabilidade celular.

4.1.4. Análise de expressão de Pró-trombina em clones do Sistema Ingresso 1.0 – Microbiorreator

Levando em consideração que o cultivo em *Fed-batch* em erlenmeyers permitiu o *screening* inicial de clones produtores de Pró-Trombina, a próxima etapa foi analisar os mesmos clones em cultivo *Fed-Batch* em microbiorreatores Ambr15 com o objetivo de checar crescimento, viabilidade celular e quantidade de proteína produzida pelos clones. Esse sistema permite controle automatizado de gases como O₂ e CO₂, bem como controle de pH em tempo real. Embora seja também possível a análise de metabólitos em tempo real nesse equipamento, até o presente estudo este equipamento não havia sido instalado.

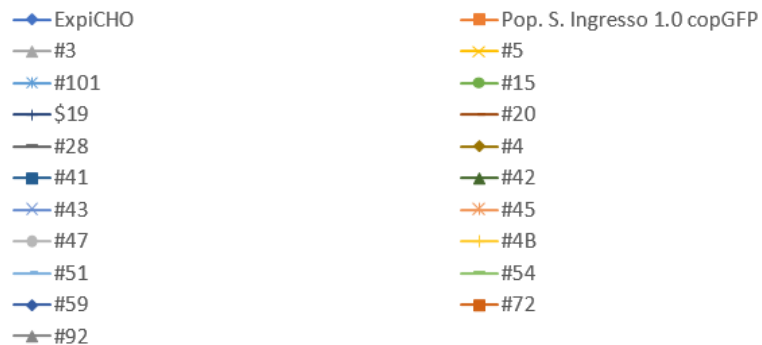
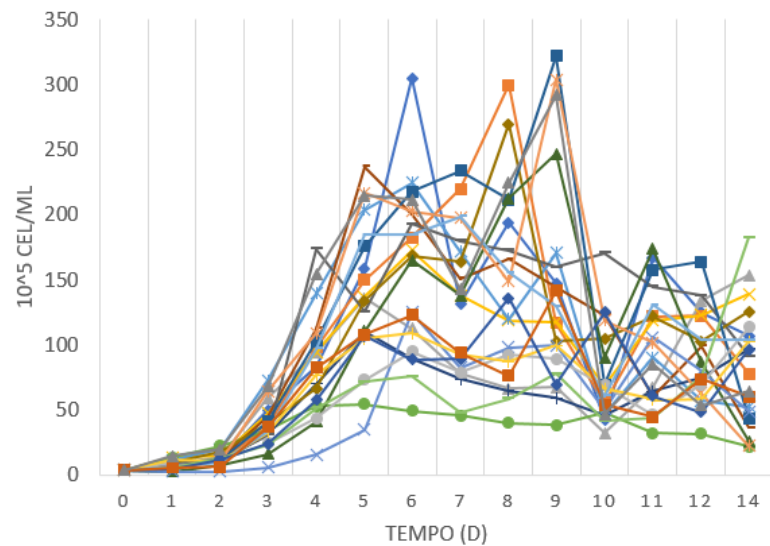
O *Fed-batch* em microbiorreatores foi realizado com os padrões similares ao experimento em erlenmeyers em relação a temperatura, ajustes de glicose e pH, porém com diferenças de volume, agitação, tempo de cultivo, bem como realizado em microbiorreatores de uso único. O experimento foi finalizado apenas quando os clones apresentaram baixas taxas de viabilidade celular (<80%).

Foi possível observar também, conforme apresentado na Figura 4.10a/b, que os clones apresentaram diferença de crescimento e viabilidade celular no decorrer do tempo de cultivo. Os clones #5, #28, #4, #43 e #51, apresentaram no dia 11 89,6%, 88,3%, 85,2%, 95,3% e 88,3% de viabilidade celular, enquanto os outros clones apresentaram viabilidade celular menor que 80%.

A maioria dos clones apresentou viabilidade celular menor que 90% no último dia de cultivo (dia 14) com exceção do #5 e a célula ExpiCHO, apresentando 87% e 81% de viabilidade celular, respectivamente.

a

DENSIDADE CELULAR



b

VIABILIDADE CELULAR

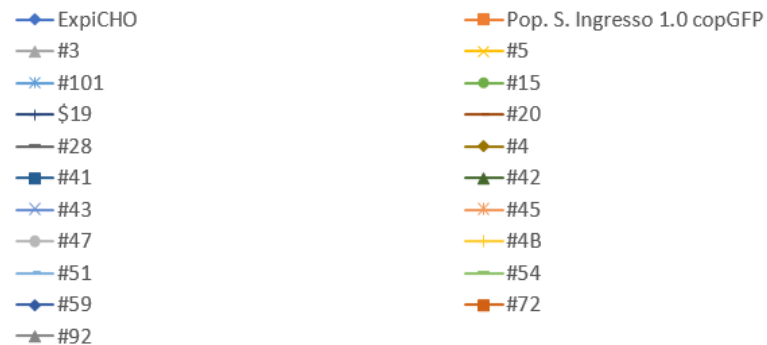
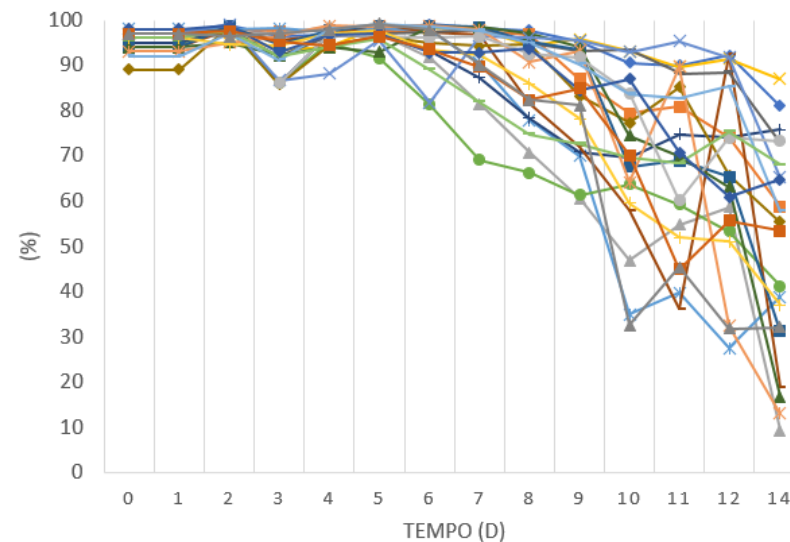


Figura 4.10. Análise de clones produtores do Sistema Ingresso para Pró-Trombina – *Fed-batch* em microbiorreator Ambr15. Acompanhamento dos clones produtores de Pró-trombina e ExpiCHO em *Fed-batch* em microbiorreator Ambr15 com o registro da **(a)** densidade e **(b)** viabilidade celular no decorrer do tempo de 14 dias.

Após *Fed-batch* em microbiorreator, os clones foram avaliados em relação a produção final da Pró-trombina por ELISA. Foi possível observar que alguns clones apresentaram o título do dia 11 maior que o título apresentado pela população Sistema Ingresso 1.0 copGFP, sendo eles os clones #4, #43, #51 e #28 com 0,1198g/L, 0,1094g/L, 0,0776g/L e 0,0768g/L de Pró-trombina, respectivamente (Figura 4.11 a/b).

Devido os clones #5, #28, #4, #43 e #51 apresentarem viabilidade celular maior que 80% no dia 11, foi possível dar continuidade no *Fed-batch* em microbiorreator até o dia 14. Conforme apresentado na Figura 4.11b, com os títulos do dia 12 e 14 dos respectivos clones foi possível alcançar 0,28g/L de Pró-trombina com o clone #28 no dia 12 e 0,20g/L de Pró-trombina com os clones #4 e #43 no mesmo dia. A densidade celular influencia no tempo de cultivo em um biorreator e poucos dias podem ser o suficiente para aumentar um título final e tornar os clones viáveis para produção.

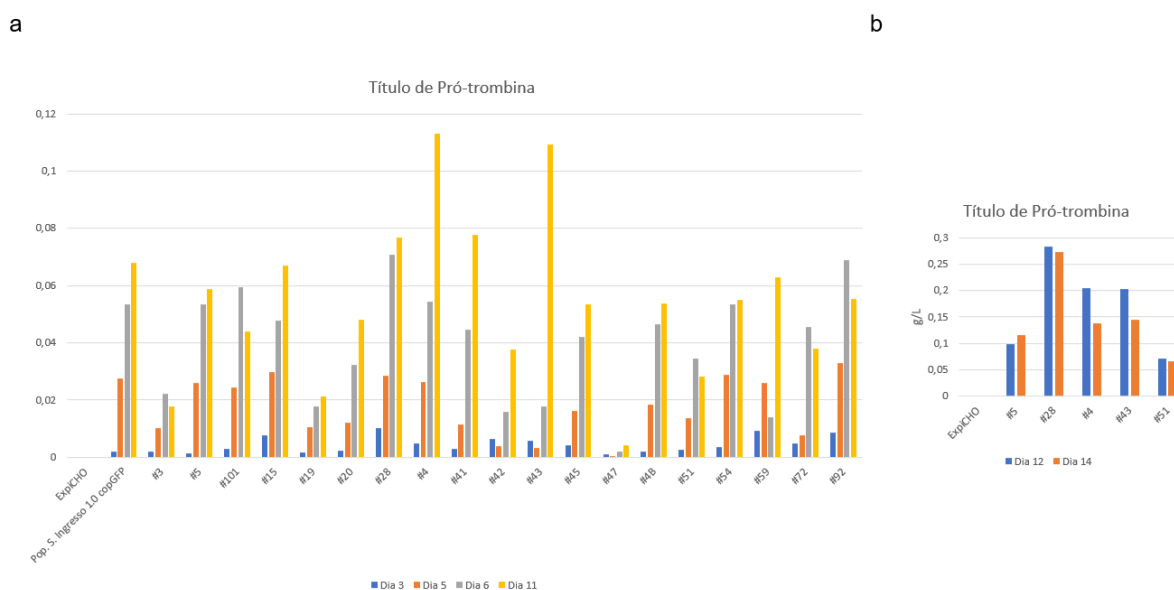


Figura 4.11. Título de Pró-trombina após cultivo em *Fed-batch* em microbiorreator Ambr15. (a) títulos de Pró-trombina quantificado por ELISA nos dias 3, 5, 6 e 11 e, **(b)** nos dias 12 e 14.

Foi observado também que o clone #15, que apresentou maior produção de Pró-trombina no *Fed-batch* em erlenmeyers, não apresentou maior produção em *Fed-batch* em microbiorreator. Esse fato pode ser justificado com o fato de que apresentou viabilidade menor que 80% a partir do dia 6 (69,1%) não suportando longo tempo em

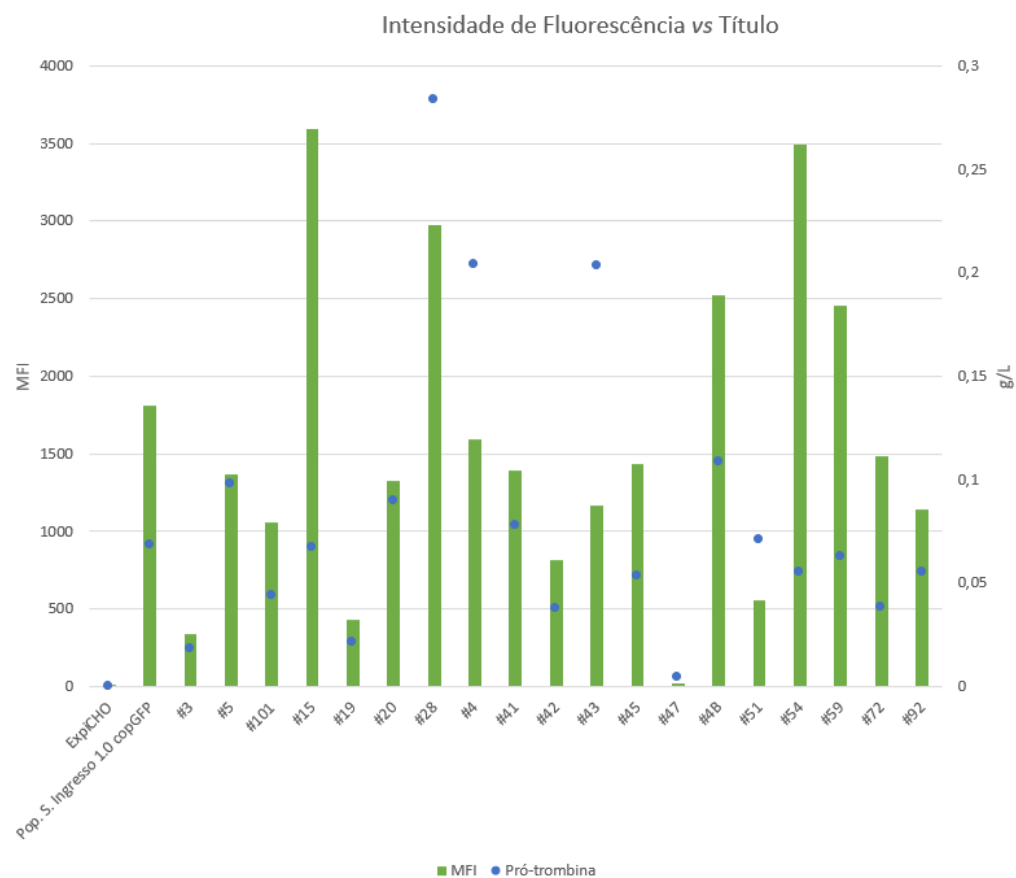
cultivo. Isso mostra que é importante considerar o comportamento celular em relação ao seu crescimento e viabilidade.

O clone #28 se destacou em relação ao título final de Pró-trombina de 0,26g/L, conforme apresentado na Figura 4.12a/b, e não apresentou a maior intensidade de fluorescência entre os clones (MFI de 3000), porém esteve presente entre os três clones com maior intensidade de fluorescência.

Embora os clones #15 e #54 apresentarem maior intensidade de fluorescência quando comparado com os outros clones avaliados, (MFI 3496 e 3562, respectivamente), mas apresentaram títulos de Pró-trombina próximos à população do Sistema Ingresso 1.0, entre 0,05 e 0,1g/L.

Já os clones com menor intensidade de fluorescência correspondem aos clones com menor título de Pró-trombina (Figura 4.12a/b), sendo eles os clones #47, #3 e #19, comportamento similar ao apresentado pelos clones #47 e # em *Fed-batch* em erlenmeyers.

a



b

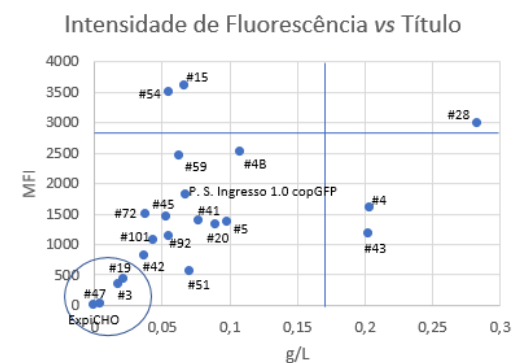


Figura 4.12. Análise de produção de Pró-trombina e intensidade de fluorescência – Fed-batch em microbiorreator Ambr15. (a) Intensidade de fluorescência registrada por citometria de fluxo (barras) no dia 8 e, título final de Pró-trombina identificado por ELISA (pontos) no dia 14 para os clones #5, #20, #28, #43, #4B, #51 e ExpiCHO e no dia 11 para o restante dos clones; (b) correlação da intensidade de fluorescência registrada no dia 8 por citometria de fluxo e, título final de Pró-trombina no dia 14 para os clones #5, #20, #28, #43, #4B, #51 e ExpiCHO e no dia 10 para o restante dos clones. Título final definido a partir do dia em que o clone apresentou viabilidade celular <80%.

Dentre os clones #28, #4 e #43, que apresentam maior título final de Pró-trombina, #4 e #43 apresentaram oscilações de viabilidade com o tempo do cultivo, porém o #28 manteve sua viabilidade estável no mesmo período (90-100%) (Figura 4.13a). Todos os clones sofreram decaimento de viabilidade (<80%) no final do *Fed-batch*, tendo alterações a partir do dia 9 para o #4 e dia 12 para os clones #28 e #43.

Os clones #15 e #54 apresentaram elevados níveis de intensidade de fluorescência e baixos títulos de Pró-trombina, quando comparado ao #28, pôde-se observar o decaimento na viabilidade celular a partir do dia 6 (Figura 4.13b). Já os clones com baixa intensidade de fluorescência e baixo título de Pró-trombina (Figura 4.13c), apresentaram diferença da viabilidade entre eles onde, o #47 apresentou decaimento da viabilidade a partir do dia 9, o #19 apresentou decaimento da viabilidade a partir do dia 6 sendo semelhante aos clones #54 e #15 e, o clone #3 apresentou decaimento da viabilidade a partir do dia 7.

Os clones com alta viabilidade celular por um longo período de cultivo apresentaram também maior densidade de células viáveis que os clones com baixo título final de Pró-trombina, onde o #28 alcançou densidade celular de 180×10^5 cel/mL no dia 4, mantendo densidade similar até o dia 10, decaindo apenas no dia 11. Já o #47 alcançou apenas a metade da densidade de células viáveis quando comparado ao #28, com 90×10^5 cel/mL no dia 6, demorando dois dias a mais para alcançar a maior densidade apresentada, decaindo logo em seguida. Com isso, é possível utilizar a viabilidade celular como um dos parâmetros do *screening* de clones altamente produtores, visto que ela influencia na estabilidade do crescimento de clones altamente produtores.

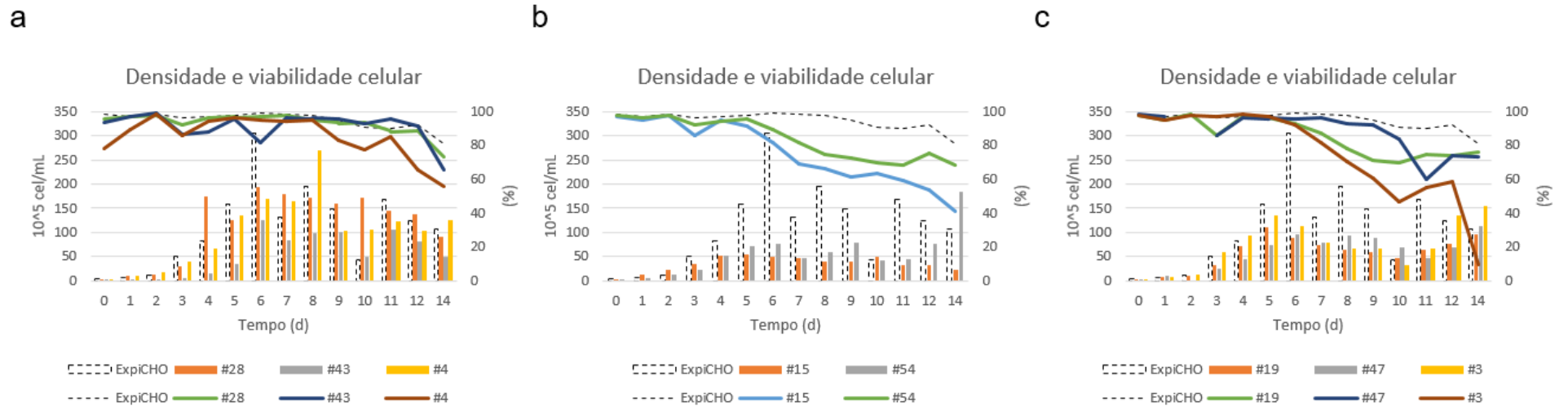


Figura 4.13. Comportamento do crescimento de clones produtores de Pró-trombina – *Fed-batch* em microbiorreator Ambr15. Densidade (barras) e viabilidade (linhas, em porcentagem) celular registrados no decorrer do tempo de cultivo em *Fed-batch* em microbiorreator Ambr15 dos clones que apresentaram **(a)** maior título final de Pró-trombina e, **(b)** título de Pró-trombina médio e **(c)** menor título final de Pró-trombina. As células ExpiCHO (barras e linhas pontilhadas) foram utilizadas como controle ideal de crescimento celular.

A viabilidade celular é de grande importância durante o cultivo de células produtoras de proteínas recombinantes e, essa característica foi apresentada na Figura 4.13. Diferentes adaptações do cultivo podem ser realizadas com o intuito de manter as células viáveis durante um longo período de tempo. Lee e colaboradores (2009), mostraram que a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas HSP27 e HSP70 proporcionou a duração da viabilidade celular acima de 80% em *Fed-batch* por mais 4 dias quando comparado com o controle, repercutindo positivamente na produção da proteína de interesse, alcançando duas vezes mais Interferon-gama no título final. A diminuição da temperatura do cultivo celular (abaixo de 37°C), técnica simples de ser empregada, também induz ao aumento da produção da proteína de interesse, reduzindo a duplicação celular e, mantendo a viabilidade celular elevada quando em comparação com o controle, em até 120h de cultivo conforme apresentado por Furukawa e Ohuye (1997). Essa redução de temperatura pode prolongar a fase G1 do ciclo celular, porém manter a viabilidade celular estável e a produção da proteína de interesse, resultando em aumento dos níveis da produtividade específica da população utilizada (Moore *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2003). Com isso, é possível empregar novos aditivos que atuem diretamente na fase G1/G0 do ciclo celular, como inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que resultam em bloqueio do ciclo celular, não ultrapassando 7×10^7 cel/mL e mantendo alta viabilidade celular (mantendo acima de 80% durante 15 dias de cultivo) (Du *et al.*, 2015). O aumento dos níveis de produtividade específica das populações, comparado ao controle, alcança um qP de até 110pg/cel/mL, não afetando as glicosilações das proteínas produzidas, pois essa é uma característica apresentada quando utilizado a diminuição da temperatura para aumento de produção (Du *et al.*, 2015). É importante ressaltar que a diminuição de temperatura pode resultar também mal dobramento das proteínas produzidas (Gomez *et al.*, 2012). Com isso, faz-se necessário adaptações que auxiliem na manutenção da alta viabilidade celular, e que além disso, resultem em prolongar alta viabilidade celular durante o tempo de cultivo, características essas conquistadas pelo clone #28 em ambos os ambientes de cultivo.

Para compreender melhor os padrões de comportamento celular na produção da proteína de interesse, foi realizado o cálculo de produtividade específica (qP), dos clones que prosseguiram em microbiorreator até o dia 14. Para o cálculo, foi utilizado os títulos anteriormente apresentados referentes ao dia 11 e 12. Conforme apresentado na Tabela 3.6, foi possível observar que o clone #28, além de apresentar

maior título de Pró-trombina, apresentou maior qP quando comparado com os clones #43, #5, #4 e #51. Já o clone #43 apresentou maior qP em relação ao clone #4, mesmo apresentando títulos semelhantes de Pró-trombina. Isso se deve ao fato de a densidade e viabilidade celular influenciaram no título final da proteína de interesse.

Tabela 3.6. Produtividade específica de Pró-trombina em clones cultivados em Microbiorreator Ambr15 (Sartorius) - dia 12 em relação ao dia 11.

	qP (produtividade específica)	Título dia 12 (g/L)	MFI	AU
ExpiCHO	0,048944597	0,00040875	5	813,54
#5	5,622993115	0,097982959	1371	10884,2
#28	25,35094161	0,283381383	2977	18871,8
#4	14,05443751	0,203861772	1596	16257,2
#43	17,57415423	0,203026773	1165	7522,4
#51	6,312639671	0,070729183	552	5670

Ao considerar o clone #28 como clone altamente produtor, foi possível observar que ele apresentou o título final de Pró-trombina, aproximadamente duas vezes maior que o título final apresentado pela população Sistema Ingresso 1.0 (Tabela 3.7) em ambos os ambientes de produção. Além de apresentar maior qP entre os clones viáveis após o 12º dia de cultivo em microbiorreator Ambr15, também apresentou comportamento mais parecido com as células ExpiCHO quando em relação à viabilidade celular, permanecendo viável até o penúltimo dia de cultivo, em ambos os *Fed-batches* (Figura 4.14).

Tabela 3.7. Título final de Pró-trombina de clone #28 altamente produtor após *Fed-batch* em erlenmeyers (dia 6) e microbiorreator Ambr15 (dia 12).

	Cultivo em erlenmeyers (g/L)	Cultivo em microbiorreator Ambr15 (g/L)
ExpiCHO	0	0,000387918
Pop. S. Ingresso 1.0		
copGFP	0,244430467	0,116034343
#28	0,405477179	0,283381383

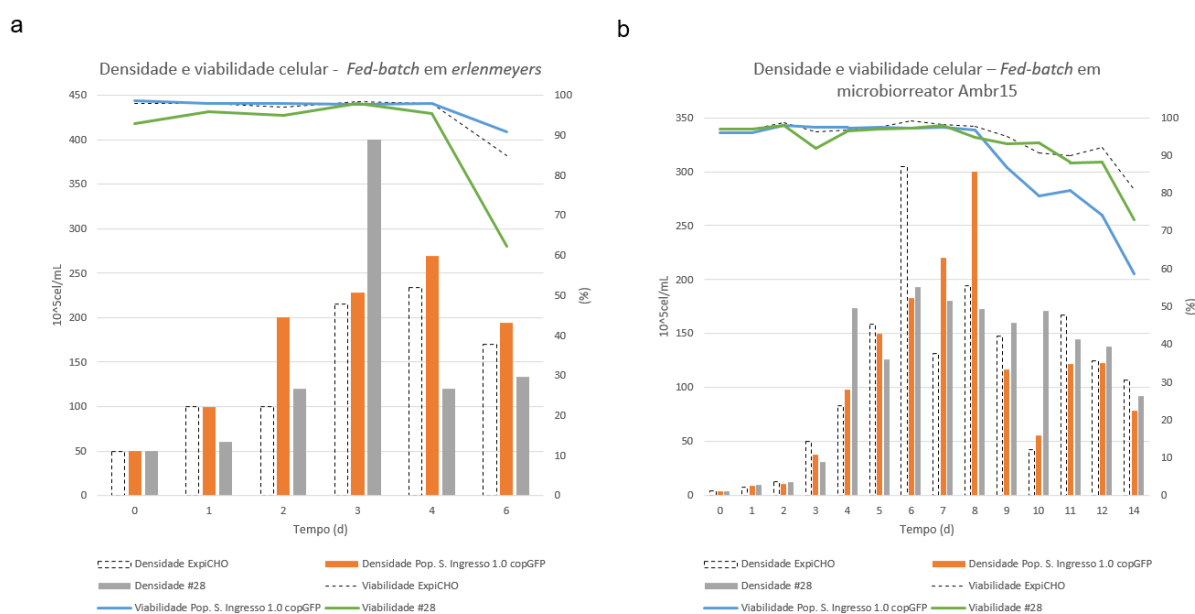


Figura 4.14. Comparação entre título final e crescimento de clones altamente produtores – *Fed-batch* em erlenmeyers e em microbiorreator Ambr15. (a) comportamento do clone #28 em *Fed-batch* em erlenmeyer durante 6 dias de cultivo e, (b) em microbiorreator Ambr 15 durante 14 dias de cultivo. As células ExpiCHO (barras e linhas pontilhadas) foram utilizadas como controle ideal de crescimento celular.

Fatores relacionados ao meio de cultivo também podem ter influenciado no título final de Pró-trombina em microbiorreator como, a presença do *antifoam* SE-15, o único reagente que não foi utilizado em comum entre os experimentos de *Fed-batch* em erlenmeyers e Ambr15. A utilização de *antifoam* é essencial para evitar danos físicos ao Ambr15 caso as borbulhas entrem no sistema de gases. Embora SE-15 seja indicado para culturas de células de mamíferos em suspensão, há um estudo que relata que essa não é a melhor escolha dentre os indicados, pois quando comparado com o Ex-cell e Antifoam C, apresenta ser prejudicial ao crescimento celular (Velugula-

Yellela *et al.*, 2017). Para melhorar os títulos de produção, novos *antifoams* foram adquiridos pelo grupo e serão testados futuramente.

A osmolaridade é outro fator que pode influenciar no meio de cultivo, mesmo sabendo que as células CHO em suspensão são menos sensíveis à osmolaridade que as células CHO aderentes (Takagi *et al.*, 2000), é possível observar que há diferença de produção específica para as populações devido o aumento da osmolaridade do meio (Lee e Koo, 2010). Nesse trabalho não foi possível mensurar a osmolaridade do meio, porém como apresentado por Lee e Koo (2010), é sabido que a adição de meios concentrados, no nosso caso o *feed* adicionado diariamente no cultivo e, soluções para ajuste de pH, também adicionado diariamente, tendem a aumentar a osmolaridade do meio de cultivo e, mesmo que não altere o título final da proteína de interesse (Zhu *et al.*, 2008), é um fator indesejado pois altera a sialilação das proteínas. Como forma de solução pode-se utilizar soluções de osmoproteção para auxiliar na diminuição do impacto causados nas células (Schmelzer e Miller, 2002).

Mesmo não aumentando o título final da proteína de interesse quando utilizado *Fed-batch* em microbiorreator, em comparação com a produção em erlenmeyer, foi possível aumentar o tempo de cultivo para alguns clones, mantendo a sua viabilidade celular acima de 80%. Como apresentado, os clones com maior título final de Pró-trombina mantiveram viabilidade maior que 80% até o 12º dia de cultivo em microbiorreator, muito provavelmente devido ao ambiente controlado (Portner, 2020), já que pH, temperatura e oxigenação são fatores críticos para o cultivo celular e diferenças entre esses parâmetros podem influenciar na produtividade final da proteína de interesse (Trummer *et al.*, 2006). Mesmo com a diferença de títulos finais de Pró-trombina entre os métodos de produção utilizados, com o *screening* de clones realizado por esse trabalho foi possível identificar clones que apresentaram títulos de Pró-trombina maiores que os estudos de Xen e colaboradores (2001), com 0,00113g/L de Pró-trombina, uma produtividade específica maior que os estudos de Kovnir e colaboradores (2018), com população apresentando um qP de 10,3/pg/cel/dia de Fator IX porém, menores que as plataformas utilizadas para a escala industrial, alcançando cerca de 10 vezes mais o título alcançado nesse trabalho, podendo chegar à ~3g/L da proteína de interesse (Joosten *et al.*, 2010).

De todos os clones avaliados, obtivemos resultados promissores quando comparamos a produção de Pró-trombina tanto em *Fed-batch* em erlenmeyers quanto em microbiorreator para ambos os clones #28 e #4, alcançando valores aproximados

à 0,4g/L que podem ser melhorados com adaptações de cultivo visto que, o #5 alcança 0,4691g/L de Pró-trombina em ambiente controlado (Biorreator XRS em cultivo inicial de 5L). Com isso, foi possível observar que obtivemos êxito em encontrar um clone com tendência a ser mais produtor que a população em que se encontrava e, mais produtor que o clone que já havia sido selecionado pelo grupo de trabalho para ser utilizado em produção em maior escala. A partir de agora, alternativas para a melhoria de produção poderão ser testadas, principalmente em relação a testes de painéis de meio de cultura e de feeds e ajustes do processo de batelada alimentada em sí (pH, DO, diminuição de temperatura).

É possível observar que desde o início da utilização de células CHO na produção de proteínas terapêuticas houve constantes adaptações nas etapas de produção como, definições da composição do meio de cultivo utilizado para cultivo (Mather e Burlingame, 1992), temperatura e pH (Joosten *et al.*, 2010), desenvolvimento de novos métodos de seleção das populações como a substituição do uso de neomicina por seleção por FACS (Kotsoupoulou *et al.*, 2013), e seleção de células únicas provenientes de uma mesma população, método conhecido como clonagem, onde clones altamente produtores apresentam aumento da produção da proteína recombinante desejada quando em comparação com a população de onde foram selecionados (Carver *et al.*, 2020).

Há como mensurar diferentes parâmetros proporcionado pelo método de cultivo (Facco *et al.*, 2020); compreender melhor o comportamento da população utilizada adaptando os métodos de acordo com as características de determinado clone ou, criar um método de cultivo padrão, que pode ser utilizado tanto para a seleção da linhagem quanto na produção (Kim *et al.*, 2020), são alternativas de ajuste para aumentar a produção de proteínas terapêuticas. A glicose, é a principal fonte de carbono utilizada pela célula para produção de energia, influenciando em diferentes comportamentos celulares. Quando em baixas quantidades no meio de cultivo, ou alto uso celular devido os elevados níveis de atividade metabólica, pode se ativada a via de consumo de lactato e NH_3 e o aumento da liberação de CO_2 e Alanina pelas células (Martínez *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2013; Altamirano *et al.*, 2006; Wilkens *et al.*, 2011). O consumo de lactato é uma característica apresentada por populações de alta expressão de proteínas heterólogas (Toussaint *et al.*, 2016) que podem ser mensurados e ajustadas para o controle do cultivo e consequente impacto na produção. O lactato produzido pelas células, acidifica o meio de cultivo que, ao ser

ajustado, pode alterar a osmolaridade e consequentemente a produção (Gilbert *et al.*, 2014).

Quando as populações celulares se encontram em atividade metabólica intensa, faz-se necessário o uso de alternativas que possuam um potencial antioxidante (Thirupati *et al.*, 2020) como a superexpressão de proteínas que atuam na produção de enzimas do *stress* oxidativo, como a Ca3 (Berger *et al.*, 2020), que juntamente com o CO₂ liberado pelo metabolismo pode produzir HCO₃⁻ que por sua vez auxilia no balanço do pH do cultivo ou, induzir a superexpressão da proteína transportadora de taurina (Tabuchi *et al.*, 2010), que possui atividade antioxidante (Das *et al.*, 2010). Pode-se também, trabalhar auxiliando no próprio ciclo do ácido cítrico como com a suplementação do meio de cultivo com cisteína (Ali *et al.*, 2020), alfa-cetoglutarato, ácido málico ou ácido succínico (Zhang *et al.*, 2020) ou inibindo a produção de enzimas próprias da célula que degradam componentes do meio de cultivo (Loue *et al.*, 2020), bem como induzindo a superexpressão de enzimas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico para aumentar o fluxo de piruvato a ser utilizado pela população produtora (Gupta *et al.*, 2017).

Quando comparado a intensidade de fluorescência emitida (MFI e AU), título final de Pró-trombina tanto para o dia 6 quanto para o dia 12 e produtividade específica para os clones foi possível observar diferentes padrões apresentados pelos clones (Figura 4.15). O comportamento dos clones e população, apresentados no dia 6, foram semelhantes nos dois métodos de cultivo utilizados, erlenmeyers e microbiorreator Ambr15, mostrando que o cultivo inicial em erlenmeyers pode ser realizado para identificar e estabelecer padrões de cultivo para depois ser estabelecido em microbiorreator. Pôde-se observar também, que houve uma tendência a clones mais produtores apresentarem maior intensidade de fluorescência, clones menos produtores apresentarem menor intensidade de fluorescência, e clones que apresentaram baixa intensidade de fluorescência apresentaram produtividade considerável. Esses resultados mostram que um novo parâmetro deve ser considerado quando houver a seleção de um clone considerado altamente produtor. Foi possível identificar clones que apresentaram baixa intensidade de fluorescência como os clones #101 e #92 que em contrapartida foram altamente produtores em 6 dias de cultivo portanto, ao selecionar um clone, deve ser levado em consideração também o tempo de cultivo desejado.

Analisando os resultados de fluorescência em diferentes dias e de quantidade de Pró-Trombina nos dias 6 (Erlenmeyers e Ambr15) e 12 (Ambr15), foi possível observar que, embora a fluorescência tenha sido analisada em dias e em equipamentos diferentes, há uma tendência que para valores maiores de fluorescência seja possível identificar clones com maior título e, provavelmente melhor produtores ao longo dos dias, sendo a fluorescência um bom fator preditor para essa busca.

Outro resultado interessante é que embora as quantidades de Pró-Trombina encontrada em Erlenmeyer e em Ambr15 tenham sido diferentes (em Ambr15 os títulos foram menores), foram obtidos resultados proporcionais de quantificação quando comparados os clones entre si nos dois experimentos no dia 6. Com isso, é possível observar que a busca de clones melhor produtores podem ser realizado futuramente em Erlenmeyer em um experimento de 6 dias, bem como a curva de crescimento e análise de viabilidade. Após esse *screening*, os clones previamente selecionados podem ser avaliados em diferentes combinações de testes de cultivo em Ambr15.

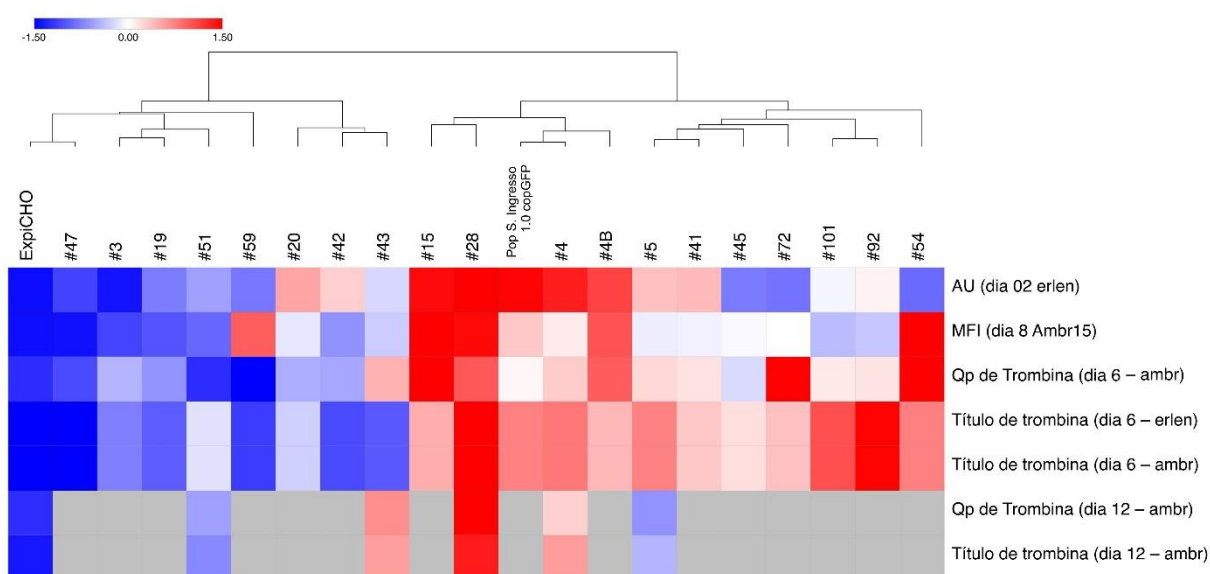


Figura 4.15. Representação gráfica em formato de Heatmap dos valores quantitativos obtidos dos experimentos realizados com linhagem ExpiCHO controle, da população enriquecida para copGFP do Sistema Ingresso 1.0 que codifica para a proteína Trombina (Pop. S. Ingresso 1.0 copGFP) e de clones obtidos a partir dessa população. As amostras encontram-se dispostas em colunas e todas as condições experimentais em linhas. O padrão de cores indica azul como baixa expressão e vermelho como alta expressão e ajustado de acordo com os valores de Z-Score em escala de -1.5 a 1.5. Foi utilizado agrupamento hierárquico não-supervisionado para avaliação da similaridade

entre as amostras considerando a distância euclidiana como métrica para construção dos dendrogramas.

4.2. Sistema Ingresso 2.0

4.2.1. Construção de plasmídeos

4.2.1.1. Plasmídeos 3'UTR e 3'UTR^{noc}

A clonagem da sequência copGFP em plasmídeo CMV_5'UTR_IRES_3'UTR-Genscript foi confirmada por digestão com enzimas de restrição específicas para a região do marcador de seleção. Essa inserção foi confirmada com a liberação do fragmento de DNA referente à copGFP. A inserção de copGFP sem alterações de sequências do gene utilizado ou alteração de fase de leitura (dado não apresentado) foi confirmado por sequenciamento.

Após a clonagem de copGFP em plasmídeo, foi necessário a clonagem da sequência do gene Pró-trombina no sítio do gene de interesse localizado no plasmídeo. Essa inserção foi confirmada com a liberação do fragmento referente ao gene de Pró-trombina (Figura 4.16) e após, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento, resultando em confirmação da inserção do gene Pró-trombina.

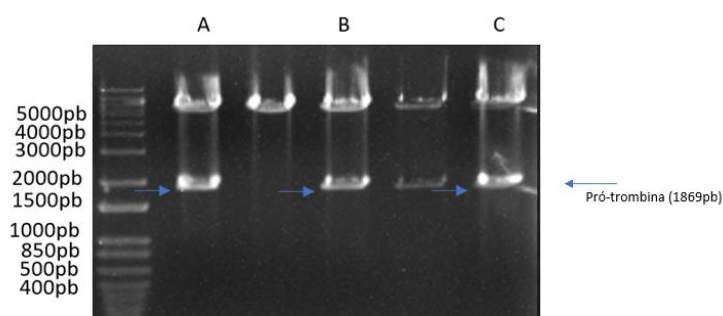


Figura 4.16. Confirmação de clonagem do gene referente à proteína Pró-trombina - Sistema Ingresso 2.0_copGFP. Digestões realizadas com conjunto de enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, para liberação de fragmentos esperados para clonagem de gene de Pró-trombina (1869pb). Clones 1, 2 e 3 representados por colunas A, B e C, respectivamente. Colônias positivas para Trombina. Os poços foram alternados e a presença de DNA em poços não intitulados significa excesso de DNA/vazamento.

Com as duas clonagens descritas anteriormente, foi possível obter o plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR que foi utilizado como primeira adaptação do

Sistema Ingresso 1.0, gerando o plasmídeo do Sistema Ingresso 2.0. Para a realização da análise de influência do aumento da expressão da proteína de interesse com o uso de uma sequência 3'UTR, fez-se necessário a deleção da sequência referente à 3'UTR, para gerar um plasmídeo CMV_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR^{noc}, sendo utilizado como controle negativo. A sequência 3'UTR foi retirada após a digestão com enzimas de restrição *Sall*-HF e *SphI* e, posteriormente o plasmídeo teve suas extremidades reparadas, religado com T4 DNA ligase e utilizado para transformação de *E.coli* para extração do plasmídeo por MiniPreparação e confirmação da deleção do fragmento. Dos inóculos de 4 clones selecionados da transformação, um clone resultou em deleção da sequência de 3'UTR (Figura 4.17), sendo esse enviado para sequenciamento, resultando em confirmação da deleção da sequência 3'UTR sem alteração de fase de leitura (dado não apresentado).

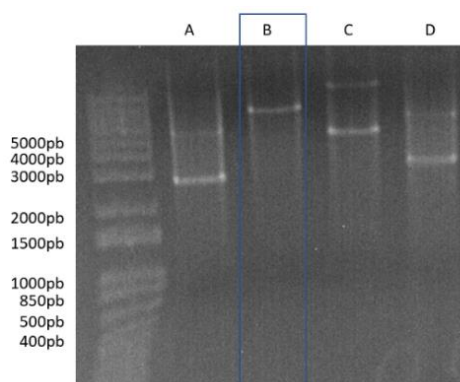


Figura 4.17. Confirmação de plasmídeo nocaute para sequência 3'UTR. Digestão realizada com enzimas de restrição *Sall*-HF e *SphI* para confirmação da ausência da sequência 3'UTR. A construção do plasmídeo nocaute resultou no crescimento de 4 colônias apresentadas nas colunas A, B, C e D onde, a o plasmídeo apresentado na coluna B (destacado em azul) apresentou ausência da sequência 3'UTR, sendo considerado o plasmídeo nocaute devido a não liberação de fragmento referente à sequência 3'UTR.

4.2.1.2. Plasmídeos *Enhancer I* e *Enhancer II*

Para teste da expressão de proteína Pró-trombina com a adição de um *Enhancer* na região da sequência promotora do plasmídeo, foi necessário a clonagem das sequências do *Enhancer I* e *Enhancer II* no plasmídeo do Sistema Ingresso 2.0 com digestão das enzimas de restrição específicas para inserção em região a montante da região promotora do plasmídeo (sequências de 321pb e 286pb,

respectivamente). Essas inserções foram confirmadas com a liberação dos fragmentos referentes ao *Enhancer I* e *Enhancer II*. Após, o plasmídeo foi extraído dos inóculos por MiniPreparação de Plasmídeos e esses clones foram enviados para sequenciamento, resultando em confirmação da inserção dos *enhancers* sem alterações de sequências do gene utilizado ou alteração de sequência (dado não apresentado).

Após a construção dos plasmídeos *EnhancerI_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR* e *EnhancerII_5'UTR_Thr_copGFP_3'UTR*, foi necessária a inserção do marcador de seleção, o copGFP. Nesse caso copGFP foi clonado depois pois as enzimas de clonagem de *Enhancers* clivam a sequência de copGFP. A clonagem da sequência referente ao gene de copGFP foi confirmada por digestão com enzimas de restrição *Sall* e *SphI*, referentes à região do marcador de seleção. Essa inserção foi confirmada com a liberação do fragmento referente ao gene de copGFP e após, o plasmídeo extraído por MiniPreparação dos inóculos desses clones foram enviados para sequenciamento, resultando em confirmação da inserção de copGFP sem alterações de sequências do gene utilizado ou alteração de fase de leitura (dado não apresentado).

Com as duas clonagens descritas anteriormente, foi possível obter os plasmídeos *EnhancerI_5'UTR_copGFP_3'UTR* e *EnhancerII_5'UTR_copGFP_3'UTR*, sendo que foi necessária a clonagem da sequência do gene de Pró-trombina no sítio do gene de interesse localizado no plasmídeo, utilizando *EcoRI* e *NotI*, para conclusão da construção do plasmídeo final. Essa inserção foi confirmada com a liberação do fragmento referente à Pró-trombina e após, o plasmídeo extraído por MiniPreparação de plasmídeo dos inóculos, esses clones foram enviados para sequenciamento, resultando em confirmação da inserção de Pró-trombina sem alterações de sequências do gene utilizado ou alteração de fase de leitura (dado não apresentado).

4.2.1.3. Plasmídeos finais Sistema Ingresso 1.0 e 2.0

Para melhor compreensão das construções dos plasmídeos obtidos durante esse trabalho e que constituem atualmente o Sistema Ingresso 1.0 e 2.0, foram realizadas digestões para a liberação de fragmentos referentes ao promotor, à proteína de interesse, ao marcador de seleção e à sequência 3'UTR. Vale ressaltar

que esses plasmídeos foram enviados para sequenciamento e assim foi confirmada a construção dos mesmos, sem alterações de genes e fases de leitura de tradução.

Os plasmídeos constituintes das plataformas do Sistema Ingresso 1.0 e Sistema Ingresso 2.0 são: (I) CMV_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR^{noc}, constituinte da plataforma Sistema Ingresso 1.0 e, (II) CMV_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR, (III) EnhancerI_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR, (IV) EnhancerII_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR constituintes da plataforma Sistema Ingresso 2.0.

Para a confirmação da sequência referente ao promotor específico de cada plasmídeo arquivado, pôde-se observar a liberação do fragmento esperado em ambos os plasmídeos, sendo o fragmento de DNA de 547pb para plasmídeo com apenas promotor CMV, 327pb para plasmídeo com *Enhancer I* e 292pb para plasmídeo com *Enhancer II* (Figura 4.18a). Pôde também ser observado a liberação de fragmento de DNA de 1881pb, fragmento este específico para o gene referente à Pró-trombina em todos os plasmídeos digeridos, conforme apresentado na Figura 4.18b.

Além da confirmação de promotor específico e gene referente a proteína de interesse, foi possível observar a liberação do fragmento de 777pb referente ao marcador de seleção, neste caso copGFP, em todos os plasmídeos digeridos (Figura 4.18c). Foram confirmadas a presença da sequência de 3'UTR com a liberação de fragmento de 598pb, em plasmídeos do Sistema Ingresso 2.0 bem como a, ausência do mesmo fragmento no plasmídeo nocaute, constituinte do Sistema Ingresso 1.0 (Figura 4.18d).

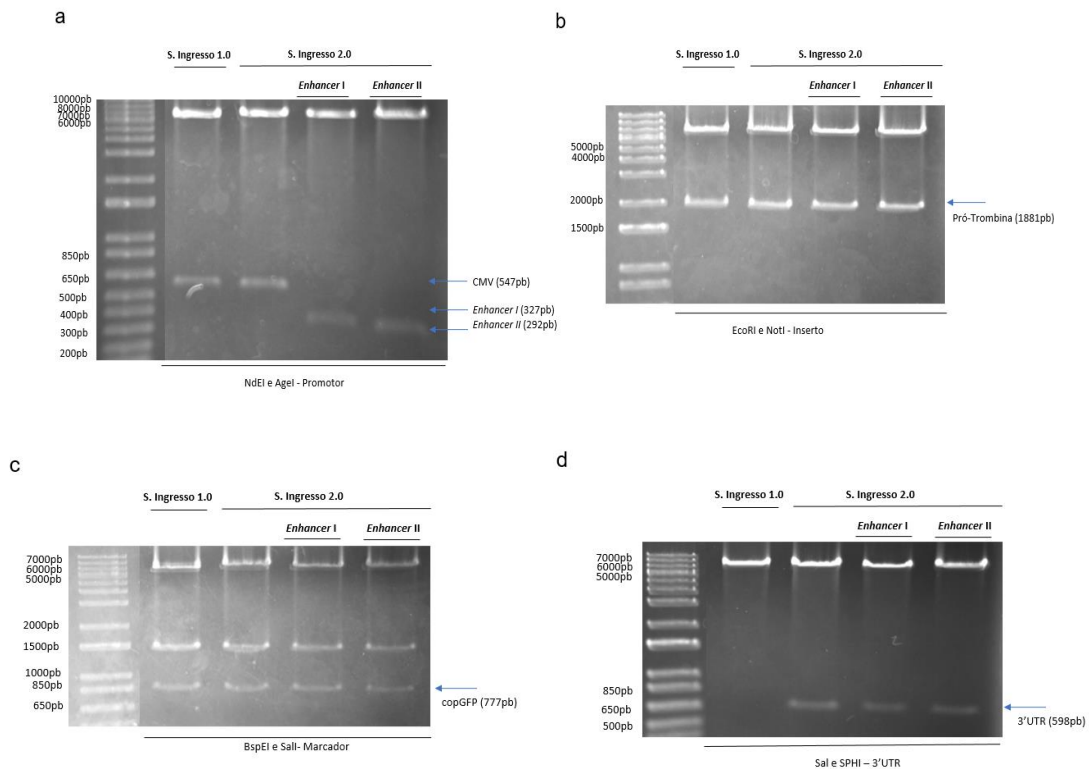


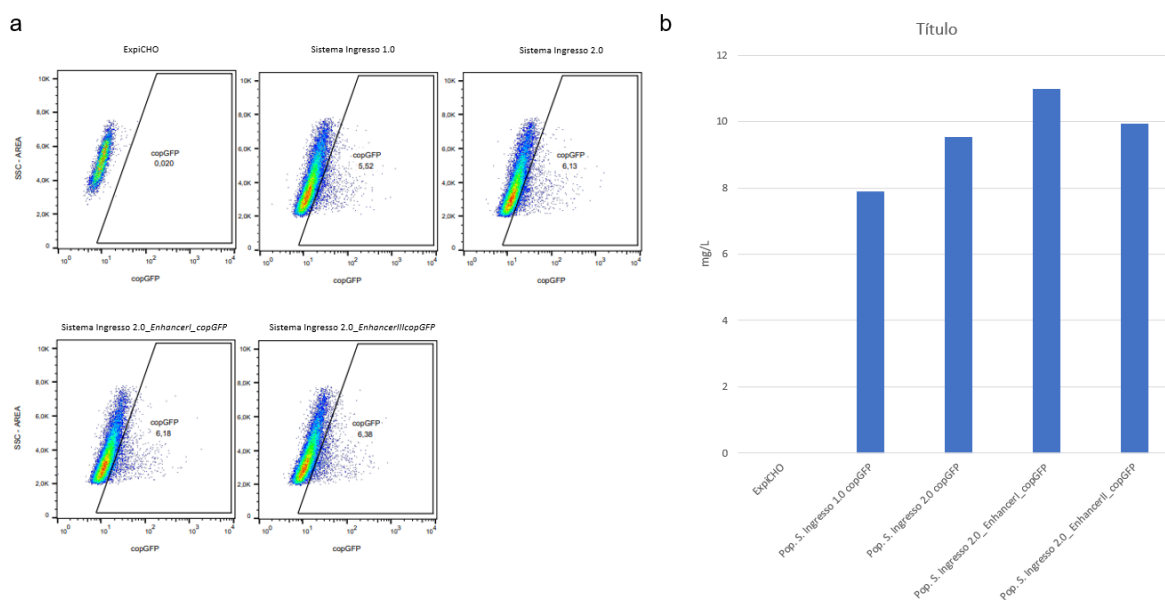
Figura 4.18. Confirmação dos plasmídeos constituintes do Sistema Ingresso 1.0 e 2.0. Plasmídeos do Sistema Ingresso, Sistema Ingresso 1.0 e Sistema Ingresso 2.0 após eletroforese em gel de agarose 0,8% para definição de perfil dos plasmídeos constituintes de cada Sistema. **(a)** Plasmídeos Sistema Ingresso 1.0 e 2.0 digeridos com enzimas de restrição *NdeI* e *AgeI* para liberação de fragmento referente ao promotor de transcrição, confirmando a presença de promotor CMV (547pb) nas colunas 1 e 2 sendo plasmídeo 1.0 e 2.0, respectivamente. Confirmação da liberação dos fragmentos referente à promotor com *Enhancer I* (327pb) e *Enhancer II* (292pb) nas colunas 3 e 4, respectivamente, referente aos plasmídeos do Sistema Ingresso 2.0. **(b)** Plasmídeos Sistema Ingresso 1.0 e 2.0 digeridos com enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para liberação da sequência do gene referente à Pró-trombina (1881pb), confirmando presença da sequência em ambos os plasmídeos analisados. **(c)** Plasmídeos Sistema Ingresso 1.0 e 2.0 digeridos com enzimas de restrição *BspEI* e *SalI* para liberação de fragmento referente ao marcador de seleção copGFP (777pb), confirmando a presença do mesmo em ambos os plasmídeos analisados. **(d)** Plasmídeos Sistema Ingresso 1.0 e 2.0 digeridos com enzimas de restrição *SphI* e *SalI* para liberação de fragmento referente à sequência 3'UTR (598pb), confirmando a ausência da sequência para quando plasmídeo do Sistema Ingresso 1.0 e presença da sequência para quando plasmídeo do Sistema Ingresso 2.0.

Os plasmídeos apresentados anteriormente foram utilizados para transfectar células ExpiCHO para expressão transiente conforme metodologia descrita e resultaram em uma taxa de fluorescência baixa, fazendo necessária a realização futura de nova transfecção para reavaliar os resultados obtidos. Porém, devido as transfecções terem sido realizadas e lançadas em *Fed-batch* em microbiorreator

juntamente com os clones anteriormente descritos, foi realizada a quantificação do título de Pró-trombina 72 horas após a transfecção onde as populações puderam se recuperar e apresentar níveis de fluorescência consideráveis para assim, descrever uma prévia análise da influência das sequências 3'UTR e *Enhancers* nos plasmídeos do Sistema Ingresso 2.0.

De acordo com os dados apresentados na Figura 4.19a, foi possível obter com a transfecção transiente em células ExpiCHO, valores semelhantes de porcentagem de células copGFP+ para ambas as populações sendo, 5,52%, 6,13%, 6,16% e 6,38% copGFP+ para as populações CMV_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR^{noc}, CMV_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR, EnhancerI_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR e EnhancerII_5'UTR_THR_copGFP_3'UTR, respectivamente.

Foi observado que os títulos de produção de Pró-trombina 72h após a transfecção dos plasmídeos referentes ao Sistema Ingresso 1.0 (ausência de 3'UTR) e Sistema Ingresso 2.0 (presença de 3'UTR), obteve-se um leve aumento no título de Pró-trombina com a adição da sequência 3'UTR, em relação ao Sistema Ingresso 1.0, e aparentemente um aumento do título de Pró-Trombina na presença de *Enhancer* I quando comparado a ausência deste, considerando que as porcentagens de fluorescências são muito parecidas (Figura 4.19b).



plasmídeos referentes aos Sistemas desenvolvidos. **(b)** Título de Pró-trombina identificado por ELISA após 72h da transfecção dos plasmídeos referentes aos Sistemas desenvolvidos.

Ao utilizar sequências 5'UTR e 3'UTR para a produção de IFN e Trastuzumab em células CHO, Mariati e colaboradores (2010) alcançaram cerca de 25µg/mL e 4µg/mL das proteínas, respectivamente, após 48hs da transfecção. Também foi possível observar diferenças nos títulos finais de acordo com a proteína de interesse e de acordo com a linhagem celular utilizada, resultados distintos entre a linhagem HEK293 e CHO. Ao comparar os resultados obtidos nesse trabalho foi possível observar que a nossa população alcançou uma produção maior que a produção do Trastuzumab, porém menor que os níveis de IFN. Quando comparado com produção de Pró-trombina, sem a adição de sequências reguladoras de expressão, foi possível observar que alcançamos em dois dias de produção níveis maiores que Chen e colaboradores (2000) em seis dias de cultivo, apresentando 16,7mg/L, mostrando que pode haver vantagem em utilizar sequências 5'UTR e 3'UTR em conjunto na produção de proteínas recombinantes.

Os *enhancers* de transcrição gênica estão presentes em diferentes tipos celulares atuando de forma específica para cada uma delas (Heinz *et al.*, 2015). Quando aplicado na produção de proteínas recombinantes é possível obter aumento dos níveis da expressão das proteínas (Williams *et al.*, 2005). Ao avaliar a expressão da proteína de interesse utilizando *enhancers* foi possível observar que houve o aumento da expressão da proteína de interesse assim como relatado em estudos de Brown e colaboradores (2014), sendo justificado pelo fato de que os *enhancers* auxiliam no recrutamento dos fatores de transcrição para a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição (Szutorisz *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que esses dados são apenas uma prospecção da influência da sequência 3'UTR na expressão da proteína de interesse e, mesmo com estudos de que o uso dessa mesma sequência em diferentes linhagens celulares podem resultar em diferentes níveis de expressão, não sendo exatamente promissora em todas as linhagens utilizadas (Klein *et al.*, 2006), foi possível observar que em células CHO, em combinação com o promotor CMV, promove o aumento da expressão da proteína de interesse, mais do que o uso apenas de sequências isoladoras que evitam o silenciamento do DNA ao se integrar ao genoma da célula (Wang *et al.*, 2020).

Com isso, foi possível definir que houve uma tendência de aumento da expressão da proteína de interesse ao utilizar sequências 5' UTR, 3' UTR e *enhancers* de transcrição gênica, porém, os procedimentos devem ser realizados novamente com a utilização da expressão gênica estável e um número maior de amostragem para confirmação dos resultados obtidos.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com esse trabalho foi possível obter o aumento da expressão das proteínas de interesse mCherry e Pró-Trombina na presença da sequência 5'UTR a *jusante* do promotor CMV, presente no cassete de integração no genoma da célula ExpiCHO. Além disso, embora sejam necessários mais testes para o Sistema Ingresso 2.0, a sequência 3' UTR e *enhancers* de transcrição gênica se apresentam promissoras para o aumento da expressão da proteína de interesse quando utilizado em conjunto com a sequência 5'UTR.

Foi possível a seleção de clones referentes ao Sistema Ingresso 1.0 através do marcador copGFP. Embora haja exceções, a maior taxa de intensidade de fluorescência de copGFP pode ser utilizada para o *screening* inicial de clones com maior produtividade.

No caso do estudo de clones celulares expressores de Pró-Trombina obtidos a partir da População do Sistema Ingresso 1.0, foi verificada a presença de clones promissores que apresentaram produtividade acima da população de origem. Os clones que apresentaram maior produtividade apresentaram viabilidade acima de 80% em experimento *Fed-batch* em Ambr15 após 12 dias de cultivo. Com o objetivo de encontrar clones altamente produtores de Pró-Trombina compatíveis com o mercado de biofármacos será necessária a repetição das análises dos clones mais produtores obtidos (replicatas biológicas) para fins de cálculos estatísticos, bem como estudo de maior quantidade de clones na tentativa de encontrar melhores opções.

Para os próximos estudos serão avaliados a produção de metabólitos inibitórios como lactato e amônio, otimizações do meio de cultivo em Ambr15, incluindo testes de outros meios de cultivo diferentes de Dynamis já adquiridos pelo grupo. Além disso serão analisados diferentes *antifoams*, bem como mudanças de temperatura, adição de moléculas que interfiram no ciclo celular e de sequências de DNA presentes no Sistema Ingresso 1.0.e 2.0.

Avaliações como a quantificação do número de cópias da sequência gênica heteróloga integrada no DNA de células CHO e quantificação das cópias de mRNA devem ser avaliadas tanto para o gene que codifica para Pró-trombina bem como para o marcador fluorescente da população enriquecida e clones. Vale ressaltar que essas análises já estão sendo realizadas pelo grupo de trabalho.

6. REFERÊNCIAS

Ali, A. S.; Chen, R.; Raju, R.; Kshirsagar, R.; Gilbert, A.; Zang, L.; Karger, B. L.; Ivanov, A. R. *Multi-omics reveals impact of cysteine feed concentration and resulting redox imbalance on cellular energy metabolism and specific productivity in CHO cells bioprocessing*. Biotechnol. J. 2020, 15, 1900565.

Altamirano, C.; Illanes, A.; Becerra, S.; Cairó, J. J.; Gòdia, F.; *Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose*. Journal of Biotechnology. Vol. 125. P.547-556. 2006.

Araujo, P.R.; Yoon, K.; Ko, D.; Smith, A. D.; Qiao, M.; Suresh, U.; Burns, S. C.; Penalva, L. O. F. *Before it gets started: Regulating translation at the 5' UTR*. Comp. Funct. Genomics. 475731. Maio, 2012.

Asrani, K. H.; Farelli, J. D.; Stahley, M. R.; Miller, R. L.; Cheng, C. J.; Subramanian, R. R.; Brown, J. M. *Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA*. RNA Biology, 2018. Vol. 15. N°6, 756-762.

Balasubramanian, S.; Matasci, M.; Kadlecova, Z.; Baldi, L.; Hacker, D.L.; Wurm, F.M. *Rapid recombinant protein production from piggyBac transposon-mediated stable CHO cell pools*. J. Biotechnol. Vol. 200, pp. 61-69. 2015.

Baldi, L.; Hacker, D. L.; Adam, M.; Wurm, F. M.; *Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives*. Laboratory of Cellular Biotechnology, Ecole. Lausanne, Switzerland. Biotechnology Letter, Vol.29, 677-684. Janeiro, 2007.

Bandaranayake, A. D. e Almo, S. *Recent advances in mammalian protein production*. FEBS Letters. 588. p. 235-260. 2014.

Barnes, L. M.; Bentley, C. M.; Dickson, A. J. *Stability of protein production from recombinant mammalian cells*. Review Wiley Periodicals. Kent, Reino Unido. Agosto, 2002.

Barret, L. W.; Fletcher, S.; Wilton, S. D. *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements*. Cell. Mol. Life Sci.

Vol.69. P.3613-3634. 2012.

Barrett, L. W.; Fletcher, S.; Wilton, S. D. *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements*. Cell. Mol. Life Sci 69(21):3613–3634. 2012.

Baush, M.; Schultheiss, C.; Sieck, J. *Recommendations for Comparison of Productivity Between Fed-batch and Perfusion Processes*. Biotechnol. J. vol. 14. 2019.

Berger, A.; Fourn, A. L.; Masternak, J.; Regamey, A.; Bodenmann, I.; Girod, P.A.; Mermod, N. *Overexpression of transcription factor Foxa1 and target genes therapeutic protein production bottlenecks in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 117. P.1101-1116. 2020.

Berger, A.; Fourn, V. L.; Masternak, J.; Regamey, A.; Bodenmann, I.; Girod, PA.; Mermod, N. *Overexpression of transcription factor Foxa1 and target genes remediated therapeutic protein production bottlenecks in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology and Bioengineering. Vol.117. P.1101-1116. 2020.

Berthold, R. K. *Significance of specific productivity for the effectiveness and consistency of mammalian cell cultivation*. Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century, 561-565. 1995.

Bertolini, R. L.; Meade, H.; Lazzaroto, C. R.; Martins, L. T.; Tavares, K. C.; Bertolini, M.; Murray, J. D. *The transgenic platform for biopharmaceutical production*. Transgenic Res. DOI 10.1007/s11284-016-9933-9. 2016.

Bettinardi, I. W. *Desenvolvimento de estratégias de alimentação com meios concentrados para o cultivo de células animais em perfusão*. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e pesquisa de Engenharia – COOPPE UFRJ. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Rio de Janeiro, RJ. 2016.

Bettinardi I. W.; Castan A.; Medronho R.A.; Castilho L.R. *Hydrocyclones as cell retention device for CHO perfusion processes in single-use bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering. <https://doi.org/10.1002/bit.27335>. 2020.

Blackwood, E. M.; Kadonaga, J. T. *Going the Distance: A Current View of Enhancer Action*. Science's Compass. Vol. 281. 3, July, 1998.

BRASIL. Decreto N°2.519, de 16 de Março de 1998. Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada no Rio de Janeiro, em 05 de Junho de 1992. Subchefia para Assuntos Jurídicos, Casa Civil, Presidência da República.

BRASIL. Decreto N°6.041, de 8 de Fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Subchefia para Assuntos Jurídicos, Casa Civil, Presidência da República.

Brezinsky, S. C. G.; Chiang, G. G.; Szilvasi, A.; Mohan, S.; Shapiro, R. I.; MacLean, A.; Sisk, W.; Thill, G. *A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity*. Journal of Immunological Methods. vol. 277 p.141-155. 2003.

Brooks, S. *Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use—implications of choice of expression system*. Mol. Biotechnol. Vol. 28. P.241–255. 2004.

Brown A. J.; Sweeney B.; Mainwaring D. O.; James, D. C. *Synthetic promoters for CHO cell engineering*. Biotechnol Bioeng. p.111:1638–L.2014.

Brown, A. J.; Sweeney, B.; Mainwaring, D. O.; James, D. C. *NF-Kappa-Beta, Cre and YY1 elements are key functional regulators of CMV promoter-driven transient gene expression in CHO cells*. Biotechnol. J. vol.10. p. 1019-1028. 2015.

Bugaut A.; Balasubramanian, S. *5'-UTR RNA G-quadruplexes: Translation regulation and targeting*. Nucleic. Acids. Res. Vol. 40(11). P.4727–4741. 2012.

Büssow, K. *Stable mammalian producer cell lines for structural biology*. Curr. Opin. Struct. Biol. Vol. 32. P. 81-90. 2015.

Cambray, G. J. C.; Mutalik, V. K.; Lam, C.; Mai, Q. A.; Thimmaiah, T. Carothers, J. M.; Arkin, A. P.; Endy, D. *Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators*. Nucleic. Acids Res. Vol. 41. P.5139–5148. 2013.

- Cao, J.; Novoa, E. M.; Zhang, Z.; Chen, W. C. W.; Diambo, L.; Choi, G. C. G.; Wong, A. S. L.; Wehrspaun, C.; Kellis, M.; Lu, T. K. *High-throughput 5'UTR engineering for enhanced protein production non-viral gene therapies*. BioRxiv, 25 de Março, 2020.
- Carver, J.; Ng, D.; Zhou, M.; Ko, P.; Zhan, D.; Yim, M.; Shaw, D.; Snedecor, B.; Laird, M. W.; Lang, S.; Shen, A.; Hu, Z. *Maximization antibody production in a targeted integration host by optimization of subunit gene dosage and position*. Biotech. Progress. Vol. 36. e2967. 2020.
- Chai, Y. R.; Ge, M. M.; Wei, T. T.; Jia, Y. L.; Guo, X. Wang, T. Y. *Human rhinovirus internal ribosome entry site element enhances transgene expression in transfected CHO-S cells*. Sci. Rep. Vol. 8 p. 6661. 2018.
- Chan, K.K.; Wu, S.M.; Nissom, P.M.; Oh, S.K.; Choo, A.B. *Generation of high-level stable transgene expressing human embryonic stem cell lines using Chinese hamster elongation factor-1 alpha promoter system*. Stem. Cells. Dev. Vol. 17. P.825–836. 2008.
- Chapman WC, Singla N, Genyk Y, et al. A phase 3, randomized, double-blind comparative study of the efficacy and safety of topical recombinant human thrombin and bovine thrombin in surgical hemostasis. *J Am Coll Surg*. 205(2):256-265. 2007.
- Chen, Z.; Iding, K.; Lutkemeyer, D.; Lehmann, J. *A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin*. Biotechnology Letters. Vol. 22. P. 837-841. 2000.
- Chetverina, D., Aoki, T., Erokhin, M., Georgiev, P., Schedl, P., Making connections: insulators organize eukaryotic chromosomes into independent cis-regulatory networks. *Bioessays*. Vol. 36. P.2163-172. 2014.
- Chusainow, J.; Yang, Y. S.; Yeo, J. H. M.; Toh, P. C.; Asvadi, P.; Wong, N. S. C.; Yap, M. G. S. *A study of monoclonal antibody producing CHO cell lines – what makes a stable high producer?* Biotechnol. Bioeng., vol. 102. p. 1182-1196. 2009.
- Costa, A. R.; Rodrigues, M. E.; Henriques, M.; Azeredo, J.; Oliveira, R. *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*. Eur. J. Pharm. Biopharm. Vol.74. P.127–138. 2010.

Coughlin, S. R. *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J. Thromb. Haemost., pp. 1800-18143. 2005.

Cuesta, R.; Xi, Q.; Schneider, R. J. *Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F*. EMBO J. 19:3465–3474. 2000.

Curran, K. A.; Karim, A. S.; Gupta, A.; Alper, H.; *Use of expression-enhancing terminators in Saccharomyces cerevisiae to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications*. Metabolic Engineering. Vol. 19. P. 88-97. 2013.

Dahodwala, H.; Lee, K. H. *The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem*. Current Opinion in Biotechnology, Vol. 60, 128-137. Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, Newark, Estados Unidos. 2019.

Dalgaard, K.; Evers, M.; Silva, J. S. *Biosimilars seven years on: Where are we and what's next?* Insights into Pharmaceuticals and Medical Products. McKinsey and Company. Fevereiro de 2013.

Das, J.; Ghosh, J.; Manna, P.; Sil, P. C. *Protective Role of Taurine against Arsenic-Induced Mitochondria-Dependent Hepatic Apoptosis via the Inhibition of PKC δ -JNK Pathway*. PLoS one. Vol. 5. n^o9. Setembro, 2020.

Davy, A. M.; Kildegaard, H. F.; Andersen, M. R. *Cell Factory Engineering*. Department of Biotechnology and Biomedicine. Cell Systems Review 4, 22 de Março de 2017.

Derouazi, M.; Girard, P.; Tilborgh, F. van.; Iglesias, K.; Muller, N.; Bertschinger, M.; Wurm, F.M. *Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells*. Biotechnol. Bioeng. Vol. 87. 537 – 545. 2004.

Dhillon, S. Fibrin Sealant (Evicel® [Quixil®/Crosseal™]). *Drugs* **71**, 1893–1915. <https://doi.org/10.2165/11207700-000000000-00000>. 2011.

Digermann, T. *Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges*. Institute for Pharmaceutical Biology, Goethe University, Frankfurt/Main, Alemanha. Biotechnol. J. Vol.3, 90-97. 2008.

Dikstein, R. *Transcription and translation in a package deal: The TISU paradigm*. Gene Vol. 491(1). P.1–4. 2012.

Dingemman, T. *Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges*. Biotechnol. J, vol. 3. P. 90-97. 2008.

Dolph, P. J.; Huang, J.; Schneider, R. *Translation by the Adenovirus Tripartite Leader: Elements which determine Independence from Cap-Binding Protein Complex*. Journal of Virology. vol. 64. n°6. p.2669-2677. 1990.

Dominguez, D. I.; Ryabova, L. A.; Pooggin, M. M.; Schmidt-Puchta, W.; Futterer, J.; Hohn, T. *Ribosome Shunting in Cauliflower Mosaic Virus: Identification of an essential and sufficient structural element*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 273. N.6. P.3669-3678. 1998.

Donello, J. E; Loeb, J. E; Hope, T. J. "*Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element*". J. Virol. 72 (6): 5085–92. Hum. Gene Ther. 10, 2295–2305. 1998.

Dorai, H.; Corisdeo, S.; Ellis, D.; Kinney, C.; Chomo, M.; Hawley-Nelson, P.; Moore, G.; Betenbaugh, M. J.; Ganguly, S. *Early prediction of instability of chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins*. Biotechnol. Bioeng. Vol. 109 P.1016–1030. 2012.

Dragone, G.; Mussato, S. I.; Silva, J. B. A. *Utilização de mostos concentrados na produção de cerveja pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade*. Cienc. Tecnol. Aliment. Vol.27. P.37-40. Agosto de 2007.

Du, Z.; Treiber, D.; McCarter J. D.; Fomina-Yadlin, D.; Saleem, R. A.; McCoy, R. E.; Zhang, Y.; Tharmalingam, T.; Leith, M.; Follstad, B. D.; Dell, B.; Grisim, B.; Zupke, C.; Heath, C.; Morris, A. E.; Reddy, P. *Use of a Small Molecule Cell Cycle Inhibitor to Control Cell Growth and Improve Specific Productivity Quality of Recombinant Proteins in CHO Cell Cultures*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 112. N°1. Janeiro, 2015.

EARTO Impact Deliverd. *The TRL Scale as a Research and Innovation Policy Tool, EARTO Recommendations*. 30 de Abril de 2014.

Eisenhut, P.; Mebrahtu, A.; Bazardd, M. M.; Thalén, N.; Klanert, G.; Weinguny, M.; Sandegren, A.; Su, C.; Hatton, D.; Borth, N.; Rockberg, J. *Systematic use of synthetic 5'UTR RNA structures to tune protein translation improves yield and quality of complex proteins in mammalian cells factories*. Nucleic Acid Research. Vol. 48, N°20 e119. 2020.

EVALUATE PHARMA. World Preview 2019, Outlook to 2024. 12ª Edição. Junho, 2019.

F. Mancia, S.D. Patel, M.W. Rajala, P.E. Scherer, A. Nemes, I. Schieren, W.A. Hendrickson, L. Shapiro. *Optimization of protein production in mammalian cells with a coexpressed fluorescent marker*. Structure (Camb). Vol.12. pp. 1355-1360. 2004.

Facco, P.; Zomer, S.; Rowlan-Jones, R. C.; Marsh, D.; Diaz-Fernandes, P.; Pinka, G.; Bezzo, F.; Barolo, M. *Using data analytics to accelerate biopharmaceutical process scale-up*. Biochemical Engineering Journal. 164. 2020.

Flint, J.; Racaniello, V. R.; Rall, G. F.; Skalka, A. M. *Principles of Virology*, 4th Edition, 2015.

Fourn, V. L.; Girod, P.A.; Buceta, M.; Regamey, A.; Mermoud, N. *CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion*. Metabolic Engineering. Vol. 21. P.91-102. 2014.

Furukawa, K.; Ohsuye, K. *Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alfa-amidating enzyme*. Cytotechnology. Vol. 26. P.153-164. 1998.

Gilbert, A.; Huang, Y.; Ryll, T. *Identifying and eliminating cell culture process variability*. Pharm. Bioprocess. Vol.2(6). P.519-534. 2014.

Gingold, H. Pilpel, Y. *Determinants of translation efficiency and accuracy*. Mol Syst Biol 7:481. 2011.

Gomez, N.; Subramanian, J.; Ouyang, J.; Nguyen, M. D. H.; Hutchinson, M.; Sharma, V. K.; Lin, A. A.; Yuk, I. H. *Culture Temperature Modulates Aggregation of Recombination Antibody in CHO Cells*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 109. N.1. Janeiro, 2012.

Gosselin R, Douxfils J. Ecarin based coagulation testing. *American Journal of Hematology*.10.1002/ajh.25852, **95**, 7, (863-869). 2020.

Greene, E.; Cazacu, D.; Tamot, N.; Castellano, S.; Datar, A.; Kronkaitis, A.; Gebhard, D.; Reed, J. Mawson, P.; Florin, L.; Rossi, N.; Lauer, A.; Juckmen, L.; Nixon, A.; Wenger, T.; Sen, S. *Optimization of a transient antibody expression platform towards high titer and efficiency*. *Biotechnol. J.* 2000251. 2021.

Greenhalgh D.G.; Gamelli R.L.; Collins J.; Sood R.; Mazingo D.W.; Gray T.E.; Alexander W.A. *Recombinant thrombin: safety and immunogenicity in burn wound excision and grafting*. *J Burn Care Res.* May-Jun;30(3):371-9. 2009.

Guidini, C. Z. *Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregando Saccharomyces cerevisiae de Características Floculantes*. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Uberlândia, MG. Abril, 2013.

Guo, J. *Transcription: the epicenter of gene expression*. *Jornal da Universidade de Zhejiang (Biomedicina e Biotecnologia)*. Vol.15(5). P.400-411. 2014.

Gupta, S. K.; Srivastana, S. K.; Shama, A.; Nalage, V. H. H.; Salvi, D.; Kushwaha, H.; Chitnis, N. B.; Shukla, P. *Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform*. *PLoS ONE*. Vol.12(8): e0181455. 2017.

Gutierrez, J. M.; Feizi, A.; Li, S.; Kallehauge, T. B.; Hefzi, H.; Grav, L. M.; Ley, D.; Hizal, D. B.; Betenbaugh, M. J.; Voldborg, B.; Kildegaard, H. F.; Lee, G. M.; Palsson, B. O.; Nielsen, J.; Lewis, N. E. *Genome-scale reconstruction of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion*. *Nature Communications*. Vol.11:68. 2020.

Hacker, D.L., S. Balasubramanian. *Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools*. *Curr Opin Struct. Biol.* Vol. 38. p.129-136. 2016.

Hamann, T., and Lange, L. *Discovery, cloning and heterologous expression of secreted potato proteins reveal erroneous pre-mRNA splicing in Aspergillus oryzae*. *J. Biotechnol.* Vol. 126. p.265–276. 2006.

Hansen, H. G.; Pristovsek, N.; Kildegaard, H. F.; Lee, G. M. *Improving the secretory capacity of Chinese hamster ovary cells by ectopic expression of effector genes:*

Lessons learned and future directions. Biotechnology Advances. Vol. 35. P.64-76. 2017.

Harraghy, N.; Calabrese, D.; Fisch, I.; Girod, P.A.; LeFourn, V.; Regamey, A.; Mermod, N. *Epigenetic regulatory elements: Recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells*. Biotechnol. J. vol. 10. pp. 967-978. 2015.

Hauser, H. *Cell Line Development*. Cell Engineering, [s.l.], p.1-25, 5 de Novembro de 2014.

Heffernan, J. et al. "Preclinical safety of recombinant human thrombin." *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 47 1 (2007): 48-58.

Heinz, S.; Romanoski, C. E.; Benner, C.; Glass, C. K. *The selection and function of cell type-specific enhancers*. Nature – Mol. Cell Bio. Vol. 16. Março, 2015.

Hertz, M. I.; Landry, D. M.; Willis, A. E.; Luo, G.; Thompson, S. R. *Ribosomal Protein S25 Dependency Reveals a Common Mechanism for Diverse Internal Ribosome Entry Sites and Ribosome Shunting*. Molecular and Cellular Biology. Vol. 33. P. 1016-1026. Março, 2013.

Hood, H. M.; Neafsey, D.E.; Galagan, J.; Sachs, M.S. *Evolutionary roles of amountante open reading frames in mediating gene regulation in fungi*. Annu Rev Microbiol 63:385–409.2009.

Hope, T. J.; Zufferey, R.; Trono, D.; Donello, J. E. *RNA export element*. Patente n°6136597. 24 de Outubro, 2000.

Hu, Z.; Hsu, W.; Pynn, A.; Ng, D.; Quicho, D.; Adem, Y.; Kwong, Z.; Mauger, B.; Joly, J.; Snedecor, B.; Laird, M. W.; Andersen, D. C.; Shen, A. *A Strategy to Accelerate Protein Production from a Pool of Clones in Chinese Hamster Ovary Cells for Toxicology Studies*. Biotechnol. Prog. Vol. 33 n°6. 2017.

Hu, Z.; Tee, W. W. *Enhancers and chromatin structures: regulatory hubs in gene expression and diseases*. Bioscience Reports. Vol. 37. 2017.

Huang, Z.; Yoon, S. *Identifying metabolic features and engineering targets for productivity improvement in CHO cells by integrated transcriptomics and genome-scale metabolic model*. Biochemical Engineering Journal. Vol. 159. 2020.

IFPMA - *International Federation of Pharmaceutical Manufactures & Associations. The Pharmaceutical Industry and Global Health – Facts and Figures 2017*. Switzerland, Fevereiro, 2017.

Izumi, M., Gilbert, D. M. *Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts*. J. Cell. Biochem. Vol. 76. P. 2280-289. 1999.

Jayapal, K. P.; Wlaschin, K. F.; Hu, W.S. *Recombinant Protein Therapeutics from CHO cells – 20 years and Counting*. CHO consortium – SBE Special Section. Society for Biological Engineer. 2017.

Johansen, J.; Tornoe, J.; Moller, A.; Johansen, T. E. *Increased in vitro and in vivo transgene expression levels mediated through cis-acting elements*. J. Gene Med. Vol. 5. P.1080–1089. 2003.

Joosten, C. E.; Leist, C.; Schmidt, J. *Cell cultivation process*. Patente N°US8.765.413B2, Junho de 2014.

Kaufman, W.L.; Kocman, I.; Agrawal, V.; Rahn, H.P.; Besser, D.; Gossen, M. *Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation*. Nucleic Acids Res., Vol. 36. 2008.

Kaufmann, H.; Mazur, X.; Fussenegger, M.; Bailey, J. E. *Influence of Low Temperature on Productivity, Proteome and Protein Phosphorylation of CHO Cells*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 63. N.5. 1999.

Kim, Y. J.; Han, S. K.; Yoon, S.; Kim, C. W. *Rich production media as a platform for CHO cell line development*. AMB Express. 10:93. 2020.

Klein, R.; Ruttkowski, B.; Knapp, E.; Salmons, B.; Gunzburg, W. H.; Hohenadl, C. *WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific*. Gene 372. 153-161. 2006.

Kochetov, A.V. *Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs*. Bioessays. Vol. 30. N°7. P.683–691. 2008.

Kotsopoulou, E.; Priest, R. C.; Uden, M. *Improved method for selecting high producing cell lines*. Publicação de Aplicação de Patente dos Estados Unidos N°US2013/0090259A1, 11 de Abril de 2013.

Kotsoupoulou, E.; Priest, R. C.; Uden, M. *Improved method for selecting high producing cell lines*. Patente n° US2013/0090259A1. 11 de Abril de 2013.

Kovnir, S.V.; Orlova, N. A.; Shakhparanov, M. I.; Skryabin, K. G.; Gabibov, A. G.; Vorobiev, I, I, *A Highly Productive CHO Cell Line Secreting Human Blood Clotting Factor IX*. ACTA NATURA E. Vol. 10. N°1(36). 2018.

Kozak, M. *Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes*. Gene 361(0). P.13–37. 2005.

Kozak, M. *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell 44(2):283–292. 1986.

Lawson J.H.; Lynn K.A.; Vanmatre R.M.; Domzalski T.; Klemp K.F.; Ortel T.L.; Niklason L.E.;, Parker W. *Antihuman factor V antibodies after use of relatively pure bovine thrombin*. Ann Thorac Surg. Mar;79(3):1037-8. doi: 10.1016/j.athoracsur.2003.09.110. PMID: 15734434. 2005.

Lee, G. M.; Koo, J. *Osmolarity Effects, Chinese Hamster Ovary Cell Culture*. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Biopreparation, and Cell Technology. John Wiley and Sons, Inc. 2010.

Lee, Y. Y.; Wong, K. T. K.; Tan, J.; Toh, P. C.; Mao, Y.; Brusic, V.; Yap, M. G. S. *Overexpression of heat shock proteins (HSPs) in CHO cells for extened culture viability and improved recombinant protein production*. Journal of Biotechnology. Vol. 143. N.1. P.34-43. 10 de Agosto de 2009.

Li, S. *Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection*. Cells. Vol.8. 2019.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., Kain, S.R. *Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter*. J. Biol. Chem. 273 (52), 34970–34975. 1998.

Liang, S.; Moghimi, B.; Yang, T.; Strouboulis, J.; Bungert, J. *Locus control regions mediated regulation of adult Beta-globin gene expression*. J. Cell. Biochem. vol. 105(1); p.9-16. 1 de Setembro, 2008.

Living Colors® Destabilized EGFP Vectors, 1998. CLONTECHniques XIII (2), 16–17.

Loeb, J. E.; Cordier, W. S.; Harris, M. E.; Weitzman, M. D.; Hope, T. J. *Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy*. Hum. Gene Ther. 1(14):2295-305. 1999.

Loetscher, P.; Pratt, G.; Rechsteiner, M.; *The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase*. J. Biol. Chem. 266 (15), 11213–11220. 1991.

Logan, J.; Shenk, T. *Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 81, P. 3655-3659, Junho, 1984.

Ma, S.; Yang, Y. *A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, Fed-batch, and Continuous Fermentation*. Eppendorf, App. Note. n°408. (?).

Majocchi, S.; Aritonovska, E.; Mermod, N. *Epigenetic regulatory elements associate with specific histone modifications to prevent silencing of telomeric genes*. Nucleic. Acids Res. Vol. 42. P.193–204.

Maksimenco, O. G.; Chetverina, D. A.; Georgiev, P. G. *Insulators of Higher Eukaryotes: Properties, Mechanisms of Actions, and Role in Transcriptional Regulation*. Russian Journal of Genetics. vol. 42, n°8, pp845-857. 2006.

Mancia F.; Patel, S. D.; Rajala, M. W.; Scherer, P. E.; Nernes, A.; Schieren, I.; Hendrickson, W. A.; Shapiro, L. *Optimization of Protein Production in Mammalian Cells with a Coexpressed Fluorescent Marker*. Structure, Vol. 12, 1355-1360, Agosto de 2004.

Mankis, J. C. *Technology Readiness Levels. A White Paper*. Advanced Concepts Office. Office of Space Access and Technology. NASA. April 6, 1995.

Mariati, Ho, S. C., Yap, M. G., and Yang, Y. *Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells*. Protein Expr. Purif. 69, 9–15. doi: 10.1016/j.pep.2009.08.010. 2010.

Martínez, J. A.; Bulté, D. B.; Conteras, M. A.; Palomares, L. A.; Ramírez, O. T. *Dynamic modeling of CHO cell metabolism using the hybrid cybernetic approach with a novel elementary mode analysis strategy*. Departamento de Medicina Molecular e

Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional do México, Cuernavava – México. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8:279. 15 de Abril de 2020.

Martínez, V. S.; Dictmair, S.; Quack, L.E.; Hodson, M. P.; Gray, P.; Nielsen, L. K. *Flux Balance Analysis of CHO Cells Before and After a Metabolic Swich From Lactate Production to Consumption*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 110. N.2. Fevereiro de 2013.

Mastroiannopoulos, N. P.; Feldman, M.L.; Uney, J.B.; Mahadevan, M.S.; Phylactou, L.A. *Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of yotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts*. *EMBO Rep*. 6 458–463. 2005.

Matasci M, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM. *The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability*. *Biotechnol Bioeng*. 2011. Vol. 108(9):2141-50.

Mather, J. P.; Tsao, M. C. *Method for culturing Chinese hamster ovary cells to improve production of recombinant proteins*. Patente nº 5122469. 16 de Junho de 1992.

Meleady, P.; Doolan, P.; Henry, M.; Barron, N.; Keenan, J.; Sullivan, F.; Clarke, C.; Gammell, P.; Melville, M. W.; Leonard, M.; Clynes, M. *Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype*. *BMC Biotechnology*. Vol.11:78. 2011.

Mignone, F.; Gissi, C.; Liuni, S.; Pesole, G. *Untranslated regions of mRNAs*. *Genome Biol*. Vol. 3(3): reviews0004.1–0004.10. 2002.

Mitchell, S. F.; Walker, S. E.; Algire, M. A.; Park, E.H.; Hinnebusch, A. G.; Lorsh, J. R. *The 5'-7-methylguanosine cap on eukaryotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway*. *Mol. Cell*. Vol. 39(6). P.950–962. 2010.

Mitrophanous, K. Rohll, J.; Miskin, J.; Kingsman, S. M. *Vector System*. Patente nº US7419829B2. 2 de Setembro de 2008.

- Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Hayakawa, T. *IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector*. *Molecular Therapy*. Vol. 1. N°4. Abril, 2000.
- Moore, A.; Mercer, J.; Dutina, G.; Donahue, C. J.; Bauer, K. D.; Mather, J. P.; Etcheverry, T.; Ryll, T. *Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch culture*. *Cytotechnology*. Vol.23. P.47-54. 1997.
- Moreau-Gaudry, F.; Xia, P.; Jiang, G.; Perelman, N. P.; Bauer, G.; Ellis, J.; Surinya, K. H.; Mavilio, F.; Shen, C. K.; Malik, P. *High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors*. *Blood* 98: P.2664–2672. 2001.
- Mountford, P. S.; Smith, A. G. *Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis*. *Trends Genet*. Vol. 11. P.179-184. 1995.
- Murad, A. B. *Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção de eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão*. *Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos*. Rio de Janeiro, RJ. 2015.
- Neville, J. J.; Orlando, J.; Mann, K.; McCloskey, B.; Antoniou, M. N. *Ubiquitous Chromatin-opening Elements (UCOE)s: Applications in biomanufacturing and gene therapy*. *Biotechnology Advances*. Vol. 35. P.557-564. 2017.
- Nienow, A. W.; Hewitt, C. J.; Heathman, T. R. J.; Glyn, V. A. M., Fonte, G. N.; Hanga, M. P.; Coopman, K.; Rafiq, Q. A. *Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms*. *Biochemical Engineering Journal*. Vol.108. P.24-29. 2016.
- Osterlehner, A.; Simmeth, S.; Gopfert, U. *Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines*. *Biotechnol. Bioeng*. Vol. 108. P.2670–2681. 2011.
- Patel, N. A.; Anderson, C. R.; Terkildsen, S. E.; Davis, R. C.; Pack, D. L.; Bhargava, S.; Clarke, H. R. G. *Antibody Expression Stability in CHO Clonally Derived Cell Lines and Their Subclones: Roles of Methylation in Phenotypic and Epigenetic Heterogeneity*. *Biotechnol. Prog*. Vol. 34. N. 3. 2018.

- Pfeiffer, B. D.; Truman, J. W.; Rubin, G. M. *Using translational enhancers to increase transgene expression in Drosophila*. PNAS, vol. 109. n°17. p.6626-6631. Abril 24, 2012.
- Pfleger, B. F.; Pitera, D. J.; Smolke, C. D.; Keasling, J. D. *Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes*. Nat. Biotechnol. Vol. 24. P.1027–1032. 2006.
- Philips-Cremins, J. E.; Corces, V. G. *Chromatin Insulators: Linking genome organization to cellular function*. Departamento de Biologia da Universidade de Emory, Atlanta - USA. Mol. Cell. Vol. 50(4). P.461-474. 23 de Maio, 2013.
- Pickering, B. M.; Willis, A. E. *The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease*. Semin. Cell Dev. Biol. Vol.16(1). P.39–47. 2005.
- Popa, I.; Harris, M. E.; Donello, J. E.; Hope, T. J. *CRM1-Dependent Function of a cis-Acting RNA Export Element*. Molecular and Cellular Biology. vol.22. n°7. p.2057-2067. 2002.
- Portner, R. *Animal Cell Biotechnology. Métodos e Protocolos 4ª Edição*. Instituto de Bioprocessos e Engenharia de Biosistemas. Universidade de Tecnologia de Hamburgo. Alemanha. 2020.
- Priola, J. J.; Calzadilla, N.; Baumann, M.; Borth, N.; Tate, C. G.; Betenbaugh, M. J. *High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production*. Biotechnol. J. 2016, 11.
- Rader, R. A. *(Re)defining biopharmaceutical*. Nature Biotechnology. Vol 26, n°7. Julho, 2018.
- Rajendra, Y.; Sowmya, B.; Hacker, D. *Large-Scale Transient Transfection of Chinese Hamster Ovary Cells in Suspension*. Methods Mol. Biol. Vol.1603. P.45-55. 2017.
- Ramezani, A.; Hawley, T. S.; Hawley, R. G. *Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells*. Mol. Ther. Vol.2. P.458–469. 2000.
- Ramke, M.; Lee, J. Y.; Dyer, D. W.; Seto, D.; Rajaiya, J. Chodosh, J. *The 5'UTR in human adenoviruses: leader diversity in late gene expression*. Scientific Reports, 7:618. Abril, 2017.

Regl, C.; Wohlschlager, T.; Holzmann, J.; Huber, C. G. *A Generic HPLC Method for Absolute Quantification of Oxidation in Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins Using UV and MS Detection*. Anal. Chem. Vol. 89. P. 8391-8398. 2017.

Rodrigues, T. V. D. *Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoids em meio agroindustrial por Rhodotorula mucilaginosa*. Universidade Federal do Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos. Rio Grande, RS. 2018.

Rohll, J. B.; Percy, N.; Ley, R.; Evans, D. J.; Almond, J. W.; Barclay, W. S. *The 59-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation*. J. Virol. Vol.68. P.4384–4391.1994.

Romanova, N.; Noll, T. *Engineered and Natural Promoters and Chromatin-Modifying Elements for Recombinant Protein Expression in CHO cells*. Biotechnol. J. Vol. 13, 1700232. 2018.

Running, J. D.; Allison, D. S. *High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene*. Biotechnol. Prog. Vol.20. P.880–889. 2004.

Salerno, M. S.; Matsumoto, C.; Ferraz, I. *Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para o seu desenvolvimento*. IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília, Julho de 2018.

SARTORIUS Stedim Biotech. ambr[®] 15 cell culture Microcarriers. Disponível em: <<https://www.sartorius.com/download/496080/3/app-note-ambr-15-microcarrier-sbi1108-e-data.pdf>>.Acesso em 09/03/2021 às 13h29min.

Schmelzer, A. E.; Miller, W. M. *Effects of Osmoprotectant Compounds on NCAM Polyasilylation Under Hyperosmotic Stress and Elevated pCO₂*. Biotechnology and Bioengineering. Vol.77. N.4. 15 de Fevereiro de 2002.

Sewell, D. J.; Turner, R.; Field, R.; Holmes, W.; Pradhan, R.; Spencer, C.; Oliver, S.; Slater, N. KH.; Dikicioglu, D. *Enhancing functionality of a microscale bioreactor system as an industrial process development tool for mammalian perfusion culture*. Biotechnology and Bioengineering. Vol.116. P.1315-1325. 2019.

Sherril, K. W.; Lloyd, R. E. *Translation of cIAP2 mRNA is mediated exclusively by stress-modulated ribosome shunt*. Molecular and Cellular Biology. P. 2011-2022. 2008.

Silva, B. G. *Avaliação de características cinéticas e metabólicas de dois hibridomas para produção de anticorpos monoclonais para tipagem sanguínea*. Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. São Carlos, SP. 2012.

Singla N.K.; Ballard J.L.; Moneta G, Randleman C.D. Jr.; Renkens K.L.; Alexander W.A. *A phase 3b open-label, single-group immunogenicity and safety study of topical recombinant thrombin in surgical hemostasis*. *J Am Coll Surg*.209(1):68-74. 2009.

Singla N.K.; Gasparis A.P.; Ballard J.L.; Baron J.M.; Butine M.D.; Pribble J.P.; Alexander W.A.; *RECOTHROM Re-Exposure Study Group*. *Immunogenicity and safety of re-exposure to recombinant human thrombin in surgical hemostasis*. *J. Am Coll Surg*. Dec;213(6):722-7. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2011.08.019. 2011.

Small, S.; Amosti, D. N. *Transcriptional Enhancers in Drosophila*. Gene Expression, Flybook. Genetics, vol. 216, 1-26. Setembro, 2020.

Smelko, J. P.; Wiltberger, K. R.; Hickman, E. F.; Morris, B. J.; Blackburn, T. J.; Ryll, T. *Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems*. Biotechnol. Prog. Vol.27. N.5. 2011.

Sreenivasan, S.; Kumar, D.; Malani, H.; Rathore, A. S. *Does interaction of monoclonal antibody charge variants with VEGF-A and ELISA reagents affect its quantification*. Analytical Biochemistry. 590. 2020.

Sunley, K.; Tharmalingam, T.; Butler, M. *CHO Cells Adapted to Hypothermic Growth Produce High Yields of Recombinant Beta-Interferon*. Biotechnol. Prog. Vol. 24. p.898-906. 2008.

Szutorisz, H.; Dillon, N.; Tora, L. *The Role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment*. TRENDS in Biochemical Sciences. Vol.30. n°11. Novembro, 2005.

Tabuchi, H.; Sugiyama, T.; Tanaka, S.; Tainaka, S. *Overexpression of taurine transporter in Cinhece Hamster Ovary Cells Can Enhance Cell Viability and Product Yield, While Promoting Glutamine Consumption*. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 107, n°6, 2010.

Takagi, Y.; Yamazaki, T.; Masuda, K.; Nishii, S.; Kawakami, B.; Omasa, T. *Identification of regulatory motifs in the CHO genome for stable monoclonal antibody production*. *Cytotechnology*. 2017, 69, 3451-460.

Thirupati, A.; Pinho, R.; Baker, J. S. István, B.; Gu, Y. *Taurine Reverses Oxidative Damages and Restores the Muscle Function in Oversure of Exercised Muscle*. *Frontiers in Physiology*. Vol. 11. Outubro, 2020.

Toussaint, C.; Henry, O.; Durocher, Y. *Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures*. *Journal of Biotechnology*. Vol. 217. P.122-131. 2016.

Trummer, E.; Fauland, K.; Seidinger, S.; Schrielbl, K.; Lattenmayer, C.; Kunert, R.; Vorauer-Uhl, K.; Robert, W.; Borth, N.; Katinger, H.; Muller, D. *Process Parameter Shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the Performance of Epo-Fc Expressing CHO Cells Cultivated in Controlled Batch Bioreactors*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 94. N°6. 20 de Agosto, 2006.

Velugula-Yellela, S. R.; Willians, A.; Trunfio, N.; Hsu, C.J.; Chavez, B.; Yoon, S.; Agarabi, C. *Impact of Media and Antifoam Selection on Monoclonal Antibody Production and Quality Using a High Throughput Micro-Bioreactor System*. *Biotechnol. Prog.* Vol. 34, n°1. 2018.

Waegeman, H. e Soetaert, W. *Increasing recombinant protein production in Escherichia coli through metabolic and genetic engineering*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 38:1891-1910.

Walsh, G. & Jefferis, R. *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*. *Nat. Biotechnol.* Vol.24. P.1241–1252. 2006.

Walsh, Gary. *Biopharmaceutical benchmarks 2018*. *Nature Biotechnology*. Vol.36. N.12. Dezembro, 2018.

Wang, X.; Zhang, W.; Jia, Y.; Wang, M.; Yi, D.; Wang, T. *Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element improves transgene expression and stability by episomal vectors in CHO-K1 cells*. *Acta Biochim. Biophys.* Vol. 52(11). P.1285-1288. 2020.

Wang, Z.; Treder, K.; Miller, W. A. *Structure of a Viral Cap-independent Translation Element That Functions via High Affinity Binding to the eIF4E Subunit of eIF4F*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 284. N°21. P.14189-14202. 22 de Maio de 2009.

Ward, O. P. *Production of recombinant proteins by filamentous fungi*. Departamento de Biologia, Universidade de Waterloo, Ontário, Canadá. *Biotechnology Advances*. Vol. 30. P.1119-1139. 2012.

Weingarten-Gabbay, S.; Khan, D.; Liberman, N.; Yoffe, Y.; Bialik, S.; Das, S.; Oren, M.; Kimchi, A. *The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA*. *Oncogene*. Vol. 33. P.611-618. 2014.

Welch, J. T.; Arden, N. S. *Considering “clonality”: A regulatory perspective on the importance of the clonal derivation of mammalian cell banks in biopharmaceutical development*. *Biologicals*. Vol. 62. P.16-21. 2019.

Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J. L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; Paux, E.; SanMiguel, P.; Schulman, A. H. *A unified classification system for eukaryotic transposable elements*. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 12, p. 973–82, dez. 2007.

Wilkens, C. A.; Altamiro, C.; Gerdtzen, Z. P. *Comparative Metabolic Analysis of Lactate for CHO Cells in Glucose and Galactose*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol.16. P.714-724. 2011.

Williams, S.; Mustoe, T.; Mulcahy, T.; Griffiths, M.; Simpson, D.; Antoniou, M.; Irvine, A.; Mountain, A.; Crombie, R. *CpG-island fragments from the HNRPA2BI/CBX3 genomics locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells*. *BCM Biotechnology*. Vol.5. n°17. 2005.

Wong, C.H. *Protein glycosylation: new challenges and opportunities*. *J. Org. Chem.* Vol. 70. P. 4219–4225. 2005.

- Wung, F. M. *CHO Quasispecies – Implications for manufacturing processes*. Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland. Process. Vol.1. P.296-311. 2013.
- Wurm, F. M. *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nature Biotechnology. Vol. 22. N.11. Novembro de 2004.
- Xen, Z.; Lutkemeyer, D.; Iding, K. Lehmann, J. *High-density culture of recombinant Chinese hamster ovary cells producing prothrombin in protein-free medium*. Biotechnology Letters. Vol.23. p. 767-770. 2001.
- Xi, Q., Cuesta, R.; Schneider, R. J. *Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs*. J. Virol. 79, 5676-5683. 2005.
- Xi, Q., Cuesta, R.; Schneider, R. J. *Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by 100k protein drives ribosome shunting*. Genes Dev. Vol.18. P.1997–2009. 2004.
- Xia, W.; Bringmann, P.; McClary, J.; Jones, P. P.; Manzana, W.; Zhu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Harvey, S.; Madlansacay, M. R.; McLean, K.; Rosser, M. P.; MacRobbie, J.; Olsen, C. L.; Coob, R. R. *High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines*. Protein Expression and Purification. Vol. 45. P.115-124. 2006.
- Xia, X.; Holcik, M. *Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure*. PLoS One. Vol. 4(1):e4136. 2009.
- Xu, J.; Rehmann, M. S.; Xu, M.; Zheng, S.; Hill, C.; He, Q.; Borys, M. C.; Li, Z. J. *Development of an intensified fed-batch production platform with double titers using N-1 perfusion seed for cell culture manufacturing*. Bioresour. Bioprocess. Vol.7(17). 2020.
- Yamashita, R.; Suzuki, Y.; Takeuchi, N.; Wakaguri, H.; Ueda, T.; Sugano, S.; Nakai, K. *Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics*. Nucleic Acids Res. Vol. 36(11). P.3707–3715. 2008.
- Yang, Y.; Mariati; Chusainow, J.; Yap, M. G. S. *DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines*. J. Biotechnol. Vol. 147. P.180–185. 2010

- Yee, J. C.; Gerdtzen, Z. P.; Hu, WS. *Comparative Transcriptome Analysis to Unveil Genes Affecting Recombinant Protein Productivity in Mammalian Cells*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 102. N.1. 1 de Janeiro de 2009.
- Yoon, S. K.; Kim, S. H.; Lee, G. M. *Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity and Transcription Level of Anti-4-1BB Antibody in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells*. Biotechnol. Prog. Vol.19. P.1383-1386. 2003.
- Yueh, A.; Schneider, R. J. *Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells*. Genes and Development. Vol.10. P.1557-1567. 1996.
- Yueh, A.; Schneider, R. J. *Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S Rrna*. Genes and Development. Vol. 14. P.414-421. 2000.
- Yun, Y.; Adesanya, T. M.; Mitra, R.D. *A systematic study of gene expression variation at single-nucleotide resolution reveals widespread regulatory roles for uAUGs*. Genome Res. Vol. 22(6) P.1089–1097. 2012
- Zhang, X.; Jiang, R.; Lin, H.; Xu, S. *Fedding tricarboxylic acid cycle intermediates improves lactate consumption and antibody production in Chinese hamster ovary cells cultures*. Biotechnology Process Research and Development, Merck and Co, Inc, 2000.
- Zhu, M. M.; Goyal, A.; Rank, D. L.; Gupta, S. K.; Boom, T. V.; Lee, S. S. *Effects of Elevated pCO₂ and Osmolarity on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1: A Case Study*. Biotechnol. Prog. 2008. Vol.21. P.70-77. 2008.
- Kropp, C.; Massai, D.; Zweigerdt, R. *Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells*. Process Biochemistry. Vol.59. P.244-254. 2017.