

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Produção da proteína recombinante Interferon- β 1b na plataforma de síntese proteica livre de célula

Camila Hiromi Chiba

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção da proteína recombinante
Interferon- β 1b na plataforma de síntese
proteica livre de célula**

Camila Hiromi Chiba

Versão Corrigida

Dissertação apresentada para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como exigência para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

São Paulo

2019

Nome: CHIBA, Camila Hiromi

Título: Produção da proteína recombinante Interferon- β 1b na plataforma de síntese proteica livre de célula.

Dissertação apresentada para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Cp Chiba, Camila Hiromi
PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE INTERFERON- γ 1B
NA PLATAFORMA DE SÍNTESE PROTEICA LIVRE DE CÉLULA /
Camila Hiromi Chiba. - São Paulo, 2019.
p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

1. Cell-free. 2. Escherichia coli. 3. Proteínas
recombinantes. 4. Interferon. 5. DNA linear. I. T.
II. Stephano, Marco Antonio, orientador.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao professor Marco, pela oportunidade e confiança desde o início; pela orientação e dedicação a este trabalho.

Ao professor Adriano, pelos seus ensinamentos e por ter cedido um espaço em seu laboratório - fundamental para os experimentos deste estudo.

À USP e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de ser aluna da pós-graduação.

À minha família, Natalina, Fernando e Henrique, pelo amor, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e de cansaço e apoio incondicional.

Às minhas pequenas Nina e Lili, que, apesar de não humanas, são também parte de minha família e me fazem um bem enorme.

Às minhas amigas de infância Raíra e Isabella, que, embora longe, estiveram sempre presentes.

Aos amigos e colegas que a USP me deu, em especial Sibylle, Magali, Lola, Carol, Alexy, Rafael e todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho e desenvolvimento profissional e pessoal.

Às secretárias e técnicos do departamento, pela disponibilidade e ajuda.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Chiba, C. H. **Produção da proteína recombinante Interferon- β 1b na plataforma de síntese proteica livre de célula.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

Biofármacos e produtos imunobiológicos representam uma parcela significativa no mercado farmacêutico global. Cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo dependem desses produtos e, muitas vezes, necessitarão delas para o resto de suas vidas. Até o momento, a tecnologia convencional para síntese dessas proteínas recombinantes é a expressão baseada em células. Porém, este sistema está frequentemente associado a problemas como a degradação da proteína-alvo devido à presença de nucleases e proteases, agregação com formação de corpos de inclusão e perda de molde de DNA. A plataforma de síntese proteica livre de células (do inglês Cell-Free Protein Synthesis ou CFPS) tem surgido como uma alternativa à expressão baseada em célula, permitindo a síntese de diversas proteínas, inclusive as de difícil expressão, na forma solúvel, em elevado rendimento e com capacidade de escalonamento. Este estudo buscou sintetizar a proteína interferon- β 1b humano recombinante (rhINF- β 1b) no sistema CFPS. Através de um trabalho de bioinformática, otimizou-se a sequência nucleotídica da proteína para expressão em lisado de *E. coli* e construiu-se um vetor de expressão linear, contendo promotor T7, RBS, região codificadora e um terminador T7. O sistema CFPS aceita molde de DNA no formato linear, que possui a vantagem de agilidade na preparação, sem a necessidade das etapas de clonagem, transformação, cultivo, extração e purificação do DNA. Também foi testado a expressão em DNA plasmidial, em que o gene do IFN foi clonado em vetor TOPO-TA Cloning. Para comparar os níveis de expressão foi utilizado esses mesmos vetores no sistema baseado em célula, com cepas de BL21(DE3) e Rosetta(DE3). Apesar da proteína de interesse não ter sido sintetizada com sucesso no sistema CFPS, foram dados alguns passos importantes para atingir este objetivo. No futuro, uma das prioridades é padronizar um sistema livre de células do laboratório capaz de fornecer um elevado rendimento para síntese de proteínas.

PALAVRAS-CHAVE: *Cell-free*, *Escherichia coli*, proteínas recombinantes, Interferon, DNA linear.

ABSTRACT

Chiba, C. H. **Cell-free protein synthesis of recombinant Interferon- β 1b**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

Biopharmaceutical and immunobiological products represent a growing share of the global pharmaceutical market. Around 400 million people worldwide are dependent of such proteins and, often, they are going to need for the rest of their lives. So far, the most employed biopharmaceutical production technology is cell-based expression. However, this system is usually associated with problems such as degradation of proteins due to the presence of endogenous nucleases or proteases, aggregation with inclusion bodies formation and loss of DNA template. Cell-Free Protein Synthesis (CFPS) platform has emerged as an alternative to cell-based expression, allowing synthesis of many types of proteins, including difficult-to-express proteins, proteins in soluble form, in high yield and possibility to scale up or down the process. This work sought to synthesize recombinant human interferon- β 1b (rhINF- β 1b) in CFPS system. Through a bioinformatics study, a nucleotide sequence of the target protein was optimized for expression in *E. coli* lysate and a linear DNA template was designed, containing a T7 promoter, a RBS, a coding sequence and a T7 terminator. The CFPS system accepts linear template DNA, which has the advantage of agility in the preparation, without the need for the steps of cloning, transformation, cultivation, extraction and purification of DNA template. Expression in plasmid DNA was also tested, wherein the IFN gene was cloned into TOPO-TA Cloning vector. To compare expression levels, the same vectors were used in the cell-based system with BL21 (DE3) and Rosetta (DE3) strains. Although the protein of interest was not successfully synthesized in the CFPS system, some important steps were taken to achieve this goal. In the future, one of the priorities is to standardize the lysate preparation for a high throughput protein production.

KEYWORDS: *Cell-free*, *Escherichia coli*, recombinant proteins, Interferon, linear DNA template.

Sumário

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Sistema de Síntese Proteica Livre de Célula	2
1.1.1. Vantagens e Desvantagens	6
1.1.2. Otimizações e avanços no sistema CFPS	8
1.1.3. Aplicações	10
1.2. Interferon e a Esclerose Múltipla	11
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. <i>In silico</i>	15
3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
3.3. Eletroforese em gel de agarose	17
3.4. Clonagem do Interferon- β 1b nos vetores de expressão pEXP5-NT/TOPO e pEXP5-CT/TOPO	17
3.4.1. Adição de adeninas às extremidades do produto de PCR	18
3.4.2. Clonagem molecular	18
3.5. Transformação	18
3.5.1. Preparo das cepas quimiocompetentes	18
3.5.2. Transformação	19
3.5.3. Seleção e Isolamento de colônias positivas	19
3.5.4. Preparo do banco	19
3.6. Extração e purificação do plasmídeo	19
3.7. Sequenciamento de DNA	20
3.8. Expressão no sistema de síntese proteica livre de célula	20
3.9. Expressão no sistema baseado em célula	21
	viii

3.10.	Análise da proteína	21
3.10.1.	Eletroforese em SDS-PAGE	21
3.10.2.	Western blotting	22
4.	Resultados e Discussão	23
4.1.	Análise do gene Interferon- β 1b	23
4.2.	Planejamento <i>in silico</i> do vetor de expressão linear	24
4.3.	Otimização de códon	25
4.4.	Design dos <i>primers</i>	27
4.5.	Verificação da sequência adquirida	28
4.6.	Preparo do vetor de expressão pEXP5/TOPO-IFN	30
4.7.	Sequenciamento genético	32
4.8.	Preparação do vetor de expressão linear	33
4.9.	Expressão CFPS	35
4.10.	Expressão celular	37
5.	Conclusão	40
	REFERÊNCIAS	41

Lista de Figuras

Figura 1: Comparação entre a expressão de proteínas através da síntese em célula (in vivo) e da síntese livre de célula (Cell-Free) (ROSENBLUM, G., COOPERMAN, B.S., 2014).	3
Figura 2: Representação esquemática de dímero cristalográfico do INF- β (Figura adaptada de Karpusas et al A estrutura cristalográfica do interferon β humanos com resolução de 2,2 Å, Proc Natl Acad Sci US A. 1997; 94: 11.813-11.818..).	11
Figura 3: Efeitos imunomodulatórios do interferon- β 1 na esclerose múltipla.....	13
Figura 4: Representação dos plasmídeos usados neste estudo. (a) pEXP5-NT/TOPO com 2,75 kb e (b) pEXP5-CT/TOPO com 2,7 kb.	17
Figura 5: Análise das modificações pós traducionais do interferon beta 1. A proteína foi anotada com evidências experimentais. Dados do banco da Uniprot	23
Figura 6: Sequência nucleotídica do vetor de expressão para síntese da proteína recombinante IFN- β 1b (GeneArt).....	24
Figura 7: Esquema dos elementos do vetor de expressão linear.	25
Figura 8: Alinhamento entre a sequência selvagem e a sequência com códon otimizado do Interferon- β 1b. Análise realizada pelo servidor EMBOSS Water.....	26
Figura 9: Representação esquemática do uso dos primers e sua localização de anelamento na sequência nucleotídica alvo	28
Figura 10: Mapa do plasmídeo (pMA) no qual foi clonado o gene Interferon- β 1b recombinante.	29
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo circular (a) e do fragmento linearizado com a digestão de XbaI (b).	29
Figura 12: Análise da sequência do vetor de expressão para detecção de regiões que possam ser reconhecidas por enzimas de restrição (SnapGene).....	30
Figura 13: Funcionamento do vetor TOPO-TA Cloning	31
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose. O padrão de peso molecular utilizado foi o GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).	31
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose para confirmar a clonagem do gene do IFN- β 1b nos plasmídeos de expressão pEXP5-NT/TOPO	32
Figura 16: Alinhamento da sequência obtida no sequenciamento genético com a sequência teórica (NCBI).....	33

Figura 17: Determinação da ORF.	33
Figura 18: Amplificação do vetor de expressão linear.	34
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose para determinação da melhor concentração de DNA para a preparação do DNA linear a partir da reação de PCR.....	34
Figura 20: Eletroforese em gel de SDS-PAGE (gradiente 7-15%). Amostras resultantes da expressão de IFN na plataforma CFPS.....	36
Figura 21: Western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag para identificação de proteínas com cauda de histidina.	36
Figura 22: Nível de síntese que o sistema cell-free deveria atingir para a proteína calmodulina (controle positivo) em um kit funcional	37
Figura 23: Seleção de colônias de <i>E. coli</i> contendo os plasmídeos INF-TOPO-CT e IFN-TOPO-NT.	38
Figura 24: Eletroforese em gel de SDS-PAGE (gradiente 7-15%). Amostras resultantes da expressão baseada em célula	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipos de extratos celulares utilizados no sistema de síntese proteica livre de célula (modificado de ZEMELLA, 2015).	4
Tabela 2: Vantagens e desvantagens do sistema de síntese protéica livre de células	8
Tabela 3: Softwares e servidores utilizados para o estudo in silico	15
Tabela 4: Reagentes da reação de PCR, com respectivas concentrações do estoque e volumes a serem adicionados em uma reação de 25 µL	16
Tabela 5: Programa do termociclador para a reação de PCR.	16
Tabela 6: Componentes para a reação de clonagem e respectivos volumes.....	18
Tabela 7: Reagentes utilizados na reação de síntese proteica livre de célula e seus respectivos volumes em µL.....	20
Tabela 8: Volume de DNA e água a serem adicionados em cada amostra.....	20
Tabela 9: Reagentes do tampão de alimentação e seus respectivos volumes em µL	21
Tabela 10: Lista dos primers utilizados nas reações de PCR, com suas respectivas sequências nucleotídica e propriedades (número de pares de bases, temperatura de melting e conteúdo CG).	27

Lista de Abreviaturas

CFPS – Cell-free protein synthesis	<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>
PCR – Polimerase Chain Reaction	IFN – interferon
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade	rhIFN- β 1b – Interferon- β 1b humano recombinante
PTM – Post-Translation Modification	TBS – Tris buffered saline
mRNA – RNA mensageiro	CDS - coding sequence
tRNA – RNA transportador	RBS – Sítio de ligação ribossomal
WGE – Gérmen de trigo	LB – Luria Bertani
RRL – Reticulócito de coelho	VLP – Vírus-like particles
CHO – Ovário de hamster chinês	SDS – sódio dodecil sulfato
GFP – Green Fluorescent Protein	PVDF – fluoreto de polivinilideno
eGFP – Enhanced GFP	pb – Pares de bases
deGFP – Destabilized eGFP	bp – Base pairs
scFv – fragmento de anticorpo de cadeia única	IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
Fab – Fragmentos ligadores de antígenos	T _m – Temperatura de melting
kDa – kilo Daltons	T _a – Temperatura de anelamento
CT – Carboxila terminal	
NT – Amino Terminal	
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados	

1. Introdução

Biofármacos e produtos imunobiológicos são basicamente proteínas terapêuticas recombinantes obtidas a partir de processos biotecnológicos. A insulina foi o primeiro produto produzido desta forma, lançada em 1982 (Humulin, pela Eli Lilly) (WALSH, 2010). Antes disso, a insulina era obtida na sua forma natural extraída de animais em uma quantidade muito baixa. Graças à tecnologia do DNA recombinante, a insulina pode ser produzida em muito maior quantidade, beneficiando um grande número de pacientes. Com os avanços na biologia molecular, hoje já é possível a síntese de diversos tipos de proteínas biológicas com uma ampla variedade de tratamentos e prevenções de doenças, tais como fatores de crescimento hematopoiéticos, fatores de crescimento, hormônios, citocinas e interferons, fatores sanguíneos, enzimas recombinantes, vacinas, anticorpos monoclonais, dentre outros com crescente número de produtos sendo aprovados (WALSH, 2018; MOORKENS, 2017).

Cerca de 400 milhões de pessoas hoje dependem de tratamentos com biofármacos e produtos imunobiológicos (KARUNAKARAN, 2017). Trata-se de um mercado bilionário (\$200 bilhões USD), com uma crescente participação no mercado farmacêutico global (BUNDY et al., 2018). Recentemente, muitos desses produtos têm perdido suas patentes e outros direitos à exclusividade, iniciando uma corrida entre indústrias farmacêuticas pela produção de tais moléculas de uma forma mais competitiva (MOORKENS, 2017; WALSH, 2018). Por este motivo, melhoramentos de moléculas assim como aprimoramento de processos têm ganhado destaque.

Atualmente há três formas de se produzir proteínas: síntese química, expressão baseada em células e síntese livre de célula (LIAN et al., 2014). A síntese química tem aplicação limitada por não ser capaz de produzir macromoléculas peptídicas ou proteínas, o que não ocorre para a síntese baseada em célula. As reações ocorrem no citoplasma da célula e reagentes podem ser absorvidos e expelidos pela membrana, associada a transportadores. Milhares de catálises ocorrem durante a reação de síntese de proteína e são impossíveis de serem totalmente controladas, além de poderem mudar durante o curso do processo em batelada (LIAN et al., 2014). Os métodos foram otimizados para a sobrevivência dos microrganismos, pois eles são opostos à superprodução e liberação de um único produto.

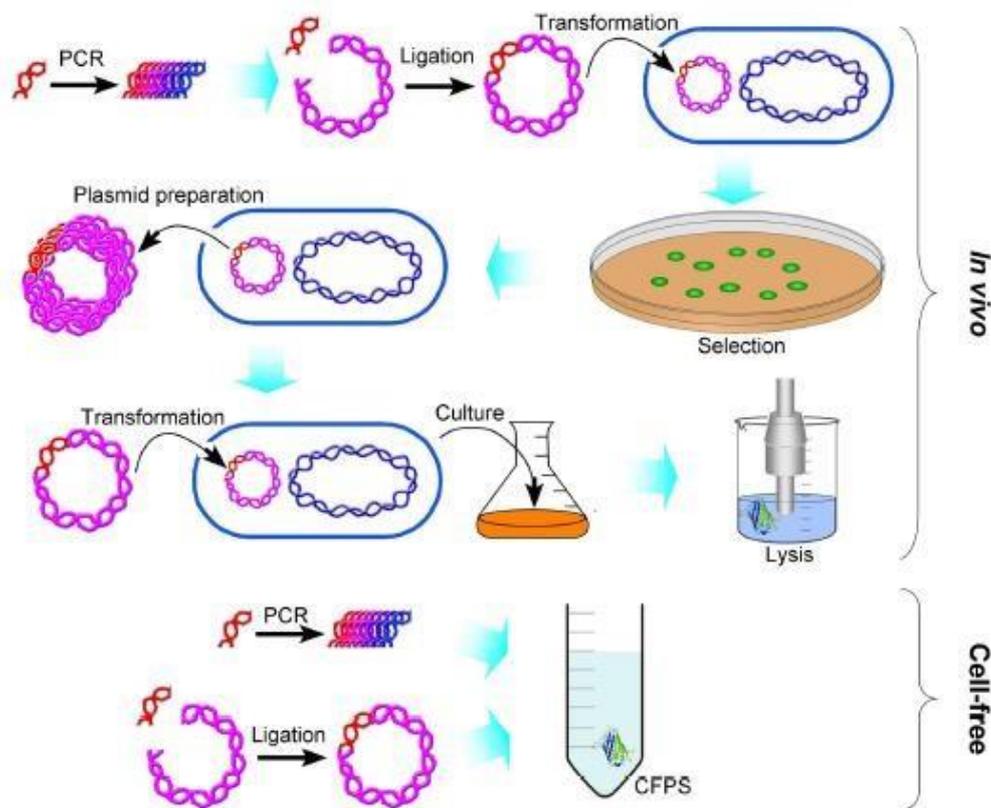
Apesar dos avanços com a tecnologia do DNA recombinante e da engenharia metabólica, ainda há desvantagens neste sistema, como a formação de corpos de inclusão, degradação da proteína de interesse, perda do molde de DNA, não compatibilidade com produção de produtos citotóxicos, dentre outros (SWARTZ, 2012). A terceira forma de síntese de proteínas é o sistema de síntese proteica livre de célula (*Cell-Free Protein Synthesis* - CFPS). Esse sistema agrega as vantagens dos dois anteriormente citados, ao possibilitar a produção de macromoléculas e permitir maior controle do processo. Explorado mais recentemente para uma aplicação em larga escala, o CFPS tem se tornado uma alternativa cada vez mais atraente para síntese de proteínas de difícil expressão e pela possibilidade de escalonamento da produção.

1.1. Sistema de Síntese Proteica Livre de Célula

Este sistema baseia-se na exploração de processos biológicos sem usar células vivas. A célula é lisada e o conteúdo citoplasmático, cheio de biomoléculas ativas, é capaz de realizar muitas funções celulares, como a transcrição e tradução. O sistema é utilizado há décadas, principalmente para estudar funções biológicas, e foi utilizada por Matthaei e Nirenberg para decifrar o código genético em 1961 (NIRENBERG e MATTHAEI, 1961). No final dos anos 60 e início de 70, CFPS foi usado para elucidar os operons da lactose e do triptofano em *Escherichia coli* (CHAMBERS, 1969). Inicialmente a plataforma era utilizada somente para fins científicos, mas recentemente ela também tem sido foco de estudos que buscam tecnologias de expressão proteica rápida e de elevado rendimento (OGONAH et al., 2017).

Existem duas formas de utilizar a tecnologia *cell-free*: através do lisado bruto ou através do uso de enzimas recombinantes purificadas (PURE). Diferentemente do lisado bruto, sistema PURE é desprovido de quaisquer biomoléculas e metabólitos que não participam diretamente da síntese proteica (PEREZ et al., 2016). Isso torna a reação ausente de nucleases e proteases que diminuem a vida útil do DNA, mRNA, proteínas e enzimas metabólicas que podem converter alguns nucleotídeos e aminoácidos necessários para a transcrição e tradução em produtos não-funcionais que não participam desse processo (MATSUBAYASHI, 2014). Tem sido utilizado para estudos de biologia sintética e, apesar de estudos tornarem a tecnologia mais acessível (LAVICKOVA e MAERKL, 2019), para uma aplicação de alto rendimento e escalas industriais, o lisado bruto é mais viável.

Figura 1: Comparação entre a expressão de proteínas através da síntese em célula (*in vivo*) e da síntese livre de célula (*Cell-Free*) (ROSENBLUM, G., COOPERMAN, B. S., 2014).



Diversos tipos celulares podem ser utilizados como extratos para a síntese cell-free, como bactérias, protozoários, plantas, insetos e mamíferos. Existem vantagens e desvantagens de cada sistema de expressão. Uma das principais diferenças entre os modelos de expressão procariotos e eucariotos baseia-se na capacidade de realizar modificações pós-traducionais nas moléculas formadas *de novo* (ZEMELLA, 2015). Outra distinção entre o sistema de expressão em eucariotos e procariotos está na porção 5'-UTR do molde de DNA. Para eucariotos, é necessária uma sequência promotora (e.g. T7), seguida por uma sequência Kozak (Sítio Ligador Ribossomal de eucariotos), que inclui o códon de iniciação. No caso de procariotos, a sequência promotora geralmente é seguida pela sequência Shine-Delgarno (Sítio de Ligação Ribossomal de procariotos) antes do códon de início (ATG) (GITE et al., 2006). Porém, as peculiaridades vão além, sendo singular para cada tipo de extrato. Para escolha do tipo celular, leva-se em consideração a proteína que se deseja sintetizar. Na tabela a 1 é possível visualizar os principais sistemas de expressão utilizados.

Tabela 1: Tipos de extratos celulares utilizados no sistema de síntese proteica livre de célula (modificado de ZEMELLA, 2015).

Sistema de Expressão	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	Alto rendimento. Cultivo, crescimento celular e lise de forma rápida e simples. Economicamente viável. Fácil manipulação genética. Bem caracterizado.	PTMs limitadas. Ausência de estruturas de membranas endógenas. Apenas chaperonas procarióticas disponíveis.	Incorporação de aminoácidos não-naturais. Síntese em larga escala. Produção industrial de conjugados droga-anticorpo.
<i>Archaea</i>	Condições de cultivo extremas como altas temperaturas, portanto reduzida inibição da tradução por estruturas secundárias em mRNA	Baixo rendimento	Síntese de proteínas termooestáveis
Protozoários	Baixo custo para cultivo e preparo do lisado. Fácil escalonamento Alta solubilidade das proteínas Melhor iniciação da tradução pela adição de sequências especiais de RNA.	Tipos de PTMs desconhecidas. Não bem caracterizado. Baixo rendimento.	Análise em alto rendimento por CFPS baseado em PCR.
Leveduras	Formação de PTMs. Simples e rápido cultivo e preparo do lisado. Bem caracterizado.	Baixo rendimento. Sem PTMs como de células mamíferas.	Produção de partículas virais (VLPs) para pesquisa de medicamentos anti-virais. Produção de bioetanol e (S)-1-acetoxialcan-2-ol.
Gérmen de trigo (WGE)	Alto rendimento. Síntese de proteínas com pontes dissulfeto. Correto enovelamento (portanto alta solubilidade). Bem caracterizado.	Preparo do lisado trabalhoso e caro. Limitadas PTMs. Ausência de estruturas de membranas endógenas. Baixo rendimento comparado a procariontes.	Produção de proteínas da malária para caracterizar novos candidatos a vacinas. Síntese proteica on-a-chip. Aplicações de alto rendimento. Produção de anticorpos monoclonais contra GPCRs. Investigação de processos traducionais.
Tabaco BY-2	Rápido e fácil preparo do lisado. É possível glicosilação e formação de ponte dissulfeto. Rendimento comparável aos extratos de Gérmen de Trigo.	Limitada análise do sistema. Contém aminoácidos endógenos, portanto dificulta a obtenção de bons rendimentos. Alto custo de cultivo.	Sistema cell-free novo. Alto potencial para aplicações futuras.
Insetos	Fácil e rápido preparo do lisado. Várias PTMs possíveis Presença de microssomas endógenas. Síntese direta e integração de proteínas de membrana.	Alto custo de cultivo.	Formação de vesículas unilamelares enormes (GUVs) para modelo de proteínas de membrana para estudo de processos. Produção de proteínas com

			aminoácidos não-essenciais. Produção automatizada para proteínas de membrana.
Reticulócito de coelho (RRL)	Bem caracterizado. Sistema mamífero. Síntese proteica com suplementação de microsomas.	Baixo rendimento. PTMs somente possíveis com suplementação de microsomas.	Tecnologias de microarranjos proteicos. Estudos de interação proteína-moléculas. Tecnologias display. Tecnologias de screening.
Ovários de Hamster Chinês (CHO)	Bem caracterizado. Contém microsomas endógenas. PTMs de mamíferos. Produção direta de proteínas de membrana. Aumento do rendimento com associação de sequências IRES.	Baixo rendimento se comparado a outros sistemas eucarióticos. Alto custo de cultivo. Linhagem celular robusta.	Produção de anticorpos monoclonais. Anticorpos biespecíficos. Proteína morfogenética do osso humano.
Linhagens humanas	Ótimo ambiente para o correto enovelamento e montagem de proteínas humanas. Contém microsomas endógenas. PTMs humanas. Uso de códons adaptados para facilitar a síntese de proteínas de alto peso molecular.	Baixo rendimento se comparado a outros extratos eucarióticos. Alto custo de cultivo. Tecnologias de cultivo laboriosas (células sensíveis).	Investigação de mecanismos de replicação viral. Desenvolvimento de drogas antivirais.

A maior vantagem do extrato de *E. coli* é seu maior rendimento em relação aos outros tipos de extratos de forma geral, mas isso pode variar pois o nível de proteína sintetizada é fortemente dependente da proteína alvo (ZEMELLA et al., 2015). Para uma comparação de rendimento, uma síntese de eGFP em um sistema de *streptomyces* produziu 282±8 µg/mL em 48 horas (LI et al., 2017), enquanto que em um sistema de *E. coli* produziu 2300 mg/mL de deGFP em 10 horas (CASCHERA e NOIREAUX, 2014). No entanto, uma das maiores desvantagens do sistema *cell-free* em organismo procarionto é a deficiência em organelas que realizem modificações pós-traducionais. As células de ovário de hamster chinês (CHO) são as células mamíferas mais frequentemente usadas para produção de proteínas terapêuticas complexas no sistema baseado em célula, como os anticorpos monoclonais e proteínas de membrana (STECH, 2015; THORING et al., 2017). Células humanas também têm sido estudadas para preparo de lisados (BRÖDEL e KUBICK, 2014). Porém, alguns trabalhos hoje já têm demonstrado a síntese de glicoproteínas em microrganismos procariontes (KEYS, 2017, SHINODA et al., 2016), como a síntese dessas proteínas em lisado de *E. coli* enriquecendo com oligossacariltransferases e oligossacarídeos ligados a lipídeos (JARAENTOMECHAI et al., 2018). Os lisados das diversas fontes de microrganismos têm sido extensivamente estudados e otimizados, tornando possível a síntese de uma vasta gama de proteínas. A

escolha do extrato depende de uma análise da proteína alvo, da escala que se deseja produzir, e das condições financeiras disponíveis.

1.1.1. Vantagens e Desvantagens

Muitas vantagens são consequências da ausência de membrana que transforma a célula em uma “máquina” produtora de proteínas recombinantes. Pelo fato de a célula não estar viva, todos os recursos disponíveis do extrato celular são canalizados para expressar o gene de interesse (PEREZ et al., 2016). O sistema CFPS desacopla os objetivos da célula (de crescimento e reprodução) dos objetivos de produção da proteína heteróloga (DUDLEY et al., 2015). Pelo fato de não haver sinalização de membrana celular (feedback negativo), a maior parte das proteínas são expressas a partir do molde de DNA que codifica para a proteína desejada. Isso diminui o processo de purificação e aumenta o rendimento do processo (SULLIVAN et al., 2016). Diversos trabalhos têm demonstrado a superioridade de nível de proteína expressão no CFPS em relação à expressão em célula. A síntese de onconase, por exemplo, em sistema *cell-free* possibilitou um aumento do nível de expressão em 80 vezes em relação à expressão em célula (SALEHI et al., 2016). Proteínas assim são consideradas de difícil expressão por serem citotóxicas, possuírem alta tendência a formar corpos de inclusão, propensão a perda da atividade biológica e baixo rendimento. Biofármacos para câncer, vacinas, peptídeos/proteínas antimicrobianas, toxinas, proteínas de membrana, anticorpos, proteínas com aminoácidos não-essenciais, são exemplos de proteínas de difícil expressão. Existem várias estratégias para otimizar a síntese, utilizado tanto nos sistemas baseados em célula como no *cell-free*. A vantagem deste último é que o ambiente aberto permite suplementação diretamente no meio reacional. Além disso, pelo fato de a proteína não ser sintetizada no interior da célula, o meio em que ela é formada é menos concentrado (frequentemente de 10 a 20 vezes mais diluído), o que melhora o enovelamento de proteínas, reduz as taxas de reações indesejáveis e melhora as taxas de difusão (SWARTZ, 2012; ROSENBLUM e COOPERMAN, 2014).

Outro benefício da plataforma é a capacidade de escalonamento de até 100 litros, com desempenho quase idêntica àquela observada em experimentos de 20 µl (uma expansão de 5×10^6) (ZAWADA, 2011). Com novos formatos de reação desenvolvidos, o tempo de síntese proteica pôde ser estendido, aumentando o rendimento da plataforma (PEÑALBER-JOHNSTONE et al., 2017; THORING et al., 2017; TRAN, 2018). A forma convencional é em batelada, mas conforme a reação ocorre, os nutrientes do meio se

esgotam, são formados co-produtos que inibem a continuidade da síntese e a reação cessa. Com a possibilidade de adição e remoção de substratos e monitoramento em tempo real, é possível, através de formatos de reação de fluxo contínuo e troca contínua, remover esses co-produtos e alimentar a reação com novos nutrientes e fatores que mantêm a síntese proteica ativa (LU, 2017; LIAN et al., 2014).

Mais uma vantagem do sistema CFPS é a possibilidade de eliminação de áreas de biossegurança, uma vez que a plataforma pode dispensar o uso de Organismos Geneticamente Modificados (OGM). Pelo fato de a plataforma permitir a síntese proteica a partir de moldes de DNA lineares gerados a partir de reação de PCR, não há necessidade dos processos de clonagem para amplificação do vetor. O sistema *cell-free* pode utilizar o DNA em três formas diferentes: produto de PCR linear, plasmídeo linearizado ou plasmídeo circular (NOMOTO e TADA, 2018; SCHINN et al., 2016). Esta última forma tem sido a preferida devido à maior suscetibilidade dos moldes lineares à clivagem nucleolítica. Por outro lado, o uso de produto de PCR linear tem a distinta vantagem de ser simples, pois elimina a necessidade de vários processos que consomem tempo e recursos financeiros, necessários quando se usa plasmídeos, os quais incluem: ligação do molde de DNA ao plasmídeo linearizado, transformação do plasmídeo em células compatíveis, seleção de colônias que abrigam o plasmídeo estrangeiro, cultivo celular em cultura de produção de plasmídeo, isolamento de plasmídeo, sequenciamento, transformação do plasmídeo em células compatíveis, cultura celular para superexpressão da proteína, cultivo e lise (NOMOTO e TADA, 2018; SCHINN et al., 2016). Em contraste, adição de um fragmento de DNA linear em uma reação cell-free permite expressão proteica em uma única etapa sem a necessidade de processos de clonagem e cultivo celular. Uma área de biossegurança nível 2, por exemplo, requer um investimento de aproximadamente 7.000 US\$/m², além do custo de manutenção em torno de 1.100 US\$/m²/ano (VITOLLO et al., 2015). É um investimento financeiro que deve ser incluído no cálculo dos custos totais de uma produção da proteína de interesse.

Porém, alguns obstáculos ainda impedem a implementação desse sistema para níveis industriais, como o elevado custo do processo. Ainda que a plataforma CFPS permita a eliminação de etapas de cultivo celular e, conseqüentemente, de áreas de biossegurança, a necessidade de suplementar a reação com substratos eleva as despesas totais. Em uma análise geral, o custo é de \$1 - \$2/mL para o sistema em batelada mais econômico em lisado de *E. coli* quando preparado *in house*, assim se aproximando de \$1/mg de proteína;

enquanto em uma expressão em célula gira em torno de \$0,01/mg de proteína (BUNDY, 2018). Outra desvantagem é a falta de padronização dos métodos. Há uma variedade de técnicas de preparação do extrato, de reagentes adicionados ao meio e de suas concentrações, de meios de cultura, de cepas modificadas, de construções genéticas, de formatos de reação e de componentes do citoplasma que podem variar em uma mesma cepa durante diferentes etapas do crescimento celular. Ao mesmo tempo que isso permite uma flexibilidade do processo, é necessária uma otimização para cada produto individualmente.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens do sistema de síntese protéica livre de células.

VANTAGENS	DESvantagens
Ambiente aberto Síntese de proteínas de difícil expressão Simplificação no processo de purificação Melhor enovelamento da proteína Escalonamento Adição e remoção de produtos Livre de processos de clonagem e cultivo de OGM	Custo Uso de equipamentos altamente especializados Falta de padronização dos métodos

1.1.2. Otimizações e avanços no sistema CFPS

Com o objetivo de tornar a plataforma *cell-free* cada vez mais acessível, muitos trabalhos têm desenvolvido modos de preparação do lisado mais economicamente viável, com reagentes de menor custo e utilizando equipamentos não tão especializados. O uso de prensa francesa e homogeneizadores de alta pressão, por exemplo, restringem a preparação de extratos a laboratórios melhor equipados (CASCHERA, 2017). Dessa forma, alternativas como lise por sonicação (KWON e JEWETT, 2015), os quais obtiveram elevado rendimento de síntese com este extrato e possibilidade de escalonamento de 10 mL a 10 L; ou o rompimento da membrana como uso de lisozima, choque osmótico e ciclos de congelamento-descongelamento (FUJIWARA e DOI, 2016) podem substituir os métodos tradicionais e aproximar a tecnologia CFPS de diversos laboratórios. Para reduzir o custo da plataforma, pesquisas vem explorando o sistema energético, uma vez que as moléculas doadoras de fosfato de alta energia responsáveis por um metabolismo eficiente são os componentes que mais elevam o preço do CFPS, tais como 3-PGA (3-fosfoglicerato), PEP (fosfoenolpiruvato) e CP (creatina fosfato) (LIAN et al., 2014). Outras opções como glicose, piruvato ou frutose-1,6-bifosfato como fontes energéticas para regeneração de ATP, e nucleotídeos monofosfatos como

precursores moleculares (KIM, 2007; CASCHERA, 2017). Um modelo que foi desenvolvido utilizando maltodextrina ou maltose acoplado ao 3-PGA alcançou um nível de produção de 2,3 mg/mL de GFP (CASCHERA, 2013). Os autores, então, em um estudo subsequente, substituíram o 3-PGA por uma molécula de menor custo, o hexametáfosfato, que libera fosfato inorgânico e desencadeia produção de glicose-1-fosfato após fosforilação de polissacarídeo (CASCHERA e NOIREAUX, 2015). Outras estratégias para tornar a plataforma mais barata estão sendo desenvolvidas, como o aumento da concentração de potássio glutamato e eliminação de piruvato, coenzima A, NAD, tRNA total ácido, folínico, putrescina e amônio glutamato, resultaram em uma economia de 95% (CAI, 2015).

Simultaneamente, pesquisas buscam aumentar o rendimento do sistema, melhorar o enovelamento e/ou modificações pós-traducionais, formatos de reação que estendem o tempo de síntese proteica. Para as reações de transcrição e tradução, alguns componentes são essenciais, tais como cátion de magnésio bivalente (Mg^{2+}), nucleotídeos, aminoácidos, reagentes de estabilização, geralmente com 1,2 mM de ATP e 0,85 mM de GTP, CTP e UTP (KWON e JEWETT, 2015). É importante fornecer os requisitos estequiométricos para a síntese de proteínas, mas maiores concentrações de aminoácido também podem ser vantajosas se as afinidades de alguns dos aminoacil-RNAt sintetases para os seus respectivos aminoácidos não forem elevados (SPIRIN e SWARTZ, 2008). Para a estabilização do sistema, que é frequentemente usado Hepes 57 mM, mas também espermidina 1,5 mM e putrescina 1 mM proporcionam um ambiente químico intracelular semelhante (KWON e JEWETT, 2015). Outros fatores, por exemplo, tRNA e ácido folínico para estimular a iniciação da tradução; NAD⁺, coenzima A e ácido oxálico que estimulam o metabolismo de energia; e T7 RNA polimerase (SALEHI et al., 2016; ZAWADA et al., 2011). Ajuste no potencial redox pode ser feito com a proporção de glutathione oxidada e reduzida, isomerase de dissulfeto pode ser adicionado para auxiliar na formação de ponte dissulfeto, chaperonas para facilitar a produção de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv), fragmentos ligadores de antígeno (Fab) e anticorpos inteiros (JIN e HONG, 2018; STECH et al., 2015; MATSUDA et al., 2013; KANTER, 2007). Adição de um detergente não iônico à mistura de incubação pode ser útil na prevenção da agregação do produto e melhorar a solubilidade e a atividade específica das proteínas; porém é preciso cuidado na escolha já que este pode interferir nos processos *downstream* (KWON e JEWETT, 2015). Além do detergente, lipossomos e nanodiscos

propiciam um ambiente artificial hidrofóbico, muito vantajoso para o enovelamento e funcionalização das proteínas de membrana sintetizadas (SCHOBORG et al., 2018). Recentemente, especialistas da área publicaram revisões analisando esses aditivos que suplementam as reações *cell-free* (DOPP, 2019; ZHANG, 2018). São inúmeros os componentes que podem ser adicionados ao meio e otimizar a síntese proteica. Em relação à extensão do tempo de reação, pesquisadores buscam novos formatos além da tradicional batelada. Formatos como fluxo contínuo e troca contínua permitem que substratos sejam reabastecidos para a continuidade da síntese e a retirada dos co-produtos que possam inibir a produção da proteína e cessar a reação (PEÑALBER-JOHNSTONE et al., 2017; THORING; 2017; TRAN, 2018; STECH et al., 2015; HONG et al., 2015). Com isso, produções em sistemas *cell-free* puderam aumentar o rendimento de 20 a 40 vezes em comparação com o formato em batelada (STECH et al., 2017).

A plataforma CFPS vêm sendo otimizada cada vez mais, com melhores rendimentos, melhor performance, menores custos e cada vez mais competitivo em relação à expressão baseada em células. No entanto, são vários os protocolos, métodos e técnicas utilizados para preparação de lisado, molde de DNA, formatos de reação, suplementos adicionados, sistemas energéticos, dentre outros parâmetros. É preciso levar em consideração a proteína que se deseja sintetizar, o nível de expressão, os equipamentos do laboratório e os recursos financeiros disponíveis.

1.1.3. Aplicações

O sistema CFPS tem ampla aplicação, podendo ser utilizado tanto na área da pesquisa, em diagnóstico e para produção de biofármacos. Na área da pesquisa esta plataforma já vem sendo explorada há décadas, porém mais recentemente novas tecnologias como biosensores (PARDEE, 2014), dispositivos para tratamento “point-of-care” (ADIGA et al., 2018), vacinas (WELSH et al., 2012) e diversas proteínas terapêuticas (CASTELEJIN et al., 2013) tem sido alvos de estudos. Dessas proteínas terapêuticas, as mais mencionadas são as de difícil expressão. Isso porque no sistema baseado em célula, essas proteínas tem um rendimento muito baixo ou necessitam de muitas etapas de purificação, re-enovelamento, como discutido previamente.

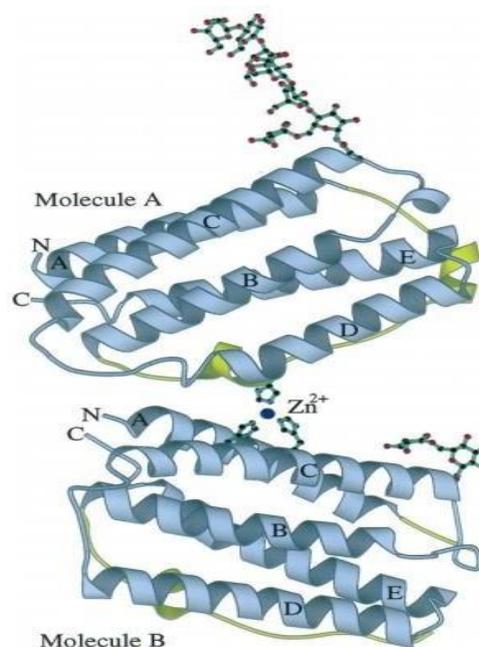
Um exemplo de proteína de difícil expressão é o interferon- β 1, devido a sua elevada tendência de agregação no citoplasma da célula hospedeira. Estudos realizados com essa molécula não obtiveram sucesso para sintetizá-la na forma solúvel, mesmo adotando

diversas estratégias como uso de diferentes cepas de *E. coli*, meios de cultivo, temperatura, formas de rompimento celular (método de congelamento-descongelamento, prensa francesa, agentes caotrópicos) (VILLELA, 2008). Por este motivo, o presente trabalho propõe a síntese de interferon- β 1b, já que a plataforma CFPS pode ser uma alternativa para a síntese de interferon na forma solúvel e em alta quantidade.

1.2. Interferon e a Esclerose Múltipla

O interferon- β 1 humano recombinante (rhIFN- β 1) é uma proteína de 165 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa. A molécula pode ser sintetizada com ou sem glicosilação, uma vez que a ausência desta modificação pós-traducional não afeta a sua eficácia terapêutica (KARPUSAS, 1997; BASU, 2006). Logo, o rhIFN- β 1 é adequado para a expressão no sistema cell-free de procariontes. Essa proteína já é produzida em *E. coli* e células CHO por empresas farmacêuticas (RUNKEL, 1998), e o maior desafio é a sua síntese sob a forma solúvel (LIN, 2002). Devido ao seu forte caráter hidrofóbico, a molécula tende a agregar dentro do citoplasma, resultando em corpos de inclusão.

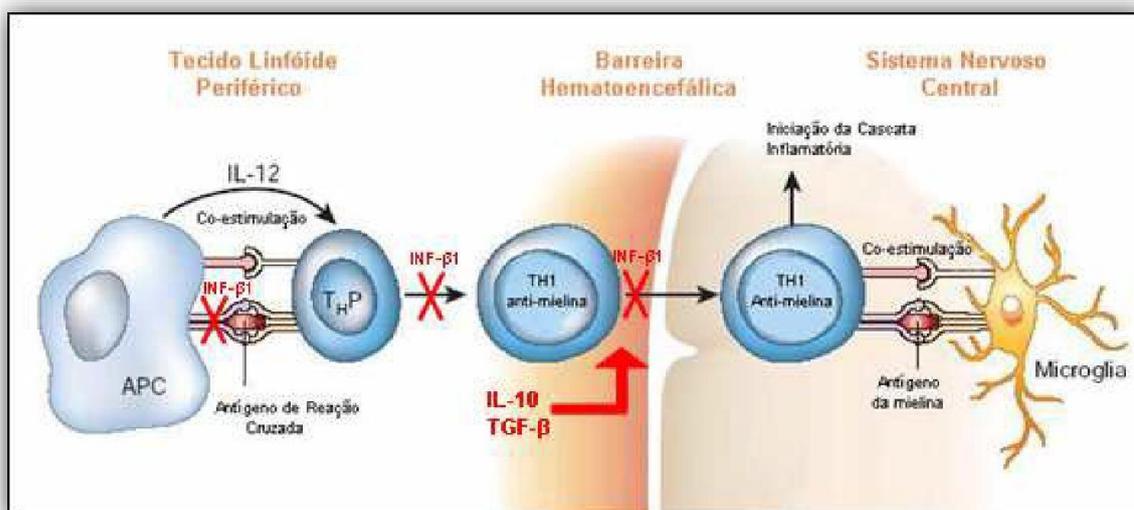
Figura 2: Representação esquemática de dímero cristalográfico do INF- β (Figura adaptada de Karpusas et al A estrutura cristalográfica do interferon β humanos com resolução de 2,2 Å, Proc Natl Acad Sci US A. 1997; 94: 11.813-11.818..).



Os interferons (IFN) são proteínas que atuam como mediadores na comunicação entre células através da ligação a receptores específicos da superfície (BORDEN, 2007). O IFN- β 1 desencadeia antiviral, antiproliferativa, atividades anti-infecciosas e imunomoduladores, sendo utilizado por esta razão no tratamento da esclerose múltipla. A esclerose múltipla é uma doença neurológica crônica e auto-imune, em que as proteínas da mielina são atacadas pelo próprio sistema imunológico do indivíduo. A desmielinização expõe os axônios, impossibilitando a transmissão dos sinais pelas fibras nervosas. Não há cura para a doença. No entanto, terapias imunomoduladoras estão disponíveis para melhorar a qualidade de vida. Entre as drogas aprovadas, o IFN- β 1 é um dos mais amplamente utilizados no tratamento de esclerose múltipla (JAVED e REDER, 2006).

Este biofármaco se mostrou eficiente na redução da progressão da doença, principalmente em relação ao acúmulo de lesões cerebrais do tipo surto-remissão. Estas lesões é o subtipo mais comum de esclerose múltipla, caracterizando-se por exacerbações clínicas agudas e inflamatórias na atividade do sistema nervoso central, seguida por períodos de estabilidade clínica. O mecanismo ainda não é totalmente esclarecido, mas sabe-se que a produção de interferon endógena em pacientes acometidos pela esclerose múltipla é deficiente e, portanto, a administração deste biofármaco auxilia na redução da progressão da doença. Além disso, devido às propriedades imunomodulatórias do IFN- β 1, a expressão de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) classe II é reduzida. Isso reduz a permeabilidade da barreira hematoencefálica e, portanto, reduz a penetração de leucócitos no SNC, diminuindo o processo de desmielinização. Acredita-se também que o IFN- β 1 participe da ativação de células T CD8, contribuindo para a supressão da resposta inflamatória (JAVED e REDER, 2006; VILLELA, 2008).

Figura 3: Efeitos imunomodulatórios do interferon- β 1 na esclerose múltipla.



Os biofármacos de rhIFN- β 1 estão disponíveis comercialmente, produzidos pelos seguintes laboratórios (VILLELA, 2008):

- Laboratório Bayer Schering / Chiron, com o biofármaco Betaferon[®] ou Betaseron[®].
- Laboratório Biogen Idec, com o biofármaco Avonex[®].
- Laboratório Merck Serono, com o biofármaco Rebif[®]

Esses dois últimos são produzidos no sistema de expressão em célula a partir de linhagens de células de CHO (ovário de hamster chinês), gerando a molécula na forma glicosilada, mesma forma do IFN- β 1 produzido endogenamente. São chamados de IFN- β 1a humano recombinante. Já o Betaseron é produzido a partir de células de *E. coli*, que, por ser um procarionte, gera moléculas não glicosiladas e são chamados INF- β 1b. Porém, a ausência desta modificação pós traducional não afeta a terapêutica do biofármaco. Foi aprovado pela agência reguladora estadunidense Food and Drug Administration (FDA) em 1993 (MARK, 1986; VILLELA DR, 2010).

2. Objetivos

Objetivo Geral

Construção do vetor de expressão para síntese do Interferon- β 1b humano recombinante e sua produção no sistema de síntese proteica livre de célula.

Objetivos Específicos

Estudo *in silico* para construção do vetor de expressão.

Preparação do vetor de expressão linear por reação de PCR.

Construção do vetor de expressão plasmidial por clonagem do gene do IFN- β 1b nos vetores pEXP5-NT/TOPO e pEXP5-CT/TOPO.

Preparação dos vetores de expressão por transformação em células DH5 α , cultivo, extração e purificação.

Síntese da proteína rhIFN- β 1b no sistema de síntese protéica livre de célula.

Síntese da proteína rhIFN- β 1b no sistema de síntese baseado em célula.

Identificação da proteína expressa.

3. Materiais e Métodos

3.1. *In silico*

Foi realizado um estudo *in silico* para a construção do vetor de expressão, utilizando softwares e servidores online como indicado na Tabela 3. Para obtenção de informações do interferon- β 1b humano recombinante foi realizado um levantamento em bancos de dados como Uniprot e USC. Pelo site do National Center of Biotechnology Information (NCBI) foi obtido a sequência genética da construção otimizada do interferon- β 1b humano. Foi realizado também uma otimização de códon para que essa proteína humana pudesse ser sintetizada em uma célula de *E. coli*. Com uma relativa alta porcentagem de códon raros, o interferon- β 1b teria uma produtividade de síntese baixa devido a baixa frequência de RNAs transportadores referentes a esses códons raros. Para isso, a plataforma da empresa Thermo Fisher Scientific propicia um software próprio para esta otimização. Também pelo site da empresa citada foi realizado a construção do vetor de expressão linear, com sítio promotor, RBS, gene rhIFN- β 1b e terminador. Com a sequência determinada, foi realizada uma predição de expressão através do ORFfinder do NCBI, que encontra regiões codificadoras (CDS ou OFR) e prevê se a sequência nucleotídica será transcrita e traduzida para uma proteína. Os sítios de restrição foram mapeados pelo software SnapGene; e os primers foram desenhados pelo Primer3Fold, que determina temperatura de melting, conteúdo de bases C e G, especificidade e avalia a possibilidade de formação de dímeros.

Tabela 3: Softwares e servidores utilizados para o estudo *in silico*.

Software/servidor	Análise
Estudo da proteína	Uniprot, USC
Sequência nucleotídica	NCBI
Otimização de códon	Thermo Fisher Scientific
Construção do vetor de expressão	Thermo Fisher Scientific GeneArt
Predição de expressão	ORFfinder
Mapa de restrição	SnapGene
Design de <i>primers</i>	Primer3Fold

3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os *primers* (direto e reverso) foram desenhados pelo software Primer3Fold e adquiridos da Exxtend. Após a chegada do produto, adicionou-se água ultrapura livre de DNase e RNase para uma concentração de 100 μM e estocados a -20°C .

A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL em duplicata, de acordo com os volumes indicados na tabela 4. O kit de PCR utilizado foi Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen).

Tabela 4: Reagentes da reação de PCR, com respectivas concentrações do estoque e volumes a serem adicionados em uma reação de 25 μL .

Reagente	Concentração Estoque	Volume (μL)
Molde de DNA	130 $\text{pg}/\mu\text{L}$	2,0
Tampão PCR	10X	2,5
MgSO_4	50 mM	1,25
dNTP	10 mM/cada	5,0
Primer direto	1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$	0,5
Primer reverso	1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$	0,5
Água ultrapura	-	13,05
Taq polimerase	5 $\text{U}/\mu\text{L}$	0,2
Volume Total		25

A reação de PCR foi realizada em um termociclador Verity. O programa foi definido de acordo com o protocolo do laboratório e com base nas temperaturas de melting dos *primers* calculadas pelo software Primer3Fold.

Tabela 5: Programa do termociclador para a reação de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação	94°C	3 minutos	
Desnaturação	94°C	1 minuto	30 vezes
Anelamento	60°C	1 minuto	
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	7 minutos	
Resfriamento	4°C	indefinidamente	

3.4.1. Adição de adeninas às extremidades do produto de PCR

Enzimas Taq polimerase de alta fidelidade removem as adeninas 3' dos produtos de PCR, o que dificulta a reação de clonagem em vetores TOPO. Para isso, foi realizado uma incubação do produto de PCR com 1U de Taq polimerase por tubo a 72°C por 10 minutos (Manual da Thermo Fisher). Não é necessário mudar o tampão, uma quantidade suficiente de produtos de PCR adiciona adenina à extremidade 3'.

3.4.2. Clonagem molecular

Para inserção do gene IFN- β 1b nos vetores TOPO, foi realizado a reação de clonagem com o produto de PCR fresco.

Tabela 6: Componentes para a reação de clonagem e respectivos volumes.

Reagentes	Volume
Produto de PCR fresco	2 μ l
Solução Salina	1 μ l
Água	2 μ l
Vetor TOPO	1 μ l
Volume final	6 μ l

3.5. Transformação

Após a construção dos vetores de expressão TOPO, células DH5 α foram transformadas para aumento da quantidade de plasmídeos e preparo de banco para estoque dos vetores.

3.5.1. Preparo das cepas quimiocompetentes

Para a reação de transformação de *E. coli*, as células passaram antes por um processo de quimiocompetência (Current Protocols for Molecular Biology). Uma colônia de células *E. coli* DH5 α foi cultivada *overnight* a 37°C e 250 rpm em tubo falcon estéril de 15 mL com 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) sem suplementação de antibiótico. Após 18 horas, a densidade ótica foi medida em comprimento de onda de 590 nm (DO_{590}). Em seguida, as células foram inoculadas em meio LB novo, novamente a 37°C e 250 rpm, até a $DO_{590} = 0,375$. As culturas foram aliqüotadas em tubos falcon estéril de 50 mL e mantidas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 1600 \times g (3000 rpm) 4°C. O pellet obtido foi ressuspensionado em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada (60 mM CaCl₂, 15% glicerol, 10 mM HEPES pH 7.0) e centrifugado novamente por 5 minutos 1100 \times g (2500 rpm) 4°C. O pellet obtido foi ressuspensionado em mais 10 mL de solução de CaCl₂

gelada e centrifugado na mesma programação anterior. Por fim, o pellet obtido foi ressuspensionado em 2 mL de solução de CaCl₂ gelada e estocadas em microtubos a -80°C.

3.5.2. Transformação

Após obtenção das células quimiocompetentes, foi realizada a reação de transformação dessas células com os plasmídeos TOPO previamente construídos. O plasmídeo é inserido na célula por transformação térmica utilizando o choque térmico. Para cada reação de transformação foi usado 100 µl de células e 1 µl da preparação de plasmídeo (10 ng). A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e, em seguida, colocada em banho-maria a 42°C por 45 segundos. Logo após, o tubo foi colocado no gelo por 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio LB e incubou por 1 hora a 37°C.

3.5.3. Seleção e Isolamento de colônias positivas

Após o período de 1 hora para recuperação das células, semeou-se 100 µl em placas LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubou-se a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foram escolhidas colônias isoladas da placa e cultivadas em 15 mL de meio líquido LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Os tubos foram incubados a 250 rpm e 37°C *overnight*.

3.5.4. Preparo do banco

Parte do cultivo obtido da etapa anterior foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL: 0,5 mL do cultivo e 0,5 mL de glicerol 30% estéril. Os microtubos foram estocados em ultrafreezer a -80°C.

3.6. Extração e purificação do plasmídeo

Para obtenção do plasmídeo a partir das células DH5α transformadas, foi realizado uma extração com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). De acordo com o protocolo do kit para volumes maiores, foi centrifugado 3 mL do cultivo bacteriano por 1 minuto a velocidade máxima (15000 rpm) em duas etapas de 1,5 mL. O pellet obtido foi ressuspensionado em 600 µL de tampão TE. Adicionou-se 100 µL do tampão de lise à mistura, tornando a solução azulada (indicativo de lise das células). Mais 350 µL da solução de neutralização foi adicionada e centrifugou-se por 3 minutos a velocidade máxima. Cerca de 900 µL do sobrenadante foi transferido para a minicoluna do kit e, junto com o tubo de coleta, centrifugou-se novamente por 1 minuto a velocidade máxima.

O sobrenadante que passou para o tubo de coleta foi descartado e adicionou-se 200 μL da solução de remoção de endotoxinas, centrifugando por mais 1 minuto. Por fim a minicoluna foi transferida para um microtubo limpo, adicionou-se 30 μL do tampão de eluição na coluna e centrifugou-se por mais 1 minuto. A solução obtida foi armazenada a -20°C . O DNA plasmidial obtido deste procedimento foi quantificado em Nanodrop.

3.7. Sequenciamento de DNA

Foi realizado um sequenciamento genético dos vetores TOPO-CT e TOPO-NT clonados com o gene do IFN- β 1b. A análise foi feita pelo Instituto Butantan.

3.8. Expressão no sistema de síntese proteica livre de célula

O kit Expressway™ Cell-Free *E. coli* Expression System (Invitrogen) adquirido contém o extrato de *E. coli* otimizado e todos os componentes para expressão da proteína de interesse. A reação foi realizada em criotubo estéril de 1,6 mL a 37°C em shaker orbital a 300 rpm por 6 horas. O volume final de cada reação foi de 100 μL e os reagentes foram adicionados nas quantidades indicadas na tabela 7. Foram seis grupos de síntese proteica com diferentes moldes de DNA:

Tabela 7: Reagentes utilizados na reação de síntese proteica livre de célula e seus respectivos volumes em μL .

Reagente	Volume
Extrato de <i>E. coli slyD</i>	20 μL
2.5X IVPS Tampão de Reação <i>E. coli</i>	20 μL
50 mM Aminoácidos	1,25 μL
75 mM Metionina	1 μL
Mix da enzima T7	1 μL
Sequência de DNA	1 μg
Água destilada livre de DNase/RNase	Volume final de 50 μL

O volume de DNA utilizado variou, conforme a concentração de cada um (tabela 8). O total do volume de DNA e água a serem adicionados totalizaram 6,75 μL .

Tabela 8: Volume de DNA e água a serem adicionados em cada amostra.

DNA	Concentração	Vol. DNA	Vol. água
IFN-TOPO-NT	222,9 ng/ μl	4,5	2,25
IFN-TOPO-CT	214,8 ng/ μl	4,7	2,05
DNA linear	804,4 ng/ μl	1,2	5,55
pMAT	347,2 ng/ μl	2,9	3,85
CALML3/controle positivo	1000 ng/ μl	1	5,75
Controle negativo	0 ng/ μl	0 ng/ μl	6,75

Após 30 minutos de incubação, o tampão de alimentação é adicionado à reação. O tampão de alimentação é composto pelos reagentes representados na tabela 9.

Tabela 9: Reagentes do tampão de alimentação e seus respectivos volumes em μL .

Reagente	Volume
2X IVPS Tampão de Alimentação	25 μL
50 mM Aminoácidos	1,25 μL
75 mM Metionina	1 μL
Água livre de DNase/RNase	Volume final de 50 μL

Após 5,5 horas, os tubos foram retirados do shaker e armazenados a -20° .

3.9. Expressão no sistema baseado em célula

As placas contendo meio LB e ágar foram suplementadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para a cepa BL21 (DE3) e com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol para a cepa Rosetta (DE3). Incubou-se a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, foram escolhidas colônias isoladas das placas, que foram cultivadas em 15 mL de meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para a cepa BL21 (DE3) e com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol para a cepa Rosetta (DE3). Mediu-se a DO_{600} e incubou-se os tubos a 37°C e 250 rpm até DO atingir um valor entre 0,5 e 0,8 (3 horas). A cultura foi dividida em tubos falcon de 50 mL, com 5 mL cada e induziu-se com IPTG 0,1 mM de acordo com estudo já realizado por Villela (2008). As culturas foram incubadas a 250 rpm e 37°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 10 minutos e o pellet foi armazenado a -20°C .

3.10. Análise da proteína

3.10.1. Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) foi realizada para identificar uma banda de aproximadamente 22 kDa, referente ao peso molecular do interferon- $\beta 1b$. Realizou-se previamente uma precipitação das proteínas com acetona. O pellet foi ressuscitado em tampão Tris e as amostras foram tratadas com tampão de amostra Laemmli 1x (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125 M Tris-HCl, pH aproximadamente 6,8). As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e aplicadas em gel gradiente de 5-15%. A eletroforese

ocorreu a 120 mV usando tampão de amostra composto de glicina 192 mM, Tris 25 mM e 0,1% de SDS, pH 8.3. Os géis foram corados com Coomassie Blue e descorados com solução 30% etanol/10% ácido acético. O marcador molecular utilizado foi o GE Rainbow Full Range.

3.10.2. Western blotting

Para o ensaio de Western blotting, foi realizado uma eletroforese em SDS-PAGE sem corar o gel. O dispositivo foi montado utilizando duas esponjas, dois papéis filtro e uma membrana de PVDF. Todos os componentes foram pré-tratados em tampão de transferência contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM e 20% metanol antes da montagem. A transferência foi realizada a 100 mV, 350 mA, por 1 hora. A membrana foi então bloqueada com tampão TBS-Tween contendo 5% de leite desnatado (Molico). A membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween e incubado overnight a 4°C com o anticorpo anti-His6 diluído em TBS-Tween 5% leite desnatado 1:500. No dia seguinte a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-Tween e incubada novamente com o anticorpo secundário (diluído em TBS-Tween 5% leite desnatado 1:15000). O gel foi visualizado através do software ImageStudio.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise do gene Interferon-β1b

Realizou-se um levantamento em bancos de dados como Uniprot para o gene selvagem do interferon-β. O gene localiza-se no cromossomo 9 do genoma humano e a proteína na sua forma endógena é composta por 166 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 23 kDa. Possui modificações pós-traducionais como glicosilação, ponte dissulfeto e peptídeo sinal. Glicosilações não são realizadas por microrganismos procariontes, mas um estudo anterior (RUNKEL, 1998) demonstrou que a ausência desta modificação pós-traducional não afeta a eficácia terapêutica do biofármaco. Outra informação obtida foi que a sequência nucleotídica é composta apenas por um éxon. Portanto, tendo em vista a ausência de íntrons e a possibilidade de não glicosilar a proteína, determinou-se que o sistema de expressão cell-free seria em *Escherichia coli*. O lisado de *E. coli* foi escolhido por garantir um alto nível de expressão e porque o Betaseron já é sintetizado neste microrganismo, porém no sistema baseado em célula.

Figura 5: Análise das modificações pós traducionais do interferon beta 1. A proteína foi anotada com evidências experimentais. Dados do banco da Uniprot.

PTM / Processing¹

Molecule processing					
Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Signal peptide ¹	1 - 21		Add BLAST		21
Chain ¹ (PRO_0000016400)	22 - 187	Interferon beta	Add BLAST		166

Amino acid modifications					
Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Modified residue ¹	24	Phosphotyrosine By similarity			1
Disulfide bond ¹	52 ↔ 162	1 Publication			
Glycosylation ¹	101	N-linked (GlcNAc...) asparagine			1

Foram realizadas algumas modificações na sequência nucleotídica. Uma delas foi a retirada da sequência que codifica o peptídeo sinal, uma vez que a ausência de membrana do sistema CFPS torna desnecessária uma sinalização para exportar a proteína. Outra alteração foi uma mutação no códon que codifica a cisteína-17 (A → T). O interferon possui três resíduos de cisteína, localizados nas posições 17, 31 e 144. Qualquer dessas cisteínas podem interagir entre si e formar pontes dissulfeto, mas somente uma conformação (entre as cisteínas 31 e 144) torna a molécula estável e biologicamente ativa.

Estudos anteriores já reportaram que trocar a cisteína-17 por uma serina preveniu a formação de pontes dissulfeto incorretas (MARK, 1986).

4.2. Planejamento *in silico* do vetor de expressão linear

Para a construção do vetor de expressão linear, incluiu-se alguns elementos a *upstream* e *downstream* do gene. A upstream o promotor T7, que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7 e tem capacidade de induzir alto nível de expressão, e o sítio de ligação ribossomal (RBS). O gene do interferon possui o códon de início (ATG) e, após o códon de parada, há uma região terminadora T7 que aumenta a estabilidade do RNA mensageiro e melhora o rendimento de síntese (NOMOTO, 2018). A sequência nucleotídica e de aminoácidos estão na figura 6 e, destacado em azul, tem-se o gene do interferon- β 1b.

Figura 6: Sequência nucleotídica do vetor de expressão linear para síntese da proteína recombinante IFN- β 1b (GeneArt).

1.	CATATGATGCATCGGTTAATACGACTCACTATAGGGAGACACACGACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTT
	M S Y N L L G F L Q R S S N
70.	TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATACCCTTATGAGCTATAATCTGCTGGGTTTTCTGCAGCGTAGCAGCAA
	F Q S Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M N
139.	TTTTCAGAGCCAGAAACTGCTGTGGCAGCTGAATGGTCTGCTGGAATATTGTCTGAAAGATCGCATGAA
	F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I Y
208.	CTTTGATATCCCGGAAGAAATTAACAGCTGCAGCAGTTCAGAAAGAAGATGCAGCACTGACCATTTA
	E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W N E T I
277.	TGAAATGCTGCAGAACATCTTTGCCATCTTTCGTCAGGATAGCAGCAGCACCGGTTGGAATGAAACCAT
	V E N L L A N V Y H Q I N H L K T V L E E K L
346.	TGTTGAAAACCTGCTGGCCAATGTGTATCATCAGATTAATCATCTGAAAACGGTGTGGAAGAGAAGCT
	E K E D F T R G K L M S S L H L K R Y Y G R I
415.	GGAAAAAGAAGATTTTACACGCGGTAAACTGATGAGCAGCCTGCATCTGAAACGTTATTATGGTCGTAT
	L H Y L K A K E Y S H C A W T I V R V E I L R
484.	TCTGCACTACCTGAAAGCCAAGAATATAGCATTGTGCATGGACCATTTGTGCGTGTGAAATTTCTGCG
	N F Y F I N R L T G Y L R N *
553.	TAACCTTCTATTTTCATTAATCGCCTGACCGGTTATCTGCGCAATTAAGGGTGTTTAAACTATATAGAA
622.	TAAAAGAACAAACCTTAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGG
691.	GTTTTTTTCTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATAATGGATCC

Os elementos do vetor de expressão linear e suas respectivas sequências nucleotídica estão listados abaixo e representados esquematicamente na Figura 8.

1. Enzima de restrição (NdeI) : CATATG
2. Espaço antes do T7: ATGCATCGGT
3. T7: TAATACGACTCACTATAGGG
4. Espaço T7-RBS:

AGACACACGACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA

5. RBS: AGGAGA
6. Espaço RBS-IFN: TACCCTT
7. IFN-beta 1b:

ATGAGCTATAATCTGCTGGGTTTTCTGCAGCGTAGCAGCAATTTTCAGAGCCAGAA
 ACTGCTGTGGCAGCTGAATGGTCGTCTGGAATATTGTCTGAAAGATCGCATGAACT
 TTGATATCCCGGAAGAAATTAACAGCTGCAGCAGTTCCAGAAAGAAGATGCAGC
 ACTGACCATTTATGAAATGCTGCAGAACATCTTTGCCATCTTTCGTCAGGATAGCAG
 CAGCACCGGTTGGAATGAAACCATTGTTGAAAACCTGCTGGCCAATGTGTATCATC
 AGATTAATCATCTGAAAACGGTGCTGGAAGAGAAGCTGGAAAAAGAAGATTTTAC
 ACGCGGTAAACTGATGAGCAGCCTGCATCTGAAACGTTATTATGGTCGTATTCTGC
 ACTACCTGAAAGCCAAAGAATATAGCCATTGTGCATGGACCATTGTGCGTGTGAA
 ATTCTGCGTAACTTCTATTTTATTAATCGCCTGACCGGTTATCTGCGCAATTAA

8. Espaço IFN-T7 terminator:

AAGGGTGTTTAAACTATATAGAATAAAAGAACAAACCTTA

9. T7 terminator:

GCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTT
 TTTGCTGAAAGGAGGAACCTATATCCGGATAAT

10. Enzima de restrição (BamHI): GGATCC

Figura 7: Esquema dos elementos do vetor de expressão linear.



4.3. Otimização de códon

O código genético é degenerado, ou seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por diferentes códons. Assim, existe um maior número de códons do que aminoácidos e seus respectivos RNAs transportadores (tRNA). Quando as primeiras sequências de genes foram determinadas, observou-se que os códons são usados de forma não-aleatória. Em outras palavras, alguns genes altamente expressos usam preferencialmente um subconjunto de códons, o que sugere uma relação entre o viés de códon e a expressão de proteínas. Dependendo do organismo hospedeiro, é diferente a frequência com que alguns tRNA são codificados. Portanto, a otimização dessa sequência para tRNAs mais frequentes para o organismo escolhido como hospedeiro torna possível o aumento da síntese, mimetizando o padrão de viés de códon.

Essa descoberta levou ao desenvolvimento de diversos softwares de melhoria de códon. Os programas se diferenciam entre si pela estratégia utilizada, como por exemplo, a forma em que o viés de códon é medido, o número de variáveis consideradas, as aplicações e as implementações. Algumas técnicas utilizam o códon mais ideal entre todas as possibilidades de aminoácidos, outras ajustam o uso de códons de modo proporcional à

Com todas as modificações realizadas no gene, a proteína do interferon- β 1b humana recombinante possui um peso molecular de aproximadamente 20 kDa. A proteína codificada pelo vetor de expressão TOPO possui uma cauda de histina que aumenta o peso molecular final da proteína para cerca de 22,5 kDa.

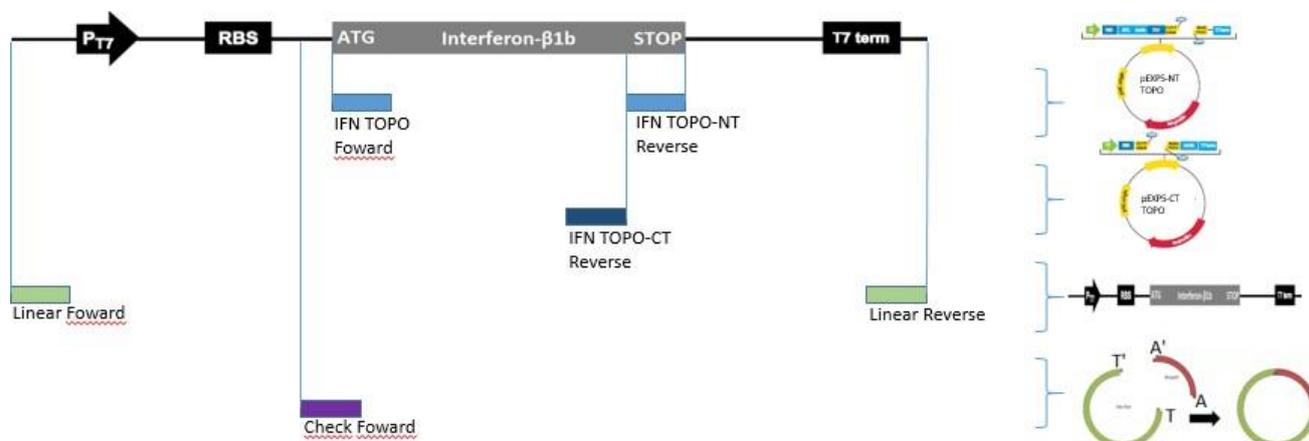
4.4. Design dos primers

Foram realizadas reações de PCR para três finalidades. A primeira foi a amplificação do gene do interferon para clonagem no vetor TOPO. Para isso, foi desenhado o primer “IFN TOPO Foward”, o “IFN TOPO-CT Reverse” e o “IFN TOPO-NT Reverse”. Foram construídos dois primers reversos para os dois tipos de vetores TOPO. Ambos os vetores possuem praticamente os mesmos elementos, a diferença entre eles é a posição da cauda de histidina, na qual um fica na extremidade carboxila terminal (C terminal) e o outro na amino terminal (N terminal). No vetor em que a cauda de histidina fica a N terminal, o primer reverso se inicia no primeiro códon ATG e termina no TAA (em azul claro na figura 9). Já no vetor que possui cauda de histidina a C terminal, é necessário que o primer reverso não possua o códon de terminação TAA do gene do interferon para que a transcrição continue e codifique a cauda de histidina (em azul escuro na figura 9). A segunda finalidade da PCR neste estudo foi para confirmar a clonagem do gene nos vetores TOPO. Para isso foi desenhado o vetor “Check Foward” (em roxo na figura 9). O par reverso deste pode ser qualquer dos *primers* reversos, desde que as temperaturas de anelamento estejam próximas. E a terceira aplicação é para amplificação do vetor de expressão linear e obtenção de maior quantidade de DNA (Linear Foward e Linear Reverse – em verde na figura 9). Portanto, os pares são: 1 e 2; 1 e 3; 4 e 5; 6 e 3.

Tabela 10: Lista dos primers utilizados nas reações de PCR, com suas respectivas seqüências nucleotídica e propriedades (número de pares de bases, temperatura de melting e conteúdo CG).

Nome do primer	Sequência 5’-3’	Propriedades
1 - IFN TOPO Foward	ATGAGCTATAATCTGCTGGGTTTTC	25 pb, Tm 59°C, 37,5 % CG
2 - IFN TOPO-NT Reverse	TTAATTGCGCAGATAACCGG	20 pb, Tm 56°C, 45,5 % CG
3 - IFN TOPO-CT Reverse	ATTGCGCAGATAACCGGTC	19 pb, Tm 58°C, 50,0 % CG
4 - Linear Foward	ATGCATCGGTTAATACGACTCAC	23 pb, Tm 58°C, 43,5 % CG
5 - Linear Reverse	ATTATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC	26 pb, Tm 57°C, 37,0 % CG
6 - Check Foward	TTAAGAAGGAGATACCCTTATGAGC	25 pb, Tm 57°C, 28 % CG

Figura 9: Representação esquemática do uso dos primers e sua localização de anelamento na sequência nucleotídica alvo.

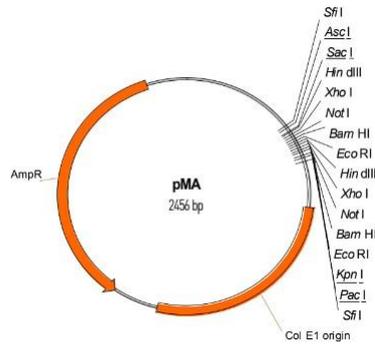


Foi realizada uma análise *in silico* para que o *primer* tenha uma temperatura de *melting* (T_m) entre 50 e 60° C, que é a temperatura de desnaturação de metade das moléculas de DNA. *Primers* com T_m acima de 65°C tem uma tendência para anelamentos secundários. Existem vários métodos de se calcular a T_m , sendo a teoria termodinâmica de Nearest Neighbor a mais aceita e de maior fidelidade. Com o valor da T_m , é possível estimar o valor da temperatura de anelamento (T_a), definido como 3 a 5°C abaixo da T_m . Também foi analisada a especificidade dos *primers* e a possibilidade de formação de dímeros.

4.5. Verificação da sequência adquirida

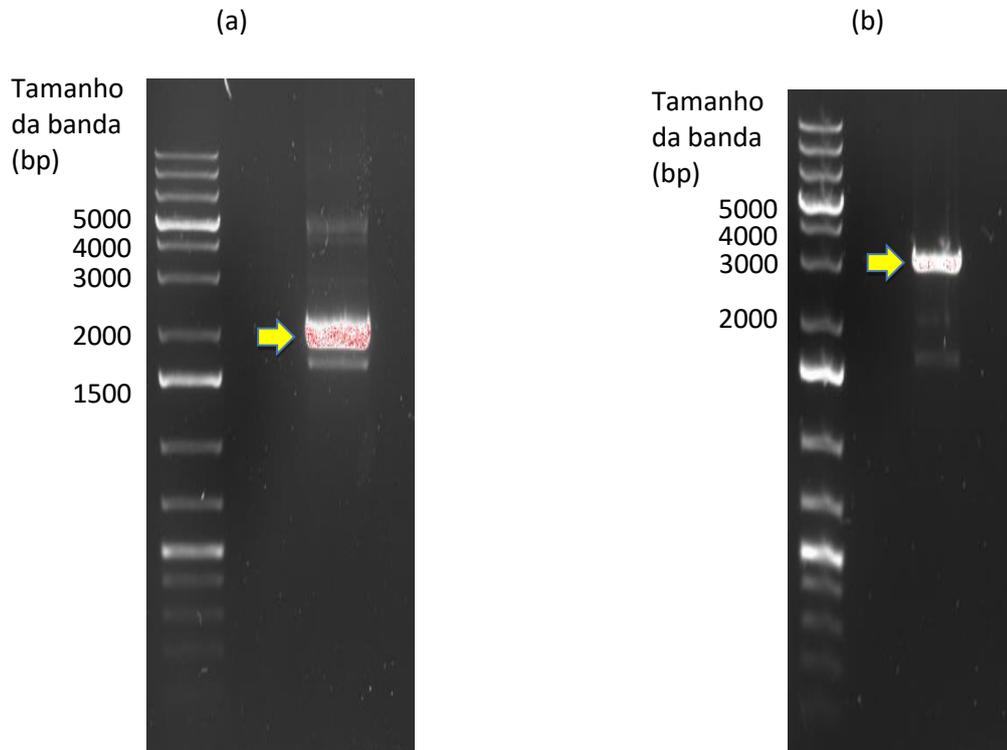
A sequência nucleotídica do gene do IFN- β 1b estava clonado em um plasmídeo (pMA) de 2456 pares de bases com resistência à ampicilina, cujo mapa do vetor está representado na Figura 10. O DNA foi ressuspensionado em água ultrapura para uma concentração final de 500 ng/ μ L. Uma segunda alíquota foi feita para uma diluição na concentração de 26 ng/ μ L para os ensaios de PCR e preparo do banco do gene (transformação de DH5 α e armazenamento a -80°C).

Figura 10: Mapa do plasmídeo (pMA) no qual foi clonado o gene Interferon- β 1b recombinante.



Para conferir o tamanho do fragmento, o plasmídeo foi extraído da célula e purificado com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) e submetido a uma eletroforese em gel de agarose. No entanto, pelo fato de o plasmídeo estar em uma estrutura superenovelada, apareceu uma banda de menor tamanho que o esperado – que seria de 3,2 kb (Figura 11a). Por isso, linearizou-se o plasmídeo através da digestão com a enzima XbaI, que cortou o fragmento em um único local (de acordo com o mapa de restrição da Figura 10), identificando-se a banda na posição esperada (Figura 11b).

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo circular (a) e do fragmento linearizado com a digestão de XbaI (b).



4.6. Preparo do vetor de expressão pEXP5/TOPO-IFN

Para expressão no sistema livre de célula através de plasmídeo circular foi utilizado o vetor TOPO® TA Cloning® (Invitrogen). A construção deste vetor com o gene do interferon- β 1b é mostrado na Figura 12. Este vetor baseia-se na topoisomerase I, isolada do vírus Vaccinia, que reconhece a sequência de DNA 5'-CCCTT-3' e abre a dupla fita neste local. A energia da quebra da ligação fosfodiéster é armazenada em uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e em um resíduo de tirosina da topoisomerase I. Na presença de um fragmento de DNA com um grupo 5' hidroxil, a ligação covalente é desfeita e as duas duplas fitas são unidas, liberando a topoisomerase I. Para que a ligação ocorra de forma complementar à timina terminal, o produto de PCR deve possuir adenina nas extremidades 3'. A Taq DNA polimerase possui uma atividade de transferase terminal independente do DNA, que adiciona adenina às extremidades 3' do produto de PCR. Dessa forma, é possível clonar o produto de PCR no vetor TOPO sem o uso de ligase ou enzimas de restrição (Figura 13). Entretanto, para que a amplificação do inserto não contenha erros, foi utilizada uma polimerase de alta fidelidade, a qual não possui a atividade de inserir adeninas às extremidades 3'. Para isso, após a reação de PCR, foi realizado uma incubação com a Taq convencional para adição das adeninas.

Figura 12: Análise da sequência do vetor de expressão para detecção de regiões que possam ser reconhecidas por enzimas de restrição (SnapGene).

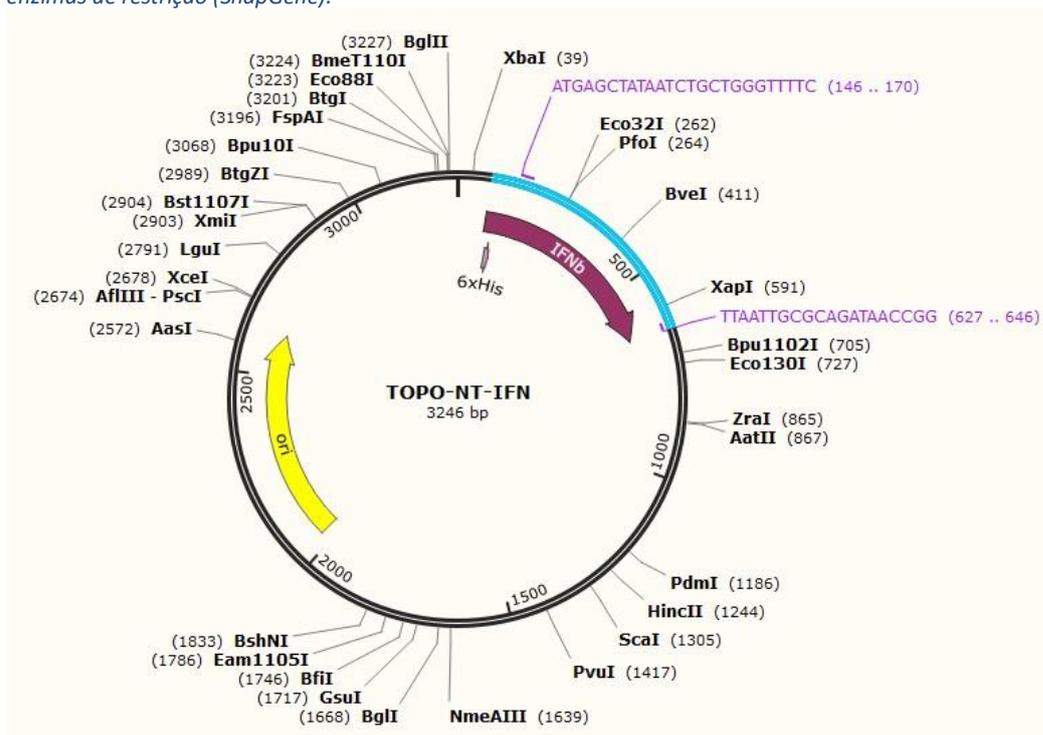
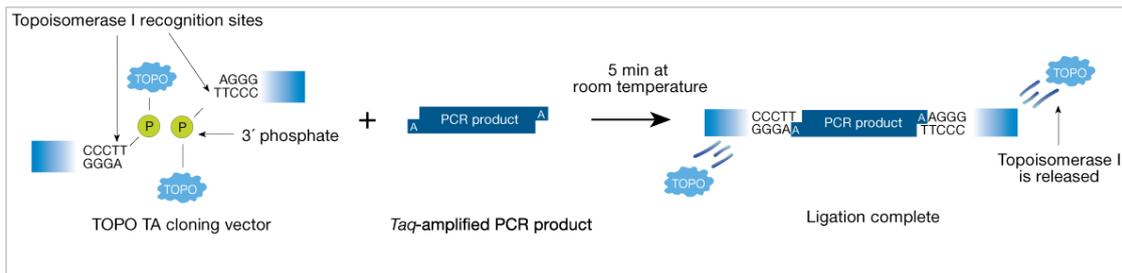
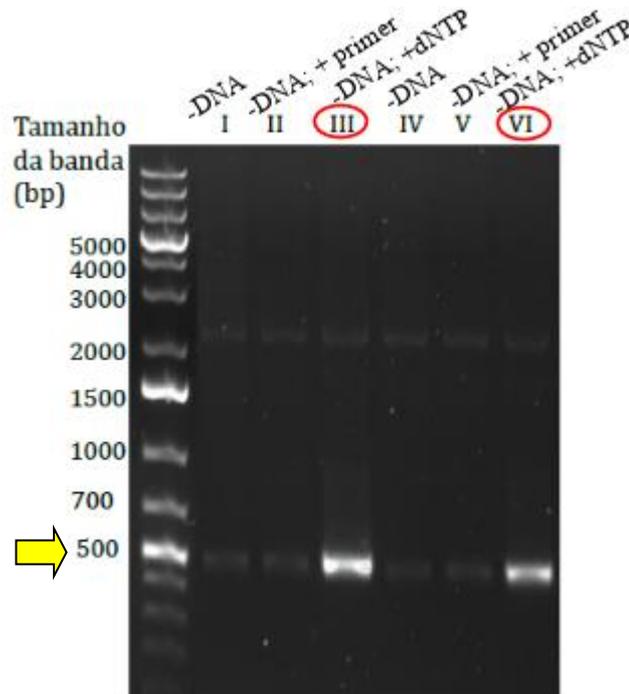


Figura 13: Funcionamento do vetor TOPO-TA Cloning.



O ensaio de PCR para amplificação do gene do IFN- β 1b foi otimizado para que houvesse um maior número de fragmentos amplificados (proporcionalmente à intensidade da banda). Para isso, alterou-se a concentração de DNA (linhas I e IV), de primers (linhas II e V) e de dNTPs (linhas III e VI). Como podemos observar na figura 14, o aumento da concentração de dNTPs (20 mM) aumentou a intensidade da banda, ou seja, maior foi a quantidade de fragmentos gerados na reação de PCR.

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose. O padrão de peso molecular utilizado foi o GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

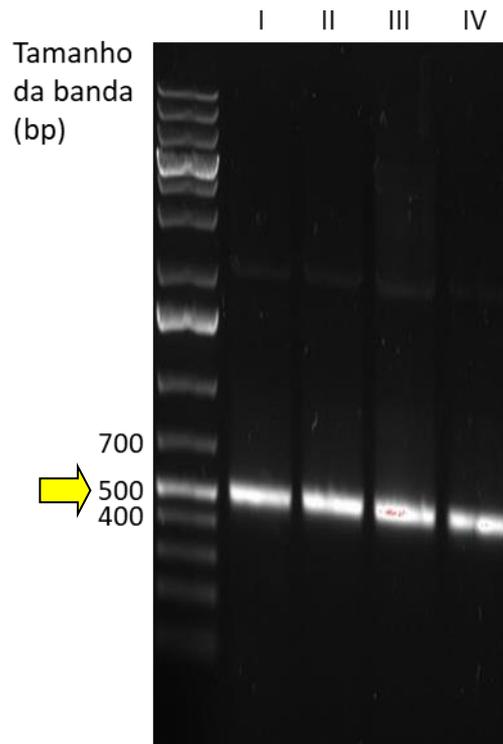


Legenda: linhas I e IV há menor concentração de DNA; linhas II e V há menor concentração de DNA e maior concentração de primer; e linhas III e VI há menor concentração de DNA e maior concentração de dNTPs

Portanto, para a construção do vetor de expressão, foi realizado a seguinte sequência de ensaios: PCR para a amplificação do gene do IFN- β 1b, incubação com a Taq para adição de adeninas às extremidades 3', clonagem nos vetores pEXP5-NT/TOPO e pEXP5-CT/TOPO, transformação do vetor em células DH5 α , seleção das colônias positivas com

o plaqueamento em LB-Agar suplementado com ampicilina, cultivo em meio líquido LB com ampicilina e, por fim, a extração do plasmídeo. Para confirmar se o plasmídeo foi clonado corretamente, foi realizada uma PCR com um primer (check) que anela na região de intersecção do vetor TOPO e do gene IFN- β 1b. O aparecimento de banda na eletroforese em gel de agarose (Figura 15) é um indicativo de que a clonagem foi realizada com sucesso.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose para confirmar a clonagem do gene do IFN- β 1b nos plasmídeos de expressão pEXP5-NT/TOPO.



Legenda: Linhas I-IV são resultados da mesma amostra, em quaduplicata

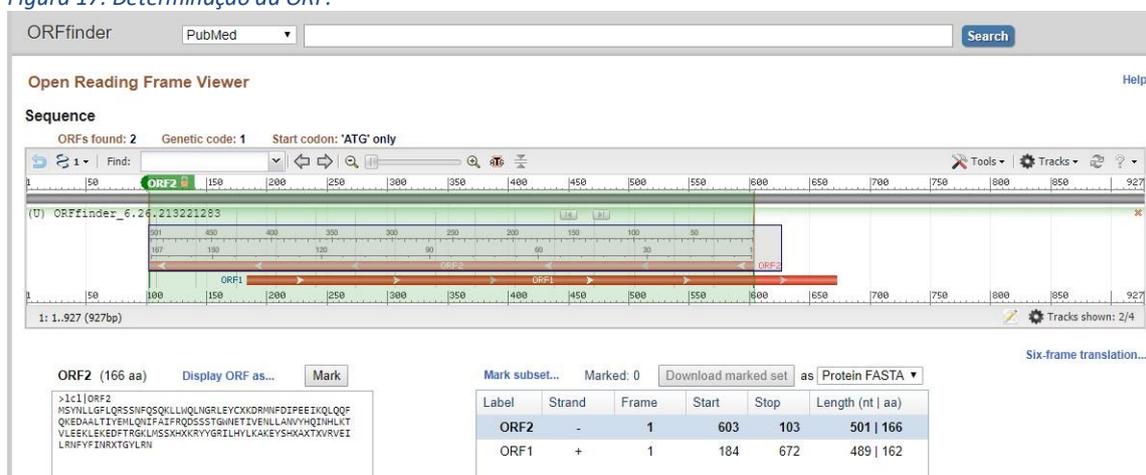
4.7. Sequenciamento genético

Após a clonagem do gene IFN- β 1b nos vetores TOPO-CT e TOPO-NT, as amostras foram sequenciadas para verificação de possíveis mutações e mudanças na fase de leitura. Como mostra a figura 16, o alinhamento com a sequência teórica resultou em 98,47% de identidade. Não correspondeu à totalidade devido às primeiras e últimas bases da sequência que não foram bem identificadas no sequenciamento. Pelo ORFfinder (NCBI) determinou-se que a região codificadora e a fase de leitura estavam corretas.

Figura 16: Alinhamento da sequência obtida no sequenciamento genético com a sequência teórica (NCBI).



Figura 17: Determinação da ORF.



4.8. Preparação do vetor de expressão linear

O vetor de expressão linear foi sintetizado pela GeneArt. Para aumentar a quantidade de DNA, realizou-se uma reação de PCR. Na eletroforese em gel de agarose espera-se uma banda única de aproximadamente 700 pares de bases (Figura 18), porém há outras bandas além do fragmento de interesse. O resquíio de DNA plasmidial e a ocorrência do arraste indicam que há excesso de DNA. Dado que não é recomendado purificar a banda a partir do gel de agarose (pois isso pode inibir significativamente a reação de síntese proteica) reduziu-se a concentração de DNA. Realizando-se uma série de diluições: 50 (linha I), 80 (linha II), 100 (linha III), 150 ((linha IV) e 200 vezes (linha V) a partir da concentração de 26 ng/μl. Determinou-se que a concentração de 0,13 ng/μl (linha V) foi a que teve melhor resultado devido ao menor arraste (Figura 19).

Figura 18: Amplificação do vetor de expressão linear.

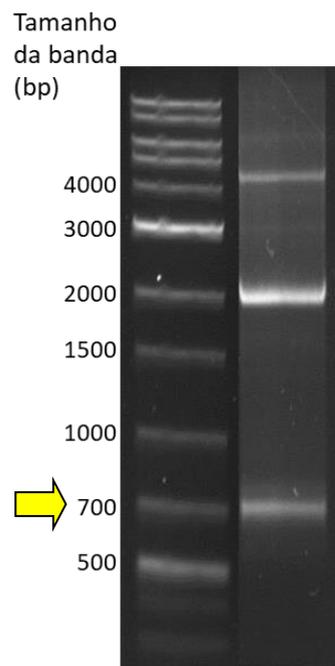
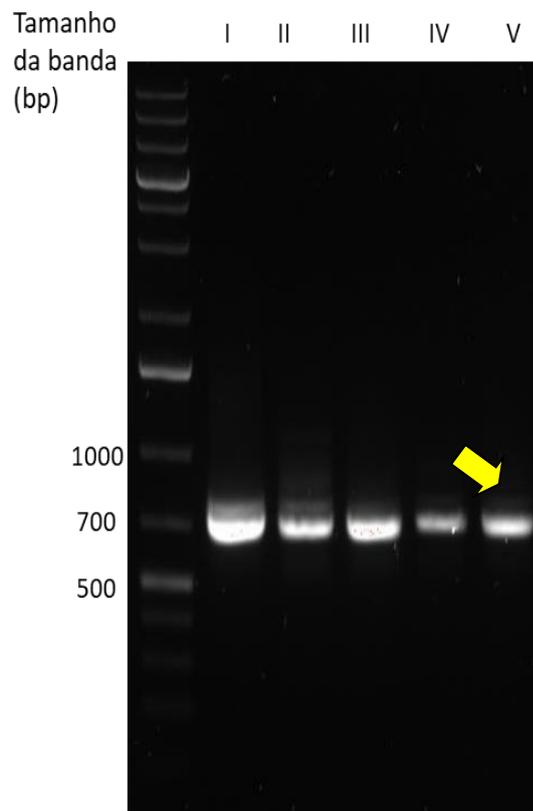


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose para determinação da melhor concentração de DNA para a preparação do DNA linear a partir da reação de PCR.



O vetor de expressão linear é uma alternativa ao DNA plasmidial que o sistema CFPS aceita. Sem a necessidade de seleção de colônias, cultivo, extração e purificação do DNA, o vetor de expressão linear requer apenas reação de PCR para amplificação (SCHINN, 2016). A desvantagem é que esse formato de DNA é mais instável e mais suscetível a ação de nucleases. Porém, recentemente estudos têm desenvolvido métodos que permitem o seu uso em reações cell-free. Estratégias como adição da proteína Gam à reação cell-free (inibidor da exonuclease V, a principal nucleasse responsável pela degradação de DNA linear) (KATSURA, 2017); construção de uma dupla fita de DNA contendo o sítio χ , que regula a atividade do complexo RecBCD (ou exonuclease V) (MARSHALL, 2017); inclusão de sequências como terminador T7, sequência poli(G), sequências *mini-hairpin* e outras sequências não traduzidas têm sido exploradas (NOMOTO, 2018; SUN, 2013) ou simplesmente a redução da temperatura de cultivo de 37°C para uma faixa de 20-34°C (SEKI, 2007); são exemplos de métodos que diminuíram a degradação do molde de DNA linear, possibilitando seu uso nas reações *cell-free*. No presente estudo, foi adicionado a sequência terminadora T7 para aumentar a estabilidade do fragmento de DNA.

4.9. Expressão CFPS

Conforme mostra o gel de eletroforese em poliacrilamida, não foi possível distinguir uma banda entre 17 e 24 kDa que diferisse do controle negativo, o qual mostra apenas as proteínas do lisado celular. A aplicação das amostras seguiu a seguinte ordem: linha I e II: controle negativo; linha III: pMAT; linha IV: calmodulina/controle positivo; linha V: DNA linear; linha VI: IFN-TOPO-CT; linha VII: IFN-TOPO-NT. Posteriormente, em outro experimento realizou-se um western blotting, um ensaio mais sensível para identificação da proteína de interesse através de afinidade pelo anticorpo monoclonal. A sequência de amostras aplicadas foram: linha I: calmodulina; linha II: controle positivo (uma proteína com cauda de histidina de 20 kDa); linha III: IFN-TOPO-CT; linha IV: IFN-TOPO-NT. No entanto, apenas a banda da linha II aparece, referente à proteína utilizada de controle positivo para a reação. Nota-se que o sistema *cell-free* não produziu a proteína de interesse, nem seu padrão positivo, a calmodulina. Uma possível explicação é o fato de que o kit adquirido ficou muito tempo (3 meses) parado na alfândega do aeroporto sem o devido armazenamento. Alguns reagentes precisavam ser mantidos a temperatura de -80°C e outros a -20°C. Se estas condições de armazenamento não foram

seguidas, provavelmente componentes da maquinaria celular, essenciais para a síntese da proteína, foram degradados. Isso é confirmado pela não produção da calmodulina, controle positivo enviado no próprio kit, o qual certifica síntese de 666,5 µg/mL (Figura 22).

Figura 20: Eletroforese em gel de SDS-PAGE (gradiente 7-15%). Amostras resultantes da expressão de IFN na plataforma CFPS.

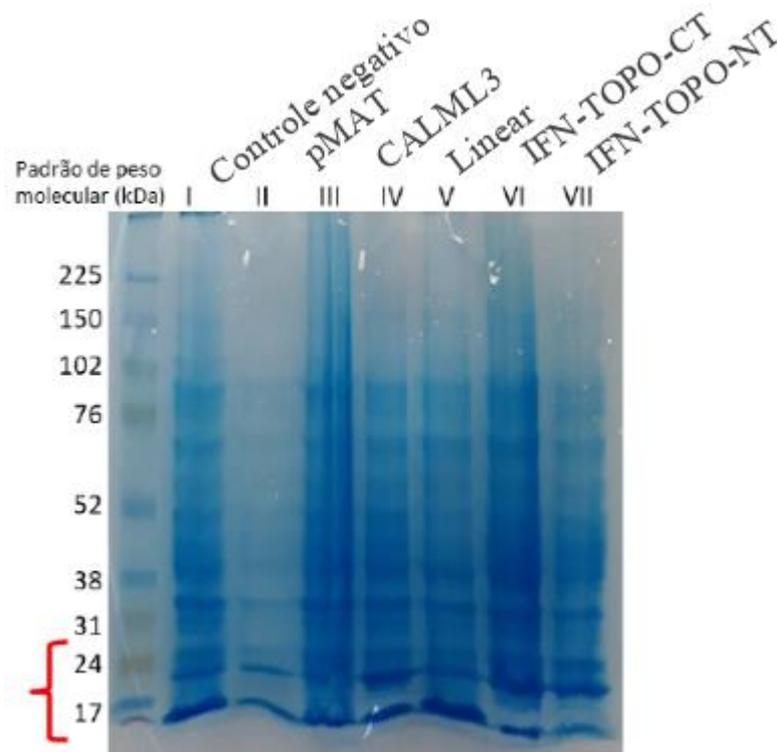


Figura 21: Western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag para identificação de proteínas com cauda de histidina.

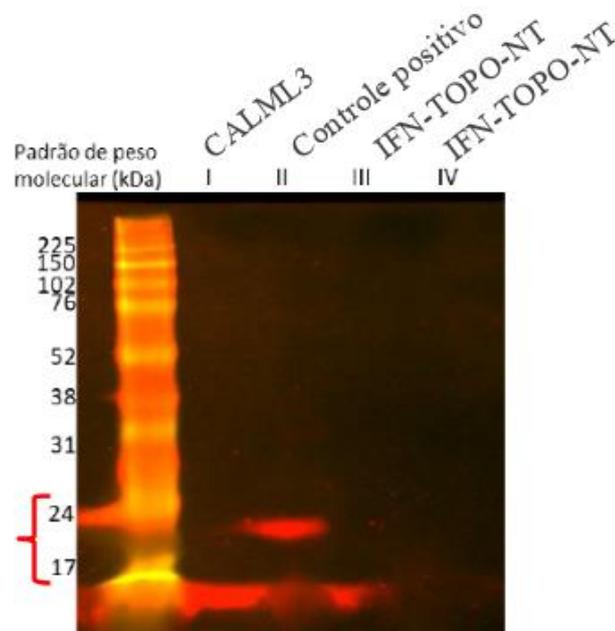
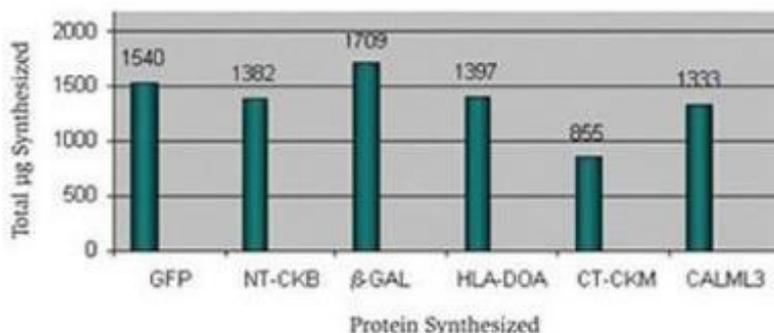


Figura 22: Nível de síntese que o sistema *cell-free* deveria atingir para a proteína calmodulina (controle positivo) em um kit funcional.



GFP, lacZ, and 4 other open reading frames were cloned into pEXP5-NT/TOPO[®] or pEXP5-CT/TOPO[®]. The resulting expression constructs were used to generate recombinant protein in 2 ml Expressway[™] Milligram reactions (1 ml initial reaction plus 1 ml Feed Buffer). Expression levels obtained after a 6 hour reaction at 37°C were determined by [³⁵S] methionine trace labeling.

4.10. Expressão celular

Foi realizado também a síntese baseada em célula com os mesmos vetores de expressão, utilizando as cepas de BL-21(DE3) e Rosetta (DE3). Cepas com (DE3) na nomenclatura são linhagens modificadas para conter o lisogen λ DE com o promotor lacUV5 para controlar a expressão de T7 polimerase. Isso permite que expressões baseadas em promotor T7 sejam induzidas via IPTG, como é o vetor de expressão deste estudo. Cepas do tipo Rosetta são derivadas de BL21 que são capazes de expressar certos tipos de códons raros. Realizou-se, portanto, a reação de transformação nestas cepas, plaqueamento em meio LB-Agar com ampicina (Figura 23); cultivo em meio LB-Amp e indução via IPTG. No gel de eletroforese (Figura 24) é possível observar bandas referentes ao tamanho do IFN- β 1b (22 kDa) expressas pela cepa BL21(DE3) (linhas I e II) e pela cepa Rosetta(DE3) (linha III). Nos poços subsequentes foram aplicadas amostras da síntese pelo sistema *cell-free*: controle negativo (linha IV); calmodulina/controlado positivo (linha V); IFN-TOPO-CT (linha VI); IFN-TOPO-NT (linha VII) e DNA linear (linha VIII). A presença de banda na expressão baseada em célula é mais um indício de que a sequência nucleotídica e o vetor de expressão estavam funcionais e que elementos do sistema *cell-free* haviam sido degradados.

Figura 23: Seleção de colônias de *E. coli* contendo os plasmídeos INF-TOPO-CT e IFN-TOPO-NT.

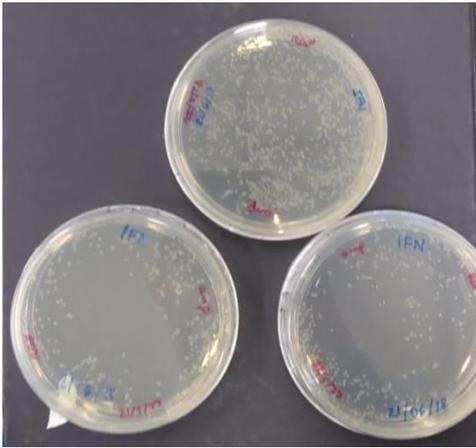
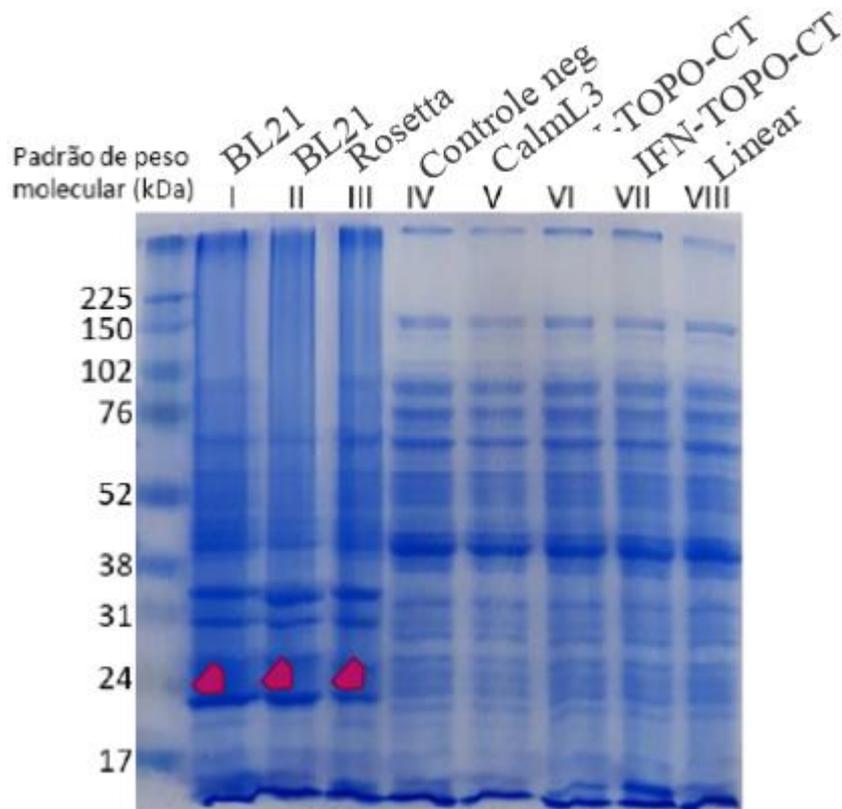


Figura 24: Eletroforese em gel de SDS-PAGE (gradiente 7-15%). Amostras resultantes da expressão baseada em célula.



Trata-se de um sistema extremamente sensível a variações de temperatura, necessitando de um transporte com cadeia de frio fortemente controlado. Como mostra alguns estudos (SALEHI, 2016), a 25°C o rendimento do sistema cai consideravelmente e, a partir de cerca de 10 dias, a viabilidade do extrato é praticamente nula. Por este motivo, a

liofilização do extrato é tão importante. Pesquisadores têm desenvolvido diferentes métodos de liofilização, possibilitando o armazenamento do lisado por meses. Salehi e colaboradores (2016) liofilizaram um extrato de *E. coli* e, apenas com a adição de água, o sistema *cell-free* retorna em sua total funcionalidade, sintetizando onconase em altos

níveis e na forma solúvel para tratamento de mesotelioma maligno e potencial para outros tipos. O lisado permaneceu viável mesmo após 90 dias em temperaturas até 25°C e até 1 ano se armazenado a 4, -20 ou -80°C. Outros estudos também desenvolveram métodos de liofilização do extrato celular, possibilitando armazenamento até 37°C (KARIG, 2017), outros com processos mais simples sem a necessidade de equipamentos especializados (DIDOVYKI, 2017). Com essa vantagem de armazenamento a temperatura ambiente por meses, torna-se possível o transporte de biofármacos e vacinas para territórios de difícil acesso, como locais remotos e áreas de guerra (PARDEE, 2018). A liofilização apresenta também o benefício de eliminação de contaminantes (SMITH, 2014). Para aplicações industriais, a contaminação bacteriana residual pode florescer exponencialmente e ser deletéria em qualquer condição de aumento de escala ou de biorreator. Para biodiagnósticos comerciais, a contaminação pode afetar a consistência e o prazo de validade do sistema. Além disso, algumas aplicações promissoras do sistema *cell-free* incluem tecnologias portáteis e personalizadas, como farmácia e lab-on-a-chip (ADIGA, 2018). A contaminação bacteriana de tais dispositivos levanta potenciais questões éticas e regulatórias em relação à possível descarga de microrganismos recombinantes no meio ambiente.

Mesmo diante dos grandes avanços alcançados na área de síntese proteica livre de célula, muitas questões ainda precisam ser estudadas. Um workshop realizado neste ano de 2019 (ROMANTSEVA; STRYCHALSKI, 2019), um dos participantes faz a seguinte citação: “*In principal, cell-free systems are simpler (than cell-based systems), but in practice, that hasn't been true, at least not yet.*” (LUX, 2019). Laboratórios de pesquisa em diversas partes do mundo têm demonstrado resultados significantes, mas que se diferem em várias etapas do processo, incluindo procedimentos de preparação do extrato, reagentes adicionados ao meio e suas concentrações, meios de cultura, cepas modificadas, construções genéticas, formatos de reação e componentes do citoplasma que podem variar em uma mesma cepa durante diferentes etapas do crescimento celular. Ao mesmo tempo que isso permite uma flexibilidade do processo, é necessária uma otimização para cada produto individualmente.

5. Conclusão

O sistema de síntese proteica livre de célula possui grandes vantagens em relação ao sistema baseado em célula. Um dos benefícios desta plataforma é a síntese de proteínas de difícil expressão. O sistema baseado em célula continua sendo economicamente mais viável para produção de proteínas recombinantes em larga escala, mas aquelas que tem alguma complexidade na síntese, como proteínas insolúveis, dificuldade de enovelamento, grandes perdas em processos de purificação, proteínas citotóxicas. Nestes casos o sistema *cell-free* se torna mais conveniente apesar de seu custo mais elevado. O Interferon- β 1b é uma proteína considerada de difícil expressão por ter elevada tendência a se agregar no citoplasma da célula devido ao seu forte caráter hidrofóbico. Várias estratégias foram adotadas na tentativa de solubilizar a molécula. Mesmo obtendo sucesso na solubilização, outro problema é no processo de re-enovelamento (*refolding*). Durante essas etapas há muita perda de proteína, uma vez que a taxa de reconstituição da proteína na sua estrutura original e biologicamente ativa é muito baixa. Por isso o sistema *cell-free* se torna interessante para a síntese do IFN- β 1b. O presente estudo, portanto, realizou um trabalho *in silico* para otimização do molde de DNA e construção do vetor de expressão; preparação do vetor de expressão com a clonagem do gene IFN- β 1b, PCR para amplificação do molde de DNA linear, expressão no sistema *cell-free* e expressão no sistema baseado em célula. No entanto, não foi possível a identificação da proteína. Por outro lado, a proteína pôde ser identificada na expressão baseada em célula, indicativo este, somado à análise de bioinformática, de que a construção genética estava correta. Possivelmente o kit com os componentes do sistema *cell-free* não ficaram corretamente armazenados durante o transporte e se degradaram. Por este motivo, a liofilização do extrato é tão importante. A forma seca do lisado garante que o produto possa ser transportado a temperatura ambiente, ficando viável de 90 dias a 1 ano. Isso abre horizontes para que a tecnologia alcance áreas remotas e de guerra, levando vacinas e medicamentos biológicos a pacientes em locais de difícil acesso. Apesar da proteína de interesse não ter sido sintetizada com sucesso no sistema CFPS, foram dados alguns passos importantes para atingir este objetivo. No futuro, uma das prioridades é padronizar um sistema livre de células do laboratório capaz de fornecer um elevado rendimento para síntese de proteínas.

REFERÊNCIAS

ADIGA, Rajani et al. Point-of-care production of therapeutic proteins of good-manufacturing-practice quality. **Nature biomedical engineering**, v. 2, n. 9, p. 675, 2018.

BASU, Amartya et al. Structure– Function Engineering of Interferon- β -1b for Improving Stability, Solubility, Potency, Immunogenicity, and Pharmacokinetic Properties by Site-Selective Mono-PEGylation. *Bioconjugate chemistry*, v. 17, n. 3, p. 618-630, 2006.

BORDEN, Ernest C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 6, n. 12, p. 975, 2007.

BRÖDEL, Andreas K.; KUBICK, Stefan. Developing cell-free protein synthesis systems: a focus on mammalian cells. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 2, n. 4, p. 339-348, 2014.

BUNDY, Bradley C. et al. Cell-free biomanufacturing. **Current opinion in chemical engineering**, v. 22, p. 177-183, 2018.

CAI, Qi et al. A simplified and robust protocol for immunoglobulin expression in *Escherichia coli* cell-free protein synthesis systems. **Biotechnology progress**, v. 31, n. 3, p. 823-831, 2015.

CARLSON, Erik D. et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnology advances*, v. 30, n. 5, p. 1185-1194, 2012.

CASCHERA, Filippo. Bacterial cell-free expression technology to in vitro systems engineering and optimization. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 97-104, 2017.

CASCHERA, Filippo; NOIREAUX, Vincent. A cost-effective polyphosphate-based metabolism fuels an all *E. coli* cell-free expression system. **Metabolic engineering**, v. 27, p. 29-37, 2015.

CASCHERA, Filippo; NOIREAUX, Vincent. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription–translation system. **Biochimie**, v. 99, p. 162-168, 2014.

CASTELEIJN, Marco G.; URTTI, Arto; SARKHEL, Sanjay. Expression without boundaries: cell-free protein synthesis in pharmaceutical research. **International journal of pharmaceuticals**, v. 440, n. 1, p. 39-47, 2013.

CHAMBERS, Donald A.; ZUBAY, Geoffrey. The stimulatory effect of cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate on DNA-directed synthesis of β -galactosidase in a cell-free system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63, n. 1, p. 118-122, 1969.

DIDOVYK, Andriy et al. Rapid and scalable preparation of bacterial lysates for cell-free gene expression. **ACS synthetic biology**, v. 6, n. 12, p. 2198-2208, 2017.

DOPP, Jared; TAMIEV, Denis; REUEL, Nigel F. Cell-free supplement mixtures: Elucidating the history and biochemical utility of additives used to support in vitro protein synthesis in *E. coli* extract. **Biotechnology advances**, 2018.

DUDLEY, Quentin M.; KARIM, Ashty S.; JEWETT, Michael C. Cell-free metabolic engineering: biomanufacturing beyond the cell. *Biotechnology journal*, v. 10, n. 1, p. 69-82, 2015.

FUJIWARA, Kei; DOI, Nobuhide. Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154614, 2016.

GITE, Sadanand; LIM, Mark; ROTHSCHILD, Kenneth J. Cell-free protein synthesis systems: Biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 22, n. 1, p. 151-170, 2006.

HONG, Seok Hoon et al. Improving cell-free protein synthesis through genome engineering of *Escherichia coli* lacking release factor 1. **Chembiochem**, v. 16, n. 5, p. 844-853, 2015.

JAROENTOMEENCHAI, Thapakorn et al. Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2686, 2018.

JAVED, Adil; REDER, Anthony T. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. *Pharmacology & therapeutics*, v. 110, n. 1, p. 35-56, 2006.

JIN, Xing; HONG, Seok Hoon. Cell-free protein synthesis for producing 'difficult-to-express' proteins. **Biochemical engineering journal**, v. 138, p. 156-164, 2018.

KANTER, Gregory et al. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3393-3399, 2007.

KARIG, David K. et al. Preservation of protein expression systems at elevated temperatures for portable therapeutic production. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 14, n. 129, p. 20161039, 2017.

KARPUSAS, Michael et al. The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 22, p. 11813-11818, 1997.

KARUNAKARAN, K. T. Recent Progress in Biopharmaceutical Drugs Research and Development. **Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 75-84, 2017.

KATSURA, Kazushige et al. A reproducible and scalable procedure for preparing bacterial extracts for cell-free protein synthesis. **The Journal of Biochemistry**, v. 162, n. 5, p. 357-369, 2017.

- KEYS, Timothy G.; AEBI, Markus. Engineering protein glycosylation in prokaryotes. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, p. 23-31, 2017.
- KIM, Tae-Wan et al. An economical and highly productive cell-free protein synthesis system utilizing fructose-1, 6-bisphosphate as an energy source. **Journal of biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 389-393, 2007.
- KWON, Yong-Chan; JEWETT, Michael C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- LAVICKOVA, Barbora; MAERKL, Sebastian J. A simple, robust, and low-cost method to produce the PURE cell-free system. **ACS synthetic biology**, v. 8, n. 2, p. 455-462, 2019.
- LI, Jian et al. Establishing a high yielding streptomyces-based cell-free protein synthesis system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 1343-1353, 2017.
- LIAN, Qianqian; CAO, Hongzhi; WANG, Fengshan. The cost-efficiency realization in the *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis systems. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 174, n. 7, p. 2351-2367, 2014.
- LIN, Leo S.; KUNITANI, Michael G.; HORA, Maninder S. Interferon- β -1b (Betaseron®): a model for hydrophobic therapeutic proteins. In: *Formulation, characterization, and stability of protein drugs: case histories*. Springer US, 2002. p. 275-301.
- LU, Yuan. Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 23-27, 2017.
- Lux, M., Personal communication. 7 February 2019.
- MARK, David F. et al. Human recombinant cysteine depleted interferon- β muteins. U.S. Patent n. 4,588,585, 13 maio 1986.
- MARSHALL, Ryan et al. Short DNA containing χ sites enhances DNA stability and gene expression in *E. coli* cell-free transcription–translation systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 2137-2141, 2017.
- MATSUBAYASHI, Hideaki; UEDA, Takuya. Purified cell-free systems as standard parts for synthetic biology. **Current opinion in chemical biology**, v. 22, p. 158-162, 2014.
- MATSUDA, Takayoshi; WATANABE, Satoru; KIGAWA, Takanori. Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 431, n. 2, p. 296-301, 2013.
- MAURO, Vincent P.; CHAPPELL, Stephen A. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine*, v. 20, n. 11, p. 604-613, 2014.

MOORKENS, Evelien et al. The market of biopharmaceutical medicines: A snapshot of a diverse industrial landscape. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 314, 2017.

NIRENBERG, Marshall W.; MATTHAEI, J. Heinrich. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 47, n. 10, p. 1588-1602, 1961.

NOMOTO, Mika; TADA, Yasuomi. Cloning-free template DNA preparation for cell-free protein synthesis via two-step PCR using versatile primer designs with short 3'-UTR. **Genes to Cells**, v. 23, n. 1, p. 46-53, 2018.

OGONAH, Olotu W.; POLIZZI, Karen M.; BRACEWELL, Daniel G. Cell free protein synthesis: a viable option for stratified medicines manufacturing?. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 18, p. 77-83, 2017.

PARDEE, Keith et al. based synthetic gene networks. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 940-954, 2014.

PARDEE, Keith. Perspective: Solidifying the impact of cell-free synthetic biology through lyophilization. **Biochemical engineering journal**, v. 138, p. 91-97, 2018.

PEÑALBER-JOHNSTONE, Chariz et al. Optimizing cell-free protein expression in CHO: Assessing small molecule mass transfer effects in various reactor configurations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1478-1486, 2017.

PEREZ, Jessica G.; STARK, Jessica C.; JEWETT, Michael C. Cell-free synthetic biology: engineering beyond the cell. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 12, p. a023853, 2016.

ROMANTSEVA, Eugenia; STRYCHALSKI, Elizabeth A. "In principle, cell-free systems are simpler [than cell-based systems], but in practice, that hasn't been true, at least not yet."—Matthew Lux, workshop.

ROSENBLUM, Gabriel; COOPERMAN, Barry S. Engine out of the chassis: Cell-free protein synthesis and its uses. **FEBS letters**, v. 588, n. 2, p. 261-268, 2014.

RUNKEL, Laura et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon- β (IFN- β). **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 4, p. 641-649, 1998.

SALEHI, Amin SM et al. Cell-free protein synthesis of a cytotoxic cancer therapeutic: Onconase production and a just-add-water cell-free system. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 274-281, 2016.

SCHINN, Song-Min et al. Protein synthesis directly from PCR: progress and applications of cell-free protein synthesis with linear DNA. **New biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 480-487, 2016.

- SCHOBORG, Jennifer A. et al. A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 739-750, 2018.
- SEKI, Eiko et al. Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. **Analytical biochemistry**, v. 377, n. 2, p. 156-161, 2008.
- SHINODA, Takehiro et al. Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane proteins. **Scientific reports**, v. 6, p. 30442, 2016.
- SMITH, Mark Thomas et al. Lyophilized *Escherichia coli*-based cell-free systems for robust, high-density, long-term storage. **Biotechniques**, v. 56, n. 4, p. 186-193, 2014.
- SPIRIN, Alexander S.; SWARTZ, James R. (Ed.). **Cell-free protein synthesis: methods and protocols**. John Wiley & Sons, 2008.
- STECH, M. et al. Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled in vitro transcription-translation system based on CHO cell lysates. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12030, 2017.
- STECH, Marlitt; KUBICK, Stefan. Cell-free synthesis meets antibody production: a review. **Antibodies**, v. 4, n. 1, p. 12-33, 2015.
- SULLIVAN, Challise J. et al. A cell-free expression and purification process for rapid production of protein biologics. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 238-248, 2016.
- SUN, Zachary Z. et al. Protocols for implementing an *Escherichia coli* based TX-TL cell-free expression system for synthetic biology. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 79, p. e50762, 2013.
- SWARTZ, James R. Transforming biochemical engineering with cell-free biology. **AICHE Journal**, v. 58, n. 1, p. 5-13, 2012.
- THORING, Lena et al. High-yield production of “difficult-to-express” proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11710, 2017.
- TRAN, Kevin et al. Cell-free production of a therapeutic protein: Expression, purification, and characterization of recombinant streptokinase using a CHO lysate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 92-102, 2018.
- VILLELA DR, Anne et al. Human interferon B1 ser17: Coding DNA synthesis, expression, purification and characterization of bioactive recombinant protein. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, p. 111-117, 2010.
- VILLELA, Anne Drumond et al. Superprodução do interferon β 1 humano recombinante em *Escherichia coli*. 2008.

VITOLO, M.; PESSOA, A. *Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre sua aplicação industrial*. 1ª Edição. Editora Blucher Ltda., Brasil, 2015.

WALSH, Gary. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 9, p. 917-924, 2010.

WALSH, Gary. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nat. Biotechnol**, v. 36, p. 1136-1145, 2018.

WELSH, John P. et al. Cell-free production of trimeric influenza hemagglutinin head domain proteins as vaccine antigens. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 12, p. 2962-2969, 2012.

ZAWADA, James F. et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1570-1578, 2011.

ZEMELLA, Anne et al. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem*, v. 16, n. 17, p. 2420-2431, 2015.

ZHANG, Yuchen et al. Enhancing the efficiency of cell-free protein synthesis system by systematic titration of transcription and translation components. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 47-53, 2018.

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



São Paulo, 20 de julho de 2019

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que os experimentos realizados nesta dissertação não utilizaram animais vertebrados e nem seres humanos em suas pesquisas, estando livre da anuência da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA-FCF) e da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP-FCF).

Prof. Marco Antonio Stephano

Camila Hiromi Chiba