



Pichia pastoris como ferramenta para produção de vacinas: limitações, desafios e oportunidades

Sérgio Miguel Carneiro Sousa

UMinho | 2023



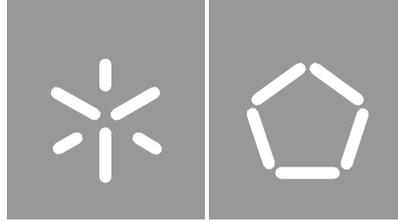
Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Sérgio Miguel Carneiro Sousa

***Pichia pastoris* como ferramenta para a produção de vacinas: limitações, desafios e oportunidades**

outubro 2023



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Sérgio Miguel Carneiro Sousa

***Pichia pastoris* como ferramenta para produção de vacinas: limitações, desafios e oportunidades**

Tese de Mestrado

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho realizado sobre a orientação de

Professora Doutora Lucília Domingues

Doutor Manuel Garrido

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Neste momento de celebração, gostaria de manifestar a minha mais profunda gratidão a todas as pessoas que estiveram comigo ao longo desta incrível jornada académica e pessoal. Cada um de vós desempenhou um papel fundamental no sucesso deste mestrado, e é com grande apreço que dedico estas palavras a todos.

Aos meus pais, que me proporcionaram uma base sólida e me ensinaram o valor do esforço e da dedicação, agradeço do fundo do coração. Vocês estiveram presentes desde o início, sempre me apoiando e incentivando em cada etapa deste percurso. O vosso amor incondicional é a minha maior motivação para alcançar os meus objetivos.

À minha querida Rita, agradeço por seres a minha companheira de vida e por estares sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e de dificuldade. O teu apoio incansável, a tua compreensão e o teu amor foram essenciais para que eu pudesse superar os desafios e concluir este ciclo de estudos. Não tenho palavras suficientes para expressar o quanto és importante para mim.

Um agradecimento especial à minha avó, cujo carinho e apoio inabalável se tornaram fonte de inspiração e força ao longo desta caminhada. A tua presença na minha vida é um verdadeiro presente, e espero honrar o teu legado e as lições que me transmitiste.

Aos meus amigos, que se tornaram uma segunda família, agradeço por estarem sempre comigo, independentemente das circunstâncias. A vossa amizade, a solidariedade e o apoio foram cruciais para me ajudar a enfrentar os momentos de incerteza e a superar os obstáculos que surgiram pelo caminho. A amizade que partilhamos é um verdadeiro tesouro, e espero que continuemos a crescer juntos no futuro.

Também gostaria de agradecer aos meus orientadores e professores, que me guiaram com conhecimento e paciência ao longo desta trajetória académica. O vosso compromisso com a excelência e a vossa dedicação ao ensino foram fundamentais para o meu desenvolvimento como estudante e profissional. Agradeço por terem acreditado em mim e por terem contribuído para a realização deste trabalho.

Por fim, não posso deixar de mencionar e agradecer aos colegas e demais membros da comunidade académica, que me acompanharam nesta jornada e compartilharam comigo as suas experiências, ideias e conhecimentos. A colaboração e o companheirismo de todos foram valiosos para o enriquecimento desta dissertação de mestrado.

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

A expressão de proteínas recombinantes é fundamental na produção de vacinas e medicamentos. Enquanto as células procarióticas, como a *Escherichia coli*, oferecem uma multiplicação rápida e simplicidade nutricional, elas possuem diversas limitações, incluindo agregação intracelular e falta de modificações pós-tradução. As leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris*, são alternativas valiosas devido ao seu crescimento rápido, modificações pós-tradução e manipulação genética fácil. A *P. pastoris*, em particular, destaca-se pela sua capacidade de usar metanol como fonte de carbono e energia e pela secreção eficaz de proteínas recombinantes.

Esta dissertação explora as limitações e desafios atuais na produção de vacinas com *P. pastoris* incluindo aquelas destinadas à prevenção de doenças como o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da Dengue, o vírus da Gripe aviária, o Papiloma Vírus Humano (HPV), o vírus da Hepatite B (HBV) e o SARS-CoV-2 (Covid-19). Além disso, estratégias como a otimização dos codões, a suplementação nutricional e a modificação do padrão de glicosilação demonstraram ser eficazes na melhoria dos níveis de expressão de genes heterólogos que codificam para proteínas que podem ser usadas como vacinas. Alguns exemplos notáveis incluem a expressão bem-sucedida da proteína E1ΔGA do vírus Epstein-Barr e da proteína gp350 do EBV. Embora estas estratégias tenham sido eficazes, em alguns casos a falta de otimização do processo assim como o padrão de glicosilação afetaram de forma negativa a produção das proteínas recombinantes.

Existiu um foco no estudo do desenvolvimento da tecnologia para produzir grandes quantidades de partículas de HBsAg a partir de estirpes recombinantes de *P. pastoris* (proteína usada na produção de vacinas contra a Hepatite B). Analisaram-se os desafios na purificação e obtenção de um produto final de alta qualidade, constatando-se que a vacina formulada com HBsAg derivada de *P. pastoris* demonstra ser segura e eficaz na proteção contra esta infecção.

Por fim, discute-se as novas oportunidades para esses sistemas de expressão, destacando o seu potencial na produção de vacinas o que oferece esperança na luta contra doenças infecciosas, permitindo a produção em larga escala de vacinas mais acessíveis e eficazes.

Palavras-chave: Vacinas, leveduras, proteínas heterólogas, *Pichia pastoris*.

Abstract

The expression of recombinant proteins is paramount in the production of vaccines and medicines. While prokaryotic cells like *Escherichia coli* offer rapid multiplication and nutritional simplicity, they come with various limitations, including intracellular aggregation and a lack of post-translational modifications. Yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, provide valuable alternatives due to their fast growth, post-translational modifications, and easy genetic manipulation. *P. pastoris* stands out for its ability to use methanol as a carbon and energy source, along with its effective secretion of recombinant proteins.

This dissertation explores current limitations and challenges in vaccine production using *P. pastoris*, including those aimed at preventing diseases such as Epstein-Barr virus (EBV), Dengue virus, Avian Influenza virus, Human Papillomavirus (HPV), Hepatitis B virus (HBV), and SARS-CoV-2 (Covid-19). Additionally, strategies like codon optimization, nutritional supplementation, and glycosylation pattern modification have proven effective in enhancing the expression levels of heterologous genes that code for vaccine proteins. Notable examples include the successful expression of the Epstein-Barr virus E1 Δ GA protein and the EBV gp350 protein.

Although these strategies have been effective, in some cases, the lack of process optimization and the glycosylation pattern negatively impacted the production of recombinant proteins.

Considerable focus has been placed on the development of technology to produce large quantities of HBsAg particles from recombinant *P. pastoris* strains (used in Hepatitis B vaccine production). Challenges in purification and obtaining a high-quality final product have been analyzed, with the vaccine formulated with HBsAg derived from *P. pastoris* demonstrating safety and efficacy in protecting against this infection.

Lastly, the monography discusses new opportunities for these expression systems, emphasizing their potential in vaccine production, offering hope in the fight against infectious diseases, an enabling the large-scale production of more accessible and effective vaccines.

Keywords: Vaccines, yeast, heterologous proteins, *Pichia pastoris*.

Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de Integridade	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xii
1. Introdução.....	13
2. A levedura <i>Pichia pastoris</i> como organismo modelo para a produção de proteínas heterólogas.....	17
3. Vantagens e desvantagens no uso de <i>P. pastoris</i> para a produção de vacinas.....	20
4. Caracterização do sistema de expressão de <i>P. pastoris</i>	22
5. O sistema de expressão <i>P. pastoris</i> para produção de vacinas	26
5.1. Vírus Epstein-Barr (EBV)	26
5.2. Vírus Dengue	28
5.3. Vírus da Gripe aviária	29
5.4. Papiloma Vírus Humano (HPV).....	31
5.5. Vírus da Hepatite B (HBV)	32
5.6. SARS-CoV-2 (Covid-19).....	34
6. Rendimento de vacinas em <i>P. pastoris</i>	36
6.1. Purificação da HBsAg a partir de <i>Pichia pastoris</i>	40
7. Perspetivas Futuras	43
8. Conclusão	44
9. Referências bibliográficas	45

Abreviaturas e acrónimos

ACE2 – Enzima conversora da angiotensina 2

AOX – Oxidase do álcool

APC – célula apresentadora de antígenos

CA – casaminoácidos

DNA - ácido desoxirribonucleico

DST – Doenças sexualmente transmissíveis

E1ΔGA – Fragmento C- terminal da EBNA1

EBNA1 – Antígeno Nuclear EBV1

EBV – Vírus Epstein Barr

EDIII – Domínio III do envelope do vírus Dengue

GAP – Gliceraldeído-3-fosfato

HA – Hemaglutinina

HBcAg - Antígeno core da hepatite B

HBeAg - Antígeno e da hepatite B

HBsAg - antígeno de superfície da hepatite B

HBV – Vírus da hepatite B

HPV – Papiloma Vírus Humano

NA – Neuraminidase

PEG – Polietilenoglicol

RBD – Domínio de ligação ao recetor

RE - Reticulo endoplasmático

S – Spike

SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho

UC - Ultracentrifugação

UF - Ultrafiltração

VLPs - Partículas semelhantes a vírus

WT – Wild-type

α -MF - fator-alfa líder da *Saccharomyces cerevisiae*

Índice de Figuras

Figura 1: Classes de vacinas: as suas vantagens e desvantagens (Traduzido de (D'Amico et al., 2021)).....	14
Figura 2: A expressão de genes heterólogos em <i>P. pastoris</i> envolve a linearização dos plasmídeos de expressão contendo o(s) gene(s) de interesse (GOI) antes da transformação. O nível de expressão da proteína desejada pode depender tanto do local de integração cromossômica, que é determinado pelas regiões homólogas de 5' e 3' (5'HR e 3'HR), quanto do número de cópias do gene. Um promotor representativo (P) e um par de terminadores de transcrição (TT) estão representados. Sequências de sinais adequadas vão direcionar a proteína recombinante para a expressão intracelular ou secretora, além de gerir a integração ou ancoragem na membrana (Traduzida de (Ahmad et al., 2014)).....	22
Figura 3: Fenómeno de recombinação homóloga no genoma de <i>Pichia pastoris</i> , que ocorre após a eletroporação de células competentes de levedura. Os vetores lineares clonados são inseridos nas células e ocorre a recombinação entre o promotor 5 (5' AOX1) do vetor e a região AOX1 do genoma de <i>P. pastoris</i> , formando células clonadas com um genoma recombinante. AOX1 refere-se à álcool oxidase 1 e TT à região de terminação de transcrição (Traduzida de (Karbalaei et al., 2020)).....	24
Figura 4: Resumo das características do sistema de expressão <i>P.pastoris</i>	25
Figura 5: A figura apresenta uma representação esquemática do processo de construção e transformação do vetor de expressão pPICZ α A-gp3501-443 em <i>P. pastoris</i> GS115. O fragmento que codifica o Terminal-5 do gp350, que engloba os codões 1 a 443 e possui um His6-tag na extremidade 5', foi inserido em pPICZ α A para permitir a produção da proteína recombinante. Para a integração do vetor recombinante na <i>P. pastoris</i> , o pPICZ α A-gp3501-443 foi linearizado utilizando a enzima SacI e em seguida, integrado no gene AOX1 (adaptado de (Wang, Jiang, Han, et al., 2016)).....	27
Figura 6: Expressão do antígeno do domínio III do envelope do vírus da dengue-1. A imagem mostra o gene sintético de EDIII-D1 com codões otimizados (Adaptado de (Cardoso et al., 2013)).....	29
Figura 7: Open reading frame de NA com uma Tag de 6xHis e um sítio de clivagem protease TEV dentro da frame. O gene NA foi amplificado através de PCR utilizando primers específicos que continham sítios	

de restrição e o sítio de clivagem protease TEV. O amplicão resultante foi clonado num vetor de expressão de levedura pPICZC sob o controlo de um promotor de álcool oxidase na frame com o c-terminal His-tag. O clone positivo foi confirmado através da digestão de restrição e sequenciação do DNA. O clone linearizado foi então transformado para *P. pastoris* por eletroporação, e a integração do gene foi subsequentemente confirmada (Adaptada de (Subathra et al., 2014)).....30

Figura 8: Partícula de HBV e os seus antígenos de superfície (Antigénio de superfície – HBsAg; antígeno core – HBcAg; antígeno e – HBeAg) (Adaptado de (Pattyn et al., 2021)).....33

Figura 9: Esquema do desenvolvimento de uma vacina baseada no domínio de ligação ao recetor (RBD) do SARS-CoV-2, produzida na levedura *P. pastoris*. O RBD foi modificado adicionando extensões flexíveis de aminoácidos N- e C-terminais para modular as interações proteína/proteína e facilitar a purificação da proteína. Processo de fermentação de metanol alimentada com um meio de cultura à base de extrato de levedura realizado num fermentador de 50 L, seguido de um processo de purificação baseado em cromatografia de afinidade de iões metálicos imobilizados. O correto enrolamento da proteína purificada foi confirmado por espectrometria de massa, dicroísmo circular e testes de afinidade de ligação ao recetor ACE2 (Adaptado de (Limonta-Fernández et al., 2022)).....35

Índice de Tabelas

Tabela 1: Aspectos positivos e pontos fracos associados ao uso da levedura <i>P. pastoris</i> na produção de proteínas heterólogas (Adaptado de (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021)).....	21
Tabela 2: Lista de proteínas recombinantes em sistemas de expressão de <i>P. pastoris</i> , usadas para o desenvolvimento de vacinas de subunidade.....	37
Tabela 3: Purificação de HBsAg a partir de cultura de <i>P. pastoris</i> , usando Ultracentrifugação (UC), Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e Ultrafiltração (UF) como passo final.....	42

1. Introdução

O paradigma da vacinação consiste em criar imunidade a longo prazo contra um ou mais antígenos específicos, para uma célula patogénica ou cancerígena, através do desenvolvimento de anticorpos e células T citotóxicas (D'Amico et al., 2021). A vacinação é uma das intervenções mais bem-sucedidas na área da saúde pública, tendo sido responsável pela erradicação de várias doenças infecciosas.

A produção de vacinas é um processo complexo que envolve a produção de proteínas antigénicas, capazes de induzir a resposta imunológica desejada. Este processo pode ser dividido em três fases principais. Na primeira fase, os antígenos e adjuvantes são capturados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Na segunda fase, ocorre a maturação das APCs que se tornam capazes de apresentar os antígenos aos linfócitos T e B. Finalmente, na terceira fase, as células B e T específicas para os antígenos são ativadas, levando à produção de anticorpos e células T citotóxicas (D'Amico et al., 2021; Korenkov et al., 2018).

Atualmente, existem oito classes distintas de vacinas, que variam tendo em conta a sua origem, composição e imunogenicidade (Figura 1). Cada tipo de vacina tem suas próprias vantagens e desvantagens, e a escolha da vacina mais apropriada depende do agente patogénico e das características da população que será vacinada (D'Amico et al., 2021).

As vacinas vivas atenuadas são um dos primeiros tipos de vacina desenvolvidos tendo contribuído para o controlo e erradicação de algumas doenças infecciosas, tais como a varíola, a poliomielite e sarampo. Estas vacinas são feitas a partir de vírus vivos, porém enfraquecidos ou atenuados, que não são capazes de causar a doença em indivíduos saudáveis. Embora essas vacinas sejam altamente eficazes no controlo de algumas doenças infecciosas, há preocupações em relação à sua segurança (D'Amico et al., 2021; Minor, 2015).

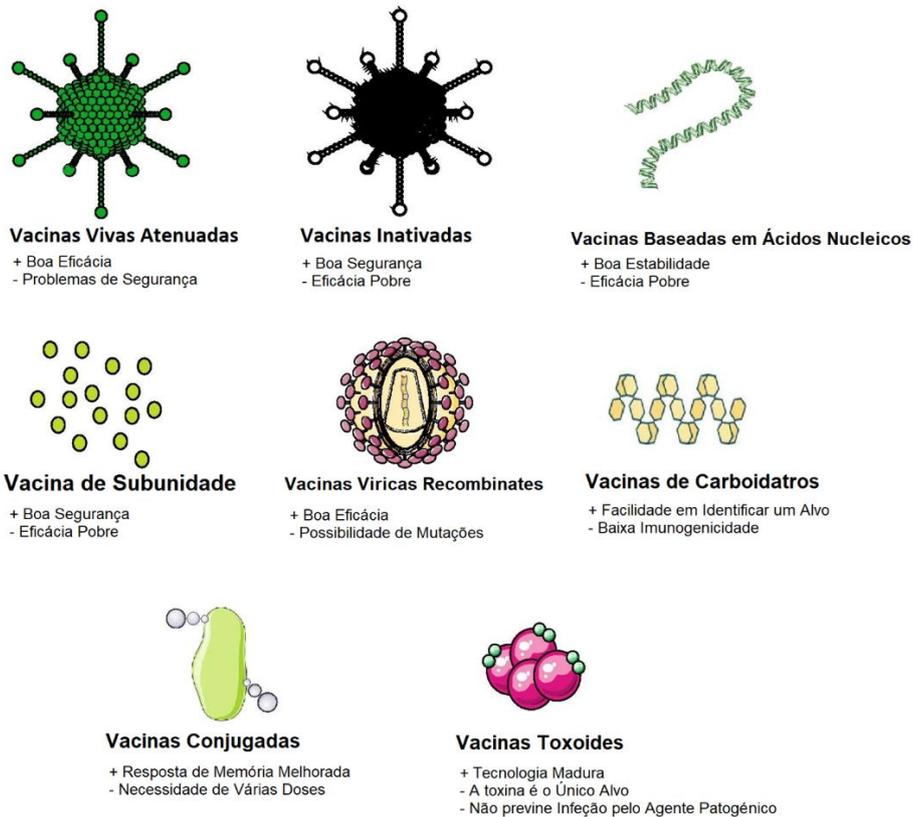


Figura 1: Classes de vacinas: as suas vantagens e desvantagens (Traduzido de (D'Amico et al., 2021)).

As vacinas inativadas, também conhecidas como "vacinas mortas", são produzidas através da inativação do agente patogénico por calor, radiação ou compostos químicos. Essa inativação destrói a capacidade do vírus de se replicar, mantendo todos os antígenos presentes na sua estrutura (D'Amico et al., 2021; Vetter et al., 2018). Uma das principais vantagens destas vacinas é a sua resposta imune forte e duradoura contra o agente patogénico, já que todos os antígenos estão presentes. No entanto, esta classe de vacinas apresenta algumas desvantagens, tais como, resposta imune diversa, necessidade de adjuvantes e uma menor eficácia em comparação com outras vacinas (D'Amico et al., 2021).

As vacinas toxoides são produzidas a partir das toxinas secretadas por bactérias, como as que causam tétano e difteria. Apesar de ser uma tecnologia madura, as vacinas toxoides não são altamente imunogénicas e, portanto, exigem a formulação com um adjuvante e múltiplas administrações (D'Amico et al., 2021).

A partir de 1970, o uso de tecnologias modernas em microbiologia permitiu o desenvolvimento de vacinas à base de carboidratos. Essas vacinas têm como alvo, principalmente os polissacarídeos

da cápsula bacteriana, bem como vírus e células tumorais, e são produzidas a partir de métodos sintéticos. Para aumentar a imunogenicidade, são frequentemente conjugados a uma proteína transportadora (Mettu et al., 2020). As vacinas conjugadas são formadas pela ligação de uma proteína a um carboidrato, o que aumenta sua imunogenicidade e estabilidade (Rappuoli et al., 2019). Elas podem ser conjugadas a toxinas do tétano para melhorar a resposta imunológica (D'Amico et al., 2021).

As vacinas vetoriais recombinantes são produzidas pela inserção de uma sequência que codifica o antígeno desejado de um agente patogénico noutra vetor, como um transgene. Embora tenham boa imunogenicidade, a presença de um transgene estranho pode levar a mutações evolutivas, reduzindo conseqüentemente, a sua eficácia (Bull et al., 2019; D'Amico et al., 2021). As vacinas de subunidades são constituídas por antígenos proteicos produzidos através de tecnologia recombinante. Estas são seguras e podem ser modificadas para facilitar a estabilidade da formulação. No entanto, sua imunogenicidade é limitada, necessitando de ser combinadas com adjuvantes para aumentar a sua eficácia (D'Amico et al., 2021; Hansson et al., 2000). Por fim, as vacinas baseadas em ácidos nucleicos, desenvolvidas nos últimos 30 anos, possuem elevada estabilidade e produção rápida, além de um perfil de segurança elevado em comparação com as vacinas vivas atenuadas (D'Amico et al., 2021; Zhang et al., 2019).

Uma das abordagens para a produção de proteínas antigénicas é a utilização de sistemas de expressão heteróloga, em que um organismo é utilizado para produzir proteínas de outro organismo. Nesse contexto, as leveduras têm-se destacado como hospedeiros para a produção de proteínas heterólogas para fins terapêuticos (Garvey, 2022; Karbalaie et al., 2020; Kumar & Kumar, 2019; Srivastava et al., 2023).

As leveduras são organismos unicelulares que apresentam várias vantagens na produção de proteínas heterólogas, tais como a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação, essenciais para a produção de proteínas com atividade biológica (Cereghino & Cregg, 2000; Mattanovich et al., 2012). Dentre as leveduras utilizadas como hospedeiros, destaca-se a levedura *Pichia pastoris*, devido a sua alta eficiência de expressão, facilidade de manipulação genética e, em particular, pela capacidade de secretar proteínas em quantidade e qualidade (Karbalaie et al., 2020).

Apesar das vantagens, a produção de proteínas heterólogas na levedura *P. pastoris* ainda apresenta desafios, pois a produtividade e a fidelidade da atividade biológica da proteína

recombinante, é muito depende da proteína em si. Assim, a otimização tem que ser feita caso a caso e dificilmente se encontram orientações mais generalizadas que possam ser aplicadas a todos os processos. De notar que a otimização de processos produtivos é essencial para garantir a alta qualidade e a grande quantidade de proteínas necessárias para a produção de vacinas.

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo sumarizar o estado da arte sobre a produção de vacinas usando leveduras como hospedeiros, com ênfase na *P. pastoris*, realçando os casos de sucesso. Serão exploradas as vantagens e desafios da utilização de leveduras como hospedeiros, assim como os métodos atualmente em prática para a produção de proteínas heterólogas no contexto da produção de vacinas. Espera-se apresentar possíveis soluções para as limitações encontradas e destacar novas oportunidades para estes sistemas de expressão, demonstrando assim o seu potencial na produção de vacinas de alta qualidade e em grande quantidade.

2. A levedura *Pichia pastoris* como organismo modelo para a produção de proteínas heterólogas

A expressão de proteínas recombinantes tem sido um dos maiores desafios para a produção de proteínas com aplicação terapêutica e é conseguida através de sistemas de expressão biológica. Estas proteínas permitem a produção de vacinas recombinantes, medicamentos, e produtos agrícolas. As células procarióticas como a *Escherichia coli* são amplamente utilizadas para a clonagem de DNA recombinante e para a produção de proteínas heterólogas devido à sua rápida multiplicação, exigências nutricionais simples e baratas, expressão de alto nível, e processo de transformação rápido e fácil. No entanto, os sistemas de expressão bacteriana têm algumas limitações, tais como a agregação intracelular (formação de corpos de inclusão) e a má distribuição das proteínas heterólogas, a produção de lipopolissacarídeo, a falta de modificação pós-tradução, e a degradação das proteínas devido às proteases. A utilização de pequenas sequências de aminoácidos, em fusão com a proteína de interesse, pode ajudar na solubilidade da proteína alvo (Costa et al. 2014), permitindo também explorar a funcionalização de biomateriais (Freitas et al. 2022). As leveduras são amplamente utilizadas para a expressão de várias proteínas na produção de vacinas e de produtos farmacêuticos. Em comparação com as bactérias, as células de levedura têm vantagens significativas, incluindo velocidade de crescimento, modificação pós-tradução e fácil manipulação genética. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada no fabrico de vacinas contra a hepatite B e o papilomavírus humano (Karbalaee et al., 2020). Nos últimos anos, leveduras metilotróficas como a *P. pastoris*, têm sido amplamente utilizadas e estudadas, devido aos seus altos rendimentos na produção de proteínas recombinantes com a elevada semelhança da glicosilação com as células de mamíferos (Karbalaee et al., 2020; Legastelois et al., 2017).

A *P. pastoris* foi inicialmente introduzida para a produção comercial unicelular de proteína como alimento para animais. Nos anos 80, foi novamente desenvolvida como um sistema para a expressão de proteínas heterólogas utilizando o promotor AOX1, que fornecia níveis elevados de proteínas heterólogas (Ahmad et al., 2014). Uma das características únicas desta levedura é a sua capacidade de utilizar metanol como a única fonte de carbono e energia, tornando-a uma escolha atrativa para aplicações industriais (Cereghino & Cregg, 2000). A *P. pastoris* tem tido sucesso na produção de mais de 500 proteínas heterólogas, muitas das quais foram aprovadas para uso humano e comercializadas. No entanto, nem todas as proteínas de interesse podem ser produzidas ou secretadas em quantidades suficientemente elevadas para satisfazer as exigências

de comercialização, especialmente se a proteína alvo for um hétero-oligómero, ligada à membrana, ou propensa a degradação proteolítica (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021).

Globalmente, *P. pastoris* oferece um modelo único e valioso para a produção de proteínas heterólogas, particularmente as que requerem modificações pós-tradução difíceis de conseguir noutros sistemas (Cereghino & Cregg, 2000). A utilização da *P. pastoris* tem vantagens, como a possibilidade de inserir o DNA de interesse linearizado através de procedimentos de recombinação homóloga para gerar linhas celulares estáveis. Além disso, há promotores disponíveis para impulsionar a expressão de um ou mais genes externos de interesse, permitindo a produção de grandes quantidades de proteínas alvo com relativa facilidade técnica e a um custo inferior ao da maioria dos outros sistemas eucariotas (Daly & Hearn, 2005). O processo envolve três etapas essenciais: inserção do gene de interesse num vetor de expressão, introdução do vetor no genoma da *P. pastoris*, e avaliação de potenciais estirpes de expressão para produzir o gene de interesse. Este organismo tem uma variedade de vetores de expressão e estirpes hospedeiras disponíveis para utilização (Cereghino & Cregg, 2000).

Assim, a sua capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono torna-a uma opção atrativa para aplicações industriais, em particular, para a valorização de resíduos com metanol, e a facilidade da sua modificação genética oferece aos investigadores uma ferramenta poderosa para a produção e descoberta de proteínas. Uma das principais enzimas envolvidas na via de utilização do metanol é a oxidase do álcool (AOX), que catalisa o primeiro passo na oxidação do metanol em formaldeído e peróxido de hidrogénio. O metanol é frequentemente utilizado para induzir a expressão de genes, por o promotor AOX ser um promotor muito forte. De qualquer forma, existem outros promotores alternativos na *P. pastoris*, tais como, GAP, FLD1, PEX8, e YPT1 que estão disponíveis para a expressão de genes para os quais a indução por metanol pode não ser adequada. Além disso, algumas estirpes hospedeiras têm mutações no promotor AOX que as tornam melhores produtoras de proteínas e requerem menos metanol para o crescimento. Várias estirpes deficientes em proteases também têm demonstrado reduzir a degradação de proteínas de interesse (Cereghino & Cregg, 2000).

A escolha dos vetores e promotores de expressão, os procedimentos para a transformação e integração dos vetores no genoma da *P. pastoris* e as consequências do uso de codões raros e transcritos truncados devem ser cuidadosamente considerados. Além disso, a otimização de codões é um fator importante na regulação da expressão de proteínas em *P. pastoris*, pois a

preferência do códon é um fator importante na regulação da expressão de proteínas (Daly & Hearn, 2005; Xu et al., 2021). Esta preferência no uso do códon é pensada para regular as taxas de síntese proteica, sendo que os genes mais expressos usam codões mais frequentes para aumentar a taxa de tradução. Pelo contrário, os codões raros atrasam a tradução e acumulam-se em genes de baixa expressão. Para além das taxas de tradução, estudos recentes sugerem que a preferência da utilização do códon interfere em vários níveis de regulação da expressão de proteínas em *P. pastoris* e, em alguns casos, deve ser adotada uma estratégia de otimização de codões para garantir a expressão e conformação apropriadas das proteínas (Xu et al., 2021).

Adicionalmente, os promotores sintéticos têm vindo a ser desenvolvidos como um instrumento essencial para a produção de proteínas recombinantes com elevada eficiência. A utilização de estratégias computacionais e a seleção de bibliotecas contribui para a síntese de promotores eficazes que podem ser aplicados a diferentes espécies de leveduras, contribuindo para a melhoria da expressão e função de proteínas heteróloga. No caso da levedura *P. pastoris* foi construída uma biblioteca de promotores sintéticos baseados no promotor AOX1, induzido por metanol, com atividades compreendidas entre 6 e 160% quando comparados com a atividade do promotor AOX selvagem, possibilitando a produção de proteínas terapêuticas biotecnologicamente relevantes (Madhavan et al., 2021).

3. Vantagens e desvantagens no uso de *P. pastoris* para a produção de vacinas

A levedura *P. pastoris* é um organismo unicelular, comumente usado para a expressão de proteínas heterólogas em sistemas de expressão recombinante. A *P. pastoris* é geralmente reconhecida como segura e é um organismo robusto, com capacidade inata para secretar proteínas heterólogas.

A expressão de proteínas heterólogas é facilmente obtida devido ao promotor AOX (álcool oxidase), o que possibilita a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Este sistema tem várias vantagens em comparação com outros sistemas de expressão recombinante (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021).

Um dos principais pontos fortes da utilização de *P. pastoris* é a sua capacidade para alcançar densidade celular muito alta, o que é essencial para a produção em larga escala. Além disso, a levedura *P. pastoris* é capaz de realizar certas modificações pós-traducionais, como glicosilação, que é uma modificação importante para muitas proteínas terapêuticas como, por exemplo, para a produção de lectinas de origem vegetal para aplicação biomédica (Oliveira et al. 2008; 2014).

Outra vantagem importante da *P. pastoris* é a baixa produção de proteínas da célula hospedeira que são secretadas, contribuindo para a produção de produtos purificados e, conseqüentemente, minimizando purificação desnecessária e os custos associados. Além disso, a *P. pastoris* é isenta de endotoxinas e contaminação por bacteriófagos (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021).

No entanto, existem alguns pontos fracos associados ao uso da *P. pastoris* para a expressão de proteínas heterólogas. A baixa produtividade celular pode ocorrer se o sistema não for otimizado adequadamente, e a libertação de proteases durante a fermentação pode afetar o rendimento e pureza do produto. Além disso, o aumento de escala requer manuseio de metanol em grande volume e elevada entrada de oxigênio, juntamente com geração substancial de calor. Adicionalmente, a colheita/desidratação de densidade celular muito alta resulta em instabilidade na centrifugação (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021).

Na Tabela 1, encontram-se resumidos os pontos fortes e fracos associados ao uso da levedura *P. pastoris* na produção de proteínas heterólogas.

Tabela 1: Aspectos positivos e negativos associados ao uso da levedura *P. pastoris* na produção de proteínas heterólogas (Adaptado de (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021)).

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ol style="list-style-type: none"> 1. Organismo seguro e robusto; 2. Habilidade de secretar proteínas heterólogas; 3. Um promotor AOX que pode ser facilmente explorado para a produção de proteínas recombinantes; 4. Capacidade de realizar modificações pós-tradução; 5. Adequado para fabricação em plataforma; 6. Densidade celular muito alta pode ser alcançada; 7. Baixo custo em comparação a outros sistemas; 8. Baixa secreção de proteínas da célula hospedeira; 9. Ausência de endotoxinas/contaminação por bacteriófagos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baixa produtividade celular sem otimização; 2. Liberação de proteases durante a fermentação; 3. Necessidade de grande volume de metanol, elevada entrada de oxigênio, com uma geração substancial de calor; 4. A elevada densidade celular, resulta em instabilidade na centrifugação; 5. Padrão de glicosilação.

Apesar desses pontos fracos, as oportunidades associadas ao uso de *P. pastoris* são significativas. A produtividade celular pode ser aumentada, e a cultura contínua com menor concentração celular e maior produtividade pode ser realizada para melhorar o processo de produção.

A otimização do meio de cultura e modo de operação (*fed-batch*) já mostrou permitir aumentar de forma expressiva a produção da proteína alvo (Wanderley et al. 2013). Além disso, estão a ser desenvolvidos sistemas isentos de metanol para minimizar os riscos associados ao manuseio de grandes volumes de metanol (Magalhães & Keshavarz-Moore, 2021).

Resumidamente, a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* é uma abordagem eficaz e amplamente utilizada devido às suas vantagens. É um sistema seguro, robusto, com capacidade inata de secretar proteínas heterólogas e realizar certas modificações pós-tradução importantes. Embora existam alguns pontos fracos, as oportunidades associadas ao uso de *P. pastoris* são significativas e promissoras.

4. Caracterização do sistema de expressão de *P. pastoris*

Na elaboração de estratégias para clonagem e expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, é fundamental considerar alguns aspectos desde o início do processo. Isso inclui a seleção cuidadosa de combinações promotor-terminador, marcadores de seleção adequados e sistemas vetoriais para a expressão intracelular ou secretada, além da escolha criteriosa de sinais de secreção adequados (Figura 2).

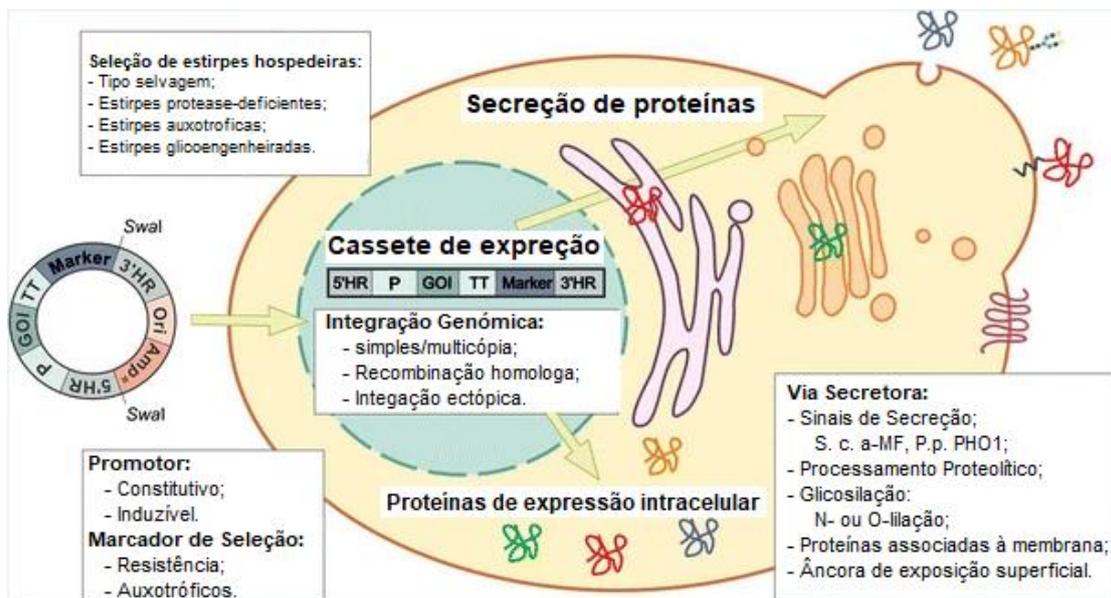


Figura 2: A expressão de genes heterólogos em *P. pastoris* envolve a linearização dos plasmídeos de expressão contendo o(s) gene(s) de interesse (GOI) antes da transformação. O nível de expressão da proteína desejada pode depender tanto do local de integração cromossômica, que é determinado pelas regiões homólogas de 5' e 3' (5'HR e 3'HR), quanto do número de cópias do gene. Um promotor representativo (P) e um par de terminadores de transcrição (TT) estão representados. Sequências de sinais adequadas vão direcionar a proteína recombinante para a expressão intracelular ou secretora, além de gerir a integração ou ancoragem na membrana (Traduzida de (Ahmad et al., 2014)).

Os promotores induzíveis são elementos regulatórios essenciais para a expressão gênica heteróloga. O promotor mais comumente utilizado é o AOX1, que é rigidamente regulado e é fortemente reprimido quando *P. pastoris* é cultivada com glicose, glicerol ou etanol. No entanto, apenas após a adição de metanol, o promotor é totalmente induzido. Embora o AOX1 tenha múltiplos elementos regulatórios identificados, a sua regulação molecular ainda não está completamente elucidada. Devido ao metanol ser altamente inflamável e perigoso, é necessário o

desenvolvimento de promotores induzíveis alternativos. A co-expressão constitutiva do fator de transcrição Prm1p, pelos promotores constitutivos GAP, TEF ou PGK, permite controlar a expressão por promotores induzíveis por metanol, como AOX1, MOX ou FMDH, sem a adição de metanol. Como referido anteriormente, variantes sintéticas do promotor AOX1 foram construídas excluindo ou duplicando locais de ligação do fator de transcrição, resultando em níveis de expressão ainda mais altos do que o promotor nativo (Ahmad et al., 2014).

Promotores constitutivos são utilizados para simplificar o processo de expressão de um gene, eliminando a necessidade de indutores potencialmente perigosos e permitindo uma transcrição contínua do gene de interesse. O promotor de gliceraldeído-3-fosfato (GAP) é amplamente utilizado para esse fim, pois alcança níveis de expressão quase tão altos quanto o promotor induzido pelo metanol AOX1, quando a glicose é utilizada como fonte de carbono (Ahmad et al., 2014).

A estirpe de tipo selvagem NRRL-Y 11430 é a estirpe-mãe de todas as estirpes de expressão de *P. pastoris*. Normalmente, são utilizadas estirpes mutantes auxotróficas (por exemplo, GS115) e deficientes em proteases (por exemplo, SMD1163, SMD1165, SMD1168). A *P. pastoris* apresenta três fenótipos diferentes em relação à utilização de metanol: Mut⁻ (utilização de metanol do tipo selvagem, com AOX1 e AOX2 intactos), MutS (utilização lenta de metanol, com AOX1 interrompido e AOX2 intacto) e Mut (utilização de metanol eliminada, com AOX1 e AOX2 interrompidos) (Celik & Calik, 2012; Wang, Jiang, & Wang, 2016).

O sistema de expressão *P. pastoris* envolve três fases para a expressão de genes recombinantes: clonagem do gene num vetor de expressão apropriado, inserção do vetor no genoma hospedeiro, e a avaliação de diferentes estirpes para expressão da proteína de interesse. Para aumentar a eficiência da integração do gene de interesse, é recomendada a linearização do vetor clonado com enzimas de restrição e depois a sua inserção em células competentes através da eletroporação. O gene inserido integra-se no genoma celular através do processo de recombinação homóloga, resultando em células recombinantes (Figura 3).

Os vetores de expressão *P. pastoris* consistem em três sequências: uma sequência promotora (geralmente AOX1) na região 5', uma sequência de terminação transcricional na região 3', e uma sequência contendo sítios de clonagem únicos ou múltiplos para o gene de interesse. Além disso, os vetores também contêm marcas seletivas, como a zeocina, G418 ou ampicilina (Karbalaee et al., 2020), uma vez que o vector recombinante é construído em *E. coli* para depois ser

transformado em células de levedura. De notar, no entanto, que as marcas seletivas zeocina e G418 funcionam quer em células bacterianas quer em células de levedura.

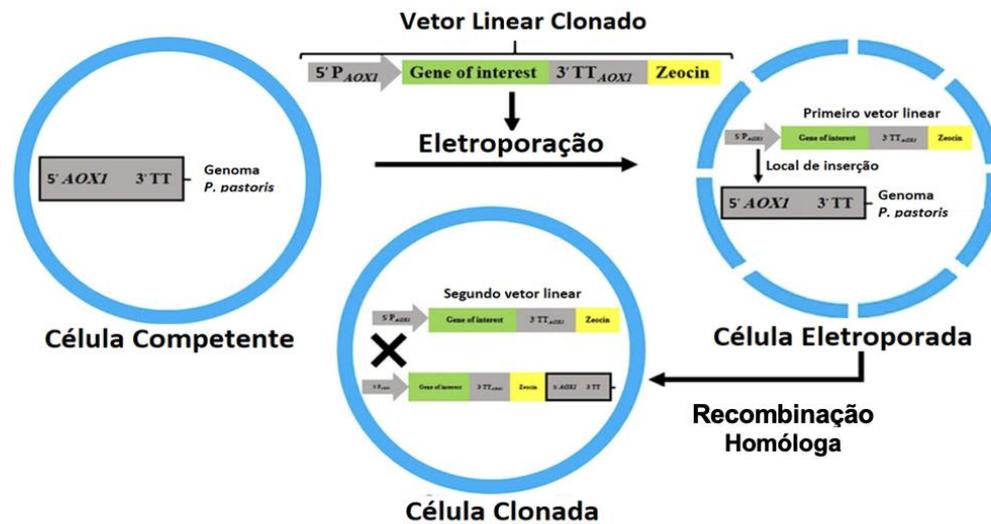


Figura 3: Fenômeno de recombinação homóloga no genoma de *Pichia pastoris*, que ocorre após a eletroporação de células competentes de levedura. Os vetores lineares clonados são inseridos nas células e ocorre a recombinação entre o promotor 5 (5' AOX1) do vetor e a região AOX1 do genoma de *P. pastoris*, formando células clonadas com um genoma recombinante. AOX1 refere-se à álcool oxidase 1 e TT à região de terminação de transcrição (Traduzida de (Karbalaie et al., 2020)).

A expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* pode ser intracelular ou extracelular, e uma das principais vantagens desse sistema, como referido anteriormente, é a sua capacidade de secretar altos níveis de proteínas ativas. Para garantir a expressão secretora, é necessário incluir uma sequência de sinal no vetor, sendo que a sequência mais comum é a do fator-alfa líder da levedura *S. cerevisiae* (α -MF). Esta sequência é altamente eficaz, direcionando as proteínas produzidas pela *P. pastoris* através da via secretora, apresentando produção superior de proteínas heterólogas quando comparada à sequência de sinal nativa da proteína de interesse (Ahmad et al., 2014).

Como *P. pastoris* secreta baixos níveis de proteínas nativas, a maioria das proteínas no meio são proteínas heterólogas secretadas, o que contribui para simplificar o processo de purificação para além de evitar a toxicidade pela acumulação intracelular de proteínas (Wang, Jiang, & Wang, 2016).

O objetivo final da produção recombinante de proteínas é a obtenção de uma proteína de qualidade e pura. A qualidade da proteína recombinante obtida depende não só do processo de produção, mas muito do processo de purificação (Oliveira et al. 2018). É comum utilizar uma sequência de histidinas - ou tag de histidina - como uma ferramenta para facilitar a purificação das proteínas. Isso é feito através da fusão do gene de interesse à sequência codificadora de histidinas, permitindo a subsequente purificação com colunas de níquel. A localização da sequência de histidinas, seja na extremidade N ou C da proteína, é cuidadosamente selecionada para minimizar qualquer impacto potencial na atividade da proteína.

No entanto, em situações onde a atividade da proteína é afetada, pode ser introduzido um sítio de reconhecimento para proteases específicas entre o gene e a tag de histidinas (Ramos et al. 2010; 2013). Isso permite que a sequência de histidinas seja removida após a purificação, mantendo a integridade funcional da proteína (Spriestersbach et al., 2015). A figura 4 resume as características do sistema de expressão *P.pastoris*.

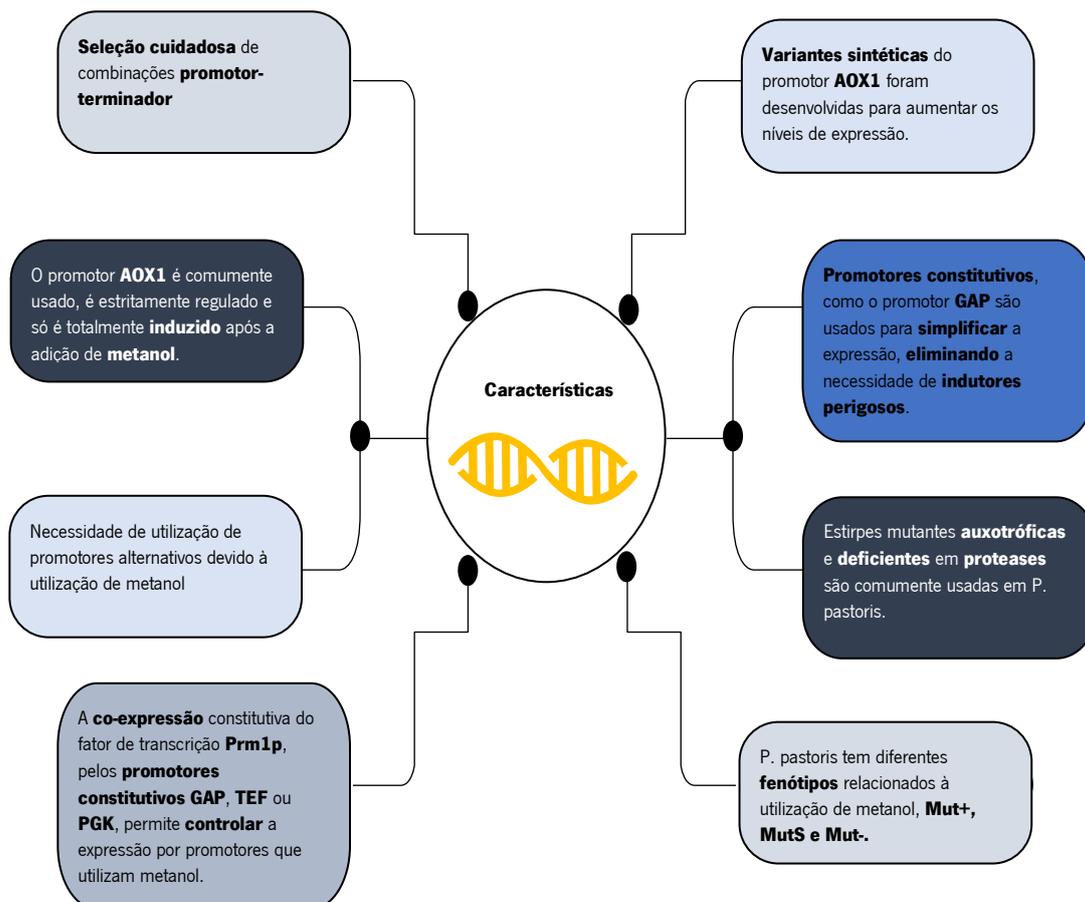


Figura 4: Resumo das características do sistema de expressão *P.pastoris*.

5. O sistema de expressão *P. pastoris* para produção de vacinas

5.1. Vírus Epstein-Barr (EBV)

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus comum γ -herpesvirus que causa infecção persistente em mais de 90% da população mundial. Embora a infecção primária pelo EBV possa ser assintomática, é responsável por mononucleose infecciosa e por várias doenças malignas, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (Wang, Jiang, Han, et al., 2016; Wang et al., 2013). Atualmente, não existe vacina comercialmente disponível para prevenir a infecção pelo EBV ou doenças associadas ao EBV devido ao potencial oncogênico do vírus (Wang, Jiang, Han, et al., 2016).

A maioria das células infectadas pelo EBV estabelece uma latência a longo prazo, durante a qual o vírus não produz descendência, em que apenas um número limitado de genes virais é expresso. O genoma viral é mantido como um genoma circular extra-cromossômico, e nas células em proliferação, a sua manutenção depende do antígeno nuclear EBV1 (EBNA1) (Mayer et al., 2012).

A EBNA1 é uma proteína de ligação de DNA multifuncional específica, atuando também como um intensificador transcricional para diferentes promotores virais e celulares. O EBNA1 não é abundante em células transformadas pelo EBV, e a sua expressão pode ser desafiante devido à presença de códons raros. No entanto, a substituição de códons raros por códons comuns não demonstrou diferença significativa a nível de expressão (Mayer et al., 2012). O antígeno nuclear EBV 1 (EBNA1) é um componente crítico do vírus e é essencial para a sua replicação e manutenção da latência. O EBNA1 também altera os processos celulares para contribuir para a sobrevivência e proliferação das células hospedeiras. O EBNA1 é expresso em todas as formas de latência nas células em proliferação e é consistentemente expresso em todas as neoplasias malignas associadas ao EBV (Wang et al., 2013).

Para desenvolver uma vacina eficaz para tumores associados ao EBV, é crucial obter grandes quantidades de EBNA1 purificado num sistema de expressão heteróloga adequado. O EBNA1 foi expresso em células recombinantes infectadas por baculovírus Sf9 e na bactéria *E. coli*, mas estes sistemas têm limitações em termos de níveis de expressão. A otimização do codão é uma técnica promissora para aumentar o nível de expressão de proteínas, e a levedura metilotrófica *P. pastoris* tornou-se um importante organismo hospedeiro para a produção de proteínas recombinantes complexas. A sequência do fragmento C-terminal de EBNA1 (E1 Δ GA) foi otimizada, tendo em conta a utilização de códons em *Pichia*, e expressa em *P. pastoris*, demonstrando fortes respostas

imunitárias humorais e celulares, sugerindo que o fragmento recombinante E1ΔGA manteve uma boa imunogenicidade. Assim, pode-se concluir que o sistema de produção de *P. pastoris* é adequado para a expressão de elevados níveis de E1ΔGA após a otimização de codão (Wang et al., 2013).

A glicoproteína de superfície gp350 é outro candidato promissor para uma vacina profilática de subunidade, uma vez que é o principal alvo da resposta de anticorpos neutralizantes do EBV. Vários estudos demonstraram que a imunização com o gp350 pode induzir anticorpos neutralizantes e proteger contra a infecção pelo EBV e doenças associadas ao EBV. A levedura metilotrófica *P. pastoris* é um sistema heterólogo poderoso e barato para a produção da proteína gp350 em grande escala (Wang, Jiang, Han, et al., 2016) (Figura 5).

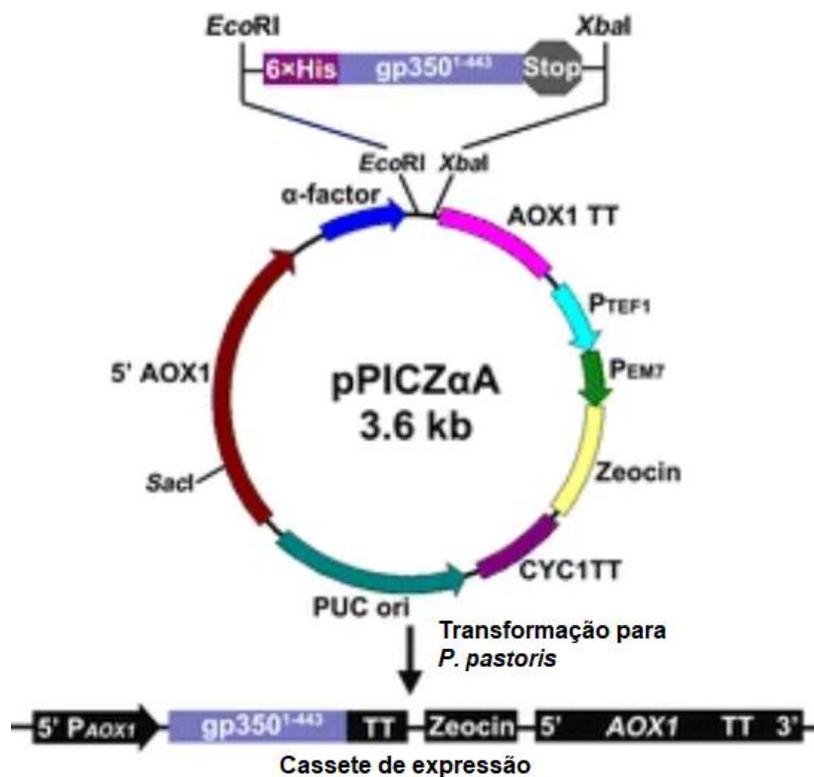


Figura 5: A figura apresenta uma representação esquemática do processo de construção e transformação do vetor de expressão pPICZαA-gp350¹⁻⁴⁴³ em *P. pastoris* GS115. O fragmento que codifica o Terminal-5 do gp350, que engloba os códons 1 a 443 e possui um His6-tag na extremidade 5', foi inserido em pPICZαA para permitir a produção da proteína recombinante. Para a integração do vetor recombinante na *P. pastoris*, o pPICZαA-gp350¹⁻⁴⁴³ foi linearizado utilizando a enzima *SacI* e em seguida, integrado no gene AOX1 (adaptado de (Wang, Jiang, Han, et al., 2016)).

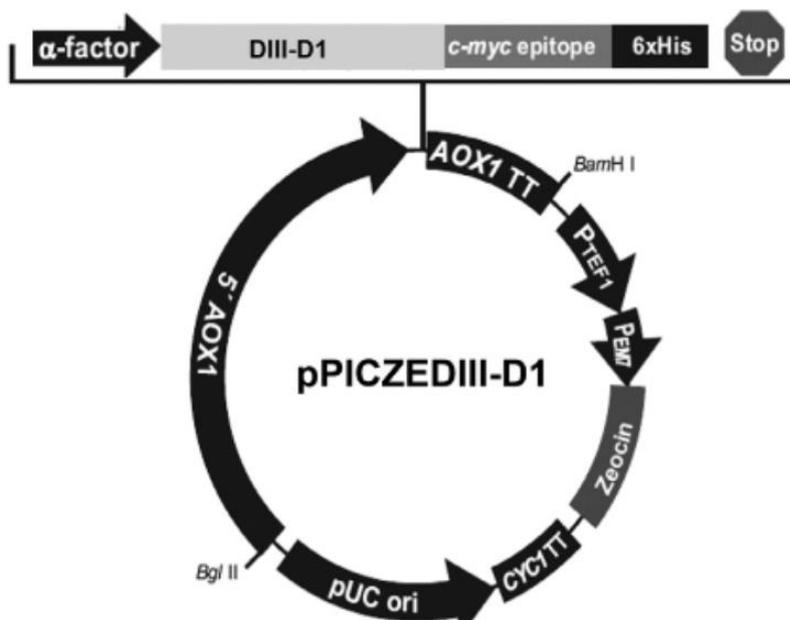
5.2. Vírus Dengue

A Dengue é uma doença de flavivírus transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*, causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (Batra et al., 2010; Cardoso et al., 2013; Wang, Jiang, & Wang, 2016). Esta doença tem uma ampla distribuição nos países com clima tropical ou subtropical. É importante notar que a imunidade a um determinado sorotipo do vírus da dengue pode aumentar a gravidade da infecção causada por um sorotipo diferente, por meio de um processo denominado de aumento mediado por anticorpos. Por isso, é imperativo o desenvolvimento de uma vacina segura que proporcione proteção contra os quatro sorotipos do vírus (Batra et al., 2010).

A obtenção de antígenos adequados para ensaios imuno-enzimáticos é um desafio, mas a utilização da expressão proteica em eucariotas como um sistema heterólogo barato e poderoso para produzir altos níveis de proteínas recombinantes funcionalmente ativas, tem sofrido avanços positivos nos últimos anos. O Domínio III do Envelope (EDIII) do vírus da dengue é um candidato a vacina, intermediário de diagnóstico, e alvo de neutralização de anticorpos terapêuticos.

Embora não haja vacina ou medicamento atualmente disponível para combater a febre do dengue, as versões recombinantes do EDIII têm permitido compreender melhor as interações hospedeiro-vírus e a resposta imunitária contra infecções naturais (Kaushik et al., 2016).

Embora a bactéria *E. coli* seja amplamente utilizada como hospedeiro de expressão para produzir EDIII recombinante, a proteína é pouco solúvel (Fahimi et al., 2014). Em contrapartida, a levedura *P. pastoris* é uma opção mais vantajosa como hospedeiro para a produção de proteína, pois é capaz de expressar a proteína recombinante de forma eficiente, com elevados níveis de secreção extracelular da proteína recombinante e secreção mínima de proteínas endógenas (Kaushik et al., 2016). Cardoso et al. (2013) otimizou o gene que codifica a proteína E domínio III de DENV-1 em *P. pastoris* GS115, resultando na secreção da proteína recombinante (sEDIII-D1) no sobrenadante da cultura, livre de toxinas (Figura 6). A proteína purificada demonstrou potencial imunogênico, podendo ser utilizada como reagente para um diagnóstico viral rápido, o que é cada vez mais necessário para permitir diagnósticos em maior escala (Cardoso et al., 2013).



tcacaagaagtgccatgcacACTGCTTTGACAGGTGCAACCGAAATACAAACATCTGGTACTACAACCATCT
 TTGCTGGTCATTTGAAGTGTAGATTGAAGATGGATAAGTTGATCTTGAAGGGTATGAGTTATGTTATGTG
 CACTGGTCTTTCAAGTTAGAAAAAGAAGTTGCAGAAACCAACACGGTACTGTATTGGTCCAGGTTAA
 GTACGAAGGTACAGATGCCCCATGTAAAATTCCTTTTTCCAGTCAAGACGAAAAGGGTGTACTCAAAA
 TGGTAGATTGATCACTGCTAACCAATTGTCACAGATAAGGAAAAGCCTGTTAACATCGAAGCAGAAC
 CACCTTTTGGTAAAAGTTATATCGTCGTTGGTGCCGGTgaaaaggcttgaagttgtct (408 bp)

Figura 6: Expressão do antígeno do domínio III do envelope do vírus da dengue-1. A imagem mostra o gene sintético de EDIII-D1 com codões otimizados (Adaptado de (Cardoso et al., 2013)).

Kaushik et al. (2016), descreveram a construção e otimização de um clone de *P. pastoris* de DENV serótipo-3 EDIII para secreção de elevados níveis de EDIII em meios mínimos. Mostram pela primeira vez um efeito doseador da suplementação de Casaminoácidos (CA) em meios de cultura na secreção da proteína recombinante em *P. pastoris*. Os dados sugerem que a suplementação de CA aumenta a secreção de EDIII recombinante, reduzindo a retenção intracelular da proteína recombinante (Kaushik et al., 2016)

5.3. Vírus da Gripe aviária

O vírus da gripe aviária H5N1 altamente patogénico, é um vírus envolvente da família do *orthomyxovirus*. Devido ao seu elevado nível de variação antigénica e à transmissão frequente da doença das espécies aviárias para os seres humanos, este vírus apresenta grandes riscos para a saúde. Uma vacina eficaz que induza uma resposta imunitária protetora contra a gripe aviária

altamente patogénica é necessária para controlar a transmissão da doença de populações infetadas para populações suscetíveis e saudáveis (Subathra et al., 2014).

O vírus H5N1 possui duas grandes glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), sendo que a HA é responsável pela entrada do vírus e a NA ajuda na sua libertação (Subathra et al., 2014). A proteína HA é crucial na infeção por vírus, sendo sintetizada como uma molécula inativa, que após clivagem por proteases semelhantes à tripsina, forma duas subunidades (HA1 e HA2) que se ligam originando a forma madura da proteína HA (Kopera et al., 2014). A vacina contra a gripe aviária atual é um antígeno inativo da gripe aviária constituído por antígenos HA e NA, que são preparados em ovos embrionados. No entanto, este processo é pouco rentável. Por conseguinte, é necessário desenvolver um método mais rápido para a produção de grandes quantidades de vacinas contra a gripe aviária. Assim a levedura *P. Pastoris* torna-se uma excelente alternativa para desenvolver uma vacina potencial mais rápida e rentável contra a gripe aviária (Kopera et al., 2014; Subathra et al., 2014). Subathra et al. (2014), clonou o gene NA em *P. pastoris*, no vetor de expressão pPICZC (Figura 7).

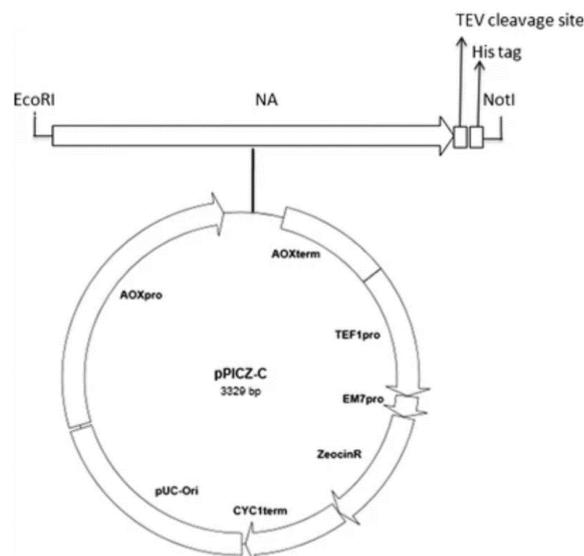


Figura 7: *Open reading frame* de NA com uma Tag de 6xHis e um sítio de clivagem protease TEV dentro da *frame*. O gene NA foi amplificado através de PCR utilizando *primers* específicos que continham sítios de restrição e o sítio de clivagem protease TEV. O amplicão resultante foi clonado num vetor de expressão de levedura pPICZC sob o controlo de um promotor de álcool oxidase na *frame* com o c-terminal His-tag. O clone positivo foi confirmado através da digestão de restrição e sequenciação do DNA. O clone linearizado foi então transformado para *P. pastoris* por eletroporação, e a integração do gene foi subsequentemente confirmada (Adaptada de (Subathra et al., 2014)).

Neste contexto, a utilidade da cauda de histidinas (tag His) torna-se relevante. Adicionada ao gene de interesse durante a etapa de clonagem, permite facilmente purificar a proteína expressa através de cromatografia de afinidade por níquel ou cobalto. Contudo, em certas ocasiões, a cauda His pode interferir na função ou na estrutura da proteína, sendo imperativo a sua remoção. Para esse fim, pode-se incorporar um sítio de reconhecimento de protease durante a clonagem, que, após a purificação, permite a remoção específica e eficiente da cauda His. Prever esta eventualidade durante a fase inicial de desenho do clone pode poupar tempo e esforço consideráveis, permitindo uma produção e caracterização mais eficiente das proteínas recombinantes (Spriestersbach et al., 2015).

Mais recentemente, o aparecimento de casos de infecção humana causada por um vírus H7N9 de origem aviária motivou o desenvolvimento de um sistema de expressão da proteína H7 recombinante integral (rH7) deste vírus, obtida através do sistema de *P. pastoris*. A proteína rH7 foi submetida a modificações complexas de glicosilação e polimerizada em nanopartículas com um diâmetro de 30-50nm. Esta proteína recombinada parece ter potencial para criar uma vacina contra o vírus H7N9, oferecendo uma plataforma eficaz para a produção rápida de futuras vacinas contra a gripe (Liu et al., 2020).

5.4. Papiloma Vírus Humano (HPV)

O papiloma vírus humano (HPVs) é responsável por verrugas benignas e tumores malignos e estão associados a doenças sexualmente transmissíveis (DST), sendo mais prevalente em indivíduos sexualmente ativos. Existem mais de 40 tipos de HPV que infetam o trato anogenital e outras áreas da mucosa, estando alguns deles associados a transformação maligna. O cancro do colo do útero, está fortemente associado à infecção por HPV, sendo as estirpes HPV16 e HPV18 responsáveis por cerca de 70% dos casos (Bazan et al., 2009; Mariz et al., 2015).

O capsídeo do HPV é constituída por duas proteínas estruturais, L1 e L2, sendo que a proteína L1 recombinante tem demonstrado induzir elevados níveis de anticorpos neutralizantes (Bazan et al., 2009). A produção de vacinas contra o HPV utilizando *P. pastoris*, tem-se mostrado uma estratégia promissora para a erradicação desta infecção.

Bazan et al. (2009) descreve um sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando as estirpes GS115 e KM71 de *P. pastoris*, onde um gene L1 otimizado por codão foi expresso sob o

controle do promotor AOX. A expressão da proteína foi induzida especificamente na presença de metanol. Posteriormente, Mariz et al. (2015) descreveu um sistema de expressão heterólogo para produzir a proteína HPV16 L1, utilizando uma variante da sequência promotora *P. pastoris* PGK1 e o codão α -MF otimizado para induzir a secreção proteica. Outros estudos utilizaram vetores integradores baseados em AOX1, no entanto, as proteínas recombinantes resultantes da regulação por AOX1 eram instáveis e pouco funcionais. Os autores propõem a utilização do promotor constitutivo PGK1 para expressar a proteína L1, permitindo cultura e expressão da proteína de interesse, mais fáceis, sem a necessidade de indução de metanol. Além disso, A utilização de um codão α -MF otimizado juntamente com vetores baseados em PGK1 contribuiu para otimizar as condições de produção e purificação das partículas de interesse, reduzindo os custos de produção de vacinas (Mariz et al., 2015).

5.5. Vírus da Hepatite B (HBV)

A hepatite B é uma doença grave e potencialmente fatal, causada pelo vírus da hepatite B (HBV). A maioria das pessoas infetadas pelo HBV não apresenta sintomas, mas em alguns casos pode ocorrer hepatite aguda, com sintomas como fadiga, dor abdominal, náuseas e icterícia. Além disso a doença pode tornar-se crônica e evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. A idade de aquisição da infecção é um fator determinante para o desenvolvimento da doença, por isso, a vacinação é fundamental para a prevenção da infecção por HBV, especialmente em recém-nascidos e crianças (Pattyn et al., 2021).

O HBV é composto por um core que está envolto num revestimento externo de lipoproteína, o envelope. Dentro do vírus, existem três antígenos estruturais principais, incluindo superfície (HBsAg), core (HBcAg), e e (HBeAg) (Figura 8). O HBsAg é produzido em quantidades excessivas e pode ser encontrado no sangue de indivíduos infetados sob a forma de partículas esféricas e tubulares. Estas partículas são imunogênicas, mas não são infecciosas e não contêm DNA genómico. Além disso, têm sido importantes para o desenvolvimento de vacinas contra a hepatite B (Pattyn et al., 2021).

As vacinas com tecnologia de DNA recombinante são seguras e eficazes contra a hepatite B. O antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é produzido sob a forma de partículas semelhantes a vírus (VLPs), utilizando leveduras, como a *S. cerevisiae* e a *P. pastoris*. Inicialmente, as VLPs HBsAg foram purificadas a partir do plasma de portadores assintomáticos de HBV, mas devido a

questões de segurança e fornecimento restrito, as vacinas derivadas do plasma já não são utilizadas, sendo atualmente efetuada a purificação do HBsAg recombinante a partir de culturas de leveduras (Gurramkonda et al., 2013; Lünsdorf et al., 2011). Por outro lado, as vacinas derivadas do plasma humano e das células recombinantes de mamíferos são glicosiladas, mas o HBsAg derivado de leveduras não é glicosilado nem a partir de *S. cerevisiae* nem de *P. pastoris*. Quando o gene viral nativo é expresso em leveduras, a proteína fica retida dentro das células, não ocorrendo assim a glicosilação, uma vez que esta modificação é feita pós-tradução, e só ocorre após a secreção da proteína. Mesmo utilizando outros sinais de secreção eucariótica para aumentar a produção de HBsAg, foram secretadas apenas quantidades insignificantes utilizando tanto *S. cerevisiae* como *P. pastoris* (Lünsdorf et al., 2011).

O uso de sistemas de expressão em leveduras para a produção de HBsAg recombinante está amplamente estudado, existindo uma variação nos diferentes processos desenvolvidos para a purificação de HBsAg. A maioria desses estudos utiliza detergentes para a dissociação de HBsAg das membranas, requerendo várias etapas de purificação e várias resinas diferentes para purificação, o que torna o processo difícil de operar e também demorado (Patil & Khanna, 2012).

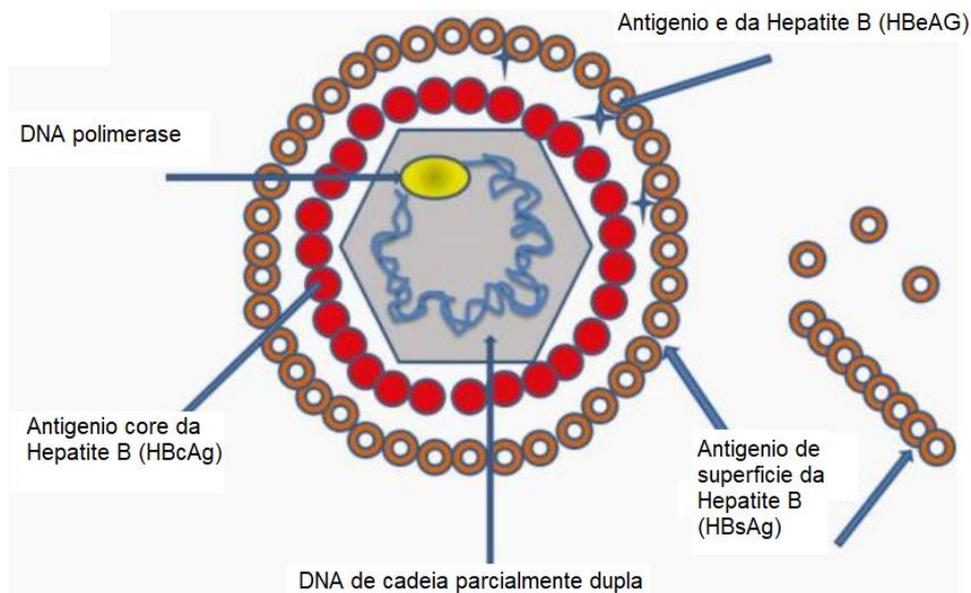


Figura 8: Partícula de HBV e os seus antígenos de superfície (Antígeno de superfície – HBsAg; antígeno core – HBcAg; antígeno e – HBeAg) (Adaptado de (Pattyn et al., 2021)).

5.6. SARS-CoV-2 (Covid-19)

O vírus SARS-CoV-2 responsável pela pandemia da COVID-19, causou até agosto de 2022, mais de 770 milhões de casos de infecções COVID-19 em todo o mundo, com 6,9 milhões de mortalidades (Edouard Mathieu et al., 2020). O vírus infecta o sistema respiratório e pode causar sintomas graves, tais como tosse, febre, e angústia respiratória aguda. A glicoproteína Spike (S) é uma parte essencial do mecanismo do vírus para a ligação, fusão, e entrada nas células de mamíferos. O domínio de ligação ao recetor (RBD) liga-se ao recetor na célula hospedeira ACE2, facilitando a entrada do genoma viral nas células hospedeiras. Com o aparecimento de novas variantes deste vírus é necessário o desenvolvimento de novas vacinas e tratamentos (Mi et al., 2022).

A proteína C-RBD-H6 PP foi desenvolvida como uma potencial candidata a vacina de subunidade contra o SARS-CoV-2. A proteína é composta por um domínio globular central -RBD-, ladeado por segmentos N- e C-terminais adicionais que contêm ligantes polares e flexíveis ricos em glicina e serina. Essas extensões facilitam a purificação da proteína e garantem a exposição do C-terminal His(6). A vacina baseada em C-RBD-H6 PP, produzida na levedura *P. pastoris*, é capaz de induzir anticorpos contra o SARS-CoV-2. As condições ideais para a produção de uma proteína recombinante no sistema de expressão de *P. pastoris* diferem de acordo com a proteína alvo, sendo essencial a sua pureza. A proteína recombinante permite a inibição da interação RBD-ACE2 (Figura 9) (Limonta-Fernández et al., 2022).

A caracterização molecular da variante kappa encontrada na Índia revelou a presença de substituições não-sinónimas na proteína S, que reduziu a atividade das vacinas contra estas estirpes mutantes do SRA-CoV-2. Mi et al. (2022) desenvolveram um sistema para expressar uma vacina kappa mutante RBD em *P. pastoris*, facilitando o desenvolvimento futuro de vacinas preventivas contra a SARS-CoV-2. A glicoproteína Kappa-RBD com His-ACE2 demonstrou afinidade superior à da WT-RBD (Mi et al., 2022).

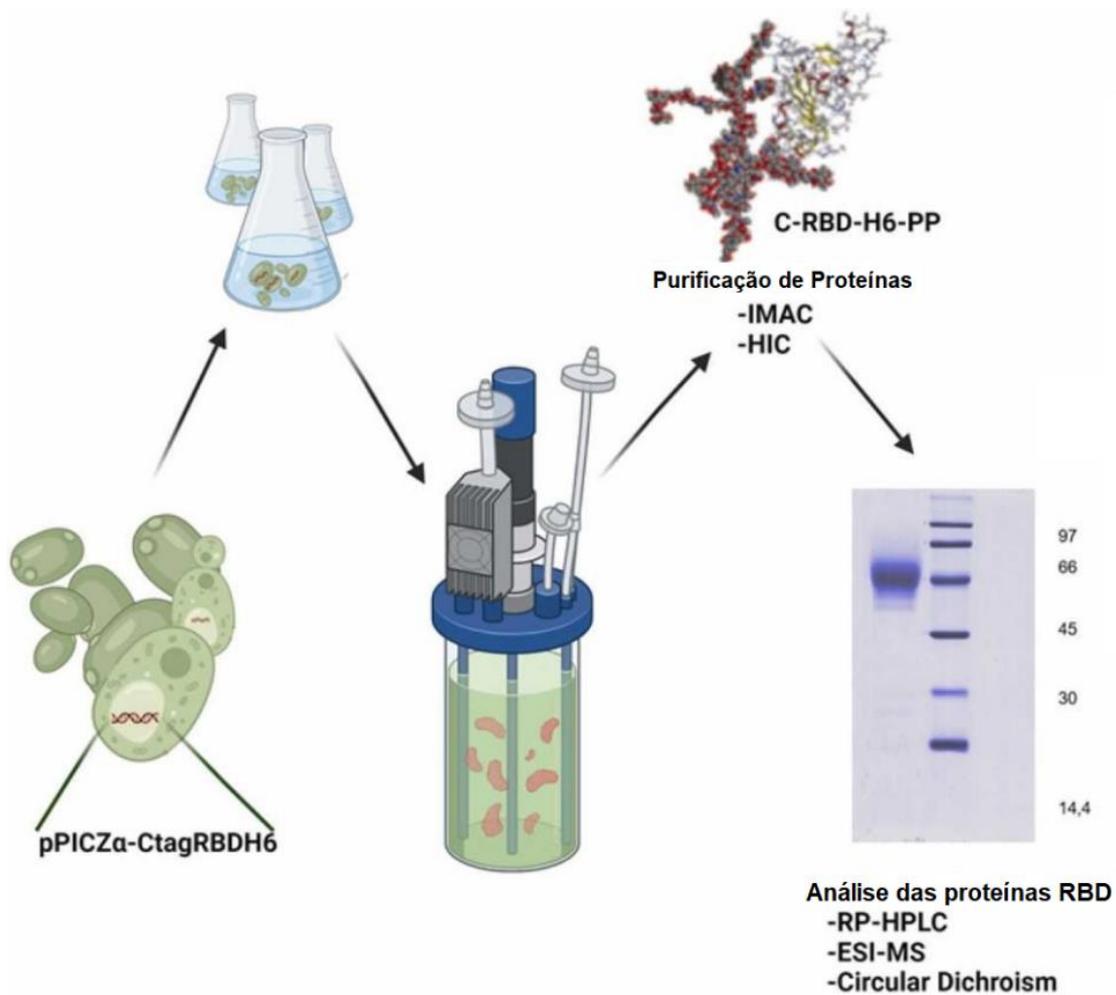


Figura 9: Esquema do desenvolvimento de uma vacina baseada no domínio de ligação ao recetor (RBD) do SARS-CoV-2, produzida na levedura *P. pastoris*. O RBD foi modificado adicionando extensões flexíveis de aminoácidos N- e C-terminais para modular as interações proteína/proteína e facilitar a purificação da proteína. Processo de fermentação de metanol alimentada com um meio de cultura à base de extrato de levedura realizado num fermentador de 50 L, seguido de um processo de purificação baseado em cromatografia de afinidade de iões metálicos imobilizados. O correto enrolamento da proteína purificada foi confirmado por espectrometria de massa, dicroísmo circular e testes de afinidade de ligação ao recetor ACE2 (Adaptado de (Limonta-Fernández et al., 2022)).

6. Rendimento de vacinas em *P. pastoris*

Ao longo das últimas décadas, têm surgido vários estudos que utilizam a *P. pastoris* como um sistema de expressão heterólogo para produzir proteínas recombinantes para aplicações biotecnológicas, especificamente no contexto do desenvolvimento de vacinas. Todos os estudos partilham o objetivo de otimizar a expressão de uma determinada proteína de interesse nesta levedura para obter altos rendimentos de proteínas recombinantes purificadas. A Tabela 2 resume os rendimentos obtidos para a produção de proteínas heterólogas através de sistemas de produção de *P. pastoris*.

A *P. pastoris* tem uma série de promotores fortes disponíveis para impulsionar a expressão heteróloga, e o promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) fortemente regulado pode ser altamente induzido pelo metanol. Wang et al. (2013) expressou com sucesso E1ΔGA em *P. pastoris* a um nível elevado através da otimização do códon e da indução do metanol. O E1ΔGA segregado foi facilmente purificado a partir de sobrenadantes de cultura usando a cromatografia de afinidade Ni-NTA. O rendimento do E1ΔGA purificado foi estimado em 210,53 mg/L, o que foi significativamente superior ao obtido em *E. coli* (2 mg/L) ou células de insetos (0,8 mg/L) (Wang et al., 2013).

Wang, Jiang, Han, et al., (2016) descreveram a otimização do códon para a forma truncada da proteína gp350 do EBV, que contém os principais epítopos imunogénicos, sendo um antígeno promissor na criação de uma vacina para o vírus. O fragmento de DNA otimizado foi inserido no vetor pPICZαA. A proteína recombinante gp3501-443 foi expressa, purificada e analisada com sucesso por SDS-PAGE e Western blotting, com um rendimento de 120,34 mg/L (Wang, Jiang, Han, et al., 2016). A preferência do uso de códon entre a sequência genética nativa e o genoma de *P. pastoris* tem impacto significativo no nível de expressão de proteínas recombinantes. A otimização de códon, substituindo por códon frequentemente usados em *P. pastoris* é uma estratégia eficiente para melhorar o nível de expressão de genes heterólogos (Daly & Hearn, 2005; Xu et al., 2021).

Tabela 2: Lista de proteínas recombinantes em sistemas de expressão de *P. pastoris*, usadas para o desenvolvimento de vacinas de subunidade.

Agente Patogénico	Antígeno	Particularidades no sistema de expressão	Rendimento (mg/L) de proteína pura	Referência
Vírus Epstein-Barr (EBV)	E1ΔGA	Promotor AOX1, otimização de codão	210,53	(Wang et al., 2013)
	Glicoproteína gp350	Otimização de codão	120,34	(Wang, Jiang, Han, et al., 2016)
Dengue	Domínio III do Envelope (EDIII)	Temperatura (20°C), 1% Casaminoácidos	187	(Kaushik et al., 2016)
Gripe aviária H5N1	Proteína recombinante NA (rNA)	-	2	(Subathra et al., 2014)
	Proteína recombinante HA (rHA)	-	13-15	(Kopera et al., 2014)
Gripe aviária H7N9	Proteína recombinante H7 (rH7)	Levedura modificada geneticamente para “humanizar” a glicosilação	2,002	(Liu et al., 2020)
Papiloma Vírus Humano (HPV)	HPV16, Proteína L1	Promotor AOX1, otimização de codão	14,2 e 13,4	(Bazan et al., 2009)
Vírus Hepatite B (HBV)	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)	GS115 (8 cópias de HBsAg), promotor AOX1	50	(Gurramkonda et al., 2013)
SARS-Cov-2	C-RBD-H6	Tag C-terminal His(6)	30-40	(Limonta-Fernández et al., 2022)

Para a criação de uma vacina contra a Dengue foi desenvolvido um sistema de *P. pastoris* para produzir grandes quantidades de sorotipo 3 EDIII do Dengue utilizando o promotor AOX1, que é induzido por metanol. A temperatura de indução teve um impacto significativo na quantidade de EDIII secretada. A diminuição da temperatura de 30°C para 20°C resultou num aumento significativo na secreção de EDIII, com um total de ~54 mg/L a 20°C contra ~21 mg/L a 30°C. Além disso, a suplementação de meios de cultura com casaminoácidos (CA) aumentou ainda mais a quantidade de EDIII secretado. A maior produção de EDIII (187 mg/L) ocorreu em condições de balão agitado, com indução a 20 °C e 1% de CA (Kaushik et al., 2016).

Vários estudos avaliaram o potencial de *P. pastoris* como hospedeiro para a produção de diferentes proteínas recombinantes, com aplicação em vacinas para a prevenção da infecção pelo vírus da gripe aviária. A proteína NA foi clonada em *P. pastoris*, tendo sido purificada com sucesso a partir de diferentes frações, incluindo membrana e sobrenadante de cultura. Embora o rendimento de purificação de NA purificada tenha sido menor no citoplasma, diferentes métodos de purificação, incluindo desnaturação e re-enrolamento, permitiram a recuperação da maior parte da proteína no seu estado ativo. O rendimento total de NA purificado foi de ~2 mg/L, comparável aos relatórios anteriores. No entanto, este rendimento podia ser substancialmente aumentado utilizando fermentadores de grande escala. A atividade da NA purificada foi próxima dos valores anteriormente relatados em baculovírus, sugerindo que o desenvolvimento de uma vacina no sistema de expressão *P. pastoris* pode ser uma opção melhor e viável para enfrentar futuras pandemias (Subathra et al., 2014).

Outro exemplo é a produção de hemaglutinina H5 recombinante do vírus da gripe em *P. pastoris*. A sobre expressão do rHA foi observada após 24 horas de indução, e o resultado ótimo foi alcançado após 5-7 dias. Quase 90% da proteína sobre expressa foi secretada no meio. O pH do meio extracelular de 7,8 demonstrou uma produção da proteína mais eficiente, necessitando de uma única indução com 5% de metanol e 7 dias de cultura após a indução para produzir os níveis mais elevados de rHA. A rHA purificado foi obtido por cromatografia de afinidade em condições nativas, com um rendimento de 1,3-1,5 mg de antígeno recombinante por 100 ml de volume de cultura (Kopera et al., 2014).

O sistema de *P. pastoris* modificado geneticamente na via de glicosilação demonstrou produzir proteínas com modificações complexas de glicosilação semelhantes às encontradas nas células de mamíferos. Este sistema tem sido utilizado para expressar o antígeno H7 hemaglutinina (HA),

que é um alvo potencial para as vacinas contra a gripe. Em contraste com os sistemas tradicionais de embriões de galinha, o sistema *P. pastoris* oferece um rendimento muito superior de antígeno HA recombinante, com uma capacidade de ~ 2 mg/L. O rH7 expresso foi detectado no citoplasma e na membrana celular das células de Glycoeng-yeast35/HA7, não tendo sido utilizadas sequências exógenas para a fusão, evitando reações alérgicas. O rH7 purificado, expresso em *P. pastoris* com glicoengenharia, formou nanopartículas com atividade de hemaglutinação, e a vacinação com rH7 proporcionou imunidade protetora em ratos (Liu et al., 2020). Assim, o sistema *P. pastoris* com glicoengenharia é uma alternativa adequada aos sistemas tradicionais de expressão para a produção de proteínas recombinantes com modificações complexas de glicosilação. Oferece várias vantagens, incluindo curtos períodos de cultura, baixo custo, alta densidade celular, e a capacidade de produzir proteínas enroladas corretamente e com modificações pós-tradução.

O sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando as estirpes GS115 e KM71 de *P. pastoris*, contou com a otimização de codão do gene L1, expresso sob o controlo do promotor AOX. A expressão da proteína foi induzida especificamente na presença de metanol, conforme evidenciado pela ausência de L1 em extratos de controlo negativo e clone não induzido. Um clone de *P. pastoris* KM71 transformado com o mesmo plasmídeo contendo o gene do tipo selvagem HPV16 L1 não expressou a proteína L1, demonstrando a necessidade de otimização do codão para a expressão do HPV16 L1 em *P. pastoris*. A concentração da proteína L1 em extratos de células de levedura foi estimada em 14,2 e 13,4 mg/l para os dois clones, respetivamente (Bazan et al., 2009).

A proteína C-RBD-H6 PP, é um candidato para a criação de uma vacina subunitária contra a SARS-CoV-2. Para assegurar uma elevada pureza da proteína C-RBD-H6 PP, foram utilizadas técnicas de afinidade e cromatografia de fase reversa, resultando num rendimento de 30-40 mg de proteína pura por litro de meio de cultura, com uma pureza de 98% ou superior. A presença do tag C-terminal His(6) permitiu uma fácil purificação e, as extensões adicionais N e C-terminal, facilitam a identificação e caracterização da proteína, sugerindo o seu potencial como candidata a vacina para a SARS-CoV-2 (Limonta-Fernández et al., 2022).

6.1. Purificação da HBsAg a partir de *Pichia pastoris*

De forma a ultrapassar as limitações associadas ao isolamento e purificação do HBsAg a partir do soro humano, foi necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para produzir grandes quantidades de partículas de HBsAg para utilização em vacinas. No início da década de 1980, os avanços na engenharia genética e biotecnologia permitiram que a primeira vacina contra a hepatite B fosse obtida através da formulação da proteína HBsAg produzida em estirpes recombinantes da levedura *S. cerevisiae*. A tecnologia para a obtenção em larga escala do HBsAg foi mais desenvolvida com base na expressão do gene HBsAg sob o controlo do promotor álcool oxidase I da *P. pastoris*. O processo a jusante para a purificação do HBsAg foi estabelecido, e foi verificada a eficácia das principais etapas para a produção em grande escala de HBsAg derivado de *P. pastoris*. A vacina formulada com HBsAg derivada de *P. pastoris* provou ser segura e eficaz, proporcionando proteção contra a infeção por hepatite B (Hardy et al., 2000). Na Tabela 3, está representada a grande variação nos diferentes processos convencionais desenvolvidos para purificar a HBsAg, baseada na literatura.

Hardy et al. (2000) descreve o processo de produção em grande escala de HBsAg utilizando leveduras recombinantes *P. pastoris*, que envolve a rutura de células para libertar a proteína HBsAg intracelular, que se encontra inicialmente numa forma agregada não-dissulfidada. Este agregado é convertido em partículas totalmente dissulfidadas que se assemelham ao HBsAg natural através de tratamento com tiocianato. Na fase inicial, a HBsAg está associada a uma grande quantidade de proteínas intracelulares citoplasmáticas, hidratos de carbono, lípidos, e detritos celulares, que devem ser removidos para satisfazer as especificações do produto. Os contaminantes são removidos por precipitação ácida, seguida de centrifugação para remover as proteínas precipitadas, carboidratos e lípidos. Posteriormente, HBsAg é submetida a absorção em lote na matriz de terra diatomácea, seguida de eluição a baixa força iónica e pH básico para semi-purificar o produto. O rendimento da HBsAg após precipitação ácida em grande escala varia de 43 a 60%, e o mecanismo de adsorção é muito provavelmente regido por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e as proteínas (Hardy et al., 2000).

A proteína HBsAg acumula-se no retículo endoplasmático (RE), podendo existir agregados de HBsAg. Em células de mamíferos, a proteína é secretada no ambiente extracelular após ser processada na via secretora, enquanto em *P. pastoris*, a proteína é retida no RE e não processada posteriormente. A montagem das VLPs a partir de HBsAg derivadas de levedura provavelmente

ocorre durante o processamento e na purificação a jusante, uma vez que não são detetadas VLPs dentro das células de levedura. Assim, pressupõe-se que o processo de montagem do HBsAg em VLPs é intrínseco e lento, resultando em diferentes estruturas lamelares, tubulares ou até mesmo agregados em condições de produção elevada (Lünsdorf et al., 2011).

Gurramkonda et al. (2013) discute o comportamento da proteína hidrófoba HBsAg produzida em levedura, e os desafios da sua purificação para utilização em vacinas. Os autores sugerem o Tween 20 como detergente substituto do Triton X-100 para solubilizar a forma "bioativa" do HBsAg a partir de homogeneizados de levedura, possivelmente devido ao seu efeito mais suave na solubilização da membrana. Além disso, sugerem a utilização do PEG 6000 para precipitar os contaminantes das células hospedeiras, e as subsequentes etapas de purificação para obter o produto final. Os autores concluem que embora os rendimentos necessitem de ser melhorados, a qualidade do produto final é excelente e demonstra uma boa estimulação das respostas imunitárias (Gurramkonda et al., 2013).

De acordo com a descrição feita por Patil and Khanna (2012), a maior parte da proteína HBsAg permanece associada às membranas das células de *P. pastoris* após lise, tendo sido utilizados detergentes para a sua libertação. O uso de 2% de Tween-20 resultou na maior recuperação da HBsAg, no entanto, a adição de ureia em 2% ao tampão de extração da membrana Tween-20 aumentou o rendimento da HBsAg de uma forma dependente da concentração (Patil & Khanna, 2012).

A proteína HBsAg recombinante pode ser expressa em vários sistemas celulares, podendo ser utilizada para a produção de vacinas. Contudo, a glicosilação da HBsAg recombinante afeta a sua imunoreatividade, e a HBsAg recombinante comercial para imunoensaio do HBsAb não é satisfatória em termos de sensibilidade. A *P. pastoris* é considerada um excelente sistema de expressão eucariótica para a produção em grande escala de proteína recombinante funcional devido aos elementos promotores fortes e rigorosamente regulados. Patil and Khanna (2012) relata expressão de alto nível e montagem eficiente de partículas HBsAg em *P. pastoris* Mut+. Contudo, o tempo necessário para atingir o pico de concentração do produto é longo, e o nível de expressão da HBsAg é baixo. As estirpes recombinantes Mut+ de *P. pastoris*, permitiram atingir a produção de 4,2 mg/L de HBsAg, um rendimento superior aos relatórios anteriores, e excelente pureza após ultracentrifugação (Patil & Khanna, 2012).

Em suma, a tecnologia para produzir grandes quantidades de partículas de HBsAg para uso em vacinas foi desenvolvida para ultrapassar as limitações associadas ao isolamento e purificação do HBsAg a partir do soro humano. Os avanços na engenharia genética e biotecnologia permitiram o desenvolvimento do processo de produção em larga escala de HBsAg em estirpes recombinantes de *P. pastoris*. A purificação do HBsAg foi estabelecida com base em diferentes processos convencionais, que variam na eficiência e qualidade do produto final. Além disso, a montagem das VLPs a partir de HBsAg derivadas de levedura provavelmente ocorre durante o processamento e a purificação a jusante. Foram testados vários detergentes e precipitantes para obter o produto final, mas o rendimento e a qualidade ainda precisam de ser melhorados. Contudo, a vacina formulada com HBsAg derivada de *P. pastoris* provou ser segura e eficaz, proporcionando proteção contra a infecção por hepatite B.

Tabela 3: Purificação de HBsAg a partir de cultura de *P. pastoris*, usando Ultracentrifugação (UC), Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e Ultrafiltração (UF) como passo final.

Passos de Purificação	Passo final	Pureza (%)	Referência
Lise →centrifugação →precipitação ácida→Aerosil 380 → cromatografia de imunoafinidade →cromatografia de troca iônica →cromatografia de exclusão de tamanho	SEC	95%	(Hardy et al., 2000)
Lise → centrifugação → precipitação com PEG 6000 →Filtração de fluxo tangencial →Fenil-600 M toyopear	UF	>99%	(Patil & Khanna, 2012)
Lise →precipitação com PEG 6000 →Aerosil 380 → cromatografia de troca iônica → ultracentrifugação ou cromatografia de exclusão de tamanho	U ou SEC	>99%	(Gurramkonda et al., 2013)
Lise →precipitação com PEG 6000 →Aerosil 380 →DEAE sepharose FF →Ultracentrifugação	UF	nd	(Lünsdorf et al., 2011)
Lise →precipitação com sulfato de amônio →Fenil-5PW →Ultracentrifugação	UF	90%	(Patil & Khanna, 2012)

7. Perspetivas Futuras

O uso da levedura *P. pastoris* como sistema de expressão recombinante para a produção de proteínas heterólogas em larga escala tem um grande potencial para crescimento no futuro. A capacidade da *P. pastoris* de realizar modificações pós-tradução importantes e produzir proteínas complexas e de alto peso molecular torna-a uma escolha atraente para a produção de muitas proteínas terapêuticas.

No entanto, é importante notar que ainda há espaço para melhorias no processo de produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*. A produtividade celular pode ser aumentada e o processo de fabricação pode ser otimizado por meio de melhorias em vetores, promotores de expressão e otimização de códons. O desenvolvimento de sistemas isentos de metanol também pode tornar o uso da *P. pastoris* ainda mais seguro e prático.

Além disso, pode ser explorada a produção de outras proteínas recombinantes, para permitir a produção de vacinas mais eficazes e acessíveis contra outras doenças infecciosas.

Em suma, com o avanço tecnológico contínuo na produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*, é possível vislumbrar um futuro promissor para a biotecnologia. Adicionalmente, a produção de produtos biotecnológicos pode ser aprimorada e expandida, o que pode ter um impacto significativo na saúde pública e na economia global.

8. Conclusão

A levedura *P. pastoris* é um organismo eucariota utilizado como hospedeiro celular para a produção de proteínas recombinantes, devido às suas características únicas, como a capacidade de utilizar metanol como a única fonte de carbono e energia e a disponibilidade de técnicas para a sua modificação genética. A produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* envolve a inserção do gene de interesse num vetor de expressão, a integração do vetor no genoma da *P. pastoris* e a avaliação de potenciais estirpes de expressão para produzir a proteína codificada pelo gene de interesse. A escolha apropriada dos vetores e promotores de expressão, a otimização de codões e a utilização de promotores sintéticos são fatores determinantes para aumentar o rendimento e a eficiência da produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*.

Vários estudos foram realizados para avaliar o potencial da *P. pastoris* como hospedeiro para produzir diferentes proteínas recombinantes para uso em vacinas, como a proteína gp350 do EBV, sorotipo 3 EDIII do Dengue e proteína rNA do vírus da gripe. Concluiu-se que a *P. pastoris* possuiu uma série de promotores fortes disponíveis para impulsionar a expressão heteróloga, como o promotor de álcool oxidase 1 (AOX1), que pode ser altamente induzido pelo metanol. Além disso, a otimização de codões, assim como a suplementação com CA e a modificação do padrão de glicosilação mostraram ser estratégias eficientes para melhorar o nível de expressão de genes heterólogos. Em relação aos níveis de produção, é importante referir que os valores variam entre a gama dos 2 mg/L até mais de 200 mg/L dependendo da proteína produzida.

Adicionalmente, o desenvolvimento da tecnologia para produzir grandes quantidades de partículas de HBsAg a partir de estirpes recombinantes de *P. pastoris* representa um grande avanço na produção de vacinas contra a hepatite B. Embora ainda existam desafios na purificação e obtenção de um produto final de alta qualidade, a vacina formulada com HBsAg derivada de *P. pastoris* mostrou ser segura e eficaz na proteção contra esta infeção.

Embora estas estratégias tenham sido eficazes, em alguns casos a falta de otimização do processo assim como o padrão de glicosilação afetaram de forma negativa a produção das proteínas recombinantes demonstrando a importância de um estudo contínuo deste sistema de expressão. Conclui-se que o avanço tecnológico na produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* para o desenvolvimento de vacinas oferece esperança na luta contra doenças infecciosas, possibilitando a produção em larga escala de vacinas mais acessíveis e eficazes.

9. Referências bibliográficas

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, *98*(12), 5301-5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Batra, G., Raut, R., Dahiya, S., Kamran, N., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2010). *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. *J Virol Methods*, *167*(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.002>
- Bazan, S. B., de Alencar Muniz Chaves, A., Aires, K. A., Cianciarullo, A. M., Garcea, R. L., & Ho, P. L. (2009). Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol*, *154*(10), 1609-1617. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0484-8>
- Bull, J. J., Nuismer, S. L., & Antia, R. (2019). Recombinant vector vaccine evolution. *PLoS Comput Biol*, *15*(7), e1006857. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006857>
- Cardoso, S. A., Paixão, V. F., Oliveira, M. D., Honda, E. R., Oliveira, L. L., da Silva, C. C., & De Paula, S. O. (2013). Dengue-1 envelope protein domain III produced in *Pichia pastoris*: potential use for serological diagnosis. *Protein Expr Purif*, *92*(1), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.014>
- Celik, E., & Calik, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*, *30*(5), 1108-1118. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, *24*(1), 45-66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Costa, S. J., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, *5*(63), 1-20.
- D'Amico, C., Fontana, F., Cheng, R., & Santos, H. A. (2021). Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Deliv Transl Res*, *11*(2), 353-372. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00924-7>
- Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, *18*(2), 119-138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Fahimi, H., Allahyari, H., Hassan, Z. M., & Sadeghizadeh, M. (2014). Dengue virus type-3 envelope protein domain III: Expression and immunogenicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *17*(11), 836-843
- Freitas, A. I., Domingues, L., & Aguiar, T. Q. (2022). Tag-mediated single-step purification and immobilization of recombinant proteins toward protein-engineered advanced materials. *Journal of Advanced Research*, *36*, 249-264.
- Garvey, M. (2022). Non-Mammalian Eukaryotic Expression Systems Yeast and Fungi in the Production of Biologics. *J Fungi (Basel)*, *8*(11). <https://doi.org/10.3390/jof8111179>
- Gurramkonda, C., Zahid, M., Nemani, S. K., Adnan, A., Gudi, S. K., Khanna, N., Ebsen, T., Lünsdorf, H., Guzmán, C. A., & Rinas, U. (2013). Purification of hepatitis B surface antigen virus-like particles from recombinant *Pichia pastoris* and in vivo analysis of their immunogenic properties. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *940*, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.030>
- Hansson, M., Nygren, P. A., & Ståhl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol Appl Biochem*, *32*(2), 95-107. <https://doi.org/10.1042/ba20000034>
- Hardy, E., Martínez, E., Diago, D., Díaz, R., González, D., & Herrera, L. (2000). Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Journal of*

- Biotechnology*, 77(2), 157-167. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00201-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00201-1)
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*, 235(9), 5867-5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kaushik, N., Rohila, D., Arora, U., Raut, R., Lamminmäki, U., Khanna, N., & Batra, G. (2016). Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*, 16, 12. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0243-3>
- Kopera, E., Dwornyk, A., Kosson, P., Florys, K., Sączyńska, V., Dębski, J., Cecuda-Adamczewska, V., Szewczyk, B., Zagórski-Ostojka, W., & Grzelak, K. (2014). Expression, purification and characterization of glycosylated influenza H5N1 hemagglutinin produced in *Pichia pastoris*. *Acta Biochim Pol*, 61(3), 597-602.
- Korenkov, D., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2018). Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 17(11), 977-987. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1541407>
- Kumar, R., & Kumar, P. (2019). Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Res*, 19(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007>
- Legastelois, I., Buffin, S., Peubez, I., Mignon, C., Sodoyer, R., & Werle, B. (2017). Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Hum Vaccin Immunother*, 13(4), 947-961. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1260795>
- Limonta-Fernández, M., Chinea-Santiago, G., Martín-Dunn, A. M., Gonzalez-Roche, D., Bequet-Romero, M., Marquez-Perera, G., González-Moya, I., Canaan-Haden-Ayala, C., Cabrales-Rico, A., Espinosa-Rodríguez, L. A., Ramos-Gómez, Y., Andujar-Martínez, I., González-López, L. J., de la Iglesia, M. P., Zamora-Sanchez, J., Cruz-Sui, O., Lemos-Pérez, G., Cabrera-Herrera, G., Valdes-Hernández, J., . . . Guillén-Nieto, G. (2022). An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *N Biotechnol*, 72, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.08.002>
- Liu, B., Shi, P., Wang, T., Zhao, Y., Lu, S., Li, X., Luo, S., Chang, S., Wang, S., Sun, P., Gong, X., Gao, Y., & Wu, J. (2020). Recombinant H7 hemagglutinin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* forms nanoparticles that protect mice from challenge with H7N9 influenza virus. *Vaccine*, 38(50), 7938-7948. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.061>
- Lünsdorf, H., Gurramkonda, C., Adnan, A., Khanna, N., & Rinas, U. (2011). Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the hepatitis B surface antigen. *Microb Cell Fact*, 10, 48. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-48>
- Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Krishnamoorthy, J., Reshmy, R., Sirohi, R., Pugazhendi, A., Awasthi, M. K., Szakacs, G., & Binod, P. (2021). Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact*, 20(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>
- Magalhães, S., & Keshavarz-Moore, E. (2021). *Pichia pastoris* (Komagataella phaffii) as a Cost-Effective Tool for Vaccine Production for Low- and Middle-Income Countries (LMICs). *Bioengineering (Basel)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8090119>
- Mariz, F. C., Coimbra, E. C., Jesus, A. L., Nascimento, L. M., Torres, F. A., & Freitas, A. C. (2015). Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16

- L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. *Biomed Res Int*, 2015, 594120. <https://doi.org/10.1155/2015/594120>
- Mathieu, E., Ritchie, H., Rodés-Guirao, L., Appel, C., Giattino, C., Hasell, J., ... Roser, M. (2020). Coronavirus Pandemic (COVID-19). OurWorldInData.org. <https://ourworldindata.org/coronavirus>
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol*, 824, 329-358. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_17
- Mayer, C. E., Geerloff, A., & Schepers, A. (2012). Efficient expression and purification of tag-free Epstein-Barr virus EBNA1 protein in Escherichia coli by auto-induction. *Protein Expr Purif*, 86(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.08.010>
- Mettu, R., Chen, C.-Y., & Wu, C.-Y. (2020). Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0591-0>
- Mi, T., Wang, T., Xu, H., Sun, P., Hou, X., Zhang, X., Ke, Q., Liu, J., Hu, S., Wu, J., & Liu, B. (2022). Kappa-RBD produced by glycoengineered *Pichia pastoris* elicited high neutralizing antibody titers against pseudoviruses of SARS-CoV-2 variants. *Virology*, 569, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.03.001>
- Minor, P. D. (2015). Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 479-480, 379-392. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>
- Oliveira, C., Felix, W., Moreira, R. A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2008). Expression of frutalin, an α -D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 60, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.008>
- Oliveira, C., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2014). Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin case study. *Frontiers in Plant Science*, 5(390).
- Oliveira, C., & Domingues, L. (2018). Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 81-92.
- Patil, A., & Khanna, N. (2012). Novel membrane extraction procedure for the purification of hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Journal of Chromatography B*, 898, 7-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.041>
- Pattyn, J., Hendrickx, G., Vorsters, A., & Van Damme, P. (2021). Hepatitis B Vaccines. *J Infect Dis*, 224(12 Suppl 2), S343-s351. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa668>
- Ramos, R., Domingues, L., & Gama, F. M. (2010). Escherichia coli expression and purification of LL37 fused to a family III carbohydrate-binding module from Clostridium thermocellum. *Protein Expression and Purification*, 71, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.10.016>
- Ramos, R., Moreira, S., Rodrigues, A., Gama, M., & Domingues, L. (2013). Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2. *Biotechnology Progress*, 29, 17-22. <https://doi.org/10.1002/btpr.1650>
- Rappuoli, R., De Gregorio, E., & Costantino, P. (2019). On the mechanisms of conjugate vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(1), 14-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819612116>
- Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of his-tagged proteins. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part D*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>

- Srivastava, V., Nand, K. N., Ahmad, A., & Kumar, R. (2023). Yeast-Based Virus-like Particles as an Emerging Platform for Vaccine Development and Delivery. *Vaccines (Basel)*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines11020479>
- Subathra, M., Santhakumar, P., Narasu, M. L., Beevi, S. S., & Lal, S. K. (2014). Evaluation of antibody response in mice against avian influenza A (H5N1) strain neuraminidase expressed in yeast *Pichia pastoris*. *J Biosci*, *39*(3), 443-451. <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9422-3>
- Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L. R., Krishnan, J., & Shapiro, M. (2018). Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine*, *50*(2), 110-120. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
- Wanderley, M. S. O., Oliveira, C., Brunaska, D., Domingues, L., Lima Filho, J. L., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of trace elements supplementation on the production of recombinant frutalin by *Pichia pastoris* KM71H in a fed-batch process. *Chemical Papers*, *67*, 682-687. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0363-3>.
- Wang, M., Jiang, S., Han, Z., Zhao, B., Wang, L., Zhou, Z., & Wang, Y. (2016). Expression and immunogenic characterization of recombinant gp350 for developing a subunit vaccine against Epstein-Barr virus. *Appl Microbiol Biotechnol*, *100*(3), 1221-1230. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7027-x>
- Wang, M., Jiang, S., Liu, X., & Wang, Y. (2013). Expression, purification, and immunogenic characterization of Epstein-Barr virus recombinant EBNA1 protein in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(14), 6251-6262. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4967-x>
- Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, *7*(3), 155-165. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>
- Xu, Y., Liu, K., Han, Y., Xing, Y., Zhang, Y., Yang, Q., & Zhou, M. (2021). Codon usage bias regulates gene expression and protein conformation in yeast expression system *P. pastoris*. *Microb Cell Fact*, *20*(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01580-9>
- Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H., & Li, J. (2019). Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases [Review]. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00594>