



25 a 29 de setembro
Jornada Farmacêutica da Unesp

BB - Expressão e secreção de fragmento variável de cadeia única de anticorpo anti-RBD de SARS-CoV-2 em *Saccharomyces cerevisiae*

Yasmin Monteiro da Silva¹, Cleslei Fernando Zanelli¹, Tatiana Maria de Souza-Moreira¹
Sandro Roberto Valentini¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus Araraquara, UNESP

Introdução: A pandemia do COVID-19 causou diversos impactos na sociedade, evidenciando a fome e o desemprego. Dentro desse cenário, a RT-qPCR foi o teste padrão utilizado para diagnóstico da infecção. No entanto, esse teste demanda uma infraestrutura tecnológica de qualidade, com equipamentos e mão de obra especializada, além de ser relativamente caro, restringindo sua utilização. Fora esses empecilhos, ficou evidente a falta de autonomia brasileira na produção dos testes por conta da dependência externa para fornecimento de insumos farmacêuticos ativos. Assim, torna-se importante o estabelecimento nacional de tecnologias que possam responder rapidamente a um cenário pandêmico, possibilitando, por exemplo, a obtenção de anticorpos que possam ser utilizados em kits diagnósticos.

Objetivos: Dessa forma, este trabalho procurou estabelecer um processo de expressão e secreção de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) do anticorpo CC12.1, que possui alta afinidade ao domínio de ligação ao receptor (RBD) do SARS-CoV-2, em *Saccharomyces cerevisiae*.

Metodologia: Para realizar o processo de secreção a sequência codificadora do scFv foi fusionada à glicoproteína Aga2, no plasmídeo pYD4, sob controle de expressão do promotor de galactose. Este foi transformado por choque térmico na linhagem de *S. cerevisiae* BJ5464 (*MATa ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL*) e os clones positivos foram selecionados em meio sintético completo (SC) sem triptofano (0,67% base de nitrogênio de levedura, 0,2% mix de aminoácidos e uracila). A indução da expressão foi realizada em meio SC com casaminoácidos (0,5%), rafinose (2%) e galactose (2%) (SG-RCAA) por 72h a 22°C com agitação. O sobrenadante coletado foi concentrado 22x por centrifugação com concentrador de 30 kDa. A produção da proteína recombinante e sua secreção para o meio extracelular foram avaliadas por eletroforese em SDS-PAGE e coloração em azul de Coomassie.

Resultados e Discussão: Desse modo, foi possível confirmar a presença e o acúmulo de uma banda de cerca de 60 kDa correspondente ao fragmento Aga2-scFv pelo gel de SDS-PAGE na amostra referente ao meio extracelular concentrado enquanto nenhum acúmulo foi observado na amostra de pellet celular lisada. Foi observado também que no processo de concentração, o corte de 30 kDa auxiliou na purificação da amostra, reduzindo a contaminação por proteínas menores.

Conclusão: Assim, espera-se estabelecer uma plataforma de produção e purificação eficazes e de menor custo do fragmento scFv de anticorpo responsivo ao RBD de SARS-CoV-2, incentivando o crescimento da indústria brasileira no setor de insumos farmacêuticos ativos.

Palavras-chave: secreção celular, COVID-19, fragmento variável cadeia única

Apoio Financeiro: processo nº 2023/03968-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) CNPq 402413/2020-2