

SISTEMA DE EXPRESSÃO SIMULTÂNEA DE MÚLTIPLAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Escherichia coli*

ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH¹; OTÁVIO JOSÉ PINTO DO NASCIMENTO²; MIGUEL ANDRADE BILHALVA³, STEFANIE BRESSAN WALLER⁴, MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelabrasch@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – otavio.uf@gmail.com

³Helper Pesquisa e Desenvolvimento em Imunobiológicos– miguel.bilhalva@ufpel.edu.br

⁴Helper Pesquisa e Desenvolvimento em Imunobiológicos - waller.stefanie@yahoo.com.br

⁵Helper Pesquisa e Desenvolvimento em Imunobiológicos– marcosferreiravet@gmail.com

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Um dos principais alvos de pesquisas em expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é o desenvolvimento de vacinas veterinárias, permitindo a produção de antígenos específicos de forma segura, eficiente e escalonável, dispensando a manipulação de patógenos para obtenção dos antígenos (PLOTKIN, S.A, 2014).

Atualmente, a maioria das vacinas recombinantes utilizam antígenos individuais, quimeras de dois ou mais antígenos ou quimeras de múltiplos epítomos. Quanto ao processo de produção, essas vacinas utilizam proteínas purificadas, que envolvem etapas laboriosas de obtenção dos antígenos desejados.

Além dos fatores mencionados acima, para alguns patógenos as formulações vacinais requerem múltiplos antígenos para conferir proteção adequada. Se levarmos em consideração a produção individual e a necessidade de purificação dos mesmos, o custo de produção desse tipo de tecnologia inviabiliza sua produção industrial e, conseqüentemente, prejudica a inserção de novas tecnologias de vacinas no manejo sanitário de doenças infecciosas dos animais.

Pensando nisso, a construção de um vetor eficiente capaz de produzir de forma eficiente múltiplos antígenos foi uma estratégia pensada pelo nosso grupo para viabilizar desenvolvimento e produção de novas tecnologias de vacinas para indústria de saúde animal. Aliamos também a utilização de células de *E.coli* inativadas (bacterinas recombinantes) para eliminar as etapas de purificação de antígenos.

Desta forma, o presente trabalho apresenta um novo vetor plasmidial pOC-HELPER que permite a produção simultânea de três proteínas quiméricas, o qual, combinado com o uso de bacterinas recombinantes, representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas de nova geração mais eficientes, seguras e aplicáveis na produção animal, oferecendo uma solução inovadora para a saúde animal.

2. ANÁLISE DE MERCADO

O vetor de expressão multi antigênico pOC-HELPER foi pensado para o setor agropecuário, viabilizando vacinas de nova geração inéditas, mas que devem ser de baixo custo para serem competitivas a nível de mercado. Empresas brasileiras que atuam produzindo insumos biotecnológicos (proteínas) se caracterizam como concorrentes diretos. As universidades e centros de pesquisa são concorrentes indiretos. Entretanto, devido à complexidade e aos desafios associados ao desenvolvimento de biotecnologias para a saúde animal, nossos concorrentes também são parceiros estratégicos e possíveis vetores da tecnologia no mercado brasileiro.

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal de 2023, o Brasil é o maior exportador de carne bovina e de frango, e o quarto maior exportador de carne suína. O rebanho nacional apresenta números extraordinários: são 1,6 bilhões de frangos, 220 milhões de bovinos e 43 milhões de suínos. Esses números tendem a aumentar uma vez que a população mundial cresce e aumenta a demanda por alimentos.

As doenças infecciosas causam impactos econômicos, ambientais e sociais. Na pecuária as doenças reduzem a produção global em 80 bilhões de quilos de carne e 179,5 bilhões de quilos de laticínios a cada ano, reduzindo o faturamento do produtor em US\$358,4 bilhões. Estima-se que uma redução de 10% das doenças em bovinos leva a uma redução de 800 milhões de toneladas em gases de efeito estufa (GEE). Além disso, doenças na avicultura foram associadas a um aumento de 5% na fome no mundo em 2019, o que equivale a 34 milhões de pessoas passando fome (HEALTH FOR ANIMALS, 2024).

O mercado de saúde animal teve um aumento de 12%, alcançando um faturamento de US\$38,3 bilhões em 2021. No Brasil, o faturamento do setor foi de 9 bilhões em 2022. Ao analisar esse mercado, observa-se que apenas 28,5% de todos os produtos comerciais no mundo destinados à saúde animal são soluções biológicas, mais sustentáveis. Portanto, existe uma grande oportunidade de mercado para novas soluções biotecnológicas.

A solução desenvolvida pela Helper tem uma enorme gama de aplicações no desenvolvimento de novas biotecnologias para a saúde animal, seja para vacinas, teste de diagnóstico ou proteínas terapêuticas (peptídeos antimicrobianos – PAMs).

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal, o Brasil possui 409 fabricantes, sendo 379 indústrias farmacêuticas e 45 de biológicos. Ao analisar a representatividade das indústrias fabricantes de produtos biológicos, selecionamos 15 indústrias como potenciais clientes. Mas, levando em consideração que muitas empresas ainda não possuem infraestrutura fabril para produção de produtos biotecnológicos que utilizam organismos geneticamente modificados, selecionamos 5 empresas com as quais já possuímos acordo de confidencialidade, foram apresentadas nossa solução. Hoje temos um projeto em andamento com a empresa Ceva Saúde Animal e outro projeto em fase de negociação com a Ourofino Saúde Animal.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Devido a necessidade de produção de múltiplas proteínas recombinantes simultaneamente para algumas formulações vacinais, com a utilização do vetor plasmidial pOC-HELPER, combinado com o uso da tecnologia de bacterinas recombinantes de *E.coli*, ocorre uma redução significativa do custo por dose

quando comparado às vacinas convencionais, apresentando um diferencial competitivo no mercado.

O modelo de negócio para essa tecnologia é através de acordos de co-desenvolvimento com indústrias de saúde animal (B2B) e centros de pesquisa (B2G). A monetização se dá através de prestação de serviços para execução de projetos de desenvolvimento de novas vacinas, taxa de licenciamento da tecnologia e recebimento de *royalties*.

Em termos de propriedade intelectual, um pedido de patente encontra-se depositado junto ao INPI sob o número do pedido BR 10 2023 021579 3.

Atualmente nossa solução encontra-se em TRL 3, onde já foram realizadas as etapas de design do plasmídeo, síntese pela empresa *Epoch Life Science*, expressão das proteínas-teste e caracterização *in vitro* por SDS-PAGE (Figura 2) e *Western blot* (Figura 1).

Os principais desafios e riscos estão diretamente ligados à produção em larga escala e questões regulatórias, as quais acreditamos que os parceiros em potencial já citados não encontrarão problemas por possuírem experiência prévia.

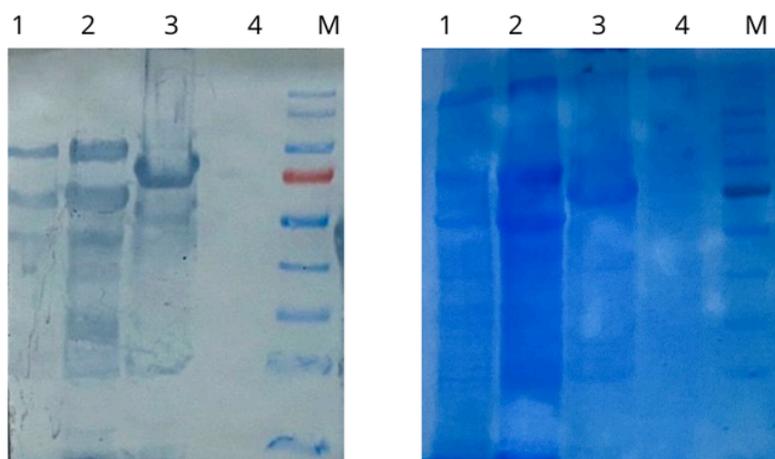


Figura 1. Caracterização da expressão das proteínas recombinantes por Western blot com anticorpo anti-histidina revelado por DAB. 1 - pOC-HELPER NI (não-induzido); 2 - pOC-HELPER IND (induzido); 3 - pOC-HELPER C.I (corpos de inclusão); 4 - pOC-HELPER S.C (solúvel).

Figura 2. Caracterização da expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em SDS page. 1 - pOC-HELPER NI (não-induzido); 2 - pOC-HELPER IND (induzido); 3 - pOC-HELPER C.I (corpos de inclusão); 4 - pOC-HELPER S.C (solúvel).

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

O plasmídeo pOC-HELPER tem o potencial de gerar impacto socioeconômico e ambiental, especialmente dentro da cadeia produtiva da pecuária nacional. Ao melhorar o acesso a vacinas de alta tecnologia, a inovação contribui diretamente para o aumento na produtividade dos rebanhos, beneficiando pecuaristas e contribuindo para o fortalecimento da soberania nacional e independência de biotecnologias para a saúde animal.

Em termos de visão de futuro, a inovação em biotecnologias destinadas à saúde animal tem o potencial de evoluir significativamente ao longo dos próximos anos, pois espera-se que a tecnologia do plasmídeo pOC-Helper evolua continuamente para tornar a produção de proteínas ainda mais eficientes, levando

a um menor custo de produção de vacinas veterinárias. A longo prazo, a inovação poderá ser integrada em um contexto de agropecuária sustentável, onde a produção animal e o bem-estar ambiental coexistem de maneira equilibrada, auxiliando na redução do uso de soluções farmacêuticas, minimizando os impactos negativos na saúde única. Dessa maneira, a tecnologia não apenas atenderá as demandas atuais do mercado local mas também poderá ser uma solução inovadora para os desafios futuros da inovação na indústria de saúde animal global.

5. CONCLUSÕES

A principal inovação deste trabalho é o vetor plasmidial pOC-HELPER, que permite a expressão simultânea de múltiplas proteínas recombinantes. Essa tecnologia está sendo aplicada no desenvolvimento de vacinas recombinantes inéditas no cenário mundial, além de simplificar a produção de vacinas já existentes, promovendo avanços em biotecnologias destinadas à saúde animal. Os resultados são promissores, com potencial para gerar impactos significativos na economia, sociedade e meio ambiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GALLAGHER TB, MELLADO-SANCHEZ G, JORGENSEN AL, MOORE S, NATARO JP, PASETTI MF, et al. (2019) Development of a multiple-antigen protein fusion vaccine candidate that confers protection against *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. **Nature, NPJ Vaccines**, 2019.

GASPAR E. B., MINHO A. P., SANTOS L. R. Manual de boas práticas de vacinação e imunização de bovinos. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015.

Health For Animals. **Global Trends in the Animal Health Sector**. Brussels, Belgium, 2022. Acessado em 27 set. 2024. Online. Disponível em: <https://healthforanimals.org/animal-health-in-data/parasites-diseases/global-trends-in-the-animal-health-sector/>

JÚNIOR, G.B. **Fatores que interferem na qualidade da carne bovina na propriedade rural**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

LIN, Y.; XU, J.; YANG, W.; ZHAO, X.; LIU, Y. Construction of recombinant *Escherichia coli* expressing multiepitope protein for vaccine development. **Vaccine**, Amsterdam, v.34, n.22, p.2506-2513, 2016.

Taís Cristina Menezes. **Challenges for the Brazilian animal health service**. CEPEA ESALQ, São Paulo, 1 nov 2019. Acessado em 29 set. 2024. Online. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/en/opinion/challenges-for-the-brazilian-animal-health-service.aspx>

YAO Y, ZHANG Z, YANG Z. The combination of vaccines and adjuvants to prevent the occurrence of high incidence of infectious diseases in bovine. **Frontiers in Veterinary Science**, 2023.