

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0823074-9 A2**

(22) Data de Depósito: 02/09/2008
(43) Data da Publicação: 10/04/2012
(RPI 2153)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/85
C12N 15/866
A01K 67/033

(54) Título: MÉTODO PARA DESENVOLVER SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, USO DAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS TRANSFORMADAS OU TRANSFECTADAS, LARVAS DE INSETO TRANSFECTADAS, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES, USO DO VETOR DE EXPRESSÃO E USO DAS LARVAS DE INSETO

(73) Titular(es): Alternative Gene Expression, S.L.(Algenex)

(72) Inventor(es): Covadonga Alonso Martí, Ismael Sanches Ramos, Javier López Vidal, José Angel Martinez Escribano, Silvia Gómez Sebastián

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT EP08061580 de 02/09/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2010/025764de
11/03/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA DESENVOLVER SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, USO DAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS TRANSFORMADAS OU TRANSFECTADAS, LARVAS DE INSETO TRANSFECTADAS, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES, USO DO VETOR DE EXPRESSÃO E USO DAS LARVAS DE INSETO. A presente invenção provê promotores derivados de inseto para a expressão de proteínas estrangeiras em células de inseto. Na invenção, sequências regulatórias polinucleotídicas, as quais dirigem a expressão das proteínas majoritárias de inseto (hexamerinas) em estágios específicos de evolução de larva, foram isolados a partir de insetos (*Trichoplusia ni*). Ditas sequências regulatórias polinucleotídicas promovem a expressão mais forte de gene estrangeiro no sistema baculovirus quando comparada à do promotor convencional de poliedrina. Adicionalmente, a combinação dos novos promotores derivados de larva da invenção com o promotor pL aumentou os níveis de expressão em baculovirus até 61%-375% (dependendo do tempo de infecção) com relação aos baculovirus convencionais usados na indústria de biotecnologia. O promotor pB2 também dirige a expressão gênica em momentos prematuros quando comparado ao promotor de poliedrina, sendo este aspecto uma grande vantagem para a proteína correta.



**MÉTODO PARA DESENVOLVER SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS
POLINUCLEOTÍDICAS, SEQUÊNCIA REGULATÓRIA POLINUCLEOTÍDICA E
USO DA MESMA, VETOR DE EXPRESSÃO E USO DO MESMO, MÉTODO PARA
OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS E USO DAS MESMAS, MÉTODO
PARA OBTENÇÃO DE LARVAS TRANSFECTADAS, INFECTADAS OU
TRANSFORMADAS DE UM INSETO E USO DAS MESMAS E MÉTODO PARA
PRODUZIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pode ser incluída no campo da biotecnologia. A invenção se refere a sequências regulatórias polinucleotídicas (tais como promotores) derivadas dos genes da família de hexamerina em insetos, e seu uso na expressão de proteína estrangeira em células de inseto e larva de inseto, por exemplo, usando o vetor de expressão de baculovirus.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 O sistema de expressão em célula baculovirus-inseto é versátil e amplamente usado para produzir proteínas heterólogas (tanto nativa quanto recombinante). Este sistema é universalmente reconhecido como um dos mais poderosos e versáteis para produzir proteínas recombinantes de qualquer tamanho. Ele é
15 baseado em duas características principais: elevados níveis de expressão de proteína alcançados e correto enovelamento das proteínas para torná-las bioativas, enquanto ocorre a maioria das modificações pós-tradução de células de mamíferos. Adicionalmente, os períodos de desenvolvimento deste sistema
20 são mais curtos e a estabilidade genética do vírus recombinante é muito alta. O genoma de baculovirus contém dois promotores fortes denominados promotor de poliedrina (pL), que é o mais forte promotor conhecido entre os organismos superiores, e o promotor p10 (proteína p10). O promotor PL
25 pode ser usado para controlar a expressão de virtualmente

qualquer gene. Ele é muito rápido e menos dispendioso para engenheirar um baculovirus para a produção de proteína do que quaisquer outros sistemas avançados de produção baseados em células transformadas de animal ou de animais transgênicos. No entanto, os promotores anteriores comercialmente disponíveis possuem algumas desvantagens, tal como um estágio muito tardio no qual eles promovem a expressão gênica. Nesse momento o maquinário celular é amplamente afetado e, então, a produção de proteínas heterólogas expressadas em células de inseto pode ser desigual devido ao incompleto processamento e agregação. Estas limitações podem ser devidas à deterioração de fatores celulares do hospedeiro à medida que a infecção viral avança. De modo a resolver tal problema, a invenção sugere o uso de promotores prematuros com expressão estável, os quais são pelo menos tão fortes quanto o promotor de poliedrina, como uma muito interessante opção para compensar os efeitos de degradação da célula do hospedeiro e, ao mesmo tempo, para alcançar elevados níveis de expressão de proteínas heterólogas. A presente invenção quer chamar atenção para o fato de que a transição da forma larva (imatura) para a de adulto (madura) é acompanhada pela ativação e supressão de inúmeros genes em vários tecidos (desenvolvimento metamórfico de inseto). Entre as proteínas associadas à metamorfose há uma família conhecida como hexamerinas que são expressadas a um nível muito alto durante o último instar. Essas proteínas são, em sua maioria, proteínas de reserva hemolinfa que são usadas durante o desenvolvimento pós-larval. O mais alto nível das hexamerinas pode ser observado durante as primeiras 48 horas do quinto instar, cerca de umas quatro vezes mais tarde do que aquele período (Figura 1). Na presente invenção, foi desenvolvida uma família de promotores a ser usada na expressão de proteínas estrangeiras partindo das sequências que codificam a família acima mencionada de proteínas-de-

larvas. Portanto, a presente invenção provê os promotores pB1 (SEQ ID NO: 1) e pB2 (SEQ ID NO: 2), os quais são prematuros e mais fortes quando comparados aos promotores usados no estado da técnica. Na presente invenção, foram isolados promotores
5 que podem dirigir a expressão da maioria das proteínas de inseto em estágios específicos da evolução larval. Eles se originam da sequência que codifica as proteínas hexamerinas em larvas e podem ser usados para construir qualquer vetor de expressão (tal como vetores de expressão de baculovirus) de
10 modo a expressar proteínas heterólogas em diversas células de inseto, preferencialmente sf9 ou sf21 de *Spodoptera frugiperda*. Sequências regulatórias similares àquelas que constituem esses novos promotores já foram caracterizados em larvas de lepidóptera, mas nunca antes usados no sistema de
15 expressão de baculovirus.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Breve Descrição da Invenção

20 Portanto, a presente invenção provê sequências regulatórias polinucleotídicas, tais como pB1 (SEQ ID NO 1) e/ou pB2 (SEQ ID NO 2), oriundas das sequências que regulam a expressão da família de genes da haxamerina. Essas proteínas mostram a mais alta expressão durante o quinto instar, a uma percentagem
25 muito alta após as 48 horas deste período de desenvolvimento larval, apresentando uma acumulação muito rápida em um curto período de tempo (Figura 1). Estas características sugerem que a expressão dessas proteínas é dirigida por promotores fortes que podem ser usados para gerar baculovirus mais eficientes ou
30 quaisquer outros vetores de expressão e, portanto, para otimizar a expressão de proteínas heterólogas. No caso de sistemas de expressão de baculovirus, uma atividade prematura do promotor é especialmente relevante no caso de proteínas

focalizadas em rotas de secreção, que, de outra forma, seria afetada por mudanças em ambos, o maquinário celular pós-tradução e rota de secreção em estágios tardios de infecção do baculovirus.

5

As sequências dos promotores da invenção são oriundas das sequências que regulam a expressão dos genes da família de hexamerina (*BJHSP1* e *BJHSP2*), mas tendo algumas mutações não compreendidas nas sequências regulatórias nucleotídicas originais de ditos genes da família da hexamerina. Ditas hexamerinas foram isoladas de larvas de *Trichoplusia ni* (*T. ni*) e identificadas em uma banda de 80 kDa por análise por espectrometria de massa (Figura 2). Depois que as proteínas foram identificadas, os genes codificantes das mesmas foram isolados, bem como as sequências a montante contendo seus respectivos promotores. Os primers usados para amplificar cada promotor original são especificados nesta patente. Os primers caracterizados pela SEQ ID NO: 3 e 4 foram usados para amplificar o promotor original que finalmente deriva no promotor pB1 (SEQ ID NO: 1). Os primers caracterizados pela SEQ ID NO: 5 e 6 foram usados para amplificar o promotor original que finalmene deriva no promotor pB2.

A principal vantagem dos promotores da invenção, especialmente o pB2, é que eles produzem uma expressão prematura e mais forte da proteína de interesse quando comparados com os promotores muito tardios conhecidos, usados atualmente em sistemas de expressão de baculovirus.

Em uma concretização preferida, a presente invenção também inclui a combinação dos promotores da invenção pB1 e pB2 (preferencialmente pB2) com qualquer outro promotor, por exemplo, pL ou p10 (preferivelmente pL). Surpreendentemente,

quando tal combinação foi executada, foi alcançado um efeito sinérgico. Quando um vetor de expressão de baculovirus compreendendo um promotor pLpB2 foi testado, os níveis de expressão das proteínas de interesse foram aumentados em até 5 61%-375% (dependendo do tempo de infecção) com relação ao uso do promotor pL sozinho. Esta concretização é muito importante para os propósitos da presente invenção porque o promotor pL é, atualmente, geralmente usado na indústria biotecnológica.

10 Em outra concretização preferida, a presente invenção também se refere à combinação do promotor da invenção (pB1 e pB2) dos mesmos: pB1-pB1, pB2-pB2 e pB1-pB2.

Não foi detectada nenhuma atividade dos promotores da invenção 15 em células de mamíferos. Então, a presente invenção também provê dois promotores seguros para o desenvolvimento de baculovirus recombinantes.

Portanto, a presente invenção elucidada (ver a descrição 20 detalhada da invenção) o fato de que as sequências regulatórias polinucleotídicas (promotores), mais eficazes do que aqueles compreendidos no estado da arte, podem ser derivadas de qualquer sequência polinucleotídica localizada a montante dos quadros abertos de leitura dos genes que 25 codificam as proteínas da família de hexamerina. Portanto, qualquer sequência regulatória polinucleotídica derivada de qualquer sequência polinucleotídica localizada a montante dos quadros abertos de leitura dos genes que codificam as proteínas da família da hexamerina podem estar incluídas no 30 objetivo da presente invenção.

Somente para o propósito da presente invenção, os seguintes termos são definidos como:

- 5 ▪ Sequência regulatória polinucleotídica: é uma região de DNA, geralmente localizada a montante (em direção à região 5' da fita sense) de um gene, que permite a transcrição do gene.
- 10 ▪ Vetor de expressão: veículo usado para transferir material genético exógeno para dentro de uma célula. Este vetor contém as sequências regulatórias necessárias para dirigir a transcrição e tradução de um gene ou genes clonado(s) e, assim, transcrever e clonar o DNA. Vetores de expressão de baculovirus foram preferencialmente usados na presente invenção.
- 15 ▪ Baculovirus: é uma família de vírus infecciosos para invertebrados, principalmente infectantes de insetos e de artrópodes.
- 20 ▪ DNA recombinante: é uma forma de DNA artificial que é engenheirado através da combinação ou inserção de uma ou mais fitas de DNA, combinando, por esse meio, DNA que normalmente não ocorreria junto. O DNA recombinante é produzido através da adição de DNA relevante ao genoma de um organismo existente.
- 25 ▪ Proteínas recombinantes: proteína codificada por um DNA recombinante.
- Expressão prematura: este termo se refere ao momento no qual os promotores começam a expressar as proteínas de interesse. Na presente invenção, este momento começa a 16 horas pós-infecção.

- 5 ▪ Expressão mais forte: este termo se refere à expressão de qualquer proteína de interesse em níveis iguais ou superiores quando comparados aos níveis de expressão encontrados por meio dos promotores de baculovirus convencionais p10 ou pL.
- 10 ▪ Proteína de interesse: proteínas que podem ser usadas para o benefício de humanos e animais e que podem ter aplicação industrial, comercial ou terapêutica.
- 15 ▪ Biofábrica: células ou organismos geneticamente modificados ou não que podem produzir proteínas em uma razão de escala industrial com inúmeras aplicações incluindo propósitos terapêuticos (inibidores, enzimas, anticorpos, antígenos, etc.) ou produtos primários ou secundários de interesse comercial.
- 20 ▪ Fragmento parcial: esta expressão se refere a qualquer fragmento parcial derivado das sequências regulatórias polinucleotídicas da invenção tendo as mesmas propriedades melhoradas: prematuro e mais forte quando comparado com aqueles compreendidos no estado da técnica.

Descrição das Figuras

Figura 1: mostra a ausência de uma banda de 80 kDa, a qual será abaixo identificada como hexamerinas, nos primeiros quatro estágios de evolução das larvas *Trichoplusia ni* (A) e sua presença após dois dias no quinto instar larval (B). O painel C mostra a quantificação de densimetria desta banda durante os 6 primeiros dias do quinto instar larval.

Figura 2: esquema de identificação por análise de espectrometria de massa da banda de 80 kDa.

Figura 3: vetores de expressão gerados, portando as sequências de promotor pB1 ou pB2 sozinhos ou pB2 em conjunção com a sequência pL (pLpB2).

Figura 4: células de inseto sf21 e larvas de inseto expressando a proteína fluorescente verde (GFP) sob o controle de diferentes promotores (pB1, pB2, pL e pLpB2) após infecção com baculovirus recombinante em diferentes momentos. Na figura estão retratadas larvas após 72 horas de infecção.

Figura 5: expressão de GFP pelo uso de diferentes promotores inseridos em vetores de baculovirus (pB1, pB2, pL e pLpB2) em diferentes momentos de pós-infecção (16-72 horas) e detectada por Western blot (A). A proteína recombinante foi quantificada por densitometria das bandas de GFP (B) ou por fluorometria de extratos de células (C).

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê sequências regulatórias polinucleotídicas, tais como os promotores pB1 e pB2 caracterizados, respectivamente, pela SEQ ID NO: 1 e a SEQ ID NO: 2, e derivados de sequências polinucleotídicas localizadas a montante dos quadros abertos de leitura dos genes que codificam as proteínas da família de hexamerina em larvas de inseto. A presente invenção ainda se refere ao uso de sequências de um polinucleotídeo de regulação para construir vetores de expressão de insetos tal como Baculovirus e para expressar proteínas heterólogas em células, preferencialmente células de inseto. As sequências dos promotores pB1 e pB2 são

oriundos das hexamerinas de *T.ni* BJHSP1 e BJHSP2 respectivamente, as quais são expressadas em nível elevado durante o quinto instar e com atividade de transcrição muito alta durante as primeiras 48 horas deste período (Figura 1).

5

A sequência pB1 é compreendida por 1057 nucleotídeos (SEQ ID NO 1) e derivada da região 5' a montante do códon de iniciação do gene codificante da proteína BJHSP1 a qual é a proteína Básica 1 reprimível pelo hormônio juvenil. A sequência foi amplificada a partir do DNA genômico de *T.ni* pelo uso de dois primers específicos: SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4. O fragmento foi depois clonado no vetor comercial pGEM-Teasy (Promega).

As sequências de pB1 e de pB2 foram extraídas de pGEM-Teasy com as enzimas *Bam*HI e *Sph*I e clonadas naqueles sítios no plasmídeo comercial dual pFastBac (INVITROGEN). Este vetor dual pFastBac aberto com as mencionadas enzimas possui as sequências do promotor de baculovirus eliminadas (os vetores obtidos foram denominados de: pFBpB1 e pFBpB2). Todos eles apresentam um sítio de clonagem para introduzir o cDNA de interesse. Estes foram usados para gerar os baculovirus recombinantes que são capazes de infectar e replicar em células de inseto e larvas de inseto. Adicionalmente, a sequência pB2 foi extraída por digestão com as enzimas de restrição *Not*I e *Pst*I (ambas sítios de restrição oriundos do vetor pGemT easy) e clonada nos mesmos sítios de restrição no vetor comercial pFastBac1 (INVITROGEN), depois a sequência de promotor pL. O vetor obtido foi denominado de: pFBpLpB2.

Portanto, a primeira concretização da presente invenção se refere a um método para desenvolver sequências de polinucleotídeo regulatórias de expressão: SEQ ID NO: 1 (pB1) and SEQ ID NO: 2 (pB2). Ditos métodos compreendem o isolamento

de qualquer sequência de polinucleotídeo localizado a montante dos quadros abertos de leitura dos genes que codificam as proteínas da família de hexamerina. Depois que as sequências regulatórias polinucleotídicas foram sequenciadas, elas foram

5 amplificadas por meios convencionais.

Em uma concretização preferida da presente invenção, a sequência polinucleotídica a montante dos quadros abertos de leitura de hexamerina pertence a um inseto, preferencialmente

10 *Trichoplusia ni*.

A segunda concretização da presente invenção se refere às sequências regulatórias polinucleotídicas: SEQ ID NO: 1 (pB1), SEQ ID NO: 2 (pB2), ou qualquer fragmento parcial das mesmas,

15 caracterizadas por compreender qualquer sequência derivada de qualquer região nucleotídica regulatória localizada a montante dos quadros abertos de leitura dos genes que codificam as proteínas da família de hexamerina. Essas sequências de promotor apresentam motivos de DNA regulatórios envolvidos na

20 modulação da atividade de transcrição. Portanto, essas sequências podem ser reguladas por hormônios durante o desenvolvimento de larva, por outros sinais e também potencialmente em culturas de célula no contexto de vetores de expressão.

Em uma concretização preferida, as sequências regulatórias polinucleotídicas da invenção: SEQ ID NO: 1 (pB1) e SEQ ID NO: 2 (pB2) estão combinadas com outras sequências regulatórias polinucleotídicas, preferivelmente o promotor pL (promotor da

30 proteína poliedrina) ou p10 (promotor da proteína p10) dando origem a diferentes combinações: pLpB2, pLpB1, p10pB2 e p10pB1. A invenção provê uma sequência de promotor muito forte

quando a sequência pL (promotor de poliedrina) é combinado com a sequência de pB2.

5 Em outra concretização preferida, as sequências regulatórias polinucleotídicas da invenção: SEQ ID NO: 1 (pB1) e SEQ ID NO: 2 (pB2) são combinadas entre si dando origem a diferentes combinações: pB1pB2, pB1pB1 (repetida pelo menos duas vezes) e pB2pB2 (repetida pelo menos duas vezes). Tem sido demonstrado que promotores localizados sequencialmente aumentam a
10 eficiência de expressão de proteína recombinante em bactérias e plantas (Il'ichev AA et al., Genetika. 1987 23:197-201; Kay R et al., Science. 1987 Jun 5;236(4806):1299-1302).

A terceira concretização da presente invenção se refere ao uso
15 de qualquer uma das sequências regulatórias polinucleotídicas acima mencionadas para construir vetores de expressão, preferivelmente um baculovirus ou um plasmídeo.

A quarta concretização da invenção se refere a vetores de
20 expressão caracterizados pelo fato de compreender qualquer uma das sequências regulatórias polinucleotídicas acima explicadas e pelo menos uma sequência codificante de uma proteína de interesse. Em uma concretização preferida, o vetor é um baculovirus ou um plasmídeo.

25 A quinta concretização da presente invenção se refere a células transformadas, transfectadas pelo vetor de expressão ou infectadas com um vírus recombinante usado como um vetor como descrito no parágrafo anterior. Em uma concretização
30 preferida, as células são células de inseto preferivelmente sf9 ou sf21 de *Spodoptera frugiperda*.

A sexta concretização da presente invenção se refere a larvas de inseto transformadas, transfectadas ou infectadas com os acima mencionados vetores de expressão.

- 5 A sétima concretização da presente invenção se refere a um método para produzir proteínas recombinantes em células de inseto ou larvas de inseto com os acima mencionados vetores de expressão e a extração e purificação da proteína recombinante de interesse por meios convencionais.

10 A oitava concretização da presente invenção se refere ao uso de dito vetor de expressão para produzir proteínas recombinantes.

- 15 A nona concretização da presente invenção se refere ao uso de ditas células para produzir proteínas recombinantes.

A última concretização da presente invenção se refere ao uso de ditas larvas de inseto como uma biofábrica para produzir
20 proteínas recombinantes.

Depósito de Microrganismos de acordo com o Tratado de Budapeste

Plasmídeos foram depositados junto à Coleção de Tipo de
25 Cultura da Espanha (Spanish Type Culture Collection (CECT);
Universidade de Valência, Espanha, tendo número de acesso CECT
7431, na data de 2 de julho de 2008.

EXEMPLOS

30 Esta invenção é mais bem ilustrada pelos exemplos a seguir, os quais não devem ser interpretados como sendo uma limitação imposta ao escopo da mesma. Ao contrário, é preciso que fique

claramente entendido que outras concretizações, modificações e equivalentes da mesma podem ser usados, os quais podem estar sugeridos nesta descrição para uma pessoa versada na técnica sem se afastar do espírito desta invenção e/ou do escopo das reivindicações anexas.

Os exemplos da presente invenção mostram a expressão de proteína que acontece em um momento prematuro de pós-infecção quando comparada com aquela em que promotores convencionais foram usados. Além disso, no caso das sequências de promotor pB2 e pLpB2, os níveis de expressão foram mais altos quando comparados àqueles encontrados no estado da técnica (promotor pL) em ambos os momentos de pós-infecção, prematura e tardia.

Exemplo 1: a proteína de fluorescência verde (GFP) é expressada pelos promotores de inseto da invenção

Clonagem da GFP

A GFP extraída a partir do plasmídeo pFBpLGFP por meio da enzima de restrição *SphI* foi clonada no sítio de restrição *SphI* dos plasmídeos pFBpB1 ou pFBpB2. Os plasmídeos doadores-de-expressão obtidos foram denominados pFBpB1GFP e pFBpB2GFP, respectivamente. Em todos os casos a sequência pL foi eliminada, de modo que a expressão de GFP foi somente devida somente à atividade dos promotores dos diferentes insetos por si (Figura 3).

Por outro lado, o promotor pB2 flanqueado pelos sítios de restrição *NotI* e *PstI* foi ligado ao pFBpLGFP também aberto pelas mesmas enzimas de restrição. Os plasmídeos doadores-de-expressão obtidos foram denominados pFBpLpB2GFP e continham o

gene codificante de GFP sob o controle do promotor duplo pL e pB2 (Figura 3).

Construção dos Vetores de Expressão GFP-Baculovirus

5

Os plasmídeos resultantes foram caracterizados por sequenciamento automatizado e usado para gerar os baculovirus recombinantes *BacpB2GFP*, *BacpB1GFP* e *BacpLpB2GFP* usando o sistema de expressão de Baculovirus Bac-to-Bac® (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, os plasmídeos doadores-de-expressão resultantes foram usados para transferir células de DH10Bac™ *E. coli* para a transposição no bacmídeo recombinante. Um µg de cada bacmídeo foi usado para transfectar 1×10^6 células sf21 de *Spodoptera frugiperda* usando o Reagente Cellfectin®. O estoque viral P1 foi obtido após 72 horas de incubação a 27°C. O baculovirus foi amplificado seguindo as instruções do fabricante. As células de inseto sf21 foram deixadas a crescer em Meio de Inseto BD BaculoGold™ TNM-FH (BD Biosciences) suplementado com 50 mg/mL de gentamicina. O baculovirus *BacpLGFP*, previamente gerado em nosso laboratório, foi obtido seguindo idêntico protocolo pelo uso do plasmídeo pFBpLGFP.

10

15

20

Inoculação em Célula de Inseto

25

Células foram depois infectadas a uma multiplicidade de infecção de 0,1 pfu e as células foram agregadas em pellets a 16h, 24h, 48h ou 72h pós-infecção por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos.

30

As células infectadas foram também fotografadas em diferentes momentos de pós-infecção em um microscópio de fluorescência e as fotografias são mostradas na Figura 4. É digna de nota a

atividade prematura (começando a 16 horas pós-infecção) das sequências de promotor pB2 e pLpB2 e também a força de ambas quando comparadas com o promotor pL, mesmo nos estágios tardios de infecção (48h e 72h pós-infecção). O promotor pB1 apresenta também atividade, apesar de não ser tão forte quanto a dos promotores pB2 ou pL.

Condições de Crescimento de Inseto e Inoculação

Larvas de *Trichoplusia ni* de quinto-instar foram injetadas com os baculovirus recombinants próximo à falsa pata de lagarta (na frente da cavidade corpórea) usando 10^4 - 10^5 pfu/dose de larva. As larvas infectadas foram mantidas em câmaras de crescimento a 28°C e coletadas a 72h. O painel inferior da Figura 4 mostra que os promotores pB1 (baixa), pB2 e a combinação de pL e pB2 apresentam atividade em larvas de inseto pela expressão da proteína GFP em tecidos de larvas.

Preparação dos Extratos de Proteína

Células em forma de pellets oriundas de uma placa de poços P6 (2×10^6 células/poço) foram infectadas a 0,1 pfu/poço) foram ressuspensas em 30 µl de NaCl 150 mM, NP-40 a 1%, SDS a 0,1 %, Tris 50 mM pH 8, inibidores de protease (complete®, Roche), 2-mercaptoetanol (tampão RIPA), mantidas em gelo por 30 minutos e clarificadas por centrifugação a 2000 **g** por 5 minutos a 4°C para remover restos celulares.

Análise dos Extratos de Proteína

40 µg de proteínas solúveis totais (TSP) foram separados sobre géis de poliacrilamida e SDS a 12% (p/v). As proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad) ou

transferidas para a superfície de membranas de nitrocelulose (Hybond C, GE Healthcare), bloqueadas durante a noite em PBS com Tween 20 a 0,1% (v/v) (PBS-T) e leite desnatado a 4% (PBS-TM), e incubadas por 1 h com anticorpo primário GFP (Chemicon) diluído a 1:1000 e anticorpo primário Actine (Sigma) diluído a 1:500 em PBS-TM. Após 2 lavagens de 10 minutos em PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 h com uma diluição a 1:2000 de conjugado peroxidase-anti-mouse IgG ou anti-rabbit IgG (GE Healthcare) diluído em PBS-TM. Após lavagem, foi detectado o sinal específico usando o sistema ECL Avançado (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

A análise realizada por Western blot produziu os resultados mostrados na Figura 5. Mais uma vez ficou demonstrado que os promotores pB2 e pLpB2 apresentaram uma atividade prematura e mais forte quando comparada à do promotor pL (Figura 5). A densitometria das bandas específicas de GFP foi medida pelo uso do programa TINA 2.0 e usando a banda de actina para normalizar os resultados.

Ensaaios de Fluorometria

A emissão de 40 µg de TSP foi medida a 535 nm após ter sido excitada a 485 nm usando um fluorímetro GENIOS. Cada valor foi tomado por medição de cada extrato por três vezes. Os resultados estão mostrados na Figura 5C. Mais uma vez, um efeito sinérgico da sequência de pL colocada a montante de 5' do promotor pB2 foi claramente observado, com acréscimos de produção de proteína variando de 61% a 375%, dependendo do tempo de pós-infecção com relação ao promotor pL sozinho (Figura 5).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para desenvolver sequências regulatórias polinucleotídicas caracterizado pelo fato de compreender:

a. isolar e amplificar a SEQ ID NO: 2 (pB2), localizada à montante dos quadros abertos de leitura dos genes que codificam as proteínas da família de hexamerina por meios convencionais;

b. combinar a SEQ ID NO: 2 (pB2) com o promotor da proteína poliedrina (pL).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amplificação da SEQ ID NO: 2 (pB2) é executada pelo uso dos primers ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as sequências regulatórias polinucleotídicas pertencem a larvas de um inseto.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a larva de inseto é *Trichoplusia ni*.

5. Sequência regulatória polinucleotídica caracterizada pelo fato de compreender a sequência de pB2 (SEQ ID NO: 2) e a sequência do promotor da proteína poliedrina (pL).

6. Sequência regulatória polinucleotídica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de pB2 (SEQ ID NO: 2) repetida pelo menos duas vezes.

7. Uso das sequências regulatórias polinucleotídicas de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo fato de ser para a construção de vetores de expressão.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de dito vetor de expressão ser um vírus, preferivelmente um baculovirus.

9. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo
5 fato de dito vetor de expressão ser um plasmídeo.

10. Vetor de expressão caracterizado pelo fato de compreender as sequências regulatórias polinucleotídicas de acordo com as reivindicações 5 ou 6 e pelo menos uma sequência codificante de uma proteína de interesse.

10 11. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que ele é um vírus, preferencialmente um baculovirus.

12. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que ele é um plasmídeo.

15 13. Método para obtenção de células transformadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. transformar ou transfectar uma célula com o vetor de expressão de acordo com as reivindicações 10 a 12;

20 b. cultivar a célula transformada sob condições de crescimento celular.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as células são células de insetos, de preferência, sf9 ou sf21 oriundas de *Spodoptera frugiperda*.

25 15. Método para obtenção de larvas transfectadas, infectadas ou transformadas de um inseto, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. transformar, transfectar ou infectar as larvas do inseto com o vetor de expressão de acordo com as reivindicações 10 a 12;

5 b. incubar as larvas transformadas, transfectadas ou infectadas do inseto sob condições adequadas.

10 16. Método para produzir proteínas recombinantes caracterizado pelo fato de compreender a inoculação ou transfecção de células de inseto ou larvas de inseto com o vetor de expressão das reivindicações 10 a 12 e a extração e purificação da proteína recombinante de interesse por meios convencionais.

17. Uso do vetor de expressão das reivindicações 10 a 12 caracterizado pelo fato de ser na produção de proteínas recombinantes.

15 18. Uso das células obtidas pelos métodos de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de ser na produção de proteínas recombinantes.

19. Uso das larvas de inseto obtidas pelo método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser como uma biofábrica para produção de proteínas recombinantes.

FIGURA 1

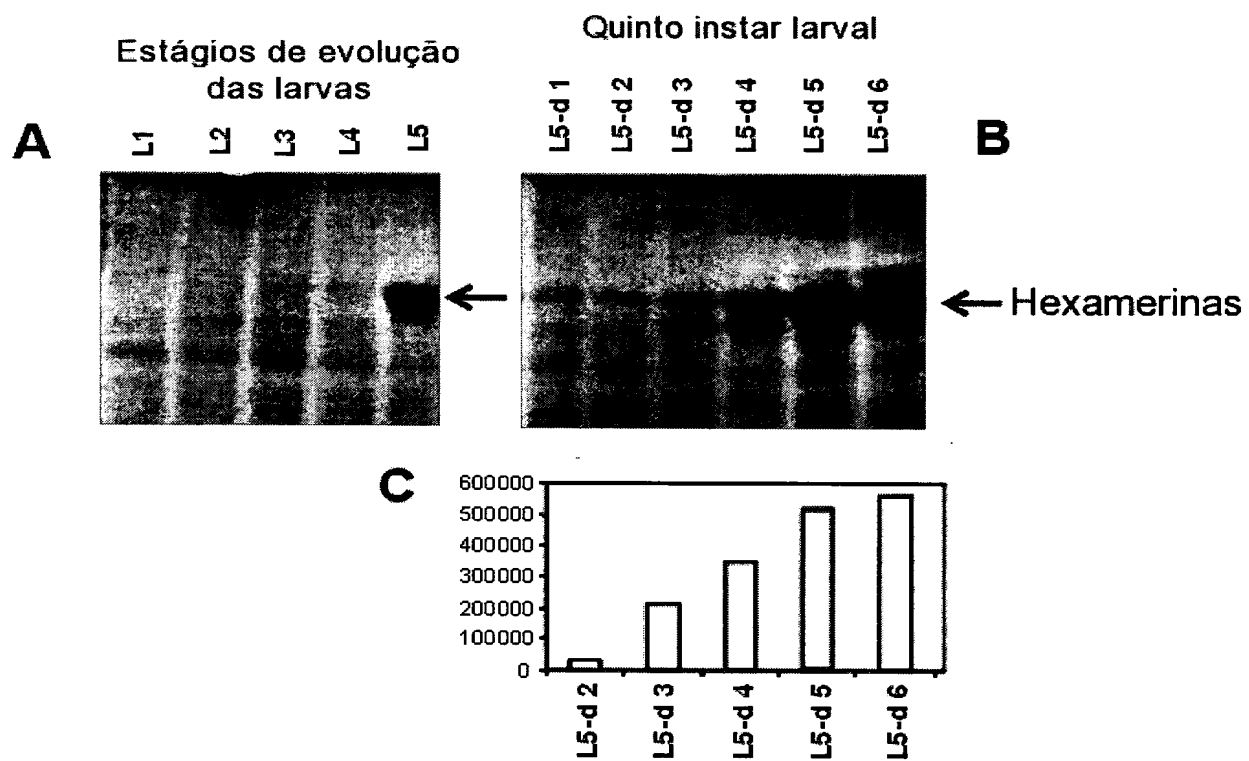


FIGURA 2

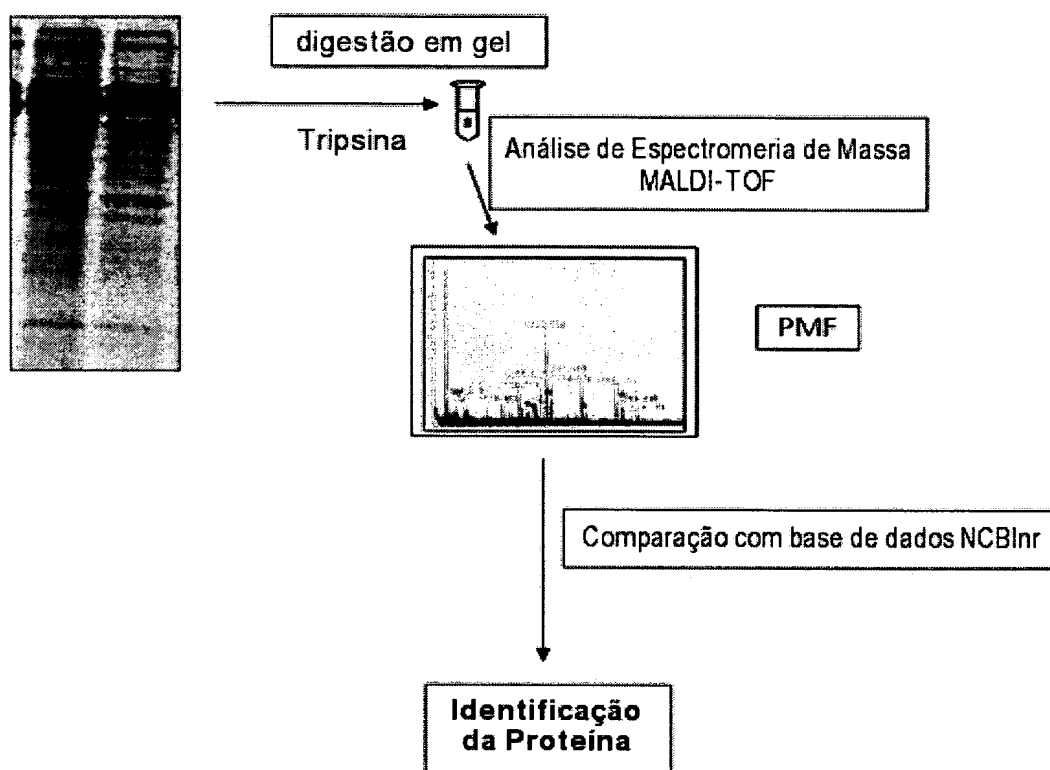


FIGURA 3

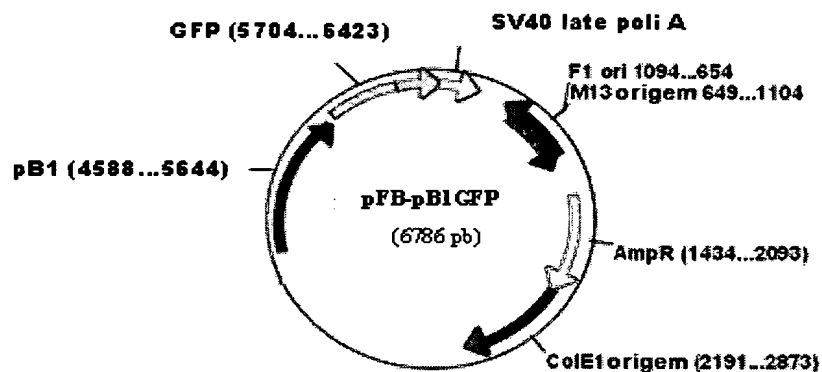
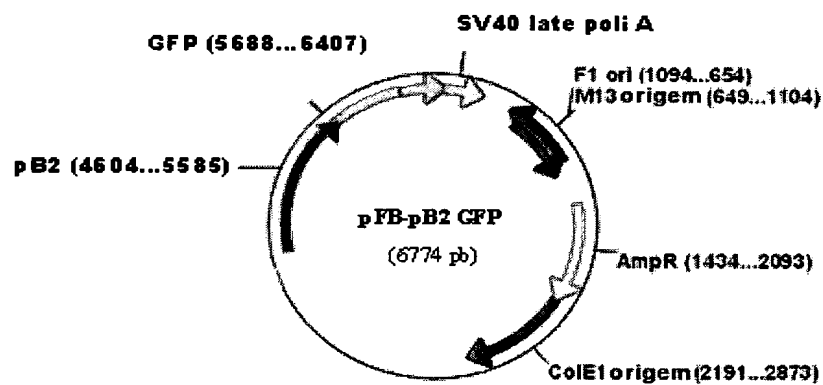
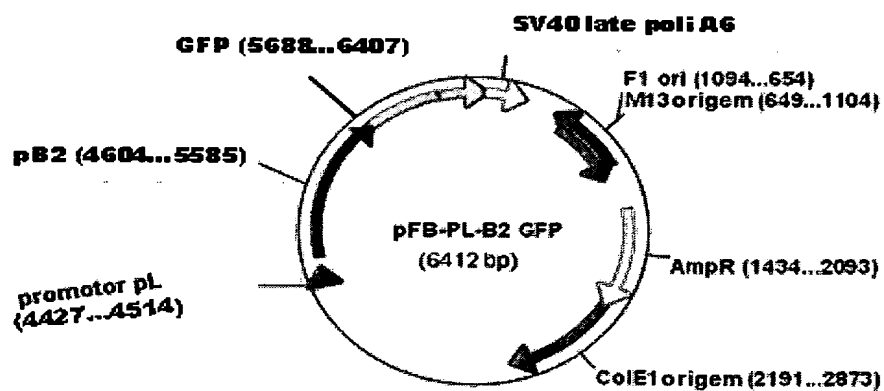
A**B****C**

FIGURA 4

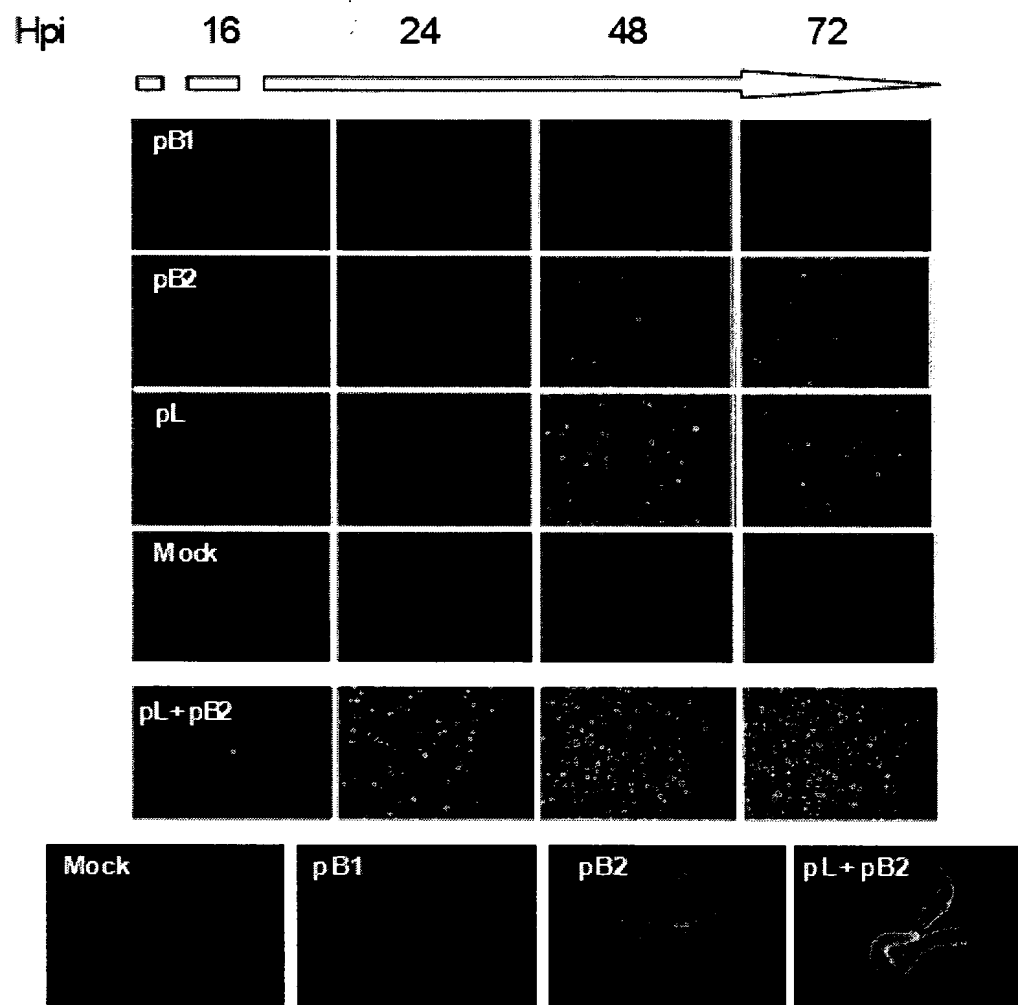
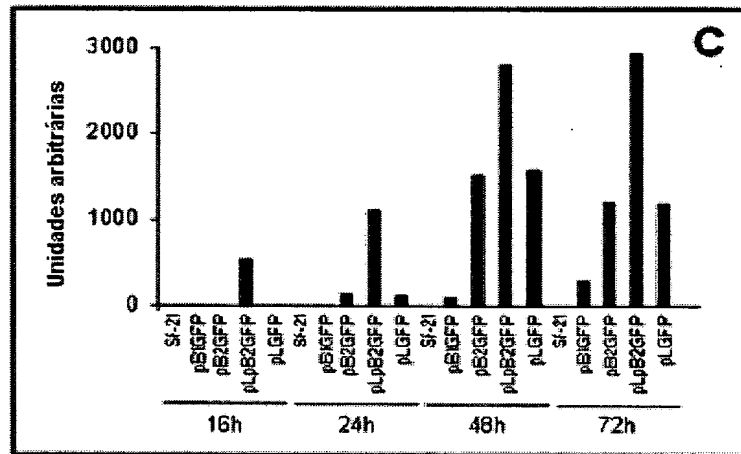
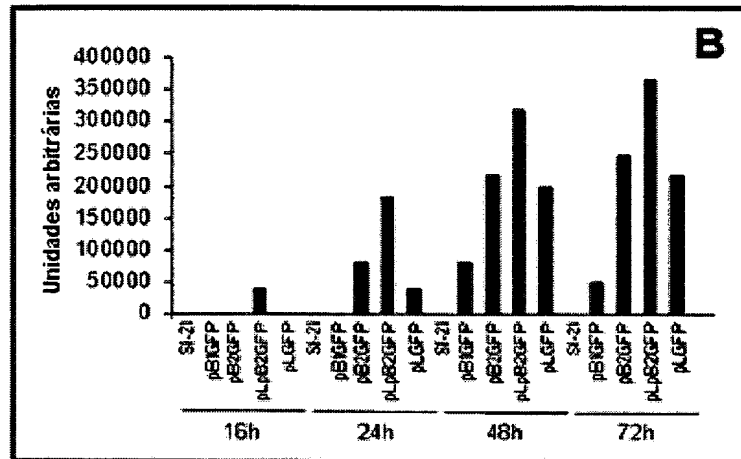
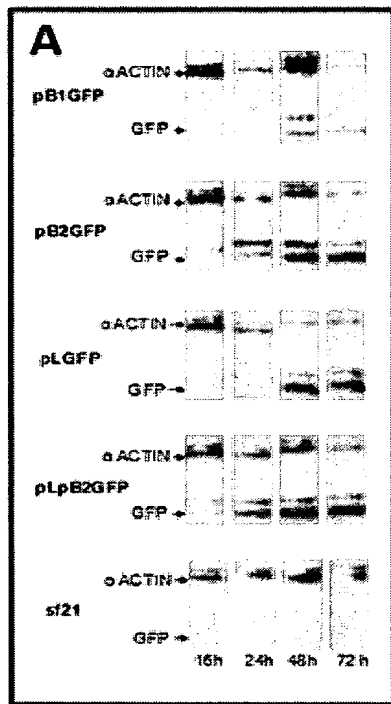


FIGURA 5



RESUMO

MÉTODO PARA DESENVOLVER SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, USO DAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS POLINUCLEOTÍDICAS, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS TRANSFORMADAS OU TRANSFECTADAS, LARVAS DE INSETO TRANSFECTADAS, MÉTODO PARA PRODUZIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES, USO DO VETOR DE EXPRESSÃO E USO DAS LARVAS DE INSETO

A presente invenção provê promotores derivados de inseto para a expressão de proteínas estrangeiras em células de inseto. Na invenção, sequências regulatórias polinucleotídicas, as quais dirigem a expressão das proteínas majoritárias de inseto (hexamerinas) em estágios específicos de evolução de larva, foram isolados a partir de insetos (*Trichoplusia ni*). Ditas sequências regulatórias polinucleotídicas promovem a expressão mais forte de gene estrangeiro no sistema baculovirus quando comparada à do promotor convencional de poliedrina.

5

Adicionalmente, a combinação dos novos promotores derivados de larva da invenção com o promotor pL aumentou os níveis de expressão em baculovirus até 61%-375% (dependendo do tempo de infecção) com relação aos baculovirus convencionais usados na indústria de biotecnologia. O promotor pB2 também dirige a

10

expressão gênica em momentos prematuros quando comparado ao promotor de poliedrina, sendo este aspecto uma grande vantagem para a proteína correta.

15