

RENATO LIMA SENRA

**OTIMIZAÇÃO MOLECULAR E METABÓLICA DE *Leishmania tarentolae* PARA
PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S478o
2022 Senra, Renato Lima, 1992-
Otimização molecular e metabólica de *Leishmania tarentolae* para produção de glicoproteínas de interesse biotecnológico / Renato Lima Senra. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (193 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 46-56.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.302>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Glicosilação. 2. Interferon-?. 3. Glicoproteínas. 4. *Leishmania tarentolae*. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.68

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

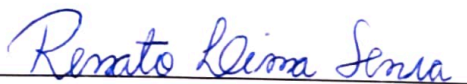
RENATO LIMA SENRA

**OTIMIZAÇÃO MOLECULAR E METABÓLICA DE *Leishmania tarentolae* PARA
PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Renato Lima Senra

Autor



Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e oportunidades concedidas, por ser meu guia, essência e força.

Aos meus pais que são tudo na minha vida, pelo amor de sempre. Ao meu pai José Renato por todo apoio, tantos sacrifícios e que sempre foi o meu modelo de ser humano, sinônimo de honestidade e integridade. À minha mãe Marli, mulher guerreira, pela dedicação, carinho, e tantos conselhos que nunca me deixaram desistir. Este trabalho leva o nome de vocês também!

Aos meus irmãos Roberto e Rayana, pelo carinho, incentivo, companheirismo e torcida de sempre.

Aos meus avós, tios, primos e toda minha família que são a minha base e raiz que me sustentaram nessa jornada.

Aos meus padrinhos Teitei e Deia e toda família, que sempre fizeram parte da minha vida, agradeço por estarem sempre presente, me apoiando e contribuindo para a construção de tudo isso.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de me graduar em um lugar de excelência, que transforma as pessoas e que tem me oferecido cada vez mais experiências enriquecedoras e um ensino de qualidade.

Ao professor e Orientador Dr. Tiago Antônio de Oliveria Mendes pela confiança em me tornar responsável de guiar este projeto. Por toda orientação, paciência, conselhos, disponibilidade e por proporcionar-me um enorme crescimento pessoal e profissional.

Às coorientadoras Prof. Dr^a. Andréa de Oliveira Barros Ribon, Prof. Dr^a Juliana Lopes Rangel Fietto e Dr^a. Jacqueline Araújo Fiuza por toda colaboração, contribuição científica, disponibilidade para tirar minhas dúvidas e agregar excelência a este trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) agradeço a todos os membros que direta ou indiretamente me ajudaram e que sempre estavam dispostos à transmitir o conhecimento. Agradeço pela estrutura que tornou possível a realização desse projeto. Um agradecimento especial ao Higor, meu amigo, pela parceria em aulas, no laboratório e na vida. Por todos os conselhos, por estar sempre presente me apoiando, incentivando, e me ajudando desde sempre. Aos alunos de graduação e iniciação científica Luana, Gabriele e Vinícius, pela paciência nas minhas tentativas de passar conhecimento e por toda contribuição. Obrigado por fazerem parte deste trabalho e o tornarem possível. À Paty, Ananda, Silvana, Thays, Fernanda, Lilian, Ramila, Igor, Larissa e Luíza, que me aturaram no desespero diário da rotina de experimentos e que estavam sempre dispostos à ajudar. Muito obrigado

pela amizade, conselhos e por tornar tudo isso muito mais leve e prazeroso. Com certeza vocês também foram meus coorientadores.

Ao Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos por toda colaboração e estrutura onde foi possível realizar os experimentos de cultivo. Agradeço a Mônica e Flávia por todo apoio e disponibilidade.

Ao Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas onde iniciei meus aprendizados em bioquímica e que até hoje posso contar com a disponibilidade e colaboração.

A todos os laboratórios da UFV e ao Instituto Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) que tive oportunidade de conhecer e trabalhar, pela receptividade, colaboração e todo conhecimento adquirido.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, obrigado pelo trabalho e disponibilidade. Em especial, ao Eduardo por todo auxílio nas questões burocráticas. Mas, principalmente pela amizade, convívio, conselhos e cafezinhos. Muito obrigado pela paciência e colaboração desde sempre.

Aos meus amigos que foram fundamentais durante todos dias proporcionando momentos inesquecíveis. Pela amizade, companheirismo, paciência, festas e risadas. Vocês são demais!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo na realização deste trabalho.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho.

A todos que ajudaram, direta ou indiretamente na realização desse trabalho, obrigado.

RESUMO

SENRA, Renato Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Otimização molecular e metabólica de *Leishmania tarentolae* para produção de glicoproteínas de interesse biotecnológico.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A produção de glicoproteínas terapêuticas possui alto custo devido a necessidade de utilização de cultura de células de mamíferos que dependem de meios de cultivo complexos e caros e possuem baixo rendimento de produção. *Leishmania tarentolae*, um protozoário tripanossomátideo não patogênico para mamíferos, tem sido sugerido como um sistema alternativo para expressão heteróloga de glicoproteínas devido a existência de métodos eficientes de expressão heteróloga, ser facilmente adaptado para produção em alta escala e depender de meios de cultura de baixo custo. Além disso, este protozoário apresenta modificações pós-traducionais ausentes em bactérias e leveduras, organismos mais utilizados para produção industrial de proteínas recombinantes. O Interferon- β , é uma proteína utilizada em tratamentos de doenças como esclerose múltipla, as suas glicosilações são extremamente relevantes para suas funções biológicas. Embora o perfil de glicosilação de proteínas expressas em *L. tarentolae* seja semelhante a mamíferos, existem algumas diferenças no perfil de carboidratos presentes nas terminações das cadeias glicídicas devido à ausência de enzimas de biossíntese e incorporação de ácido siálico. Nesta tese foi desenvolvido e otimizado uma plataforma de expressão de glicoproteínas utilizando linhagens de *L. tarentolae* geneticamente otimizadas para síntese de glicoproteínas em alta escala mais estáveis com incorporação de ácido siálico na extremidade da cadeia glicídica e sua aplicação na produção de Interferon- β humano. Além da validação da produção do Interferon- β , também foi realizado caracterização de seus glicanos e validação de sua atividade para regulação de inflamação em modelo murinho, demonstrando que esta nova linhagem geneticamente otimizada de *L. tarentolae* é adequada para produção em larga escala de glicoproteínas terapêuticas.

Palavras-chave: *Leishmania tarentolae*. Interferon- β . Proteínas terapêuticas. Glicosilação

ABSTRACT

SENRA, Renato Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Molecular and metabolic optimization of *Leishmania tarentolae* for glycoproteins production of biotechnological interest.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

The production of therapeutic glycoproteins is expensive due to the need to use mammalian cell cultures that depend on complex and expensive culture media and have low yield of production. *Leishmania tarentolae*, a non-pathogenic mammalian trypanosomatid protozoan, has been suggested as an alternative system for heterologous expression of glycoproteins due to the existence of efficient methods of heterologous expression, it is easily adapted for high-scale production and depending on low-cost culture media. In addition, this protozoan presents post-translational modifications absent in bacteria and yeasts, organisms most used for industrial production of recombinant proteins. Interferon- β is a protein used in the treatment of diseases such as multiple sclerosis, its glycosylations are extremely relevant to its biological functions. Although the glycosylation profile of proteins expressed in *L. tarentolae* is similar to mammals, there are some differences in the profile of carbohydrates present at the ends of the sugar chains due to the absence of biosynthesis enzymes and sialic acid incorporation. Here, we developed and optimized a platform using genetically optimized *L. tarentolae* strains for the synthesis of more stable high-scale glycoproteins with sialic acid incorporation at the end of the sugar chain and its application in the production of human Interferon- β . In addition to validating the production of Interferon- β , characterization of its glycans and validation of its activity for regulating inflammation in a murine model was also performed, demonstrating that this new genetically optimized strain of *L. tarentolae* is suitable for large-scale production of glycoproteins therapeutics.

Keywords: *Leishmania tarentolae*. Interferon- β . Therapeutic proteins. Glycosylation.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Produção Heteróloga de Proteínas Terapêuticas.....	9
2.2. Proteínas Glicosiladas de aplicação biotecnológica	12
2.3. Interferon- β	14
2.4. <i>Leishmania tarentolae</i> como hospedeiro de expressão	16
2.5. Ácidos Siálicos e sialização	18
2.6. Engenharia de proteínas.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. DELINEAMENTO DO TEXTO	25
5. OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO 1 -ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA NUCLEIC ACIDS RESEARCH.....	27
CAPÍTULO 2 -OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA UTILIZANDO MULTIPLAS CÓPIAS GÊNICAS DE INTERFERON-B EM <i>Leishmania tarentola</i>	52
4. CONCLUSÕES GERAIS	73
5. BIBLIOGRAFIA	75
Anexo I - Depósito de patente: <i>Leishmania tarentolae</i> otimizada, processo de produção, e uso para produção de glicoproteínas sializadas.	86
Anexo II - Depósito de patente: Processo de produção da proteína interferon-β humano em <i>Leishmania tarentolae</i> e uso.....	131
Anexo III - - Artigo de revisão publicado como co-autor na revista Process Biochemistry intitulado: “Application of the LEXSY <i>Leishmania tarentolae</i> system as a recombinant protein expression platform: A review”.	177

1. INTRODUÇÃO

Embora glicoproteínas e proteínas oligoméricas apresentem elevado potencial biotecnológico na terapêutica, indústria de alimentos e outras, sua produção em alta escala é comprometida. Devido à sua complexidade bioquímica, a melhor forma de produção é pela obtenção de proteínas recombinantes em organismos geneticamente modificados. Os sistemas mais favoráveis para cultivo em escala industrial, com alto rendimento do produto e curto período de produção, são baseados em bactérias e leveduras. Bactérias não são capazes de realizar glicosilação. Apesar de possuírem parcialmente a maquinaria necessária, leveduras produzem perfil de glicosilação diferente de eucariotos superiores e glicoproteínas que necessitem de um padrão de glicosilação específico de mamíferos produzidos neste organismo falham em atividade biológica e estabilidade. Além disso, ambos os sistemas podem produzir incorreto dobramento de proteínas que prejudiquem sua atividade. Células de mamíferos produzem proteínas com correto perfil de glicosilação e dobramento, porém ambas possuem dificuldade de cultivo em grande escala, longo tempo de cultivo necessário e baixa produtividade de proteínas. Dentro deste contexto, uma boa opção seria a utilização de *Leishmania tarentolae* para expressão heteróloga de glicoproteínas e proteínas oligoméricas. Este eucarioto é não patogênico para humanos e a manipulação genética deste organismo necessita de laboratório de segurança NB1 igual a bactérias e leveduras, é passível de cultivo em larga escala com alto rendimento de produção de proteínas. Além disso, o processo de glicosilação e formação de pontes dissulfeto em *L. tarentolae* são muito semelhantes aos processos que ocorrem em mamíferos e existe vetor comercial para manipulação genética como ocorre para bactérias e leveduras. Apesar destas vantagens, o perfil de glicosilação é semelhante, mas não idêntico ao de mamífero devido à ausência de enzimas da via de biossíntese de ácido siálico e existem poucos estudos sobre otimização de produção heteróloga de proteínas neste organismo.

Atualmente existem técnicas computacionais que guiam a otimização de produção do biocompostos de interesse, além de protocolos e vetores que possibilitam engenharia genética de *Leishmania*. O interferon- β foi selecionado como

um primeiro alvo com validada atividade terapêutica para avaliar o potencial das novas linhagens a serem utilizadas para expressão heteróloga de proteínas. Essa proteína é utilizada para o tratamento de doenças que causam impacto econômico tanto para sistemas públicos e privados de saúde devido à alta demanda e a seu alto custo de produção. Como depende de uma N-glicosilação com padrão específico de mamíferos para estabilidade e aumento da atividade da proteína, sua correta síntese utilizando uma plataforma de expressão mais otimizada proporcionaria uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos além de reduzir custos do produto. A produção com padrão correto de glicosilação diminui a quantidade de vezes que a proteína precisa ser administrada ao paciente por injeção e aumenta a estabilidade e o tempo de meia-vida desta proteína no corpo humano.

Por meio da otimização direcionada por modelos computacionais com a adição dos genes de mamíferos importantes para a biossíntese e incorporação de ácido siálico e posterior validação experimental utilizando metodologias de engenharia genética, as linhagens de *L. tarentolae* geradas poderão ser utilizadas para produzir centenas de outras glicoproteínas em larga escala com aplicações nas mais diferentes áreas industriais como farmacêutica, de alimentos, de biocombustíveis, entre outras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção Heteróloga de Proteínas Terapêuticas

A produção industrial de proteínas é uma área em expansão que atinge diversos segmentos de mercado com produtos proteicos com potencial para serem utilizados na produção de biocombustíveis mais sustentáveis, no uso na indústria alimentícia, de papel e celulose e na terapêutica, representada por diversos fármacos (Rabert et al., 2013; Walsh, 2014). Muitos dos medicamentos atuais, como anticorpos, antibióticos e hormônios são compostos por proteínas, e observa-se o uso crescente desses produtos terapêuticos no combate de diversas doenças (Vega 2016). Esse mercado tem gerado uma receita de mais de 140 bilhões de dólares

(Walsh 2006, Lalonde and Durocher 2017), com mais de 240 proteínas aprovadas para uso terapêutico nos Estados Unidos e União Europeia e 500 em fase de triagem clínica (Russel, Wang and Rathore, 2007; Walsh, 2014)(Usmani, Bedi et al. 2017).

Em alguns casos, para suprir a necessidade das indústrias a produção de proteínas era realizada primariamente por processos laboriosos, caros e de baixo rendimento pela extração do produto de sua fonte natural como tecidos humanos, animais e vegetais (Gräslund et al., 2008; Nehete et al., 2013). O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e o progresso feito na otimização de organismos para produção heteróloga de proteínas oferecem uma variedade de alternativas para produção de proteína com alto rendimento para uso em processos industriais com novas ou melhores propriedades (Gräslund et al., 2008).

Um bom organismo com potencial utilização como sistema de expressão de proteínas recombinantes deve ser eficiente e produzir a proteína de interesse em grandes quantidades, ter custo reduzido e possibilidade de cultivo em larga escala com bom rendimento de biomassa em equipamentos de escala industrial como fermentadores, facilidade e rapidez de purificação do produto final (Gerngross, 2004). Sistemas de expressão em bactérias representada principalmente por *Escherichia coli* são os mais utilizados por serem facilmente manipulados e passível de cultivo em alta escala (Gräslund et al., 2008). Porém, esse sistema falha na realização de modificações pós-traducionais como glicosilação por ausência de maquinaria apropriada. Além disso, proteínas hidrofóbicas ou com alta massa molecular são frequentemente expressas em corpúsculos de inclusão que inviabilizam o processo de purificação em condições não desnaturantes (Mus-Veteau, 2002; Palomares, Estrada-Mondaca and Ramírez, 2004; Yoon, Kim and Kim, 2010).

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são os segundos sistemas mais utilizados por também serem facilmente manipuláveis, permitir produção em escala industrial e ainda apresentarem maquinaria para diversas modificações pós-traducionais (Gerngross, 2004; Rabert et al., 2013). Devido a leveduras possuírem um padrão de glicosilação diferente de mamíferos e outros

eucariotos superiores, a maior dificuldade de utilização deste sistema são para proteínas que necessitam de um padrão específico de *N* e *O*-glicosilação para possuírem atividade biológica (Berger, Kaup and Blanchard, 2012; Gerngross, 2004). Tanto sistemas de bactérias como de levedura também podem gerar um dobramento incorreto das proteínas pela ausência de chaperonas e outros fatores determinantes que podem comprometer sua atividade (Palomares, Estrada-Mondaca and Ramírez, 2004).

Esses problemas de padrão de glicosilação e dobramento de proteínas podem ser resolvidos utilizando células de inseto ou células de mamífero. Porém, estes dois sistemas de expressão falham no escalonamento industrial, seja por dificuldade de cultivo de suspensão de célula em fermentadores ou devido ao tempo necessário para multiplicação e expressão de proteínas que contribuem para elevar os custos de produção (Dalton and Barton, 2014; Douris et al., 2006). Além disso, por mais semelhanças que células de outros mamíferos apresentam com células humanas, os humanos não possuem maquinaria de biossíntese de um glicano terminal chamado galactose-alfa-1,3-galactose (alfa-Gal) e do principal ácido siálico de mamíferos, N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Estas diferenças no padrão de glicosilação podem causar efeitos imunogênicos quando proteínas são produzidas por sistemas baseados em células de mamíferos não humanas (Ghaderi, Zhang et al. 2012).

Cada método ou sistema de expressão apresenta características, vantagens e limitações diferentes e na escolha de qual utilizar deve-se levar em consideração a natureza da proteína que se deseja expressar e a qualidade que se espera obter da molécula produzida. Um bom organismo com potencial utilização como sistema de expressão de proteínas recombinantes deve ser eficiente e produzir a proteína de interesse em grandes quantidades, ter custo reduzido e possibilidade de cultivo em grandes quantidades em equipamentos de escala industrial como fermentadores, além de permitir facilidade e rapidez de purificação do produto final (Gerngross, 2004).

2.2. Proteínas Glicosiladas de aplicação biotecnológica

Mais de um terço dos produtos proteicos terapêuticos são glicoproteínas (Albrecht, 2014) e estima-se que a taxa de crescimento anual deste mercado seja de 26% (Gerngross, 2004; Mistry, Wraight and Cox, 1996; Walsh, 2006, 2014). Glicosilação é a mais prevalente e a mais estruturalmente diversa modificação pós-traducional encontrada em proteínas, presente em aproximadamente metade das proteínas de eucariotos. A ocorrência de glicosilação em proteínas é crítica para vários processos biológicos incluindo adesão celular, interação proteína-proteína e funções importantes em receptores e transdução de sinais (Dwek, 1998; Dwek et al., 2002; Albrecht, 2014).

Glicosilação também é considerada uma das mais complexas modificações pós-traducionais porque envolve um grande número de reações enzimáticas altamente ordenadas (Spiro, 2002; Wieland, 1988). De acordo com o átomo dos resíduos de aminoácidos ao qual os glicídios são ligados, pode-se classificar o processo de adição de carboidratos a proteínas em *O*-glicosilação e *N*-glicosilação. Em *O*-glicosilação, monossacarídeos são ligados a hidroxilas preferencialmente dos aminoácidos serina e treonina e o processo pode ocorrer em diferentes compartimentos da célula como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, citosol e núcleo (Zauner et al., 2012). A *N*-glicosilação é extensivamente mais frequente que *O*-glicosilação (Gerngross, 2004). Nesse tipo de glicosilação, os carboidratos são ligados a grupos aminos dos resíduos de asparagina com processo inicialmente ocorrendo no retículo endoplasmático e finalizando no complexo de Golgi (Figura 1) (Kukuruzinska and Lennon, 1998).

Do ponto de vista de utilização terapêutica de proteínas, glicosilação é importante tanto para atividade biológica das mesmas como para alteração das propriedades farmacocinéticas de produtos de interesse médico. Por esse motivo, muitas proteínas glicosiladas são produzidas por sistemas de expressão eucarióticos, que possuem o padrão de glicosilação semelhante ao de humano, como células imortalizadas de rim de hamster neonato (BHK-21), linhagens de células de camundongos como mieloma e hibridoma (NS0 e Sp2/0) e células de ovário de hamster chinês (CHO), que são responsáveis por cerca de 50% da

produção das proteínas terapêuticas (Yoo, Chintalacharuvu et al. 2002, Demain and Vaishnav 2009, Ghaderi, Zhang et al. 2012).

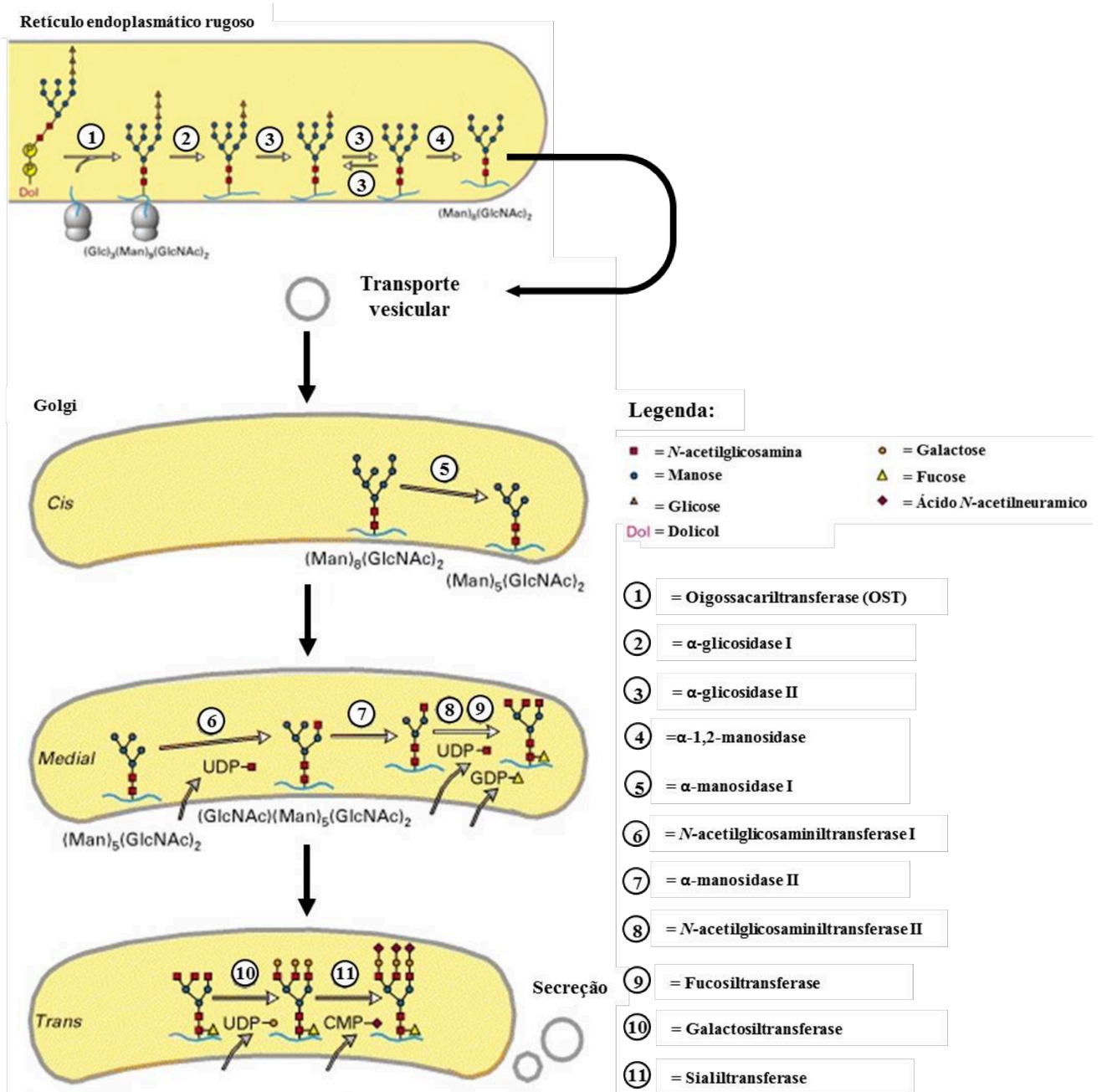


Figura 1. Biossíntese de N-glicanos: O precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ é transferido do transportador de dolicol para uma proteína recém traduzida assim que um resíduo de aminoácido de asparagina (em uma sequência consenso de Asn-X-Ser/Thr) passa para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (1). Posteriormente, reações, retiram resíduos de glicose e manose (1-5). A re-adição de um único resíduo de glicose (3) faz parte do processo de controle do ER. Após estas reações, a proteína glicosada é transportada por vesícula até o Golgi. Após a remoção de três resíduos de manose na região cis, a proteína se move para região medial e remove-se mais dois resíduos de manose (5-7), são adicionados então três resíduos de N-acetilglicosamina e um de fucose (6-9). O

processamento é completado na região trans com a adição de três resíduos de galactose (10) e por fim um resíduo de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) a cada um dos resíduos de galactose (11). Figura adaptada, fonte: Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition.

2.3. Interferon- β

Os Interferons (IFNs) são proteínas glicosiladas da família das citocinas produzidas como resposta do organismo de muitos vertebrados a diversos agentes como vírus, bactérias, parasitas e células oncogênicas. Das três principais classes de interferon, o Interferon- β (IFN- β) se inclui na do tipo I e é conhecido por exercer diversas funções como antiviral, antisséptica, antioncogênica, antiproliferativa e imunomoduladora (Dissing-Olesen, Thaysen-Andersen et al. 2008).

O uso terapêutico dessa proteína inclui a forma glicosilada ou IFN- β 1a (Rebif® ou Avonex®) produzida por células de ovário de hamster chinês (CHO) e a forma não glicosilada IFN- β 1b (Bferon®) produzida por bactérias (Gerngross 2004, Han, Koo et al. 2009). Ambas as formas variantes do interferon- β recombinante humano ((hr)IFN- β) são aprovadas e utilizadas para tratamento de doenças neurodegenerativas inflamatórias e auto imunes como esclerose múltipla (Goldenberg, 2012) e artrite reumatoide (Holten, van, Plater-Zyberk and Tak, 2002). Entretanto, a forma não glicosilada demanda uma quantidade muito maior de proteína, quando comparada com a forma glicosilada para alcançar o mesmo efeito e eficácia (Bertolotto et al., 2001). Observou-se uma redução significativa de 10 vezes na resposta de IFN- β glicosilado nativo quando submetido a diferentes glicosidases (Dissing-Olesen, Thaysen-Andersen et al. 2008, Han, Koo et al. 2009). Estudos comprovam que frações de IFN- β sem a sialização na extremidade da glicosilação tem sua atividade reduzida quando comparada com a sua forma inicial, sendo relacionado com esse efeito a dependência desse carboidrato na interação com os receptores de IFN- β (Mastrangeli, Rossi et al. 2015).

A proteína IFN- β 1 possui em torno de 18 kDa sem a glicosilação e aproximadamente 25 kDa quando glicosilada (Han, Koo et al. 2009). É composta por 166 resíduos de aminoácidos na sua forma madura e contém um único sítio de glicosilação na posição 80 em um resíduo de asparagina (Dissing-Olesen, Thaysen-Andersen et al. 2008) e uma ponte dissulfeto entre a cisteínas nas posições 31(Cys31) e 141 (Cys141) (Lennon, Cherry et al. 1983).

Quanto à melhoria de propriedades farmacocinéticas, a produção de interferon- β glicosilado proporciona o aumento da meia vida da proteína comparada com a isoforma não glicosilada devido ao aumento do volume hidrodinâmico (Figura 2) e consequente diminuição da eliminação renal (Gerngross, 2004). Além disso, foi observado um aumento na termoestabilidade quando comparadas na mesma concentração, com a forma glicosilada desnaturando em cerca de 5°C a mais que a forma não glicosilada (Runkel, Meier et al. 1998). Esse aumento da estabilidade pode melhorar o rendimento na produção e reduzir a frequência na qual a proteína deve ser injetada no paciente, reduzindo custos e efeitos adversos que são comumente observados.

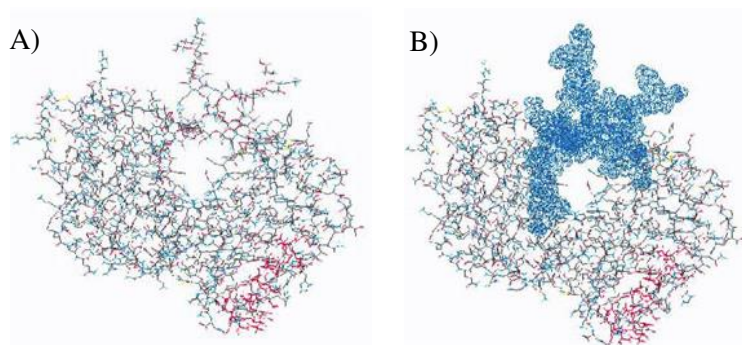


Figura 2. Estrutura do interferon- β não glicosilado (A) e glicosilado com o complexo N-glicano em evidência na cor azul (B). A ilustração demonstra o impacto que o glicano exerce na molécula aumentando seu volume hidrodinâmico (Gerngross 2004). Fonte: <http://www.dkfz.de/spec/glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>.

O IFN- β glicosilado está na lista dos principais fármacos vendidos no mundo, com uma receita de aproximadamente 3 bilhões de dólares e tendo uma taxa de crescimento de 3% em 2013 (EvaluatePharma, 2014). O produto está incluso na lista de Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF) do SUS e apresentam um custo que varia de aproximadamente R\$ 4.000,00 a R\$ 8.000,00 para compras públicas e podendo chegar a quase R\$ 10.000 para o consumidor no estado de Minas Gerais (ANVISA, 2017).

2.4. *Leishmania tarentolae* como hospedeiro de expressão

Recentemente, *Leishmania tarentolae* tem sido sugerida como um sistema para expressão heteróloga de proteínas. *L. tarentolae* é um protozoário tripanossomatídeo parasito de lagartos *Tarentola mauritanica* do mesmo gênero de espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose em mamíferos incluindo humanos. O genoma de *L. tarentolae* foi sequenciado (Raymond et al., 2012) e, por ser eucarioto, este organismo possui maquinaria para diversas modificações de proteínas realizadas após o processo de tradução, inclusive com padrões de modificações pós-traducionais mais similares aos de células de mamíferos se comparado com leveduras (Breitling et al., 2002; Raymond et al., 2012). Organismos do gênero *Leishmania* são conhecidos por possuírem muitas glicoproteínas, que podem ser encontradas em mais de 10% do total das proteínas codificadas no seu genoma (Ferguson 1997, Basile and Peticca 2009). Essa característica se deve provavelmente ao estilo de vida parasitário dos tripanossomatídeos, já que a maioria dos representantes dessa família parasitam mamíferos e apresentam padrão de glicoproteínas semelhantes (Breitling, Klingner et al. 2002).

L. tarentolae também exibe rápida multiplicação celular em cultura, os meios de cultura não exigem suplementações complexas como exigidas por células de mamífero e de insetos, seu cultivo pode ser facilmente escalonado para fermentadores industriais com volumes de 100 litros, com densidade de $0,65-1 \times 10^9$ células/mL (Meehan, Lundberg et al. 2000) e esta espécie apresenta um tempo de duplicação celular de 6-8 horas (Simpson, Frech and Maslov, 1996). Diferente das espécie causadoras de leishmaniose, *L. tarentolae* é não patogênica para mamíferos (Raymond et al., 2012) e exige estrutura laboratorial para cultivo com nível de segurança igualmente aplicado para bactérias e leveduras não patogênicas que são usuais sistemas de expressão heteróloga (Basile and Peticca, 2009; Breton et al., 2005).

O sistema LEXSY (Leishmania Expression System), comercializado pela empresa Jena® e desenvolvido por Breitling em 2002, disponibiliza vetores de expressão para *L. tarentolae* e possui modelos constitutíveis e induzíveis para expressão intracelular ou secretada (Figura 3). A expressão de forma constitutiva

acontece por meio da integração do gene de interesse ao *locus* da subunidade 18S do DNA ribossômico (ssu) e é controlada pela RNA polimerase I endógena (JenaBioscience, 2013).

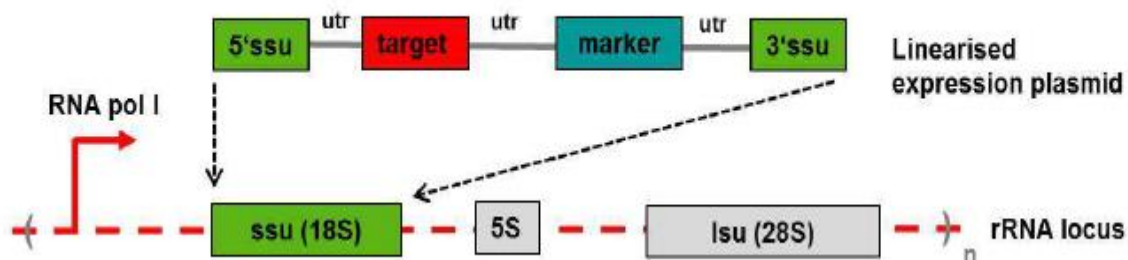


Figura 3. Arquitetura do sistema LEXSY constitutivo. Os genes de interesse são inseridos ao sítio alvo do genoma. Após a linearização com enzima de restrição, o plasmídeo é introduzido no hospedeiro de expressão (Cepa P10) por eletroporação e é integrado por recombinação homóloga em uma das cópias dos genes 18S rRNA (ssu). Para seleção de clones, ainda é disponibilizado marcadores alternativos de resistência aos antibióticos. Fonte: Manual LEXSYcon2 Expression Kit - Jena Bioscience, 2015).

A principal vantagem de expressão heteróloga de proteínas em *L. tarentolae* é sua capacidade para gerar dobramento e modificações pós-traducionais de proteína como formação de pontes de dissulfeto e glicosilação semelhante a mamíferos (Figura 4) (Basile and Peticca, 2009; Hemayatkar et al., 2010; Raymond et al., 2012). Entre proteínas que já foram expressas neste sistema e necessitam de modificações pós-traducionais para serem ativas estão eritropoietina (Breitling et al., 2002), proteína ativadora de plasminogênio tecidual (Hemayatkar et al., 2010) e fator VII da coagulação (Mirzaahmadi et al., 2011). Embora o perfil de glicosilação de proteínas expressas em *L. tarentolae* seja semelhante ao processo que ocorre em mamíferos, existem algumas diferenças no perfil de carboidratos presentes nas terminações das cadeias glicídicas devido à ausência de enzimas de biossíntese e incorporação de ácido siálico nos tripanossomatídeos (Ghoshal and Mandal, 2011; Ghoshal et al., 2010). Espera-se que significantes avanços no desenvolvimento de novas linhagens e vetores, melhoria de técnicas de manipulação genética, melhor entendimento da biologia de espécies de *Leishmania* contribuam para expansão das

vantagens do uso deste sistema para expressão heteróloga em escala industrial (Basile and Peticca, 2009).

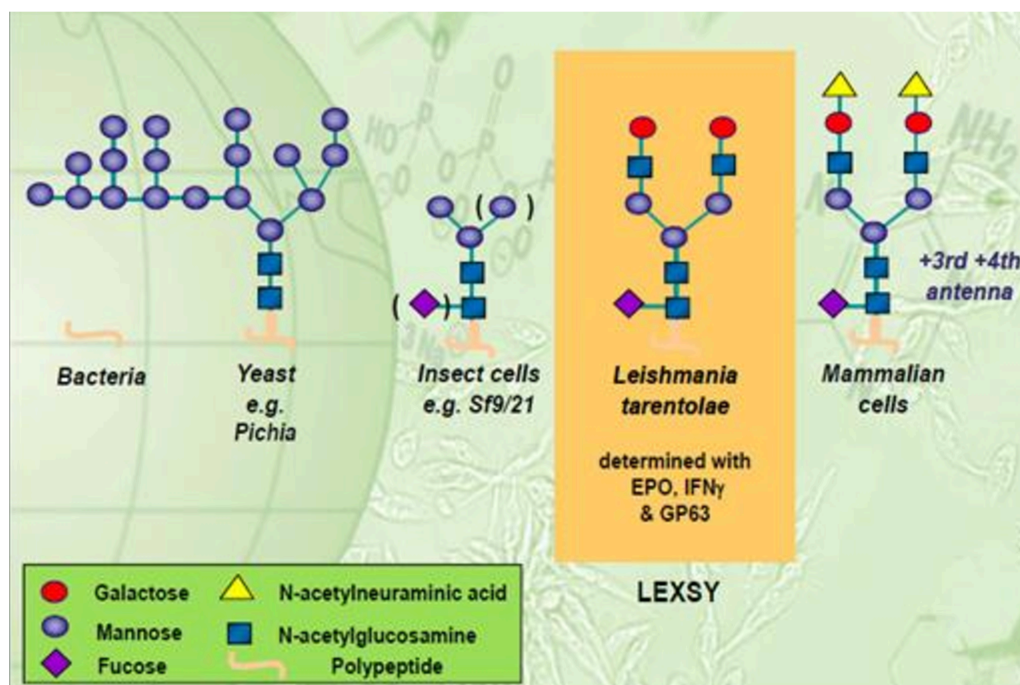


Figura 4. Comparação do padrão de *N*-glicosilação nos diferentes sistemas de expressão de proteína recombinante. Em evidência no quadro alaranjado o perfil de glicosilação encontrado em *L. tarentolae*, semelhante ao de células de mamíferos com exceção da adição do ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) na extremidade da cadeia glicídica. (Fonte: Manual LEXSYcon2 Expression Kit - Jena Bioscience, 2015).

2.5. Ácidos Siálicos e sialização

Os ácidos siálicos são monossacarídeos normalmente encontrados nas extremidades das cadeias glicídicas de *N*-glicanos, *O*-glicanos e glicoesfingolipídeos. Atualmente são descritos mais de 50 membros na família de ácidos siálicos, dentre eles, os mais conhecidos e mais abundantes em mamíferos são o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e o ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (Varki, et al, 2017). Sendo o Neu5Gc mais deficiente em humanos devido a ausência do gene *CMAH* que codifica a hidroxilase responsável por converter CMP-Neu5Ac a CMP-Neu5Gc. Entretanto, Neu5Gc é metabolicamente encontrado e incorporado nos tecidos humanos pela dieta (principalmente por ingestão de carne vermelha), e pode ser detectado em altos níveis em alguns tipos de câncer (Samraj, et al, 2014).

A diversidade de ácidos siálicos se apresenta em dois níveis: o primeiro em relação a ligação α (entre o carbono 2 e cadeia de glicanos) e o segundo nas modificações naturais variando grau de substituição e oxidação no esqueleto carbônico. Eles são sintetizados no núcleo a partir de um carboidrato precursor, o *N*-acetil-D-manosamina 6-fosfato, na presença fosfoenolpiruvato. A ação da enzima ácido siálico sintetase então converte essa molécula em uma base de Schiff e posteriormente, o ácido *N*-acetilneuramínico 9-fosfato. Após a ação de uma fosfatase, o produto será o ácido siálico livre, que é direcionado para o núcleo da célula. Nessa organela acontece a ativação pela hidrólise de uma molécula de citidina trifosfato (CTP), formando o produto CMP-Neu5Ac (Figura 5). Esse ácido siálico ativado é enviado através de uma proteína transportadora para o complexo de Golgi, onde atuará na extensão das cadeias de oligossarídeos das proteínas, por ação de sialiltransferases. As glicoproteínas sializadas agora são enviadas para membrana plasmática onde poderão ser incorporadas ou secretadas. O ácido siálico presente nas glicoproteínas pode participar diretamente de diversas funções biológicas, como mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras. (Fatima, et al, 2005).

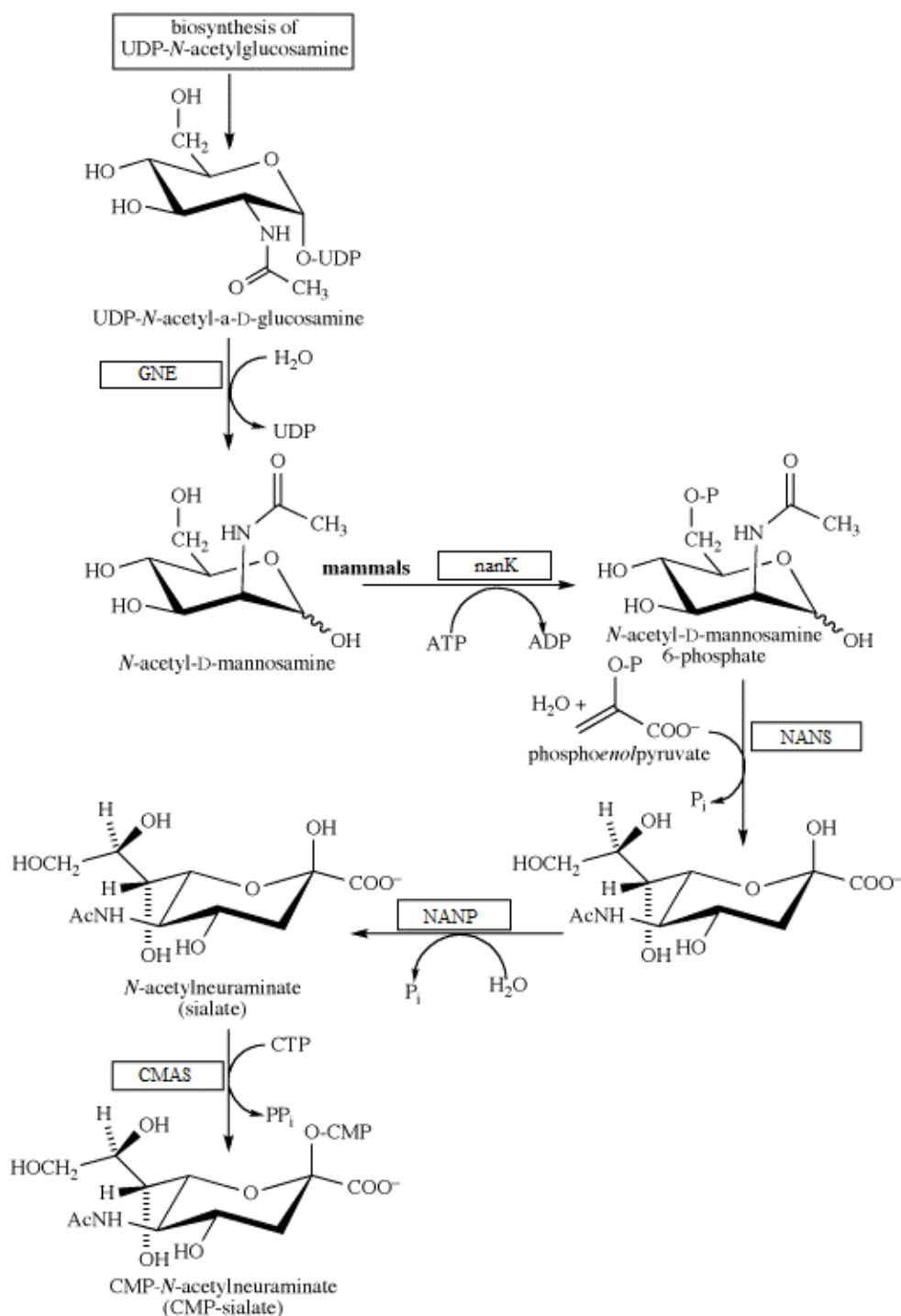


Figura 5. Via de biossíntese de ácido siálico. (GNE=UDP-*N*-acetilglicosamina 2-epimerase/*N*-acetilmanosamina quinase; nanK=*N*-acetilmanosamina quinase; NANS=*N*-acetilneuraminato sintase; NANP=*N*-acetilneuraminato-9-fosfatase; CMAS=*N*-acetilneuraminato citidiltransferase)

(Fonte: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/reaction/polysacc/sialic.html>. Acesso em 15/06/2020)

2.6. Engenharia de proteínas

Nas últimas décadas houve expansão de métodos que possibilitam modificar as propriedades das proteínas, permitindo acúmulo de conhecimento sobre mecanismo funcional e relação estrutura-atividade destas macromoléculas (Baker, 2011). Esses métodos também podem ser aplicados para modificar proteínas de forma a obter novas ou melhoradas capacidades, em que o planejamento racional de modificação de proteínas é denominado engenharia de proteínas. Dentro do contexto de expressão de macromoléculas de interesse biotecnológico em alta escala, tanto proteínas recombinantes obtidas como produto desejado como proteínas que pertencem a vias metabólicas importantes para obtenção do produto final podem ser otimizadas. Um exemplo de modificação é a adição de peptídeos sinais à região amino terminal de proteínas para direcionar para vias de secreção ou envio para outro compartimento subcelular. Proteínas secretadas são mais facilmente purificadas pela menor complexidade dos meios mínimos de cultura geralmente utilizados comparado ao ambiente intracelular e, além disso, evita-se que as proteínas recombinantes sejam degradadas por proteases intracelulares (Yoon, Kim and Kim, 2010). Quimeras de proteínas contendo dois ou mais sítios catalíticos de diferentes enzimas que catalisam reações subsequentes em uma mesma via bioquímica podem ser desenhadas para garantir expressão de ambas as enzimas e restringir as reações ao mesmo compartimento subcelular, assegurando que produtos da primeira reação sejam substratos da reação subsequente (Jermutus et al., 2001; Sun, Geng and Shamoo, 2006). Alteração de sequências de aminoácidos em regiões não essenciais para função da proteína podem aumentar a estabilidade da estrutura contribuindo para a produção de proteínas com maior tempo de meia vida (Kumar, Tsai and Nussinov, 2000; Teng, Srivastava and Wang, 2010).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para alteração da sequência primária de proteínas e conseqüentemente alteração de sua estrutura e função como mutação sítio dirigida, mutações aleatórias, síntese química de genes codificadores de proteínas, adição de modificações pós-traducionais, entre outras (Bornscheuer and Kazlauskas, 2011; Kazlauskas and Bornscheuer, 2009). Mutações

sítio-dirigidas apresentam vantagens sobre mutação aleatória por permitir maior controle das alterações, inclusive impedindo modificações de aminoácidos essenciais para função da proteína (Muhl and Filloux, 2014). Por outro lado, sem o conhecimento do mecanismo da atividade de uma proteína, mutações aleatórias podem gerar grande quantidade de dados em curto espaço de tempo que permite elaboração de um planejamento mais racional (Chusacultanachai and Yuthavong, 2004). A síntese química de genes codificadores de proteínas contendo as alterações ou montagens necessárias permite produção de proteínas com alta taxa de modificações em menor espaço de tempo (Hughes, Miklos and Ellington, 2011; Xiong et al., 2008). Combinações de diferentes métodos também permitem a elaboração de modificações mais complexas e efetivas (Zawaira et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Embora glicoproteínas e proteínas oligoméricas apresentem elevado potencial biotecnológico na terapêutica, indústria de alimentos e outras, sua produção em alta escala é comprometida. Devido a sua complexidade bioquímica, a melhor forma de produção é através de proteínas recombinantes em organismos geneticamente modificados. Os sistemas mais favoráveis para cultivo em escala industrial, com alto rendimento do produto e curto período de produção são baseados em bactérias e leveduras. Bactérias falham na realização de glicosilação. Apesar de possuírem parcialmente a maquinaria, leveduras produzem perfil de glicosilação diferente de eucariotos superiores e glicoproteínas que necessitem de um padrão de glicosilação específico de mamíferos produzidos neste organismo falham em atividade biológica e estabilidade. Além disso, ambos os sistemas podem produzir incorreto dobramento de proteínas que prejudiquem sua atividade. Células de insetos e de mamíferos produzem proteínas com correto perfil de glicosilação e dobramento, porém ambas possuem dificuldade de cultivo em grande escala, longo tempo de cultivo necessário e baixa produtividade de proteínas. Dentro deste contexto, uma boa opção seria a utilização *Leishmania tarentolae* para expressão heteróloga de glicoproteínas e proteínas oligoméricas. Este eucarioto é não patogênico para humanos e necessitam de laboratório de segurança NB1 igual a bactérias e leveduras, é

passível de cultivo em larga escala com alto rendimento de produção de proteínas. Além disso, o processo de glicosilação e formação de pontes dissulfeto em *L. tarentolae* são muito semelhantes aos processos que ocorrem em mamíferos e são facilmente manipuladas como bactérias e leveduras. Apesar destas vantagens, o perfil de glicosilação é semelhante, mas não idêntico a mamífero devido à ausência de enzimas da via de biossíntese de ácido siálico e existem poucos estudos sobre otimização de produção heteróloga de proteínas neste organismo.

Nesta perspectiva, este projeto propôs a utilização de métodos de engenharia de proteínas e engenharia metabólica para planejamento e produção de linhagens de *Leishmania tarentolae* otimizadas para produção de glicoproteínas com perfil de glicídios idênticos a mamíferos. Esta otimização será direcionada por modelos computacionais com a adição dos genes de mamíferos importantes para a biossíntese e incorporação de ácido siálico com posterior validação experimental utilizando metodologias de engenharia genética e biologia molecular. Atualmente existem técnicas computacionais que guiam a otimização de produção do biocompostos de interesse, além de protocolos e vetores que possibilitem engenharia genética de *Leishmania*. O interferon- β foi selecionado como um primeiro alvo com validada atividade terapêutica para avaliar o potencial das novas linhagens serem utilizadas para expressão heteróloga de proteínas. Essa proteína é utilizada para o tratamento de doenças que causam um impacto no sistema único de saúde por possuir alta demanda e alto custo de produção. Além disso, possui um único sitio de *N*-glicosilação, o que facilitaria as análises de validação dessa modificação traducional nas linhagens otimizadas. Como depende de glicosilação com padrão específico de mamíferos para estabilidade e aumento da atividade da proteína, sua correta síntese utilizando uma plataforma de expressão mais otimizada proporcionaria uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos além de reduzir custos do produto.

As linhagens otimizadas geradas poderão ser utilizadas para produzir centenas de outras glicoproteínas em larga escala com aplicações nas mais diferentes áreas industriais como farmacêutica, de alimentos, de biocombustíveis, entre outras. Um segundo avanço tecnológico será a viabilização da produção da proteína alvo interferon- β , que é um composto já bem caracterizado e validado para

tratamento de patologias humanas, porém com comprometida produção industrial nas metodologias atuais. A produção com padrão correto de glicosilação diminui a quantidade de vezes que esta proteína precisa ser administrada ao paciente por injeção e glicosilação aumenta a estabilidade e o tempo de meia vida desta proteína no corpo humano.

4. DELINEAMENTO DO TEXTO

A presente tese, será apresentada em dois capítulos e três anexos que serão detalhados brevemente abaixo:

- Capítulo 1: Artigo para ser submetido na revista *Nucleic Acids Research* (Fator de Impacto de 16,971) no qual apresentamos os resultados obtidos da maioria dos objetivos propostos da teste em relação a padronização, otimização e desenvolvimento de uma plataforma de expressão de proteínas de baixo custo utilizando linhagens de *L. tarentolae* geneticamente modificadas para síntese de glicoproteínas em escala industrial e com incorporação de ácido siálico.

- Capítulo 2: Possui os resultados obtidos nas metodologias propostas de avaliar o aumento da expressão de transcritos e produção proteica e relacionando com número de cópias do gene IFN- β transfectado em *L. tarentolae* que será formatado como um artigo científico para publicação.

- Anexo I: Depósito de Patente intitulado: “*Leishmania tarentolae* otimizada, processo de produção, e uso para produção de glicoproteínas sializadas”.

- Anexo II: Depósito de Patente intitulado: “Processo de produção da proteína interferon- β humano em *Leishmania tarentolae* e uso”.

- Anexo III: Artigo de revisão publicado como co-autor na revista *Process Biochemistry* intitulado: “Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review”, onde apresentamos uma parte das metodologias e resultados gerados pelas análises genômicas propostas para o entendimento das vias de *N*-glicosilação em *L. tarentolae*

5. OBJETIVOS

5.1. Geral:

Desenvolver uma plataforma de expressão de proteínas de baixo custo utilizando linhagens de *L. tarentolae* geneticamente otimizadas para síntese de glicoproteínas em escala industrial e com incorporação de ácido siálico.

5.2 Específicos:

1) Integrar dados de genômica, proteômica e metabolômica de *L. tarentolae* para identificar alvos enzimáticos para otimização da produção de glicoproteínas com incorporação de ácido siálico nas terminações das cadeias glicídicas.

2) Desenvolver e validar a produção de uma linhagem de *L. tarentolae* com alta capacidade produtiva de proteínas glicosiladas com incorporação de ácido siálico.

3) Obter a proteína recombinante Interferon- β nas linhagens de *L. tarentolae* selvagem e otimizada.

4) Realizar a clonagem e expressão heteróloga da proteína recombinante Interferon- β em sistema procarioto (*E. coli*).

5) Otimizar e escalonar a expressão heteróloga de proteínas recombinantes dependente de glicosilação em linhagens otimizadas de *L. tarentolae*.

6) Analisar o perfil e presença de glicosilação encontrados nas proteínas expressas pelas linhagens de *L. tarentolae* otimizadas por espectrometria de massas.

7) Analisar a expressão gênica por qPCR comparativa relacionando número de cópias do gene IFN- β transfectado em *L. tarentolae* com o número de transcritos.

8) Realizar teste de atividade comparativa de proteínas recombinantes expressas em linhagens geneticamente otimizadas de *L. tarentolae* e expressas em sistemas de *E. coli* e células de mamíferos CHO.

CAPÍTULO 1

ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA NUCLEIC ACIDS RESEARCH

Title

Production of humanized therapeutic glycoprotein IFN-beta by *Leishmania tarentolae* with N-glycosylation optimized by co-expression of sialyltransferase

Authors and affiliations

Renato Lima Senra¹, Higor Sette Pereira¹, Luana Maria Pacheco Schittino¹, Patrícia Pereira Fontes¹, Tatiana Aparecida de Oliveira¹, Mônica Maria Magalhães Caetano¹, Andrea de Oliveira Barros Ribon¹, Juliana Lopes Rangel Fietto,¹ Liza Figueiredo Felicori Vilela², Jacqueline Araújo Fiúza³ and Tiago Antônio de Oliveira Mendes¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H, Rolfs s/n, 36570-900 Viçosa, Brasil

²Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

³Instituto Renne Rocheau – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brasil

Abstract

The production of therapeutic glycoproteins is expensive due to need to use mammalian cell culture that depend of complex and expensive culture media and have low yield of production. *Leishmania tarentolae*, a non-pathogenic trypanosomal protozoan for mammals, has been suggested as an alternative system for heterologous expression of glycoproteins due to the existence of efficient methods for heterologous expression easily adapted for high-scale production using culture media with low cost. In addition, this protozoan performed some mammalian like post-translational modifications including glycosylation. However, there are some differences in the carbohydrate profile present in the endings of the N-glycan chains due to the absence of biosynthesis enzymes and the incorporation of terminal sialic acid. Here, a genetically optimized *L. tarentolae* strain was developed to produce recombinant interferon- β (IFN- β) with mammalian N-glycosylation profile. Genomic and metabolomics analysis indicated that heterologous expression of sialytransferase enzyme and cultivate in medium containing sialic acid substrate would be sufficient to result in mammalian like N-glycosylation. Polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blot confirmed heterologous protein production and purification by affinity

chromatography. N-glycan mass spectrometry analysis indicated glycosylation signal compatible with incorporation of sialic acid in glycan structure. *In vitro* IFN-beta activity assays showed the efficiency of the protein produced in the optimized system to reduce the inflammatory effect compared to IFN-beta produced in different platforms including bacteria, non-optimized *Leishmania tarentolae* and mammalian cells.

Introduction

An organism with the potential for expression of recombinant proteins must be efficient and produce the protein in large quantities with reduced cost and, the possibility of industrial-scale and simple product purification protocol (1). The most favorable systems for cultivation on an industrial scale, with high product yield and short production period, are based on bacteria and yeasts.

Bacteria are not able to carry out glycosylation. Yeasts presenting parts of the glycosylation machinery producing a glycan different from others eukaryotes including mammals. Glycoproteins that require specific mammals post-translate patterns are produced in this organism with fail in biological activity and stability. Also, both systems can produce incorrect folding of proteins that impair their activity. Insect and mammalian cells produce proteins with similar glycosylation and folding profile, but both have difficulty cultivating on large scale, long cultivation time required, and low protein productivity (1-5).

Recently, *Leishmania tarentolae* has been suggested as a system for heterologous protein expression. *L. tarentolae* is a trypanosomatid protozoan, non-pathogenic to humans and other mammals. The genome of *L. tarentolae* has been sequenced (6) and this organism has machinery for several protein modifications carried out after the translation process, including post-translational modification patterns more similar to those of mammalian cells (6,7). Organisms of the *Leishmania* genus are known to have many glycoproteins, which can reach more than 10% of the total proteins (8,9). This characteristic is probably due to the parasitic lifestyle of trypanosomatids since most representatives of this family parasitize mammals and present similar glycoprotein patterns (7). Although the glycosylation profile of proteins expressed in *L. tarentolae* is similar to mammals, there are some differences in the carbohydrate profile present at the end of the

glycid chains due to the absence of biosynthesis enzymes and incorporation of sialic acid. Trans-sialidase expression of *Trypanosoma* species or glycosyltransferases has been suggested as alternatives to produce human-like sialylated glycoproteins (10).

Among the glycoproteins of therapeutic interest, Interferon-beta (IFN- β) is used for the treatment of forms of multiple sclerosis and other inflammatory autoimmune diseases, for its functions such as anti-inflammatory, antiproliferative antiviral, and immunomodulatory activities (11). Glycosylated recombinant human interferon- β -1a (IFN- β -1a) produced in mammalian system and non-glycosylated interferon- β -1b (IFN- β -1b) produced in prokaryote system are commercially available (12). As for the improvement of pharmacokinetic properties, the production of glycosylated IFN- β provides an increase in the half-life of the protein compared to the non-glycosylated isoform due to the increase in hydrodynamic volume and consequent decrease in renal elimination provided by the carbohydrate groups linked to the polypeptide chain (1). The degree of sialylation is suggested as an additional mechanism under biological conditions to modulate IFN- β bioactivity (13).

In the following study, interferon-beta, a medical therapeutic glycoprotein, was selected as the target to assess the potential of a low-cost protein expression platform using *L. tarentolae* strains genetically optimized to complete mammalian glycosylation for industrial-scale glycoprotein synthesis with sialic acid incorporation. This protein is used to treat diseases that have an impact on the unified health system because it has high demand and high production costs. As it depends on glycosylation with a specific mammalian pattern for stability and increased protein activity, its correct synthesis using a better-optimized expression platform would provide a more effective action in treatments using this drug, increasing the well-being of patients by reducing dosage and adverse effects as well as reducing production costs. Production with the correct pattern of glycosylation decreases the number of times this protein needs to be administered to the patient by injection and glycosylation increases the stability and half-life of this protein in the human body.

Results

Genomic and metabolomic analysis of sialylation pathways

Analyzes using the approaches of genome annotation of proteins involved in glycosylation metabolism and Blastp sequence alignment tool resulted in the identification of a group of proteins present in *N*-glycan metabolism in the predicted *L. tarentolae* proteome corresponding to the same ones found in humans, with exception of sialyltransferase (HST), N-acetylneuraminyltransferase (CMAS) and Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) (14) (Figure 1a). As the last enzyme in the process of formation of *N*-glycosylated proteins, HST has the function of catalyzing the addition of sialic acid at the end of the sugar chain. The function of some of these *Leishmania* proteins in the *N*-glycosylation process was also double validated by the recognition of specific protein domains after submission of the sequences to the protein family database, Pfam (14).

NMR approach detected metabolites present in *L. tarentolae* and relate them to potential metabolic pathways associated with *N*-glycosylation. After the analysis carried out in the genomics approach, where they evaluated the genes that encode the enzymes present in the *N*-glycan biosynthesis pathway in humans and whether they were present in *L. tarentolae*, we observed the absence of the HST that adds a sialic acid to the end of the glycidic chain of glycoproteins. Our focus, then, was to identify those metabolites detected by NMR that participate in the biosynthesis of sialic acid (Figure 1a). After the analysis, it was possible to find all precursor substrates of the Neu5Ac molecule, and it was not possible to identify only its form associated with a CMP molecule (cytidine monophosphate) (Figure 1b). A CTP molecule (cytidine triphosphate) is used through hydrolysis and loss of a phosphate group to activate sialic acid in the nucleus, forming CMP-Neu5Ac, which can be transported to the Golgi complex. The absence of the CMP-Neu5Ac molecule allows us to infer that *L. tarentolae* also lacks the expression of the enzyme that catalyzes the activation of sialic acid, N-acetylneuraminyltransferase (CMAS). Another important protein found in this metabolism and present in *Leishmania* genome is the specific CMP-Neu5Ac transporter, which is coupled to the medial-trans intermembrane region of the Golgi and is responsible for transferring the active sialic acid synthesized in the nucleus for the synthesis of sialylated glycoproteins within the Golgi (Supplementary Table 1) (15). Following a methodology similar to that addressed in the genomic analysis, the enzymes involved in the metabolism of sialic acid

and those that were possible to find annotated in the predicted in data of quantitative proteome of *L. tarentolae* produced by LC-MS approach, and also validated by the specific functional domain, are represented (Supplementary Table 1).

Validation of constitutive integrative LEXSY expression system

For the design of the sequences, it was also planned the addition of a signal peptide (acquired in the expression vector) that allows the synthesized protein to be directed to the extracellular medium and addition of histidine tail (either by chemical synthesis or acquired in the expression vector) that allows the protein to be identified by specific antibodies. Both strategies are used to facilitate and optimize the purification of expressed proteins (Figure 2a) (16,17).

The genes of interest were amplified from synthetic genes using the pairs of primers designed for each one as shown in Table 1. The amplicons obtained by PCR resulted in single and defined bands, of 496 bp for IFN- β and 1068 bp for HST observed after electrophoresis. The purified material of these bands was used in subsequent cloning reactions.

After cloning confirmation, the vectors were inserted by transformation into *E. coli* (DH5 α) for plasmid multiplication and subsequently extracted. The tests to verify the efficacy of cloning were performed using PCR with the specific primers of each gene and having with DNA mold the plasmids extracted from the clones, digestion to observe the release of the cloned fragment, and sequencing.

PCR reactions were used to verify the insertion of the expression cassette of the IFN- β gene in the gene locus of cells transfected with linearized constructions. Using the F3001 primer that amplifies endogenous regions and the specific primers of the HST and IFN-beta genes.

The primer forward F3001 is specific for the 5'ssu region present only on the host chromosome, and we validate the insertion by observing the amplification of a fragment of approximately 1847bp (for IFN-beta) and 2443bp (for HST) that corresponds to this region up to the 3' region of the inserted gene. The bands of interest were observed, both to which the genomic insertion and the presence of the gene were observed (Figure 2b).

The immunofluorescence result confirmed that the HST protein was intracellularly expressed in *L. tarentolae* cells (Figure 2c).

To verify the protein expression of HST and IFN- β were applied in a 12.5% polyacrylamide gel (Figure 2d) protein samples obtained by cell pellet (intracellular) and precipitation with TCA from the culture medium (Secreted) from *L. tarentolae* cultures. It shows the characteristic bands of 39,5 kDa corresponding to HST in the samples obtained intracellularly and of 25 kDa corresponding to IFN-beta in samples obtained from secreted proteins. Compatible with the molecular size found in the express isoform of the protein IFN- β glycosylated as described in different studies already published (18, 19). The equivalent bands were not observed in the lines where the wild-type cell samples (Wt) were applied.

The growth curve is shown in (Figure 2e). *L. tarentolae* strains with HST, IFN-beta, and both genes were cultivated under agitation and measured the optical density at 600nm every 24h. The results indicated that the strains expressing heterologous proteins do not present different growth compared to the control group (Wild type) with potential to produce high concentration of recombinant protein.

Purification and glycan profile of IFN-beta

Four types of IFN-beta were analyzed in SDS-PAGE and Western Blot. IFN-beta produced using *E. coli* system, produced in *L. tarentolae* wild and optimized strains and commercially obtained (Avonex $\text{\textcircled{c}}$, CHO). The IFN-beta produced from *L. tarentolae* cells were purified from the culture supernatant using nickel affinity chromatography on an ÄKTA-start system (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing the protein IFN-beta at the expected molecular size and evaluated by western blot were pooled and applied again on a comparative gel with other IFN-beta molecules from other expression systems (Figure 3a). The IFN-beta produced in CHO could not be observed in the Western blot assay, as it was obtained commercially and does not have a histidine tag. The molecular weight difference was attributed to additional glycosylation. The nonglycosylated form (*E. coli*) had a weight of approximately 20kDa, contained only the protein chain. And the upper bands

corresponding to glycosylated forms obtained from *L. tarentole* had a weight of approximately 25kDa. The weight observed in IFN-beta produced in CHO shows intermediary glycosylation. The observed masses on the spectrum obtained in LC/MS analysis, from glycans extracted from proteins of *L. tarentolae* cells, suggest the expected theoretical masses of the glycosylation. The differences in mass of the most abundant ions (390,7 Da) among the strains of *L. tarentolae* wild-type and HST-optimized demonstrate a difference in the pattern of glycosylation of these cells (Figure 3b).

Interferon-beta immunomodulatory and anti-inflammatory effect

To assess the potential immunomodulatory effects of interferon-beta produced in *L. tarentolae* cells, *in vitro* analysis was performed in two times of incubation (24h and 48h) comparing these molecules with the proteins control, non-glycosylated (*E. coli*) and glycosylated (Avonex®). Primarily subsets of lymphocytes proliferation were evaluated. The percentages of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ splenocytes were determined by FACS (Figure 4a). The contents of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes did not significant difference between the tested IFN-beta, that has a direct relationship with the response to inflammation induced by LPS. Intracellular cytokines are important effectors of the inflammatory response. At 24 h of incubation, we evaluated whether LPS induction increases levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-17A and IL-5, IFN- β and humoral response as IL-4 produced by *L. tarentolae* HST-optimized decreases the secretion of these cytokines and even stimulates anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Figure 4b and 4c). In all the cytokines tested expression levels with a significant difference were observed between the optimized IFN-beta and the others molecules tested (with the exception of IL-10 in CD8⁺ cells, where it differed only with bacterial IFN-beta). In 48h, mainly for CD3⁺CD4⁺ lymphocytes, the levels of cytokines found tend to normalize between treatments, which may indicate a late effect of the other molecules compared to the optimized IFN-beta, also demonstrating the stability of this protein after this time of incubation.

Figures

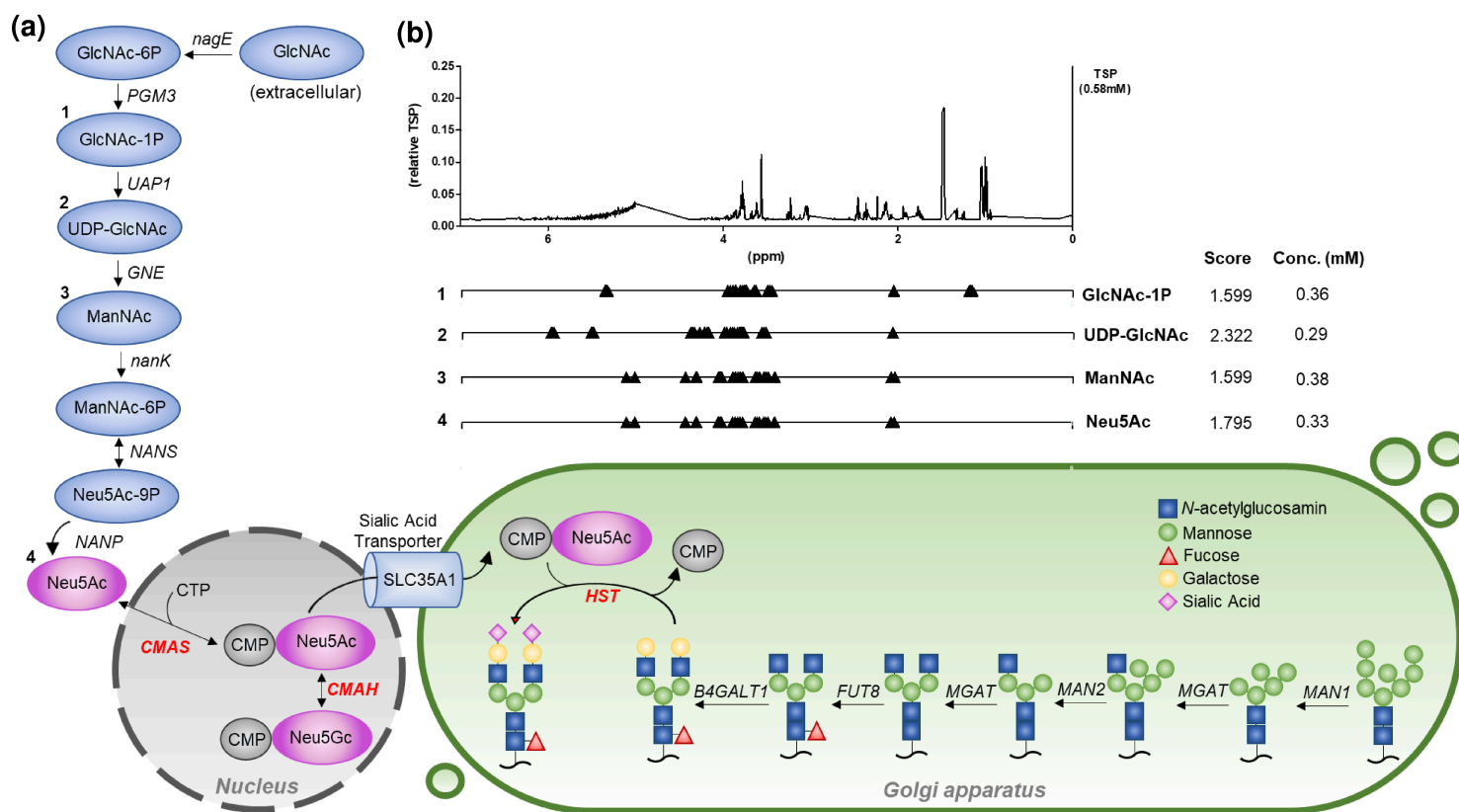


Figure 1. Spectrum obtained by NMR in 1D-1H NMR from *L. tarentolae* metabolic profile and scheme of reactions involved in sialic acid biosynthesis metabolism. (a) The scheme shows all the substrates and enzymes of the sialic acid biosynthesis pathway identified by the NMR experiment and the sialylation pathway of glycoproteins identified by genomic analysis (Oliveira, 2019). In red, the enzymes not found in the glycosylation pathway in *L. tarentolae*. **(b)** All standard NMR spectra (H) of the metabolites found in the sialic acid biosynthesis pathway are aligned with the spectrum obtained experimentally from *L. tarentolae* (Wild Type) cells in culture. On the right of each spectrum is the concentration found for each substrate (measured by adding the 3-(trimethylsilyl)-propionic acid (TSP) calibrator) and the number of scores calculated by the matches found by similarity of the peaks. The score represents the confidence level of compound identification based on NMR spectrum signals.

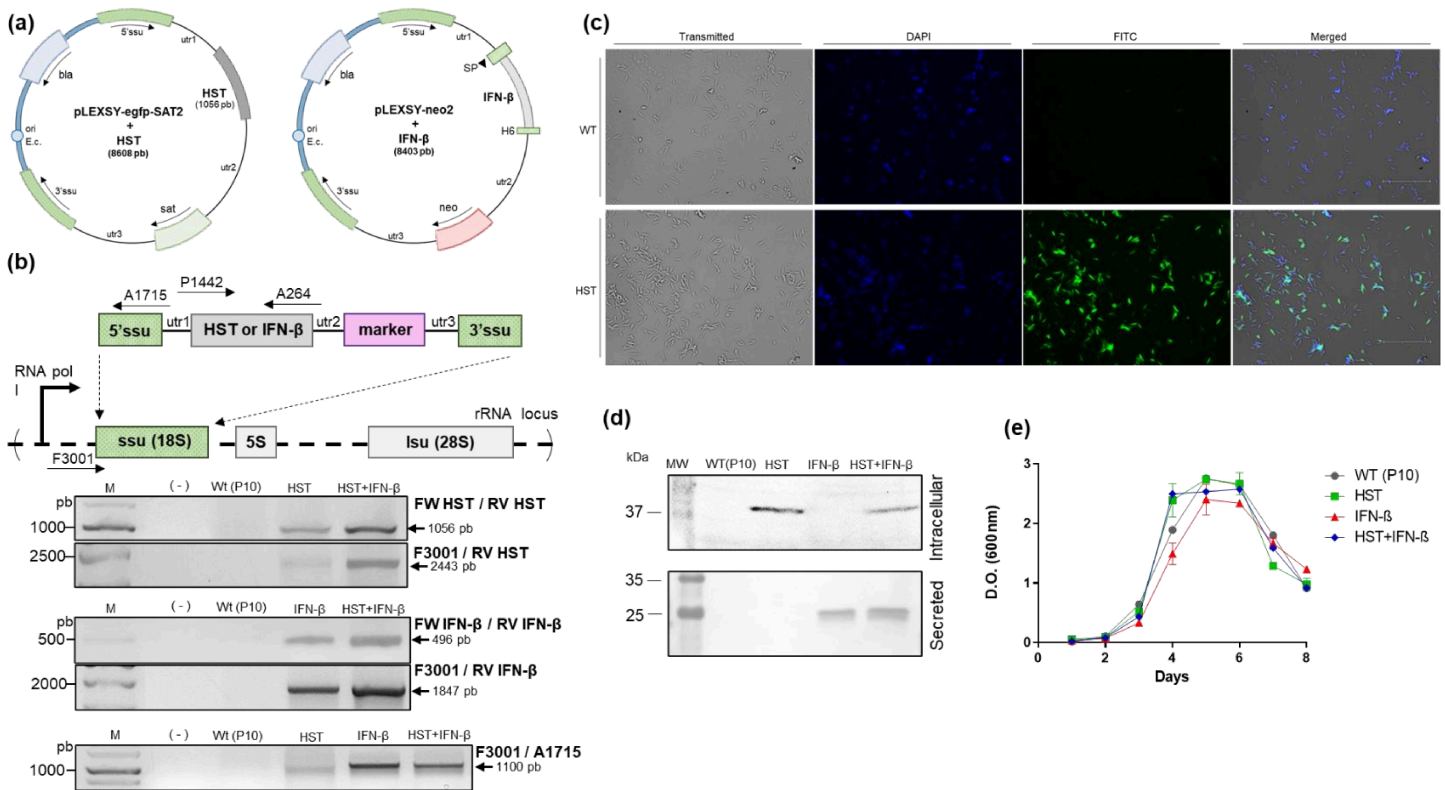


Figure 2. Expression of HST and IFN-beta in *L. tarentolae* (a) Expression plasmids construction to expression of target proteins. pLEXSY_egfp_SAT2 was selected for intracellular expression of HST and pLEXSY-NEO2 for secreted expression of IFN-beta, using the signal peptide. (b) Scheme and molecular validation of constitutive integrative LEXSY expression system and evaluation by PCR amplifying genomic DNA obtained from each transfected (HST, IFN-beta, and HST+IFN-beta) and wild-type (Wt) cells. (c) Immunofluorescence staining of HST intracellular expression in transfected *L. tarentolae* cells. Polyhistidine tagged HST was detected in transfected *L. tarentolae* cells using anti-His antibody and anti-mouse-IgG-Alexa Fluor 488. Control and transfected cells were stained with DAPI. (d) Secreted and Intracellular proteins viewed by Western Blot, using anti-His antibody anti-mouse-IgG-Alexa Fluor 488. (e) A growth curve with the expression of HST, IFN-beta, and both genes. The curve was made by measuring by the O.D. 600nm of each recombinant cell at different time (days) points.

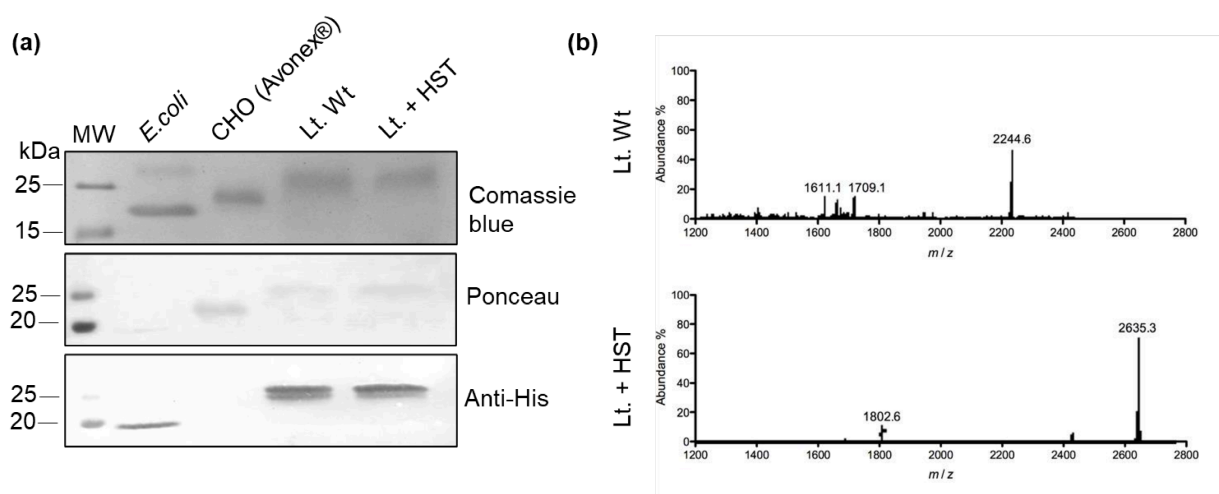
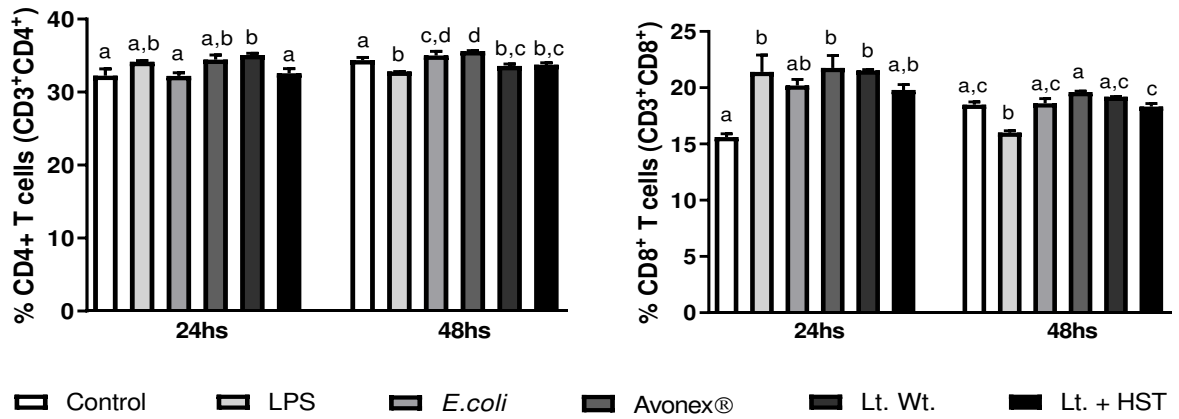
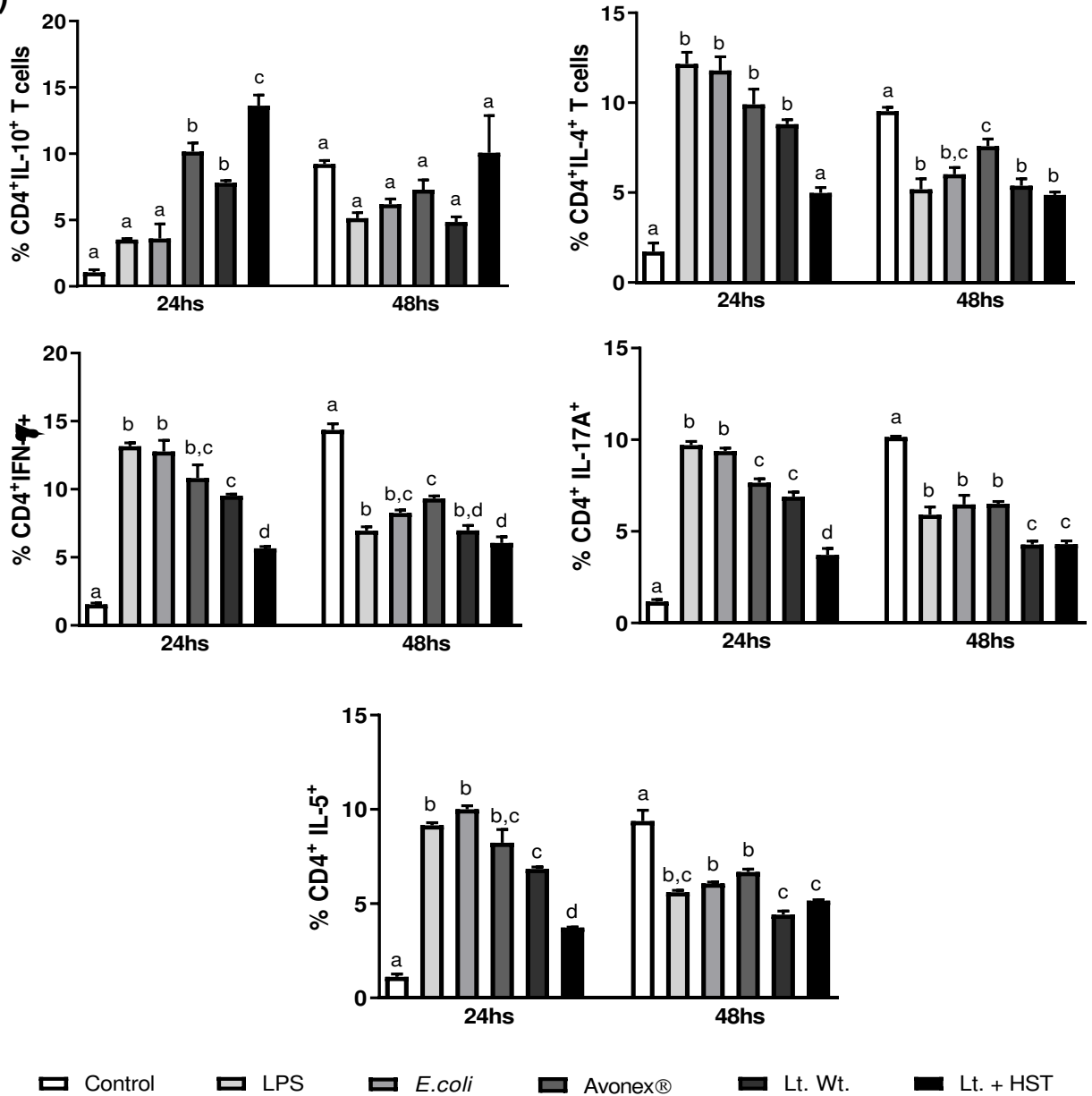


Figure 3. SDS-PAGE and Western Blot of purified IFN-beta proteins in different expression systems and glycosylation profile obtained by LC/MS in wild and optimized strains of *Leishmania tarentolae* (a) SDS-PAGE and Western Blot of IFN-beta proteins purified by affinity chromatography in *E. coli* and *L. tarentolae* expression systems and commercially obtained (CHO). The size differences observed, of approximately 5kDa, correspond to the non-glycosylated (*E. coli*) and glycosylated (CHO and *L. tarentolae*) forms of the protein. The IFN-beta produced in CHO could not be observed in the Western blot assay, as it was obtained commercially and does not have a histidine tag. (b) LC-MS mass spectrometry evidencing mass differences obtained from wild-type *L. tarentolae* and HST-optimized N-glycan fraction obtained from recombinant IFN-beta. The difference in masses found, between the two strains, between the two most abundant peaks suggests the insertion of a sialic acid at the end of the chain.

(a)



(b)



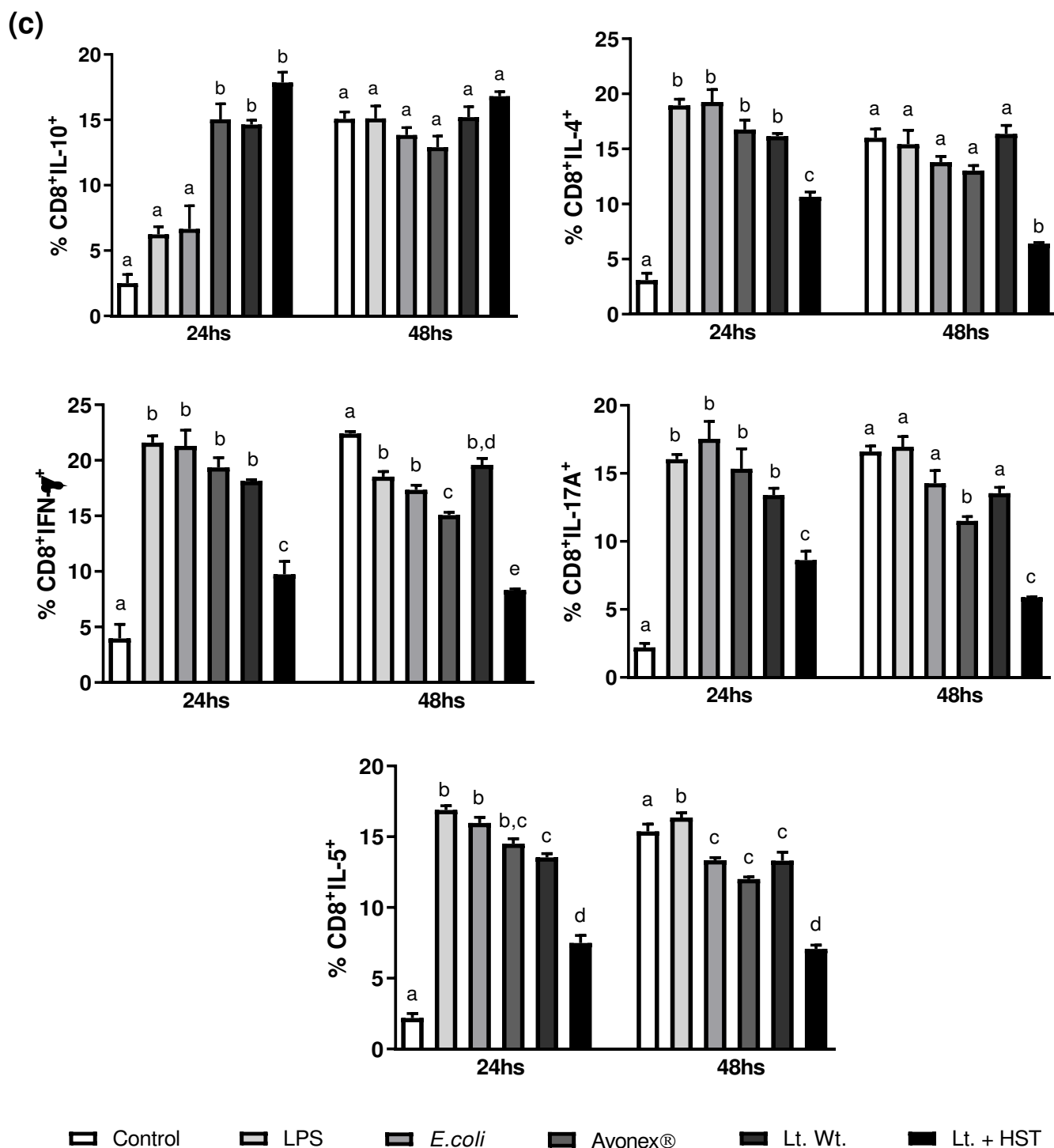


Figure 4. FACS analysis of cytokine-induced in mouse splenocytes by bacterial Lipopolysaccharide (LPS) and subsequent incubation with different interferon-beta glycosylated and non-glycosylated. *In vitro* analysis of the potential of different non-glycosylated (*E. coli*) and glycosylated (Avonex®, wild-type and HST-optimized *L. tarentolae*) interferon-beta molecules to affect the immune response of mouse cells splenocytes. The immunological parameters (a) CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells levels, and IL-10, IL-4, IFN- γ , IL-17A, IL-5 cytokines levels and (b) CD3⁺CD4⁺ and (c) CD3⁺CD8⁺ cells, were measured 24 and 48 hours after incubation with different IFN- β . Statistical analysis between groups was performed by ANOVA with Tukey correction and different letters on the bars represent a

significant difference ($p < 0.05$) between the experimental groups and the same letters represent no significant difference. (LPS: Lipopolysaccharide, bacterial endotoxin, *E. coli*: Interferon-beta produced in *E. coli*, Avonex®: Interferon-beta commercially produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells, Lt. Wt: Interferon-beta produced in wild-type *L. tarentolae*, Lt+HST: Interferon-beta produced in *L. tarentolae* optimized with the human sialyltransferase enzyme).

Discussion

The main purpose of this work is based on the development of a more accessible expression platform of glycoproteins with biochemical and pharmacokinetic properties more similar to the organism of origin using *L. tarentolae*. This organism has been widely studied as an alternative to other expression systems, becoming an easier, cheaper, and relatively more efficient means in the production of therapeutic glycoproteins.

As the glycosylation process in *L. tarentolae* still presents some doubts (7), we chose to use the comparative genomics methodology as an attempt to elucidate points not yet discussed in the process of biosynthesis of glycoproteins in these organisms.

Our analyzes corroborate the observations and tests carried out by Breitling in 2002: by sequencing techniques by polyacrylamide gel electrophoresis, it was demonstrated that *L. tarentolae* actually has an active N-glycosylation pathway capable of producing the biantennary complex of higher eukaryotes present into glycoproteins, just missing the sialylation. An important feature of protein expression in these organisms was also demonstrated, which is the homogeneity of structure, very important for therapeutic proteins.

With genomic analyzes, we developed the first strategy through the heterologous expression of the enzyme sialyltransferase (HST), for general an optimized lineage capable of performing sialylation. There are different methods used for metabolite analyzes, including mass spectrometry, chromatographic methods, and nuclear magnetic resonance (NMR). The NMR technique stands out from the other ones, due to several advantages such as the non-need to introduce structural changes in the molecules to be analyzed and specificity in the separation of compounds with similar masses (20).

Performing blastp in the trypanostite database we found the specific carrier protein of CMP-sialic acid. This information is debatable because there is no evidence that *L. tarentolae* has the enzyme that catalyzes the activation of sialic acid and therefore, the molecule used by this transporter does not exist in these organisms. There is then the possibility, because of the genome annotation found in the TrytriDB database not being validated, and being available only in automatic form, the protein found by the Blastp tool has many domains similar to the sialic acid transporter of another model organism, but its function is not to specifically carry this molecule. In fact, as demonstrated by Riemersma in 2015, the transporter in question performs other functions independent of sialic acid, such as o-mannosylation of α -dystroglycan, which are receptors associated with the extracellular matrix and cytoskeleton of cells (21).

The presence of the metabolite Neu5Ac can be explained by this molecule being used in other metabolic processes such as glycolipid biosynthesis. Sialized lipids are important for the recognition of epitopes in mammalian cells, for example, widely used for the parasitism mechanism (22).

As the Substrate CMP-Neu5Ac is currently produced industrially and commercialized, its insertion in *L. tarentolae* cells by adding to the culture medium is an alternative to the heterologous expression of the enzyme N-acetylneuramine citidiltransferase. With this approach associated with the heterologous expression of the enzyme sialyltransferase, it is expected to obtain a lineage qualitatively capable of producing glycoproteins with a glycosylation pattern similar to that of humans.

The protein sequences of sialyltransferase and Interferon- β , which were used as a therapeutic target to validate the glycosylation potential of the optimized strains, were obtained in Kegg (23) and synthetic gene sequences were generated for these proteins with codons optimized for the genus *Leishmania*. Studies have already shown that the optimization of codons can double the protein concentration expressed in the culture medium, thus cheaping the production, since it increases the yield maintaining the same conditions (24).

All cloning steps, as well as confirmatory tests, showed satisfactory results demonstrating the efficiency of the LEXSY expression method. We confirmed intracellular HST expression by immunofluorescence and secreted production of IFN-beta in *L. tarentolae* strains by SDS-PAGE and Western Blot and no

negative effects on the growth of recombinant strains were observed. By mass spectrometry analysis, it was possible to recognize a difference in the pattern of glycosylation in the glycoproteins produced by the optimized system.

We show here that human recombinant IFN-beta produced in *L. tarentolae* HST-optimized cells is *N*-glycosylated and shows differential anti-inflammatory effect confirmed by FACS analysis and levels cytokine-induced observed in mouse splenocytes. In the presence of a pro-inflammatory stimulus, such as bacterial LPS, IFN- β HST-optimized decreases the secretion of inflammatory cytokines (25). These results are in accordance with the antiviral nature of IFN- β and its pharmacological use (26). In addition, the triggered anti-inflammatory profile may be associated with improvements in prognostics of individuals affected by cancer and multiple sclerosis (27, 28).

The use of IFN- β in this study is highlighted both for its importance as a drug, as it is used in the treatment of serious diseases, and for the economic impact generated in public and private health systems due to high demand and high production cost.

Methods

Metabolomics and Comparative Genomic

Metabolite extraction was performed with samples containing 5×10^8 parasites using the methanol/chloroform/water method (29). Samples with extracted metabolites were resuspended in 500 μL of deuterium oxide (D_2O) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) containing a final concentration of 0.58 mmol.L^{-1} of trimethylsilyl-2,2,3,3-sodium tetradeuteropropionate (TSP) as an internal reference for chemical displacement and internal standard for quantifying metabolites (29). The NMR spectra were obtained in a Bruker DRX400 equipment (Bruker, Billerica, USA) of 9.4 T (400.13 MHz for hydrogen frequency), 303 K, and equipped with a 5 mm inverse detection probe. For processing, the line widening of 0.3 Hz was used, before the Fourier transform. To identify and quantify the metabolites present in each sample, initially, NMR spectra obtained were loaded into the rNMR program version 1.1.9 (30) implemented in platform R version 3.4.1 (31). The noise of the readings was eliminated using a cutoff value as 2 times the standard deviation from the baseline, considering only values above this cutoff as a sign. The list of chemical displacement and signal intensity was generated and used as an input file for the NMR_based Search tool implemented in the *Madison Metabolomics Consortium Database* of metabolites (32). This program allows identification of the metabolites present in the samples by comparing the chemical displacements present in the sample reading with chemical displacement data of reference compounds deposited in the database. The parameters for analysis of mixtures were adjusted to a minimum of 80% of the number of peaks expected for a given compound to ensure the presence of the compound in the mixture, deviation from the expected displacement for signals originating from hydrogen of 0.05 ppm, type of spectrum 1D-1H and NMR field strength of 400.13 MHz. The relative concentration of metabolites concerning TSP was multiplied by 0.58 to obtain the absolute concentration in mM of the compounds.

Protein sequences involved in the biosynthesis of *N*-glycans were recovered from KEGG (23). Sequences were contrasted with the proteins encoded in the *L. tarentolae* genome present in the TritypDB version 35 database (33). Blastp tool was used to compare *H. sapiens* proteins against the predicted proteome of *L. tarentolae*. The function of glycosylation was confirmed by

validating the presence of specific functional domains using the *Pfam protein family database* (<http://pfam.xfam.org/>) (14).

Cultivation of Leishmania tarentolae

Leishmania tarentolae promastigotes (LEXSY host P10, Jena Bioscience) were cultured at 26° C, in the dark, in Brain Heart Infusion (LEXSY Broth BHI, 37g/L) medium supplemented with 10mg/mL Hemin (Sigma), 10000unit/ml penicillin (Sigma) and 10 mg/ml streptomycin (Sigma). The culture was performed primarily in tissue culture flasks until getting the density of cells and posteriorly in Erlenmeyer flasks under agitation.

Generation of recombinant L. tarentolae strains

Expression plasmids pLEXSY-egfp-SAT2 (Cat. No. EGE-235) and pLEXSY-Neo2 (Cat. No. EGE-233) and antibiotics were purchased from Jena Bioscience (Jena, Germany). Sequence codons of the HST (with six histidines) and human IFN-beta gene, were optimized for *Leishmania donovani* using Integrated Data Technologies Codon Optimization Tool (IDT CodonOpt). Both genes were amplified and the products were cloned into pGEM-T (Promega, Fitchburg, USA). These vectors were used as templates for cloning into pLEXSY plasmids. HST was cloned into the *BglII/NotI* site of pLEXSY-egfp-SAT2 and IFN-beta was cloned into the *XbaI/KpnI* site of pLEXSY-Neo2 and adds a C-terminal sequence of six histidines and an N-terminal signal sequence from the gene for secreted acid phosphatase (LMSAP) of *Leishmania mexicana* to the desired secreted proteins expression. Before transfection by electroporation (GenPulser XCell, BioRad) in *L. tarentolae*, 10 µg of each plasmid were linearized by digestion with *SwaI* as recommended by the manufacturer. Three recombinant strains were obtained: with the HST gene, IFB-beta, and with both genes. The growth rate of transfected cells cultures was measured and compared to mock controls. Leshmanias were seeded in triplicate at an initial concentration of 10⁵ cells/ml and optical density was assessed daily. In addition, genomic integration was evaluated by PCR amplifying genomic DNA, obtained from each transfected (HST, IFN-beta, and HST+IFN-beta) and wild-type (WT) cells. The specific primer

F3001 (forward) anneals upstream of the 5' ssu, in *Leishmania* endogenous region. Expression of HST e IFN-beta in each recombinant cell was confirmed by SDS-PAGE, Western blot, and Fluorescence microscopy.

Fluorescence microscopy

L. tarentolae strain cells with HST gene were seeded on 24-well plates containing coverslips. Next, the coverslips were fixed with 4% v/v of paraformaldehyde for 20 min, washed with PBS, and then permeabilized in 1% v/v Triton X-100/PBS for 20 min, washed with PBS, and blocked with 2% m/v BSA/PBS-T (PBS containing 0.05% v/v of Tween-20) for 30 min. The cells were then incubated with primary antibody anti-his (Thermo Scientific) for 1h. Then, the cells were incubated with secondary anti-mouse-IgG-Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) for 1h. The compound 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) was used as a nuclear counterstain. The fluorescence was recorded using an inverted fluorescence microscope (EVOS FL).

Protein purification and mass spectrometry

For protein expression, *L. tarentolae* strains were grown in agitation, in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of BHI medium supplemented with hemin. The cultures were maintained at O.D.600 2-3 and the supernatant was recovery, filtered with 0.22µm membrane, and diluted with PBS pH 7.6. The supernatants were loaded on a 5-mL HisTrap Crude FF column (GE Healthcare, München, Germany) equilibrated in 20 mM NaHPO₄, 500 mM NaCl, and 20mM imidazole, pH 7.6. Proteins were eluted from the Histrap Crude FF column with an elution buffer containing 20 mM NaHPO₄, 500 mM NaCl, and 500mM imidazole on an ÄKTA-start system (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing the protein IFN-beta at the expected molecular size and evaluated by western blot were pooled.

Recombinant proteins produced in *L. tarentolae* were initially dissolved in 200 µL of 50 mM ammonium bicarbonate buffer containing 10 mM DTT and

incubated at 60°C for 40 minutes to reduce disulfide bridges. Cysteine alkylation was performed by adding 30 µL of 100 mM iodoacetamine followed by incubation at room temperature for 30 minutes under the light shelter. The alkylation reaction was interrupted by placing the samples under illumination with fluorescent lamp for 30 minutes (34). Reduced and alkylated glycoproteins were submitted to N-glycosylation removal by incubation at 37°C for 16 hours with 10 mU PNGase F (Roche Applied Science, Germany). The glycans obtained were purified and concentrated with the aid of HILIC SPE microtips (Rainin Instrument, USA), washed 10 times with acetonitrile 83% followed by three washes with 83% acetonitrile solution containing 0.1% trifluoroacetic acid (35). Glycans were conjugated with 2-amino benzamidine (2AB) (36) analyzed in Ultraflex II MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Daltonics, Alemna) equipment. The data were processed in flexanalysis version 3.0 software (Bruker Daltonics) (34).

Animals and evaluated protocol

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CEUA/UFMG Protocol 216/2017) and performed according to the guidelines set by the Brazilian Animal Experimental College (COBEA). All animals were certified free of endo/ectoparasites by animal house logistics. The mice, with 5-7 weeks of age were divided into six groups (6 animals per group/time). The splenocytes were incubated as described below.

Flow cytometric analysis of the phenotypic profile and intracytoplasmic cytokine production

Spleens were sterilely removed and cell suspensions prepared (37). Mononuclear cells were enumerated using a Countess Automated Cell Counter (Thermo Fischer, Invitrogen, MA). Cells were cultured at 1×10^6 cells per well in duplicate in a 96 wells plate (Corning Incorporated, Corning, NY) in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 50,000 Units penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 1% L-glutamine (Gibco). The cells were incubated in the presence or absence of 50ng of LPS at 37°C in 5% CO₂ for 24 h. After incubation, the

supernatant was removed and replaced with fresh supplemented medium, with or without 50ng of IFN- β (produced in bacteria, mammalian cells, and *L. tarentolae* wild type and with HST). The immunological parameters were measured 24 and 48 hours after incubation with IFN- β . In the last 4 hours, cultures received brefeldin A (10 μ g/mL). Cells were stained for the surface markers, all purchased from Biolegend (CA, USA): a) CD3 FITC (clone 145–2C11), b) CD4 PerCP-Cy5.5 (clone RM4-4), c) CD8 BV421 (clone 53-6.7). Cells were then fixed, permeabilized, and stained for the following cytokines: a) IL-4 (clone 11B11), b) IFN- γ (clone XMG1.2), c) IL-5 (clone TRFK5), d) IL-17A (clone TC11-18H10.1), and e) IL-10 (clone JES5–16E3), all labeled with PE. For each sample, at least 100,000 cells were analyzed. The data were analyzed using FlowJo software and a FACS Fortessa flow cytometer (both from Becton Dickinson, San Jose, CA).

References

1. Gerngross,T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, **22**, 1409-1414.
2. Gräslund,S., Nordlund,P., Weigelt,J., Hallberg,B.M., Bray,J., Gileadi,O., Knapp,S., Oppermann,U., Arrowsmith,C., Hui,R., *et al.* (2008) Protein production and purification. *Nat Methods*, **5**, 135-146.
3. Rabert,C., Weinacker,D., Pessoa,A. and Fariás,J.G. (2013) Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Braz J Microbiol*, **44**, 351-356.
4. Berger,M., Kaup,M. and Blanchard,V. (2012) Protein glycosylation and its impact on biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **127**, 165-185.
5. Palomares,L.A., Estrada-Mondaca,S. and Ramírez,O.T. (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*, **267**, 15-52.
6. Raymond,F., Boisvert,S., Roy,G., Ritt,J.F., Légaré,D., Isnard,A., Stanke,M., Olivier,M., Tremblay,M.J., Papadopoulou,B., *et al.* (2012) Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*, **40**, 1131-1147.
7. Breitling,R., Klingner,S., Callewaert,N., Pietrucha,R., Geyer,A., Ehrlich,G., Hartung,R., Müller,A., Contreras,R., Beverley,S.M., *et al.* (2002) Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif*, **25**, 209-218.
8. Ferguson,M.A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **352**, 1295-1302.
9. Basile,G. and Peticca,M. (2009) Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*, **43**, 273-278.
10. Klatt S, Simpson L, Maslov DA, Konthur Z (2019) *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **13**(7), e0007424.
11. Goldenberg,M.M. (2012) Multiple sclerosis review. *P T*, **37**, 175-184.
12. Revel,M. (2003) Interferon-beta in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*, **100**, 49-62.
13. Mastrangeli,R., Rossi,M., Mascia,M., Palinsky,W., Datola,A., Terlizese,M. and Bierau,H. (2015) In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms. *Glycobiology*, **25**, 21-29.
14. Oliveira, T.A., Silva, W., Torres, N. R., Moraes, J.V.B., Senra, R. L., Mendes, T. A. O., Júnior A. S., Bressan, G.C., Fietto, J. L. R. (2019). Application of the LEXSY *Leishmania*

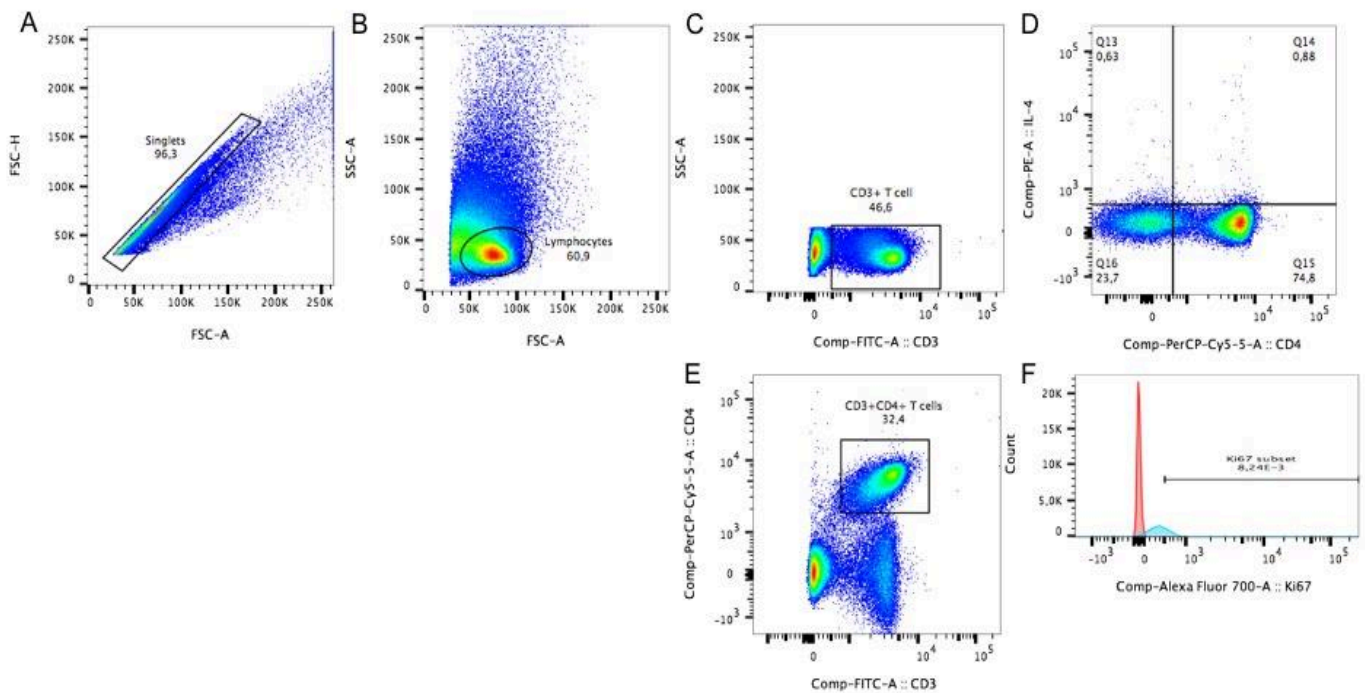
- tarentolae system as a recombinant protein expression platform: A review, *Process Biochemistry*, **87**,164-17
15. Van Karnebeek,C.D., Bonafé,L., Wen,X.Y., Tarailo-Graovac,M., Balzano,S., Royer-Bertrand,B., Ashikov,A., Garavelli,L., Mammi,I., Turolla,L., *et al.* (2016) NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet*, **48**, 777-784.
 16. Wiese,M., Ilg,T., Lottspeich,F. and Overath,P. (1995) Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *EMBO J*, **14**, 1067-1074.
 17. Klatt,S. and Konthur,Z. (2012) Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microb Cell Fact*, **11**, 97.
 18. Runkel,L., Meier,W., Pepinsky,R.B., Karpusas,M., Whitty,A., Kimball,K., Brickelmaier,M., Muldowney,C., Jones,W. and Goelz,S.E. (1998) Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res*, **15**, 641-649.
 19. Dissing-Olesen,L., Thaysen-Andersen,M., Meldgaard,M., Højrup,P. and Finsen,B. (2008) The function of the human interferon-beta 1a glycan determined in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, **326**, 338-347.
 20. Pontes,JG., Brasil,AJ., Cruz.GC, de Souza,RN, Tasic,L. (2017) NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. *Analytical Methods*, **9**, 1078-96.
 21. Riemersma,M., Sandrock,J., Boltje,T.J., Büll,C., Heise,T., Ashikov,A., Adema,G.J., van Bokhoven,H. and Lefeber,D.J. (2015) Disease mutations in CMP-sialic acid transporter SLC35A1 result in abnormal α -dystroglycan O-mannosylation, independent from sialic acid. *Hum Mol Genet*, **24**, 2241-2246.
 22. Barreto-Bergter,E., Beatriz Vermelho,A. (2010) Structures of glycolipids found in trypanosomatids: contribution to parasite functions. *The Open Parasitology Journal*, **4**.
 23. Kanehisa,M. (2002) The KEGG database. *Novartis Found Symp*, **247**, 91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52.
 24. Kianmehr,A., Mahrooz,A., Oladnabi,M., Safdari,Y., Ansari,J., Veisi,K., Evazalipour,M., Shahbazmohammadi,H. and Omidinia,E. (2016) Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*, **58**, 566-572.
 25. Bolívar,S., Anfossi,R., Humeres,C., Vivar,R., Boza,P., Muñoz,C., Pardo-Jimenez,V., Olivares-Silva,F. and Díaz-Araya,G. (2018) IFN- β Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. *Front Pharmacol*, **9**, 1368.

26. Lazear, H.M., Schoggins, J.W. and Diamond, M.S. (2019) Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, **50**, 907-923.
27. Jakimovski, D., Kolb, C., Ramanathan, M., Zivadinov, R. and Weinstock-Guttman, B. (2018) Interferon β for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **8**, a032003.
28. Borden, E.C. (2019) Interferons α and β in cancer: therapeutic opportunities from new insights. *Nat Rev Drug Discov*, **18**, 219-234.
29. Teng, S., Srivastava, A.K. and Wang, L. (2010) Sequence feature-based prediction of protein stability changes upon amino acid substitutions. *BMC Genomics*, **11 Suppl 2**, S5.
30. Lewis IA, Schommer SC, Markley JL. (2009) rNMR: open source software for identifying and quantifying metabolites in NMR spectra. *Magn Reson Chem*. **47** Suppl 1(S1):S123-6.
31. Team 2013
32. Cui, Q., Lewis, I.A., Hegeman, A.D., Anderson, M.E., Li, J., Schulte, C.F., Westler, W.M., Eghbalnia, H.R., Sussman, M.R. and Markley, J.L. (2008) Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol*, **26**, 162-164.
33. Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., *et al.* (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*, **38**, D457-62.
34. Selman, M.H., McDonnell, L.A., Palmblad, M., Ruhaak, L.R., Deelder, A.M. and Wuhrer, M. (2010) Immunoglobulin G glycopeptide profiling by matrix-assisted laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem*, **82**, 1073-1081.
35. Bondt, A., Rombouts, Y., Selman, M.H., Hensbergen, P.J., Reiding, K.R., Hazes, J.M., Dolhain, R.J. and Wuhrer, M. (2014) Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics*, **13**, 3029-3039.
36. Bigge, J.C., Patel, T.P., Bruce, J.A., Goulding, P.N., Charles, S.M. and Parekh, R.B. (1995) Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem*, **230**, 229-238.
37. Lim, J. F., Berger, H., & Su, I. H. (2016). Isolation and Activation of Murine Lymphocytes. *Journal of visualized experiments*, **116**, 54596.

Supplementary information

Supplementary Table 1: Enzymes involved in the sialic acid biosynthesis process, codes related to databases, and e-value obtained by the Blast performed TrytripDB bank and the validation of specific functional domain in the Pfam database.

Abbreviation	Name	Kegg Code	TrytripDB Code	E-value TrytripDB	Family	E-value Pfam
GNE	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/ N-acetylmannosamine kinase	K12409	LtaP33.2750	-	UDPGP	1E-23
NANS	N-acetylneuraminase synthase	K05304	-	-	-	-
NANP	N-acetylneuraminase-9-phosphatase	K01097	-	-	-	-
CMAS	N-acetylneuraminase cytidyltransferase	K21749	-	-	-	-
CMP-SAT	CMP-sialic acid transporter	K15272	LtaP24.0350	9E-24	Nuc_sug_transp	6,6E-51



Supplementary Figure 1. Flow cytometry analysis of mouse splenocyte cells treated with different glycosylated and non-glycosylated interferon-beta molecules. (a) Selection of viable splenocytes. (b) Selection of lymphocytes based on cell size (FSC) and granularity (SSC). (c) Selection of lymphocytes using the CD3 marker. (d) Identification of IL-4 producing CD4 lymphocytes. (e) and (f) Quantification of CD4 lymphocytes in the sample.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA UTILIZANDO MULTIPLAS CÓPIAS GÊNICAS DE INTERFERON-B EM *Leishmania tarentolae*

1. INTRODUÇÃO

O uso *Leishmania tarentolae* com plataforma de expressão heteróloga de proteínas apresenta diversas vantagens da qual se destaca a existência dos mecanismos de modificação pós-traducionais semelhantes a mamíferos (Oliveira, 2019). Porém, uma das barreiras de utilização deste organismo é o menor rendimento comparável aos de produção de proteínas existentes já utilizados na indústria, incluindo bactérias e leveduras. Dentre as opções para se aumentar a produção de proteínas e principalmente obter um bom rendimento após as etapas de purificação podemos citar a padronização do melhor ponto do cultivo para extração dessas moléculas, avaliar diferentes condições de cultivo (volumes, meios de cultivo, suplementação, oxigenação, temperatura, formato dos frascos, entre outros), estratégias de cromatografia e metodologias que permitem a integridade dessas proteínas, como a utilização de inibidores de proteases. Além disso, considerando a ausência de controle transcricional em protozoários do gênero *Leishmania* e o controle da expressão gênica é prioritariamente pós-transcricional, aumentar o número de cópias de um gene é uma estratégia evolutiva para aumentar os níveis de transcrito e proteína de um gene.

Desta forma, foi avaliado o efeito da retransfecções de um mesmo gene e avaliar o efeito de múltiplas-cópias recombinadas ao locus da subunidade 18S do DNA ribossômico (ssu) na expressão proteica e de transcritos. Existem algumas vantagens para se utilizar a expressão gênica de forma integrativa constitutiva. No caso da inserção gênica no locus ssu de tripanossomatídeos, podemos citar a presença de muitas cópias de genes do 18S rDNA permitindo a integração de sequencias exógenas e ainda mantendo a função e expressão dos genes de origem. Além disso, genes ribossomais geralmente são muito expressos, portanto há a possibilidade de uma alta taxa de expressão do gene recombinado (Inga, De Doncker et al. 1998, Misslitz, Mottram et al. 2000, Soysa, Tran et al. 2015).

Esses organismos possuem a característica de seus RNAs mensageiros serem produzidos como transcritos precursores únicos ou policistrônicos. Esses precursores então são processados pós-transcrição por meio de reações *trans-splicing* e poliadenilação nas regiões intergênicas (Figura 1) (De Gaudenzi, Noe et al. 2011). Estudos demonstram também que os níveis de RNAm não necessariamente estão relacionados com os níveis de proteínas e que há um rígido

controle em eventos transcripcionais e pós transcripcionais nesses parasitos (Martínez-Calvillo S et al. 2010).

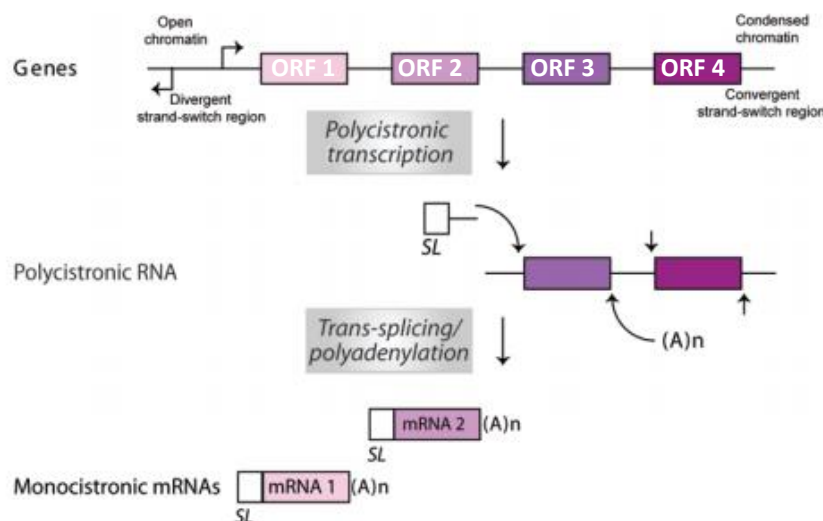


Figura 4. Esquema geral do mecanismo de transcrição em tripanossomatídeos. Os genes que podem possuir funções bem distintas são organizados em grupos policistrônicos (ORFs) mantidas na mesma direção de transcrição, que será realizada pela RNA Polimerase II. A esses genes então são adicionados os RNA Splice Leader na região 5' terminal (trans-splicing) e posteriormente acontece a poliadenilação na região 3' terminal para gerar os mRNAs maduros. (De Gaudenzi, Noe et al. 2011).

Com o objetivo de analisar os níveis de expressão gênica e proteica e relacionar com o aumento do número de cópias transfectadas do mesmo gene em *L. tarentolae*, nós utilizamos como estratégia inicial construir três plasmídeos de expressão com marcas de seleção diferentes e gerar cepas contendo um, dois ou três desses vetores. Assim, após a seleção clonal por antibióticos diferentes e posterior validação por PCR, confirmamos a presença de pelo menos uma, duas ou três cópias do gene e correlacionamos com o nível de transcrito e proteína produzidos por estas linhagens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Técnicas Básicas de Bioquímica e Biologia Molecular

As técnicas básicas de bioquímica e biologia molecular não descritas detalhadamente nesta seção, tais como preparo de géis de agarose e de

poliacrilamida (SDS-PAGE), eletroforese de DNA e de proteínas, extração de DNA plasmidial (Miniprep), extração de RNA total e preparo de tampões, foram realizadas de acordo com os protocolos propostos por Sambrook e colaboradores (Sambrook et al., 1989)

Todas as dosagens e quantificações dos materiais genéticos (DNA genômico, DNA plasmidial e RNA) e proteicos utilizados neste projeto foram realizadas utilizando o equipamento Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

2.2. Organismos

Durante este projeto foi cultivada a estirpe de *E. coli* da linhagem DH5 α para as técnicas de multiplicação de plasmídeos (antes ou após as clonagens) e a linhagem de *L. tarentolae*: cepa P10 (Código: LT-101, Jena Bioscience) utilizada para expressão constitutiva integrativa.

2.3. Manutenção e cultura de *L. tarentolae*

Formas promastigotas de *L. tarentolae* da cepa P10 foram descongeladas e mantidas em meio BHI (Brain Heart Infusion), preparado de acordo com as recomendações do manual do kit LEXSY (37g/L). O meio de cultivo foi inicialmente esterilizado por 15 minutos a 121°C e 1 atm de pressão e no momento da inoculação foi suplementado com hemina (10 mg/mL), antibióticos Penicilina (10000u/mL) e Streptomina (10000 μ g/mL) para evitar contaminações bacterianas. As células foram mantidas a 26°C ao abrigo de luz, em volumes de 5-10 mL com as garrafas posicionadas horizontalmente sem agitação (cultura estática) sendo checadas diariamente no microscópio para verificar sua viabilidade e presença de contaminantes no meio de cultivo. Para mensuração da quantidade de células, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer diluindo alíquotas das células em cultivo em 1:40 ou mais em solução de formalina 4%.

2.4. Extração de metabólitos

Extração de metabólitos foi realizada pelo método de metanol/clorofórmio/água conforme TENG et al., 2009. Amostras contendo 5×10^8 parasitos foram centrifugadas a 2000 x *g* por 10 minutos a 4°C, o meio de cultura foi descartado e os parasitos foram lavados duas vezes com PBS. Ao

sedimento contendo as células foi adicionado 750 μ L de solução 2:1 de metanol e clorofórmio e levado ao vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Itália) por 5 minutos a 3000 rpm. Seguiu-se com adição de 100 μ L de água ultrapura gelada, e levado ao vortex por 5 minutos a 3000 rpm. As amostras foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos seguida por adição de 750 μ L de água ultrapura gelada. Após serem novamente levadas ao vortex por 5 minutos a 3000 rpm, as amostras foram centrifugadas a 2000 x *g* por 10 minutos a 4°C. A fase superior de metanol/água foi coletada e a fase inferior de clorofórmio foi reextraída por adição de 750 μ L de solução 2:1 metanol e água. As amostras foram levadas ao vortex por 5 minutos a 3000 rpm seguida por incubação em banho de gelo por 5 minutos e centrifugação a 2000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. A fase superior foi recolhida e combinada com a fase superior previamente recuperada. As amostras foram secas em centrífuga evaporadora e estocadas a -80 °C até utilização.

2.5. **Síntese dos genes otimizados e desenho de *primers***

A sequência do gene de interesse foi projetadoO com os códons otimizados para serem expressos em *L. tarentolae* utilizando a ferramenta Codon Optimization Tool da Integrated DNA Technologies (IDT)(<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) utilizando como espécie de referência *Leishmania donovani*. Os *primers* específicos para cada gene foram desenhados adicionando os sítios de restrição estratégicos para a ligação do gene de interesse nos plasmídeos de expressão utilizando o software OligoExplorer 1.2 (GeneLink). As sequências resultantes dos genes e dos primers foram encaminhadas à empresa Integrated DNA Technologies (IDT) para síntese química.

2.6. **Amplificação dos genes sintéticos do Interferon- β e Sialil-transferase**

Após ensaios para verificação das melhores condições experimentais, as amplificações das sequências gênicas de interesse foram realizadas utilizando os pares de iniciadores previamente adquiridos como demonstrado na tabela 1. A amplificação foi realizada em termociclador primeiramente a 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial e alternando em um total de 35 ciclos a temperatura de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 50° C (para primers IFN- β) e 55° C (para primers

HST) por 40 segundos para anelamento e 72°C por 1 minutos para extensão, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 7 min.

Tabela 1. Conjunto de iniciadores utilizados nos experimentos de PCR.

Nome do iniciador (enzima para clonagem)	Sequência (5'-3')	Orientação
IFN-β FW (<i>Xba</i>I)	TCTAGAAATCAATTACAAGCAGCTC	Direto
IFN-β RV (<i>Kpn</i>I)	GGTACCGTTTTGGAAATTCCG	Reverso

As amplificações tinham como objetivo obter o produto de PCR para posterior clonagem em sistema pGEM-T para isso foi utilizado a enzima DNA polimerase GoTaq® (Promega) que adiciona por meio de uma reação denominada *A-tailing procedure* uma base nitrogenada adenina (A) na extremidade 3' do gene amplificado. Os amplicons foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

2.7. Clonagem nos plasmídeos pGEM T e pGEM T-Easy

O Sistema pGEM-T e pGEM-Teasy (Figura 6) de clonagem (Promega) é constituído de plasmídeos adquiridos na forma linear e que possuem em suas extremidades 3' uma deoxitimidina (T) que permite a inserção direta dos amplicons adenilados obtidos pela reação de PCR. A inserção da sequência de interesse ocorre mediante a incubação do plasmídeo e do produto adenilado na presença da enzima T4 DNA ligase. Após a reação de circularização com a inserção do gene o plasmídeo recombinante foi introduzido em bactérias competentes *E. coli* previamente preparadas para a propagação plasmidial.

2.8. Cultivo de *E. coli*

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi cultivada em meio LuriaBertani (LB) líquido estéril, constituído de 1% de triptona (p/v); 0,5% de extrato de levedura (p/v); 1% de NaCl (p/v). Foi adicionado como método de seleção das células transformadas com os vetores de expressão pLEXYs o antibiótico ampicilina (concentração final de 100 μ g/mL) após a esterilização do meio e antes da realização dos inóculos. Para a seleção dos clones em placas de petri após as transformações foi utilizado o meio

LB sólido que contém todos os reagentes do meio LB líquido com a adição de 1,5% (p/v) de ágar.

2.9. Preparo de *E. coli* DH5 α competentes e transformação por choque térmico

O preparo de células competentes, foi realizado com pré-inóculo de 5mL em meio LB líquido sem adição de antibióticos e com alíquotas de 50 μ L de *E. coli* DH5 α estocadas em -80°C . Após incubação overnight sob agitação a 180 rpm a 37°C , o pré-inóculo foi expandido para 250mL em meio SOB (2% de triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 0,05% de cloreto de sódio (p/v), 2,5 mmol.L $^{-1}$ de cloreto de potássio e 20 mmol.L $^{-1}$ de cloreto de magnésio) e incubado a 18°C sob agitação de 150 rpm até atingir D.O 600 nm entre 0,5 de 0,6. Atingida a D.O, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e 4°C . O sobrenadante foi descartado, e as células sedimentadas foram gentilmente ressuspensas em 30 mL de solução TB (15 mmol.L $^{-1}$ de CaCl $_2$, 250 mmol.L $^{-1}$ de KCl, 10 mmol.L $^{-1}$ de HEPES, 55 mmol.L $^{-1}$ de MnCl $_2$ em pH 6,7) gelada e filtrado, incubadas em banho de gelo por 10 minutos. Decorrido este tempo repetiu-se o passo anterior e ressuspendeu as células em 8mL de TB gelado e 7% de DMSO e incubadas em banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente o volume total foi distribuído em alíquotas de 100 μ L, congelados primeiramente em nitrogênio líquido e estocados em ultrafreezer a -80°C .

As transformações bacterianas foram realizadas com as alíquotas de 100 μ L de células ultracompetentes previamente preparadas. Após a retirada do ultrafreezer foram adicionados os DNAs plasmidiais transformantes (mínimo de 50ng), as células mantidas em banho de gelo por 30 minutos e depois submetidas a choque térmico em banho-maria a 42°C por 45 segundos. Após esta etapa, retornamos as células para o banho de gelo por mais 2 minutos, depois suspensas em 1 mL de meio LB ou SOB (preferencialmente) sem antibiótico e incubadas de 1 a 2 horas sob agitação a 180 rpm a 37°C (no caso dos vetores exclusivamente bacterianos) ou 30°C (temperatura recomendada para manutenção dos plasmídeos LEXSY em *E. coli*). Após a recuperação das culturas, as mesmas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado até o restante de 100 μ L que foi usado para ressuspender o pellet. Esse volume então foi utilizado para plaqueamento com

auxílio de uma alça de Drigalski em LB-ágar, com o antibiótico de seleção ampicilina. As placas foram mantidas a 30°C por 40 horas (para vetores LEXSY).

2.10. Tratamento com enzimas de restrições

As reações e condições de digestão, como tampão, unidades de enzima, e tempo de digestão foram adaptadas para cada enzima utilizada. As enzimas *XbaI*, *KpnI*, *BglII*, *NotI* e *SpeI* foram adquiridas pela empresa Cellco. Os protocolos de digestão foram desenvolvidos de acordo com as recomendações deste fabricante. Após as reações de digestão os DNAs foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da eficiência do processo e posterior purificação das bandas de interesse com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

2.11. Clonagem e características dos plasmídeos pLEXSY

Os vetores de expressão integrativos constitutíveis do Sistema LEXSY permitem que por meio dos sítios de restrição disponíveis e como o gene é inserido, as proteínas recombinantes de interesse sejam expressas e mantidas no citoplasma da célula hospedeira ou endereçadas para secreção extracelular. O que define a secreção é a presença da sequência da fosfatase ácida secretada de *L. Mexicana* (LMSAP), utilizada como peptídeo sinal, disponível nos plasmídeos.

Dos plasmídeos utilizados neste trabalho, apenas pLEXSY-neo2 (Figura 2a)) apresenta essa configuração. Por este motivo foi o primeiro vetor escolhido para a clonagem do gene do IFN- β utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *KpnI*. Dessa maneira mantemos a sequência do peptídeo sinal para expressão proteica secretada e adicionamos ao gene também a cauda de histidina. O plasmídeo pLEXSY-egp-SAT2 (Figura 2b) foi utilizado após retirada da sequência codificante “enhanced green fluorescent protein” (egfp) pelas enzimas de restrição *BglII* e *NotI* para a inserção do cassete de expressão inteiro (Peptídeo sinal, gene e cauda de histidina) digerido do plasmídeo já clonado pLEXSY-neo2+IFN- β . Em relação ao plasmídeo pLEXSY_IE-blecherry4 (Figura 2c), foi utilizado apenas a sequência correspondente à marca de seleção para bleomicina fusionada ao gene repórter *cherry* (Blecherry). Essa sequência foi retirada com as enzimas de restrição *SpeI* e

NotI e inserida no plasmídeo de expressão já clonado pLEXY-neo2+IFN- β digerido com as mesmas enzimas.

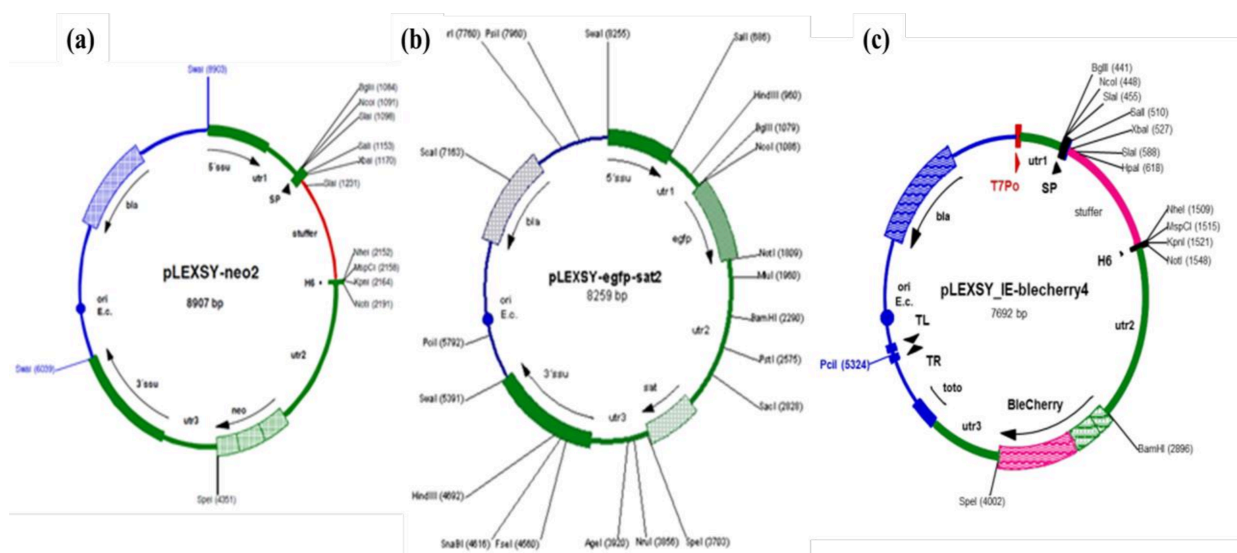


Figura 2. Mapa dos vetores de expressão constitutiva integrativa pLEXY. O fragmento destacado em vermelho em (a) corresponde a sequência do *stuffer* liberado durante a digestão para inserção do gene de interesse. A região em azul destaca a sequência que possui a origem de replicação bacteriana e marca de seleção para ampicilina que antes da transfeccção deve ser retirada pela enzima de restrição *SwaI*. Após a linearização do vetor realizada pela enzima *SwaI*, as regiões de recombinação homóloga 5'ssu e 3'ssu, são utilizadas para integração no genoma do hospedeiro (cepa P10). Os sítios utr são regiões transcritas e não traduzidas de *L. tarentolae*, adicionadas com a finalidade de fornecer os sinais de *trans-splicing* apropriados para as modificações pós-transcricionais dos mRNAs da proteína alvo e sinais de início de tradução típicos de tripanossomatídeos.

Para confirmar a inserção dos genes de interesse nos vetores de expressão foi realizado um PCR utilizando iniciadores específicos dos plasmídeos pLEXY, o *primer forward* P1442 (5'- CCGACTGCAACAAGGTGTAG-3' – Código PM110) e *reverse* A264 (5'-CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG-3'- Código PM101) incluídos no kit LEXSY. O primer direto P1442 anela na região 5' de inserção (cerca de 80 pb a montante do ATG) e o iniciador inverso A264 anela na região 3'do inserto (cerca de 80 pb a jusante do códon de parada).

2.12. Transfeccção e seleção clonal de *L. tarentolae*

A cepa contendo pelo menos uma cópia (1X) foi gerada transfetando o plasmídeo clonado pLEXSY-blecherry+IFN- β . A segunda cepa contendo pelo menos duas cópias (2X) foi gerada a partir da transfecção do plasmídeo construído pLEXSY-neo2+IFN- β na cepa 1X. A terceira cepa contendo pelo menos três cópias (3X) foi gerada a partir da transfecção do plasmídeo construído pLEXSY-egp-SAT2+IFN- β na cepa 2X.

Para a Transfecção as células da linhagem P10 com densidade de 6×10^7 células/mL foram sedimentadas por centrifugação a $3000 \times g$ por 5 minutos e suspensas no meio remanescente na concentração de 10^8 células/mL. As células foram transferidas para cuβs de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) e mantidas por 10 minutos em gelo juntamente com os DNAs plasmidiais transformantes (na concentração de 5 a 10 μ g) em um volume total de 400 μ L. A eletroporação foi efetuada no aparelho Gene Pulser (Bio-Rad) seguindo seguinte programa: voltagem de 450V, capacitância de 450 μ F e pulsos de 5 a 6 milissegundos. Imediatamente após o pulso elétrico as cuβs voltaram para o gelo por mais 10 minutos e decorrido este tempo as células foram transferidas para 5 mL de BHI suplementado com hemina, penicilina-estreptomicina e incubadas nas condições de cultivo por 48 horas para recuperação das células. Após esse tempo foi adicionado o(s) antibiótico(s) de seleção e analisado o seu tempo de ação com o auxílio de uma cultura de células como controle negativo transformadas sem material plasmidial, apenas com água. A seleção clonal foi realizada em placas de cultivo BHI-ágar preparadas com o meio BHI na concentração 2X, além da adição de soro fetal bovino inativado, tampão HEPES 1M pH 7.4, hemina e antibióticos (incluindo o de seleção). As placas foram incubadas em condições de cultivo por no mínimo 48 horas até ser possível visualizar colônias. Essas colônias foram expandidas em meio BHI líquido (com todas as suplementações já citadas) gradativamente em média de 1 a 2 dias: primeiramente em 200 μ L, depois em 500 μ L, 1 mL, 5 mL e finalmente 10 mL. O preparo de novos estoques para congelamento, tanto das cepas transformadas como das não transformadas, e o plaqueamento em meio sólido era realizado sempre que as células já estavam recuperadas, e com uma densidade de 8×10^7 células/mL. Para o congelamento, em 9 mL das culturas adicionou-se 3 mL de glicerol 80% estéril, misturado gentilmente por inversão e as células foram distribuídas em alíquotas de 2 mL por criotubo, que foram mantidos 10 minutos a temperatura ambiente, 1 hora incubados em gelo, por 16 horas a -20°C e depois

transferidos para ultrafreezer a -80°C . Para reativação das células de *L. tarentolae* estocadas a -80°C , o conteúdo total de um criotubo era inoculado em 10 mL de BHI (suplementado com hemina, contendo antibióticos apropriados, e 10% de soro fetal bovino) e as células recuperadas por sucessivas passagens a cada 2 ou 3 dias, em diluições de 1:10 ou 1:20, dependendo da densidade celular.

2.13. Validação de integração genômica dos vetores de DNA em clones de *L. tarentolae*

Com o objetivo de se avaliar se houve a inserção do cassete de expressão no locus do cromossomo da célula hospedeira, a presença do gene do IFN- β e também verificar a presença dos vetores de expressão com marcas de seleção diferentes, foi realizado um ensaio de PCR. Para a reação utilizou-se o material genômico das culturas de *L. tarentolae* após a transfecção, extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification-Promega. A partir da fita molde de DNA genômico extraído das células selecionadas, foi realizado um PCR com iniciadores específicos fornecidos pela empresa Jena Bioscience que anelam em regiões endógenas da *Leishmania*, o direto F3001 e o reverso F3002. O oligonucleotídeo direto F3001 hibridiza com a região 5' ssu presente somente no cromossomo da célula hospedeira, enquanto o reverso F3002 hibridiza a região 3' ssu. Para o primer F3001, foi utilizado os oligonucleotídeos reversos específicos do IFN- β . Para o primer F3002 foram utilizados os oligonucleotídeos diretos específicos para sequência de cada marca de seleção A708 (bleo), H4662 (neo) e F2999 (sat) (Tabela 2). Como controle negativo da reação foi utilizado o material genômico extraído de células selvagens. Além dos PCR de recombinação foi possível verificar a presença de pelo menos um dos vetores de expressão, o pLEXY-blecherry+IFN- β , contido em todas as cepas geradas, através da microscopia de fluorescência pela presença da proteína *cherry*. A fluorescência Cherry fusionada ao gene que confere resistência de seleção com o antibiótico Bleomicina, pode ser mensurada ou visualizada a 590 nm (excitação) e 610 nm (emissão).

Tabela 2. Conjunto de iniciadores utilizados nos experimentos de PCR de recombinação.

Nome do	Sequência	Orientação	Código
---------	-----------	------------	--------

iniciador	(5'-3')		Jena
F3001	GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG	Direto	PM-105
F3002	CTGCAGGTTACCTACAGCTAC	Reverso	PM-104
A708 (bleo)	GATCCACCGCATGGCCAAGTTGACCAGTG-	Direto	PM-107
H4662 (neo)	GGATCCAATATGGGATCGGCCATTG	Direto	PM-118
F2999 (sat)	CCTAGTATGAAGATTTTCGGTGATC	Direto	PM-103

2.14. Curva de Crescimento

A curva de crescimento com a expressão de IFN- β foi realizada comparando as cepas transfectadas com um, dois ou três vetores de expressão. A curva foi feita medindo O.D. a 600nm de cada célula recombinante em diferentes a cada 24 horas. O cultivo foi realizado em triplicatas para cada cepa, utilizando 100mL de BHI suplementado com Hemina, em garrafas de cultivo sob agitação. Na fase estacionária (especificamente no dia 4) foram coletados 10mL do cultivo de cada triplicata de cada cepa para extração de DNA, RNA e proteínas.

2.15. Extração de DNA, RNA e proteínas

As células coletadas foram centrifugadas a 5000g por 5 minutos e as frações de sedimentos celulares e sobrenadante separadas em tubos distintos. O preparo das amostras de sobrenadante foi realizado segundo manual LEXSY. Para precipitação das proteínas secretadas, ao sobrenadante foi adicionado uma solução de TCA 50% (concentração final de 10%). O volume final foi mantido a 4°C overnight e posteriormente centrifugado a 15000 x g, por 15 minutos e 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspende-se o pellet em acetona 100% gelada. Essa lavagem com acetona foi realizada pelo menos 5 vezes. Foi realizada outra centrifugação (com as mesmas configurações da anterior) e o pellet ressuspendido com PBS. Os sedimentos de células previamente separados do meio de cultivo foram suspensos diretamente em 1mL de Trizol para extração de RNA. Após o tempo de 5 minutos de incubação no gelo foi adicionado 200 μ L de clorofórmio para a separação das fases, e essa solução deixada no gelo por 15

minutos. Centrifugou-se por 12000g a 4°C e 15 minutos. Transferiu-se a fase aquosa adquirida na preparação das amostras para um tubo limpo para posterior adição de 500 µL de isopropanol gelado (misturado por inversão). O restante do volume foi utilizado para extração de DNA e proteína seguindo a recomendações do fabricante. Após 10 minutos de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o RNA sedimentado com 1mL de etanol 70%. Após novamente serem submetidas a centrifugação o sobrenadante foi descartado e utilizou-se 20 µL de água livre de RNase para ressuspensão do pellet.

Após a extração do RNA celular total o material foi quantificado e em seguida o submetido a digestão com uma enzima DNase I (Invitrogen, Cat# 18068-015) seguindo as orientações do fabricante. O produto da digestão com a DNase foi utilizado para a síntese de uma molécula de cDNA numa reação de RT-PCR. Após a síntese do cDNA o produto da reação foi utilizado em outra reação de PCR utilizando-se a enzima Taq DNA Polimerase (Cellco) e os primers e condições de reação de cada gene.

2.16. Análise quantitativa por qPCR e Western Blot da expressão de IFN-β

Para o ensaio de qPCR as amostras foram analisadas com duas repetições técnicas, em uma mesma placa de reação utilizando os primers para gene IFN-β e para o gene endógeno alfa-tubulina. O DNA de cada clone foi extraído e utilizado como molde em reações de qPCR com o objetivo de quantificar o número de cópias e o cDNA produzido a partir de RNA extraído de cada clone foi utilizado para avaliar o nível de expressão do IFN-β. Inicialmente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração ótima de DNA e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 1µL de DNA ou cDNA (50ng), 5 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Promega), 0,1 µL de CXR Reference Dye, 1µL de primers diretos e reversos a 10µM e 2,9µL de água livre de RNase. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (slope) foi utilizada a fórmula Eficiência PCR= $(10^{(1/\text{slope})} - 1) \times 100$. A condição de amplificação para todos os sistemas foi 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60 °C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para obtenção da

curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1 °C durante 30 seg, partindo de 60 °C até atingir o limite de 94 °C. As amostras foram quantificadas utilizando os CTs e as curvas obtidas para cada primer e o nível de expressão foi calculada pelo método da curva padrão relativa com normalização dos valores da expressão de IFN- β em relação ao gene constitutivo alfa-tubulina.

Para análise das proteínas precipitadas do sobrenadante, a mesma quantidade de proteína para cada amostra (5 μ g) foi fervida após a adição de tampão de amostra em alíquotas de 20 a 30 μ L e foram aplicadas em SDS-PAGE 12,5%. Após a transferência para membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco. Foi realizado o bloqueio da membrana com uma solução de BSA (Albumina de soro bovino) 3% em PBS-T 1X incubada por 1 hora. Após o bloqueio as membranas foram lavadas com solução de PBS-T 1X por três vezes e incubadas por 1 hora com primário monoclonal de camundongo, contra cauda de histidina, diluído em 1:3000 (GE Healthcare; código: 27-4710-01). As membranas foram novamente lavadas por três vezes com solução de PBS-T 1X e posteriormente incubadas por 1 hora com anticorpo secundário contra camundongo conjugado à peroxidase (Sigma; código: A4416), em diluição de 1:7500. Após mais três lavagens a atividade peroxidásica foi detectada com o uso de solução de revelação contendo 10 mL de Tris 50 mM pH 7,5, 10 mg/mL de DAB e 10 μ L peróxido de hidrogênio 30%. Todos anticorpos foram diluídos em tampão PBS-T 1X. Após a revelação, a membrana foi digitalizada e os *pixels* das bandas correspondentes a proteína IFN- β foram mensurados pelo software Image J.

2.17. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 8.0.2 (Prism Software, Irvine, EUA). A comparação de três ou mais grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) para dados de natureza paramétrica seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de clones transformados com vetores de DNA contendo gene codificador de IFN- β

A sequência proteica do Interferon- β foi gerada com os códons otimizados para o gênero *Leshmania*. Por meio da característica básica do código genético ser degenerado, é possível alterar os códons ou nucleotídeos de uma sequência gênica e ainda manter a mesma sequência proteica traduzida. Nesse sentido, a técnica de otimização de códons tem sido muito utilizada para alterar a sequência gênica, retirando códons raros que podem tornar a tradução ineficiente e gerando códons mais abundantes no organismo e conseqüentemente mais RNAt (RNAs transportadores) aumentando a eficiência da produção proteica. Estudos já demonstraram que a otimização de códons pode dobrar a concentração proteica expressa no meio de cultivo, portanto barateando a produção, já que aumenta o rendimento mantendo-se as mesmas condições (Kianmehr, Mahrooz et al. 2016).

O gene de interesse foi amplificado a partir do gene sintético utilizando os pares de *primers* desenhados para cada um como demonstrado na tabela 1. O amplicom obtido através de PCR resultaram em banda única e definida, de 496 pb observada após a eletroforese. O material purificado dessas bandas foi utilizado nas subseqüentes reações de clonagem. Primeiramente em vetor de clonagem pGEM-Teasy e após reação de digestão com as enzimas *XbaI* e *KpnI*, clonagem no vetor de expressão pLEXY-neo2. O plasmídeo clonado pLEXY-neo2+IFN- β foi utilizado como molde para construção de mais dois vetores de expressão (pLEXY-egfp-SAT2 e pLEXY-blecherry) para a mesma proteína, porém com diferentes marcas de seleção (Figura 3). Após a construção e validação dos plasmídeos de expressão foram inseridos por transformação em *E. coli* (DH5 α) para multiplicação plasmidial e posteriormente extraídos. Os testes para verificação da eficácia da clonagem foram realizados utilizando PCR e tendo com DNA molde os plasmídeos extraídos dos clones, digestão para observar a liberação do fragmento clonado e sequenciamento. Após a extração plasmidial dos clones selecionados como

positivos, os mesmos foram submetidos à reação de linearização pela digestão com a enzima de restrição *SwaI*. Após a eletroforese em gel de agarose 0,8% observou-se a formação de duas bandas no gel. A de aproximadamente 3000pb, correspondente a origem de replicação de *E. coli* e do gene de resistência a ampicilina e a outra banda de aproximadamente 6000pb para o vetor clonado, representando fragmento linearizado do cassete de expressão que será integrado

por recombinação homóloga no hospedeiro. A seleção clonal foi realizada em placas sólidas seletivas contendo os antibióticos específicos para cada plasmídeo. As colônias de maior crescimento observado foram retiradas das placas e expandidas em meio BHI líquido. Após a geração das cepas contendo um, dois ou três plasmídeos de expressão contendo o gene do IFN- β , cada uma foi cultivada em triplicatas biológicas sob agitação e o crescimento foi observado pela medição da O.D. a 600nm (Figura 3). Uma alíquota desse cultivo, coletada na fase estacionária foi utilizada para extração de DNA, RNA e proteínas que foram utilizados para os ensaios quantitativos e comparativos de expressão (Figura 3).

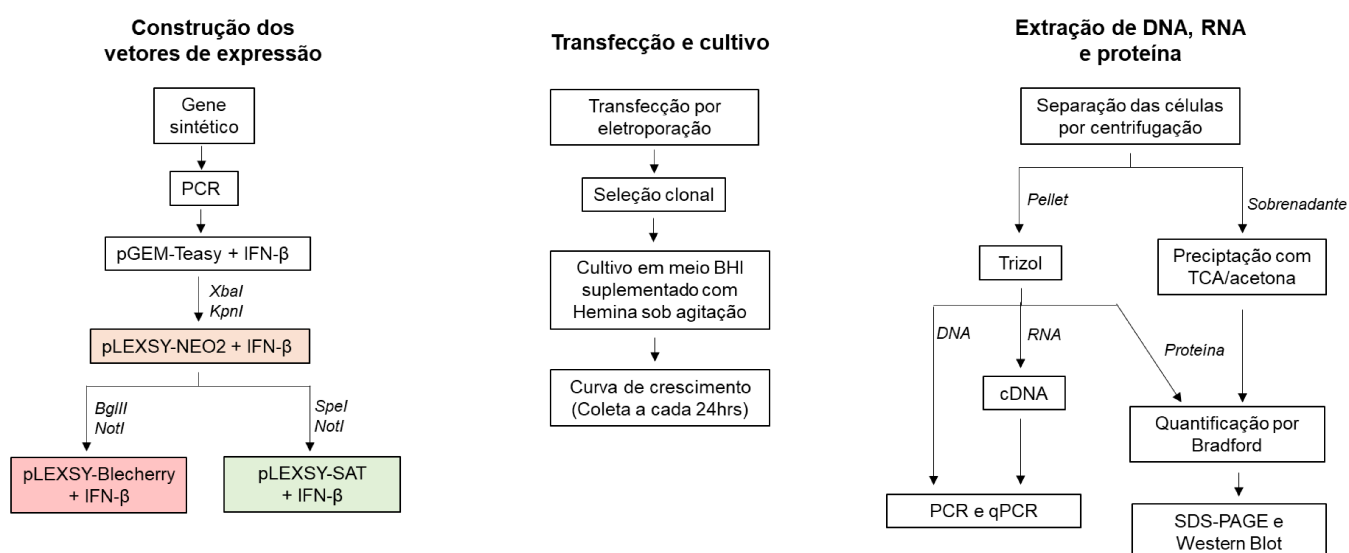


Figura 3. Fluxograma das metodologias utilizadas para construção dos plasmídeos de expressão, cultivo e validação da expressão gênica e proteica.

3.2. Validação da construção e da integração genômica dos plasmídeos de expressão

Três plasmídeos de expressão pLEXY com marcas de seleção diferentes foram gerados para expressão secretada de IFN- β (Figura 4a). Foram utilizadas quatro reações de PCR que serviram para constatar a inserção dos três cassetes de expressão do gene IFN- β no *locus* gênico das células transfectadas com as construções linearizadas. Em uma reação utilizaram-se os pares de oligonucleotídeos específicos *forward* F3001 e o *reverse* específico para o gene IFN- β e em outras utilizou-se o par de *primers forward* específicos para cada marca de

seleção e o *reverse* F3002. Como um dos controles negativos foi utilizado água no lugar de DNA e como outro controle foi utilizado o material genômico extraído de células de *L. tarentolae* selvagens da cepa P10. O oligonucleotídeo direto F3001 é específico para a região 5'ssu presente apenas no cromossomo do hospedeiro, enquanto oligonucleotídeo reverso F3001 é específico para a região 3'ssu (Figura 4b). Como uma validação adicional podemos observar a inserção do cassete de expressão do IFN-beta, utilizando o plasmídeo pLEXSY-blecherry, pela microscopia de fluorescência. Como essa construção foi a primeira utilizada nas transfecções, todas as cepas geradas possuem esse cassete de expressão, apresentam a mesma expressão do gene repórter e mesmo fenótipo observado na microscopia (Figura 4c).

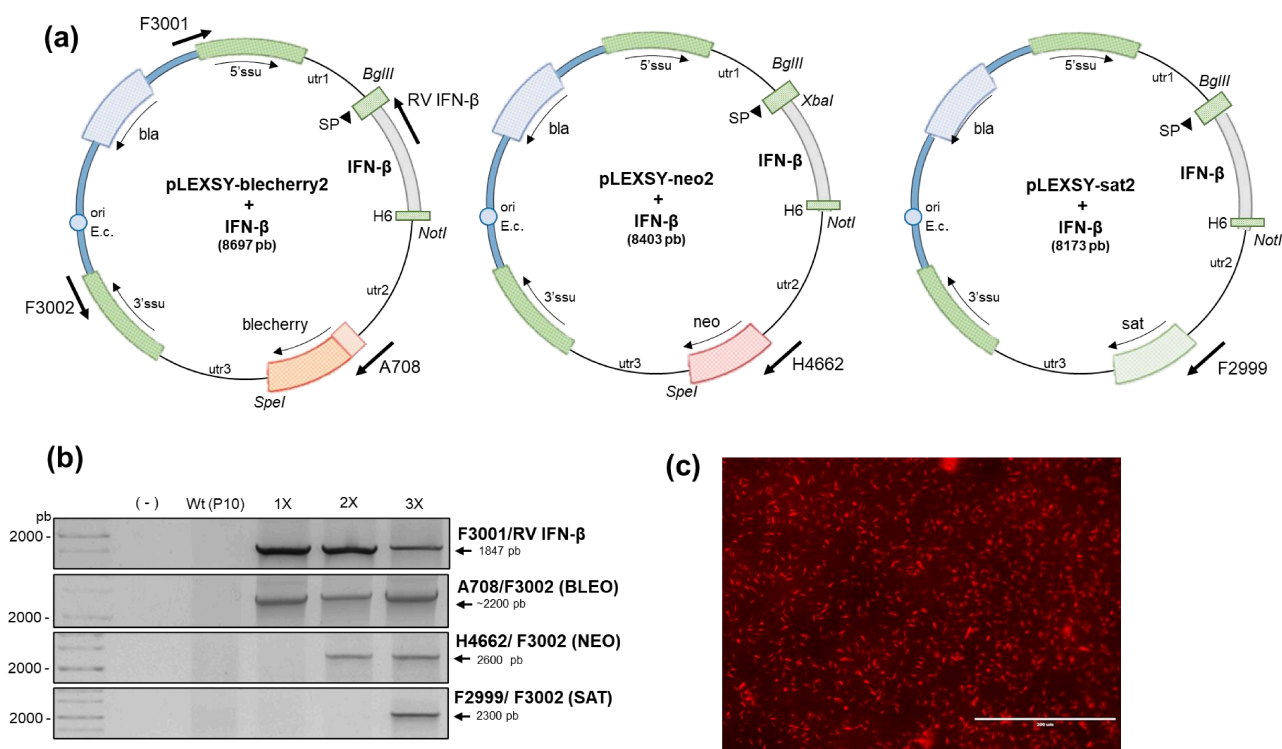


Figura 4. Construção dos plasmídeos de expressão da proteína IFN- β e validação de integração genômica. (a) Representação dos plasmídeos de expressão da proteína IFN- β , diferenciando as marcas de seleção para Bleomicina (blecherry), Neomicina (neo) e Nourseotricina (sat). A construção dos vetores PLXESY foi planejada para expressão secretada de IFN- β utilizando o peptídeo sinal, além da inserção da cauda de histidina. (b) Validação da integração constitutiva dos cassetes de expressão por PCR utilizando DNA genômico obtido de cada cepa. Os primers F3001/RV IFN- β amplificam a sequência correspondente a região 5' ssu cromossomal da *Leishmania* e a região 3' do gene IFN- β , contend em torno de 1847pb. Os amplicons observados utilizando o primer reverso F3002 e os primers diretos A708, H4662, F2999 são correspondents as sequências da região 3' ssu cromossomal da *Leishmania* e as marcas de seleção dos vetores de expressão blecherry, neo e sat respectivamente. (c) Microscopia de fluorescência validando a integração gênica do primeiro vetor de expressão utilizado nas três cepas obtidas. A fluorescência Cherry fusionada ao gene que confere resistência de seleção com o antibiótico Bleomicina, pode ser mensurada ou visualizada a 590 nm (excitação) e 610 nm (emissão).

3.3. Perfil de crescimento comparativo das cepas de *L. tarentolae* transfectadas com diferentes números de cópias genicas do IFN- β

Para se determinar o melhor momento de cultivo para obtenção dos transcritos e de proteína, foi realizado uma curva de crescimento comparando as cepas *L. tarentolae* obtidas com diferentes números de cópias gênicas do IFN- β e também a cepa selvagem. O crescimento máximo para as cepas testadas foi em

média no quarto dia, não diferenciando estatisticamente o valor de O.D. entre elas. Por esta razão, esse ponto foi escolhido para a coleta de 10 mL de cultivo de cada amostra para extração de DNA, RNA e proteínas.

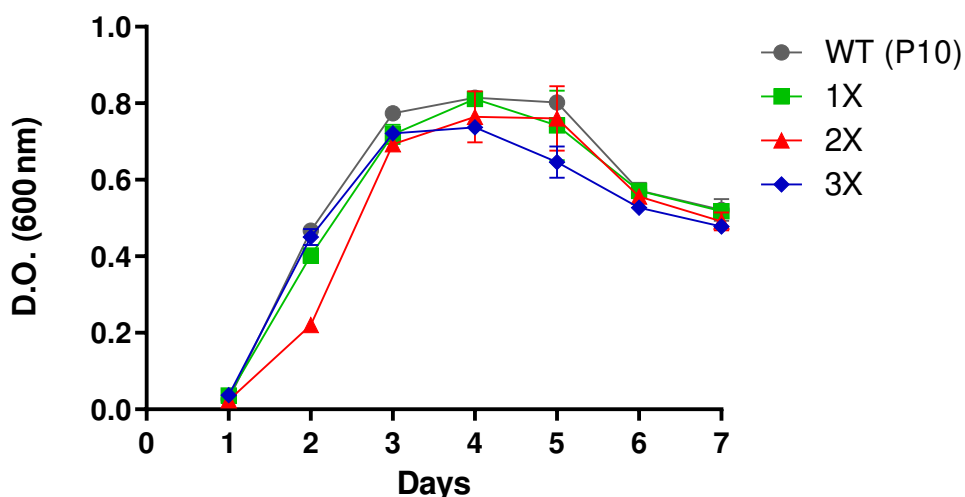


Figura 5. Curva de crescimento das cepas de *L. tarentolae* transfetadas com diferentes números de cópias genéticas do IFN- β . Curva de crescimento com a expressão de IFN- β comparando as cepas transfetadas com um, dois ou três vetores de expressão. A curva foi feita medindo O.D. a 600nm de cada célula recombinante a cada 24 horas.

3.4. PCR quantitativo do número de cópias gênicas encontrado no DNA total

O primeiro ensaio quantitativo que realizamos foi utilizando o DNA genômico extraído das cepas de *L. tarentolae* gerada com múltiplas cópias do gene IFN- β para avaliação do número de cópias integradas no genoma (Figura 6). Como esperado, houve aumento de números de cópias detectadas no genoma dos clones em correlação positiva com o número de vetores utilizados nas transformações. O clone 2x apresentou o dobro de cópias do gene codificador de IFN- β do que o clone 1x. Por outro lado, o número de cópias do clone 3x foi maior que os clones 1x e 2x em mais de uma escala de grandeza (aproximadamente 100 vezes). Esse resultado confirma que houve aumento de número de cópias com aumento de número de vetores e procedimentos de retransfecções realizados, porém o uso de alfa-tubulina com padrão endógeno pode não ser adequado, uma vez que este gene está no sítio de integração das construções e consequentemente tem seu número de cópias também alterado. Assim, esse ensaio deverá ser repetido utilizando como gene

endógeno um gene cópia única distante do locus de integração dos vetores e assim inferir quantidade de cópias real em cada cepa de *L. tarentolae* gerada.

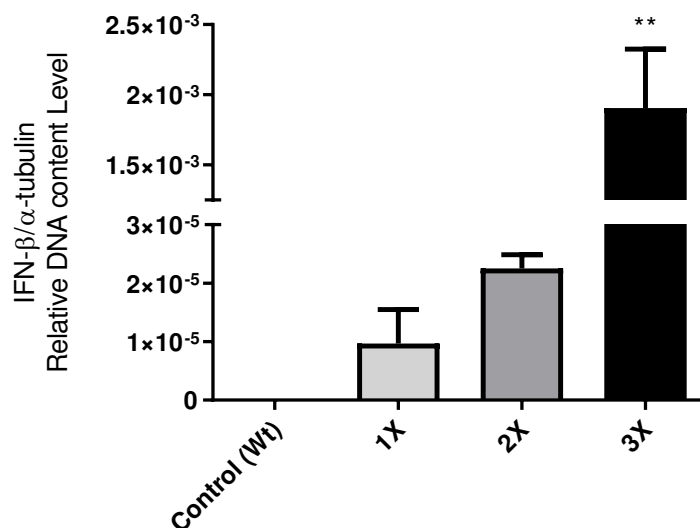


Figura 6. Ensaio de PCR quantitativo utilizando DNA das cepas de *L. tarentolae* transfectadas com diferentes números de cópias genicas do IFN-β. Os asteriscos indicam os valores das médias que diferem estatisticamente pelo método de ANOVA com correção de Tukey.

3.5. Expressão comparativa de transcritos e de proteínas das cepas de *L. tarentolae* transfectadas com diferentes números de cópias genicas do IFN-β

A presença de pelo menos três cópias de IFN-β aumentou a expressão de transcritos desse gene em torno de 180 vezes em comparação a cepa de *L. tarentolae* contendo pelo menos uma ou duas cópias (as cepas contendo pelo menos uma e duas cópias não diferenciaram na expressão de transcritos entre si) (Figura 7a).

Por meio do ensaio de Western Blot (Figura 7b), foi possível observar as bandas características de aproximadamente 25kDa compatíveis ao tamanho molecular encontrado na isoforma expressa da proteína IFN-β (forma glicosilada) como descrito em diferentes trabalhos já publicados ((Runkel, Meier et al. 1998, Dissing-Olesen, Thaysen-Andersen et al. 2008)). Não foram observadas as bandas equivalentes na linha onde foram aplicadas as amostras das células selvagens (WT)

(Não apresentado). As amostras foram aplicadas em triplicadas para cada cepa de *L. tarentolae* gerada (1X, 2X e 3X) com diferentes números de cópias gênicas de IFN- β . Os pixels das bandas relativa à proteína IFN- β glicosilada de aproximadamente 25kDa, foram quantificados pelo software Image J e os valores foram utilizados para gera o gráfico de barras apresentado (Figura 7b). Apesar da diferença de expressão proteica não ser tão visível na membrana de nitrocelulose, pela quantificação de pixels existe uma diferença estatística entre as cepas 1X e 3X. O que corrobora com os resultados obtidos e apresentados anteriormente pelo PCR quantitativo usando o DNA e o cDNA das mesmas cepas. A pequena diferença, no entanto, não se compara a diferença observada nos ensaios de qPCR, e isso se deu provavelmente pela aplicação normalizada da mesma quantidade de proteínas no ensaio de SDS-PAGE e Western Blot. Como o IFN- β é a proteína majoritária contida no precipitado do meio de cultivo, normalizando a quantidade de proteínas totais, espera-se ver também uma quantidade equivalente aproximada dessa proteína específica. No entanto, mesmo após a normalização observamos uma diferença estatística entre as duas cepas (1X e 3X). Para melhor validação desse resultado, e confirmação da otimização de expressão proteica, um segundo ensaio de Western Blot ou ELISA poderá ser realizado, aplicando o mesmo volume de amostra (sem normalização da concentração) e refletindo o real valor de quantidade proteica presente em cada amostra extraída de cada cepa de *L. tarentolae*.

O ensaio de Western Blot descrito acima foi realizado também com os extratos proteicos obtidos com o *pellet* das culturas e extraído com Trizol, porém não foram observadas bandas após a revelação. Como espera-se que a proteína de interesse seja expressa e secretada pela presença do peptídeo sinal, a visualização da expressão intracelular fica restrita ao limite de detecção do método.

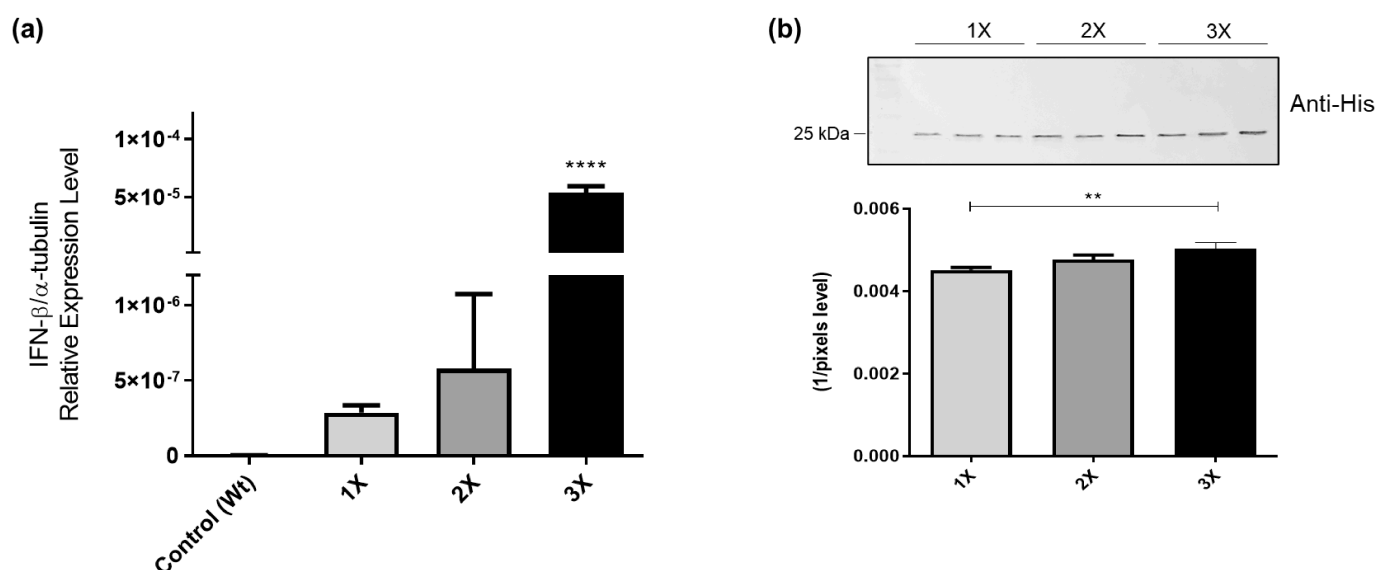


Figura 7. Ensaio de PCR quantitativo utilizando cDNA das cepas de *L. tarentolae* transfetadas com diferentes números de cópias genicas do IFN-β e expressão proteica. (a) Expressão quantitativa relativa dos transcritos obtidos das cepas transfetadas com um, dois ou três vetores de expressão. **(b)** Western Blot utilizando anti-His e anticorpo secundário anti-mouse-IgG com peroxidase. Os pixels das bandas relativa à proteína IFN-β glicosilada de aproximadamente 25kDa, foram quantificados pelo software Image J e os valores foram utilizados para gerar o gráfico de barras apresentado. Os asteriscos indicam os valores das médias que diferem estatisticamente pelo método de ANOVA com correção de Tukey.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O principal intuito deste trabalho se baseou no desenvolvimento de uma plataforma de expressão mais acessível de glicoproteínas com propriedades bioquímicas e farmacocinéticas mais semelhantes ao organismo de origem utilizando *L. tarentolae*. Esse organismo tem sido muito estudado como alternativa a outros sistemas de expressão, se tornando um meio mais fácil, barato e relativamente mais eficiente na produção de glicoproteínas terapêuticas. Como apresentado na seção de revisão de literatura apesar de todas as vantagens que a produção de proteínas recombinantes utilizando *L. tarentolae* como hospedeiro apresenta, o perfil de glicosilação destes organismos não é idêntico ao de mamíferos.

As abordagens apresentadas neste projeto visaram entender mais sobre as vias metabólicas encontradas nestes organismos que pudessem indicar uma alternativa de tornar o sistema de expressão em *L. tarentolae* mais otimizado. Tanto na otimização da glicosilação quanto na eficiência de produção dessas proteínas. Como já se sabe, o sistema LEXSY de expressão é característico por possuir toda uma metodologia já estabelecida com plasmídeos planejados e desenvolvidos para a produção de proteínas heterólogas com o padrão de glicosilação semelhante ao de mamíferos com alto rendimento. Porém, esse método falha na adição do último glicano da cadeia glicídica, característico das proteínas *N*-glicosiladas, o ácido siálico. Somente essa diferença pode acarretar na diminuição da atividade de fármacos, com também gerar efeitos colaterais e adversos ao tratamento.

Por meio das metodologias de genômica e metabolômica apresentadas foi possível desenvolver uma primeira estratégia como tentativa de resolver esse problema por meio da expressão heteróloga da enzima sialiltransferase, e tendo a proteína interferon- β como alvo para validação do potencial das novas linhagens otimizadas. O uso do IFN- β neste trabalho é destacado tanto pela sua importância como fármaco, pois é utilizado no tratamento de doenças graves, quanto pelo impacto econômico gerado em sistemas públicos e privados de saúde devido à alta demanda e alto custo de produção. Também não são encontradas publicações que citam a expressão dessa proteína em *L. tarentolae*.

Todas as etapas de clonagem, expressão proteica e ensaios de atividade apresentaram resultados satisfatórios que demonstram a eficiência do método que poderá ser utilizado para outras glicoproteínas de interesse biotecnológico.

Em relação aos experimentos utilizando cepas de *L. tarentolae* contendo múltiplas-cópias gênicas de IFN- β é importante destacar que a presença de pelo menos três cópias desse gene não alterou o crescimento celular em relação as cepas contendo pelo menos uma ou duas cópias, e também em relação a cepa selvagem. Ensaios de qPCR demonstraram um aumento significativo de cópias e de transcritos na cepa de *L. tarentolae* transfectada com três plasmídeos de expressão. E o ensaio de expressão proteica utilizando Western Blot validou uma diferença de expressão da proteína IFN- β , porém, ensaios de purificação de proteínas e otimização de cultivo ainda precisam ser realizados para validação da eficiência das cepas geradas em produzir proteínas glicosiladas com alto rendimento.

5. BIBLIOGRAFIA

ABÈS, R.; TEILLAUD, J. L. Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic. IgGPharmaceuticals, 2010.

AGREN, R. et al. The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*. PLoS Computational Biology, v. 9, 2013.

ALBRECHT, S. (2014). Therapeutic proteins: facing the challenges of glycobiology. Journal of Health Policy & Outreach Research. 1. 12-17

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. Components, v. 6597, p. 1–6, 2011.

ANVISA, 2017. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos>. Acesso em 24/09/2017.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic acids research, v. 38, p. D457–62, 2010.

BAKER, M. Protein engineering: navigating between chance and reason. Nature methods, v. 8, p. 623–626, 2011.

BARRETO-BERGTER, E. et al. Structures of Glycolipids Found in Trypanosomatids: Contribution to Parasite Functions, 2010.

BASILE, G.; PETICCA, M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. Molecular Biotechnology, v. 43, p. 273–278, 2009.

BERGER, M.; KAUP, M.; BLANCHARD, V. Protein glycosylation and its impact on biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2012.

BONDT, A. et al. IgG Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. Molecular & cellular proteomics: MCP, v. 31, p. 1–30, 2014.

BORNSCHEUER, U.; KAZLAUSKAS, R. J. Survey of protein engineering strategies. Current Protocols in Protein Science, v. 1, 2011.

BREITLING, R., S. KLINGNER, N. CALLEWAERT, R. PIETRUCHA, A. GEYER, G. EHRLICH, R. HARTUNG, A. MULLER, R. CONTRERAS, S. M. BEVERLEY AND K. ALEXANDROV (2002). "Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production." *Protein Expr Purif* 25(2): 209-218.

BRETON, M. et al. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 6372–6382, 2005.

CHUSACULTANACHAI, S.; YUTHAVONG, Y. Random mutagenesis strategies for construction of large and diverse clone libraries of mutated DNA fragments. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 270, p. 319–334, 2004.

CUI, Q. et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nature biotechnology*, 2008.

DALTON, A. C.; BARTON, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein science : a publication of the Protein Society*, v. 23, p. 517–25, 2014.

DANGORIA, N. S. et al. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 23459–23468, 2002.

DE GAUDENZI, J. G., G. NOE, V. A. CAMPO, A. C. FRASCH AND A. CASSOLA (2011). "Gene expression regulation in trypanosomatids." *Essays Biochem* 51: 31-46.

DEMAIN, A. L. AND P. VAISHNAV (2009). "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms." *Biotechnol Adv* 27(3): 297-306.

DINGERMANN, T. (2008). "Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges." *Biotechnol J* 3(1): 90-97.

DISSING-OLESEN, L., M. THAYSEN-ANDERSEN, M. MELDGAARD, P. HOJRUP AND B. FINSEN (2008). "The function of the human interferon- β 1a glycan determined in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* 326(1): 338-347.

DOURIS, V. et al. Stably Transformed Insect Cell Lines: Tools for Expression of Secreted and Membrane-anchored Proteins and High-throughput Screening Platforms for Drug and Insecticide Discovery. *Advances in Virus Research*, 2006.

DWEK, R. A. Biological importance of glycosylation. *Developments in biological standardization*, v. 96, p. 43–47, 1998.

DWEK, R. A. et al. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 1, p. 65–75, 2002.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

EVALUATEPHARMA: World preview 2014, outlook to 2020: Returning to growth

FERGUSON, M. A. (1997). "The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352(1359): 1295-1302.

FERNANDEZ, F. J. AND M. C. VEGA (2013). "Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology." *Curr Opin Struct Biol* 23(3): 365-373.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, v. 39, 2011.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Insights on the structure of native CNF, an endogenous phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1844, n. 9, p. 1569–1579, set. 2014.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature biotechnology*, v. 22, p. 1409–1414, 2004.

GHADERI, D., M. ZHANG, N. HURTADO-ZIOLA AND A. VARKI (2012). "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation." *Biotechnol Genet Eng Rev* 28: 147-175.

GHOSHAL, A. et al. Sialic acids in different *Leishmania* sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses. *Glycobiology*, v. 20, p. 553–566, 2010.

GHOSHAL, A.; MANDAL, C. A Perspective on the Emergence of Sialic Acids as Potent Determinants Affecting *Leishmania* Biology. *Molecular Biology International*, 2011.

GLOCKSHUBER, R.; SCHMIDT, T.; PLÜCKTHUN, A. The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, v. 31, p. 1270–1279, 1992.

GOLDENBERG, M. M. Multiple sclerosis review. [s.l: s.n.]. v. 37p. 175–84.

GRÄSLUND, S. et al. Protein production and purification. *Nature methods*, v. 5, p. 135–146, 2008.

GUO, Z. Y.; JIA, X. Y.; FENG, Y. M. Replacement of the interchain disulfide bridge-forming amino acids A7 and B7 by glutamate impairs the structure and activity of insulin. *Biological Chemistry*, v. 385, p. 1171–1175, 2004.

HAN, Y. K., T. Y. KOO AND G. M. LEE (2009). "Enhanced interferon- β production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature." *Biotechnol Prog* 25(5): 1440-1447.

HEMAYATKAR, M. et al. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in *Leishmania tarentolae*. *Biotechnology Journal*, v. 5, p. 1198–1206, 2010.

HOLTEN, J. VAN; PLATER-ZYBERK, C.; TAK, P. P. Interferon- β for treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis research*, v. 4, p. 346–352, 2002.

HRISTODOROV, D.; FISCHER, R.; LINDEN, L. With or without sugar? (A)glycosylation of therapeutic antibodies. *Molecular Biotechnology*, 2013.

HUA, Q. X. et al. The folding nucleus of the insulin superfamily: A flexible peptide model foreshadows the native state. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 28131–28142, 2006.

HUGHES, R. A.; MIKLOS, A. E.; ELLINGTON, A. D. Gene synthesis: Methods and applications. *Methods in Enzymology*, v. 498, p. 277–309, 2011.

INGA, R., S. DE DONCKER, J. GOMEZ, M. LOPEZ, R. GARCIA, D. LE RAY, J. AREVALO AND J. C. DUJARDIN (1998). "Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*." *Mol Biochem Parasitol* 92(2): 219-228.

J. SAMBROOK, E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. 1989

JERMUTUS, L. et al. Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: Phytase as a test case. *Journal of Biotechnology*, v. 85, p. 15–24, 2001.

KANEHISA, M. The KEGG database. *Novartis Foundation symposium*, v. 247, p. 91–101; discussion 101–103, 119–128, 244–252, 2002.

KAUFMAN, R. J. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb Haemost*, v.79, n.6, p.1068-79, Jun. 1998.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Finding better protein engineering strategies. *Nature chemical biology*, v. 5, p. 526–529, 2009.

KIANMEHR, A., A. MAHROOZ, M. OLADNABI, Y. SAFDARI, J. ANSARI, K. VEISI, M. EVAZALIPOUR, H. SHAHBAZMOHAMMADI AND E. OMIDINIA (2016). "Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*." *Mol Biotechnol* 58(8-9): 566-572.

KLATT, S. AND Z. KONTHUR (2012). "Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*." *Microb Cell Fact* 11: 97.

KUKURUZINSKA, M. A.; LENNON, K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Critical reviews in oral biology and medicine* : an official publication of the American Association of Oral Biologists, v. 9, p. 415–448, 1998.

KUMAR, S.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein engineering*, v. 13, p. 179–191, 2000.

LALONDE, M. E. AND Y. DUROCHER (2017). "Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells." *J Biotechnol* 251: 128-140.

LEE, J. M.; GIANCHANDANI, E. P.; PAPIN, J. A. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Briefings in Bioinformatics*, 2006.

LENNON, D. R., J. D. CHERRY, A. MORGENSTEIN, J. G. CHAMPION AND Y. J. BRYSON (1983). "Longitudinal study of influenza B symptomatology and interferon production in children and college students." *Pediatr Infect Dis* 2(3): 212-215.

LIU, H.; MAY, K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs*, 2012.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, ET AL. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W.H. Freeman; 2000. Section 17.7, Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/>

MARTÍNEZ-CALVILLO S, VIZUET-DE-RUEDA JC, FLORENCIO-MARTÍNEZ LE, MANNING-CELA RG, FIGUEROA-ANGULO EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010; Feb 11.

MASTRANGELI, R., M. ROSSI, M. MASCIA, W. PALINSKY, A. DATOLA, M. TERLIZZESE AND H. BIERAU (2015). "In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms." *Glycobiology* 25(1): 21-29.

MCAULEY, A. et al. Contributions of a disulfide bond to the structure, stability, and dimerization of human IgG1 antibody C(H)3 domain. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v. 17, n. 1, p. 95–106, 20 jan. 2008.

MEEHAN, H. A., R. A. LUNDBERG AND G. J. CONNELL (2000). "A trypanosomatid protein specifically interacts with a mammalian iron-responsive element." *Parasitol Res* 86(2): 109-114.

MENZEL, N. et al. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious Hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens*, v. 8, p. 21, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portal da Saúde, SUS. Avanços no tratamento do SUS beneficiam pacientes hemofílicos. 2015. (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17480-avancos-no-tratamento-do-sus-beneficiam-pacientes>. Acesso em 24/09/2017).

MIRZAAHMADI, S. et al. Expression of recombinant human coagulation factor VII by the lizard *Leishmania* expression system. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, 2011.

MISSLITZ, A., J. C. MOTTRAM, P. OVERATH AND T. AEBISCHER (2000). "Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes." *Mol Biochem Parasitol* 107(2): 251-261.

MISTRY, P. K.; WRAIGHT, E. P.; COX, T. M. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: Implications for treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, v. 348, p. 1555–1559, 1996.

MUHL, D.; FILLOUX, A. Site-directed mutagenesis and gene deletion using reverse genetics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1149, p. 521–39, 2014.

MUS-VETEAU, I. Heterologous expression and purification systems for structural proteomics of mammalian membrane proteins. *Comparative and Functional Genomics*, 2002.

NEHETE, J. Y. et al. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy reviews*, v. 7, p. 107–116, 2013.

NIWA, J. I. et al. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 28087–28095, 2007.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 267, p. 15–52, 2004.

PERALES, J. et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 227, p. 19–26, 1995.

PONTES, JOÃO GUILHERME M. et al. NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans, 2016.

RABERT, C. et al. Recombinants proteins for industrial uses: Utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013.

RABINER, L. R. A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition Proceedings of the IEEE, 1989. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=18626@ieeejrns.

RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 1131–1147, 2012.

RIEMERSMA, M., J. SANDROCK, T. J. BOLTJE, C. BULL, T. HEISE, A. ASHIKOV, G. J. ADEMA, H. VAN BOKHOVEN AND D. J. LEFEBER (2015). "Disease mutations in CMP-sialic acid transporter SLC35A1 result in abnormal alpha-dystroglycan O-mannosylation, independent from sialic acid." *Hum Mol Genet* 24(8): 2241-2246.

RUNKEL, L., W. MEIER, R. B. PEPINSKY, M. KARPUSAS, A. WHITTY, K. KIMBALL, M. BRICKELMAIER, C. MULDOWNNEY, W. JONES AND S. E. GOELZ (1998). "Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon- β (IFN- β)." *Pharm Res* 15(4): 641-649.

RUSSEL, E.; WANG, A.; RATHORE, A. Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry. In: *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry*. [s.l: s.n.]. p. 1–58.

SANTOS, R. M. M. DOS et al. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1717, p. 27–33, 2005.

SCHELLENBERGER, J. et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature protocols*, v. 6, p. 1290–1307, 2011.

SCHMIDT, Cleber A. et al. Avaliação da atividade e caracterização de eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 183-189, Apr. 2003.

SEGRÈ, D.; VITKUP, D.; CHURCH, G. M. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 15112–15117, 2002.

SELMAN, M. H. J. et al. Immunoglobulin G glycopeptide profiling by matrix-assisted laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 82, p. 1073–1081, 2010.

SEO, Y. J. et al. Validation of a HeLa Mx2/Luc reporter cell line for the quantification of human type I interferons. *Pharmacology*, v. 84, p. 135–144, 2009.

SIMPSON, L.; FRECH, G. C.; MASLOV, D. A. [10] RNA editing in trypanosomatid mitochondria. In: GIUSEPPE M. ATTARDI, A. C. B. T.-M. IN E. (Ed.). *Mitochondrial Biogenesis and Genetics Part B*. [s.l.] Academic Press, 1996. v. Volume 264p. 99–121.

SMALL, G. W.; MCLEOD, H. L.; RICHARDS, K. L. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ*, v. 1, p. e31, 2013.

SOYSA, R., K. D. TRAN, B. ULLMAN AND P. A. YATES (2015). "Integrating ribosomal promoter vectors that offer a choice of constitutive expression profiles in *Leishmania donovani*." *Mol Biochem Parasitol* 204(2): 89-92.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, v. 12, p. 43R–56R, 2002.

SUN, S.; GENG, L.; SHAMOO, Y. Structure and enzymatic properties of a chimeric bacteriophage RB69 DNA polymerase and single-stranded DNA binding protein with increased processivity. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 65, p. 231–238, 2006.

TAKEUCHI, M. et al. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 7819–7822, 1989.

TANABE, M.; KANEHISA, M. Using the KEGG database resource. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2012.

TENG, S.; SRIVASTAVA, A. K.; WANG, L. Sequence feature-based prediction of protein stability changes upon amino acid substitutions. *BMC genomics*, v. 11 Suppl 2, p. S5, 2010.

USMANI, S. S., G. BEDI, J. S. SAMUEL, S. SINGH, S. KALRA, P. KUMAR, A. A. AHUJA, M. SHARMA, A. GAUTAM AND G. P. S. RAGHAVA (2017). "THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics." *PLoS One* 12(7): e0181748.

VAN KARNEBEEK, C. D., L. BONAFE, X. Y. WEN, M. TARAIO-GRAOVAC, S. BALZANO, B. ROYER-BERTRAND, A. ASHIKOV, L. GARAVELLI, I. MAMMI, L. TUROLLA, C. BREEN, D. DONNAI, V. CORMIER, D. HERON, G. NISHIMURA, S. UCHIKAWA, B. CAMPOS-XAVIER, A. ROSSI, T. HENNET, K. BRAND-ARZAMENDI, J. ROZMUS, K. HARSHMAN, B. J. STEVENSON, E. GIRARDI, G. SUPERTI-FURGA, T. DEWAN, A. COLLINGRIDGE, J. HALPARIN, C. J. ROSS, M. I. VAN ALLEN, A. ROSSI, U. F. ENGELKE, L. A. KLUIJTMANS, E. VAN DER HEEFT, H. RENKEMA, A. DE BROUWER, K. HUIJBEN, F. ZIJLSTRA, T. HEISSE, T. BOLTJE, W. W. WASSERMAN, C. RIVOLTA, S. UNGER, D. J. LEFEBER, R. A. WEVERS AND A. SUPERTI-FURGA (2016). "NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development." *Nat Genet* 48(7): 777-784.

VEGA, M. C. (2016). "Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization." *Anticancer Res* 36(8): 4375.

WALSH, G. (2006). "Biopharmaceutical benchmarks 2006." *Nat Biotechnol* 24(7): 769-776.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotech*, v. 32, n. 10, p. 992–1000, out. 2014.

WEDEMEYER, W. J. et al. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, v. 39, p. 4207–4216, 2000.

WIELAND, F. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Biochimie*, v. 70, p. 1493–1504, 1988.

WIESE, M., T. ILG, F. LOTTSPREICH AND P. OVERATH (1995). "Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase." *EMBO J* 14(6): 1067-1074.

XIONG, A. S. et al. Chemical gene synthesis: Strategies, softwares, error corrections, and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008.

YOON, S. H.; KIM, S. K.; KIM, J. F. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent patents on biotechnology*, v. 4, p. 23–29, 2010.

ZAUNER, G. et al. Protein O-glycosylation analysis. *Biological Chemistry*, 2012.

ZAWAIRA, A. et al. A discussion of molecular biology methods for protein engineering. *Molecular Biotechnology*, 2012.

ZHANG, L.; CHOU, C. P.; MOO-YOUNG, M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotechnology Advances*, 2011.

Anexo I - Depósito de patente: *Leishmania tarentolae* otimizada, processo de produção, e uso para produção de glicoproteínas sializadas.



29409161811583988

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 003674 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE

VIÇOSA Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade:

Vicosa

Estado:

MG

CEP: 36570-900

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 15:42, Petição 870190018405

País: Brasil
Telefone: (31) 3899
1421
Fax: (31) 3899 2148
Email: propriedadeintelectual@ufv.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa

Jurídica CPF/CNPJ:

17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão

Público

Endereço: Avenida Antonio Carlos,

6627Cidade: Belo Horizonte

Estado:

MG

CEP:

31270-901

País:

BRASIL

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Leishmania tarentolae OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E

Utilidade (54): USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS

Resumo: A invenção refere-se ao processo de obtenção de Leishmania tarentolae transgênica assim como ao sistema de produção de glicoproteínas heterólogas sializadas por meio da Leishmania tarentolae transgênica. As glicoproteínas obtidas por meio do processo da presente invenção tem maior estabilidade e tempo de meia vida no organismo de mamíferos, podendo o processo ser usado para produção de glicoproteínas úteis para tratamento de patologias humanas ou animais. A invenção se refere ainda ao uso da Leishmania tarentolae transgênica para fabricação de glicoproteínas heterólogas sializadas.

Figura a publicar: 11

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 15:42, Petição 870190018405

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA

MENDESCPF: 07954090604

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Vereador Jose Valentino da Cruz, 54,

CentroCidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

36570-000

País:

BRASIL

Inventor 2 de 8

Telefone:

Fax:

Email: tiagoamendes@ufv.br

Nome: RENATO LIMA

SENRACPF:

11699893659

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Dr. Milton Bandeira, nº 230/403,

CentroCidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

36570-000

País:

BRASIL

Inventor 3 de 8

Nome: HIGOR SETTE

PEREIRACPF:

11033174661

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Bueno Brandão, N°182/802, Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

36570-000

País:

Inventor 4 de 8

BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: higor.pereira@ufv.br

Nome: JULIANA LOPES RANGEL

FIETTOCPF: 88979881649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua João Lopes Rosado, nº176, Bairro Quinta dos Guimarães

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

36570-420

País:

Inventor 5 de 8

BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: jufietto@ufv.br

Nome: ANDREA DE OLIVEIRA BARROS

RIBONCPF: 83035486620

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Condomínio Residencial Bosque Acamari, 55, Bairro Acamari

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

36570-000

País:

BRASIL

Inventor 6 de 8

Telefone:

Fax:

Email: abribon@ufv.br

Nome: TATIANA APARECIDA DE

OLIVEIRACPF: 08456487643

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Alex Dorofeff, 50/102,

Centro

Cidade:

Viçosa

Estado:

MG

CEP:

36570-000

País:

BRASIL

Inventor 7 de 8

Telefone:

Fax:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 15:42, Petição 870190018405

Nome: LIZA FIGUEIREDO FELICORI

VILELACPF: 05000719697

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Desembargador Paulo Mota, 1665, bloco 3, apt 802, Bairro
OuroPreto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

31310-340

País:

BRASIL

Inventor 8 de 8

Telefone:

Fax:

Email: liza@icb.ufmg.br

Nome: JACQUELINE ARAUJO

FIUZACPF: 05070524631

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Joaquim Jose Diniz, 20, apt 1001/3, Bairro Fernão Dias

Cidade: Belo Horizonte

Estado:

MG

CEP:

31910-520

País:

BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: jacfiuza2@hotmail.com

 Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pag GRU.pdf
Procuração Afonso e	Procuração UFV e DOU Dr.
Procuração	Reitora.pdf
ufv1.pdf Relatório Descritivo	procuracao ufmg-
descritivo.pdf	P1-Relatório
Reivindicação	P1-
Reivindicac_ões.pdf Desenho	P1-
Desenhos.pdf	
Resumo	P1-Resumo.pdf

 Sequências Biológicas


Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	N
Listagem de Sequências Biológicas em formato	o
TXT	m
	e
Acesso ao Patrimônio Genético	Listagem de sequencias.txt



Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético

Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL	001-9	00190.00009 02940.916188 11583.988172 1 77220000007000		
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CPF/CNPJ: 25944455000196 CAMPUS UFV PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUACAO SALA 04 , VICOSA -MG CEP:36570900				
Sacador/Avalista				
Nosso-Número 29409161811583988	Nr Documento 29409161811583988	Data de Vencimento 28/11/2018	Valor do Documento 70,00	(=) Valor Pago
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37 RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910				
Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1			Autenticação Mecânica	

BANCO DO BRASIL	001-9	00190.00009 02940.916188 11583.988172 1 77220000007000		
Local de Pagamento PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37				
Data do Documento 30/10/2018	Nr Documento 29409161811583988	Espécie DOC DS	Aceite N	Data do Processamento 30/10/2018
Uso do Banco 29409161811583988	Carteira 17	Espécie R\$	Quantidade	xValor 70,00
Informações de Responsabilidade do Beneficiário A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n o campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT				
(-) Desconto/Abatimento				
(-) Juros/Multa				
(-) Valor Cobrado				

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CPF/CNPJ: 25944455000196 CAMPUS UFV PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUACAO SALA 04 , VICOSA-MG CEP:36570900				
Sacador/Avalista			Código de Baixa	Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação



___ SIAFI2018-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
29/11/18 08:41 USUARIO : CELMAR
DATA EMISSAO : 08Nov18 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2018GR800310
UG/GESTAO EMITENTE : 154051 / 15268 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 154051 GESTAO : 15268
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: NOV18 VENCIMENTO: 08Nov18
DOC. ORIGEM: 154051 / 15268 / 2018NP002835 PROCESSO : 18-010567
RECURSO : 1
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161811583988
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
PAGAMENTO DE PEDIDO NACIONAL DE INVENCAO, NOSSO NUMERO 29409161811583988, PROC
ESSO 18-010567.
LANCADO POR : 92283535620 - MARILUCE UG : 154051 08Nov2018 12:39
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional

Em circulação desde 1º de outubro de 1862



SEÇÃO

2

ISSN 1677-7050

Sumário

Ministério do Turismo.....	57	NOMEAR
Ministério dos Transportes.....	57	
ÁGINA dos Poder Executivo.....	1	ÂNGELA MARIA PAIVA CRUZ, Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.
Presidência da República.....	1	
Ministério Público da União.....	58	Brasília, 19 de maio de 2015; 194ª da Independência e República.
Tribunal de Contas da União.....	1270	
Poder Legislativo.....	60	DILMA ROUSSEFF
Poder Judiciário.....	61	<i>Luiz Cláudio Costa</i>
Editais e Avisos.....	70	

Atos do Poder Executivo

Ministério da Defesa.....	8	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Ministério da Educação.....	14	DECRETOS DE 19 DE MAIO DE 2015
Ministério da Fazenda.....	14	NOMEAR NILDA DE FATIMA FERREIRA SOARES, Professora da Universidade Federal de Viçosa, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.
Ministério da Integração Nacional.....	14	A PRESIDENTA DA REPÚBLICA , no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput , inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, caput , inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve
Ministério da Justiça.....	14	NOMEAR NILDA DE FATIMA FERREIRA SOARES, Professora da Universidade Federal de Viçosa, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.
Ministério da Pesca e Aquicultura.....	48	

Ministério da Previdência Social.....	48	TABELA DE PREÇOS DE JORNAIS AVULSOS
Ministério da Saúde.....	48	Presidência da República
Ministério das Comunicações.....	48	DESPACHOS DA PRESIDENTA DA REPÚBLICA
Ministério das Relações Exteriores.....	48	PROVOCACIA-GERAL DA UNIÃO
Ministério de Minas e Energia.....	52	Exposição de Motivos
Ministério do Desenvolvimento Agrário.....	52	Nº 19, de 13 de maio de 2015. Afastamento do País do Advogado- Geral da União, com ônus, no período de 20 a 24 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para proferir palestra na Conferência Courts and the Rule of Law in Democratic Brazil . Autorizo. Em 19 de maio de 2015.
Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome.....	53	MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.....	53	Exposição de Motivos
Ministério do Esporte.....	53	Nº 20, de 14 de maio de 2015. Afastamento do País do Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação, com ônus, no período de 25 a 29 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para
Ministério do Meio Ambiente.....	53	
Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.....	54	
Ministério do Trabalho e Emprego.....	55	

Páginas	Distrito Federal	Demais Estados
de 02 a 28	R\$ 0,30	R\$ 1,80
de 32 a 76	R\$ 0,50	R\$ 2,00
de 80 a 156	R\$ 1,10	R\$ 2,60
de 160 a 250	R\$ 1,50	R\$ 3,00
de 254 a 500	R\$ 3,00	R\$ 4,50

- Acima de 500 páginas = preço de tabela mais excedente em páginas multiplicado por R\$ 0,0107

participar da IV Reunião da Comissão Mista Brasil Estados Unidos de Cooperação Científica e Tecnológica, de Fórum de Inovação organizado pelo Conselho Empresarial Brasil-Estados Unidos e de reuniões no Banco Interamericano de Desenvolvimento, na Administração Nacional de Aero-náutica e do Espaço, nos Institutos Nacionais de Saúde e no Museu Smithsonian. Autorizo. Em 19 de maio de 2015.

MINISTÉRIO DA FAZENDA

Exposição de Motivos

Nº 56, de 14 de abril de 2015. Alteração do afastamento do País do Ministro de Estado da Fazenda, objeto do despacho publicado no Diário Oficial da União de 10 de abril de 2015, Seção 2, página 1, para fazer constar o período de 14 a 22 de abril de 2015, mantidas as demais condições. Ciente. Em 19 de maio de 2015.

CASA CIVIL

PORTARIAS DE 19 DE MAIO DE 2015

CONTROLADORIA-GERAL DA UNIÃO

O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 911 - **NOMEAR**

RENATO DE LIMA FRANÇA, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Controladoria-Geral da União, código DAS 102.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO

AGRÁRIO

O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 912 - **EXONERAR**

RAILDY AZEVÉDO COSTA MARTINS do cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

Nº 913 - **NOMEAR**

LUCIMAR CEVALLOS MIJAN, para exercer o cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 914 - **EXONERAR**, a pedido,

HELDER SILVA CHAVES do cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 915 - **NOMEAR**

FERNANDO DE MAGALHÃES FURLAN, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 916 - **EXONERAR**

ALEXANDRE COMIN do cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5, a partir de 1º de abril de 2015.

Nº 917 - **NOMEAR**

IGOR NOGUEIRA CALVET, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
REITORIA

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3899-2100 -- E-mail: reitoria@ufv.br

PROCURAÇÃO

OUTORGANTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, pessoa jurídica de direito público, criada pelo Poder Público Federal, na forma de fundação pública de cunho educacional, com sede na Avenida P.H. Rolfs, s/n, campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por sua Reitora, Prof^ª. Nilda de Fátima Ferreira Soares, brasileira, portadora da Carteira de Identidade de nº MG 1.516.297, expedida pela SSP/MG, inscrita no CPF sob o nº 423.581.916-04;

OUTORGADO: AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, brasileiro, casado, servidor público federal da carreira de Procurador Jurídico Federal, inscrito no CPF sob o nº: 137.424.346-91 e OAB/MG nº 21.972, com domicílio legal na Procuradoria Jurídica junto à Universidade Federal de Viçosa, localizada à Avenida P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais, CEP 36.570-900;

PODERES: A **OUTORGANTE** confere ao **OUTORGADO** os poderes contidos na cláusula “AD NEGOTIA”, objetivando representar a Universidade Federal de Viçosa junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI**, com poderes amplos e gerais, podendo o **OUTORGADO**: assinar formulários e termos de autorização para cópia, promover, perante autoridade competente, prova ou contraprova pertinentes à titularidade de direitos de propriedade industrial e, ainda, tudo o mais que se fizer necessário para o bom e fiel cumprimento do presente mandato, podendo substabelecer, no todo ou em parte, a presente procuração, que terá a validade de 03 (três) anos.

Viçosa, 12 de setembro de 2018.

3º OFÍCIO
VIÇOSA (MG)

Nilda de Fátima Ferreira Soares
Nilda de Fátima Ferreira Soares
Reitora





MIN
IST
ÉRI
O
DA
ED
UC
AÇ
ÃO

A MINISTRA DE
ESTADO CHEFE DA
CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA
REPÚBLICA, no uso de suas
atribuições e tendo em vista o
disposto no art. 1º do Decreto nº
4.734, de 11 de junho de 2003,

resolve
PAULO AUGUSTO MALTA MOREIRA do cargo de Procurador-
Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Vi-
çosa, código CD-3, a partir de 1º de julho de 2012.

Nº 704 - EXONERAR, a pedido,

PAULO AUGUSTO MALTA MOREIRA do cargo de Procurador-
Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Vi-
çosa, código CD-3, a partir de 1º de julho de 2012.

Nº 705 - NOMEAR

AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, para exercer o cargo de
Procurador-Chefe da Procuradoria Procurador-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Fe-
deral de Viçosa, código CD-3.

Nº 706 - NOMEAR

IRACI DE OLIVEIRA VAZ, para
exercer o cargo de Procuradora-
Chefe da Procuradoria Federal
junto à Universidade Federal Rural
da Amazônia, código CD-3.

G
L
EI
SI
H
O
FF
M
A
N
N

MIN
IST
ÉRI
O
DA
CASA CIVIL
TIC
A

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
CASA CIVIL
IMPRESA NACIONAL

DILMA VANA ROUSSEFF
Presidenta da República

GLEISI HELENA HOFFMANN
Ministra de Estado Chefe da Casa Civil

FERNANDO TOLENTINO DE SOUZA VIEIRA
Diretor-Geral da Imprensa Nacional
DA PRESIDÊNCIA DA
REPÚBLICA, no uso de suas
atribuições e tendo em vista o
disposto no art. 1º do Decreto nº
4.734, de 11 de junho de 2003,

resolve
Publicação de atos normativos

SEÇÃO 2
Publicação de atos NOMEAR
relativos a pessoal da
Administração Pública Federal

SEÇÃO 3
Publicação de contratos,
editais, avisos e ineditais

JORGE LUIZ ALENCAR GUERRA
Coordenador-Geral de Publicação e Divulgação

ALEXANDRE MIRANDA MACHADO

ORLANDO MAGALHÃES DA CUNHA, para exercer o
cargo de Diretor de Programa da Secretaria-Executiva do
Ministério da Justiça, código DAS 101.5.

- GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DAS CIDADES

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA
CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas
atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº
4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 708 - EXONERAR

VIVIANA SIMON do cargo de Diretora do Departamento de Ar-
ticulação Institucional da Secretaria Nacional de Saneamento Am-
biental do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

Nº 709 - NOMEAÇÃO

ERNANI CIRÍACO DE MIRANDA, para exercer o cargo de
Diretor do Departamento de Articulação Institucional da Secretaria
Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades,
código DAS 101.5.

Nº 710 - NOMEAR

YURI RAFAEL DELLA GIUSTINA, para exercer o cargo de
Diretor do Departamento de Políticas de Acessibilidade e
Planejamento Urbano da Secretaria Nacional de Acessibilidade
e Programas Urbanos do Ministério das Cidades, código DAS
101.5.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO,
ORÇAMENTO E GESTÃO

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA
CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas
atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº
4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 711 - EXONERAR, a pedido,

ALIOMAR ARAPIRACA DA SILVA do cargo de Chefe do
Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria do
Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do
Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5, a partir
de 15 de agosto de 2012.

Nº 712 - NOMEAR

CLEIDE ANTONIA DE SOUZA, para exercer o cargo de Chefe
do Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria
do Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do
Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIA Nº 207, DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CASA CIVIL
DA

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso da competência que
lhe foi subdelegada pelo inciso I do art. 1º da Portaria nº 590, de
13 de junho de 2007, da Ministra de Estado Chefe da Casa Civil
da Presidência da República, e tendo em vista o disposto no
Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

NOMEAR

CARLOS HENRIQUE DE AZEVEDO MOREIRA para exercer o

cargo de Assessor na Subchefia de Articulação e Monitoramento da Casa Civil da Presidência da República, código DAS 102.4.

BETO FERREIRA
MARTINS
VASCONCELOS

GABINETE DE SEGURANÇA INSTITUCIONAL AGÊNCIA BRASILEIRA DE INTELIGÊNCIA SECRETARIA DE PLANEJAMENTO ORÇAMENTO E ADMINISTRAÇÃO

DEPARTAMENTO DE GESTÃO DE PESSOAL

RETIFICAÇÃO

Na Portaria nº 14/DGP/SPOA/ABIN/GSIPR, publicada no DOU nº 22, de 01/02/2010, referente à concessão de aposentadoria do ex-servidor, matrícula Abin nº 007036, incluir na fundamentação legal a menção ao "inciso III, do artigo 3º, da Emenda Constitucional nº 47/2005".

Publicada de acordo com o Art. 9º, da Lei 9.883/99.

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIAS DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DO GABINETE DE SEGURANÇA INSTITUCIONAL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA

DECLARAÇÃO, no uso da subdelegação de competência que lhe foi conferida pelo art. 1º da Portaria nº 9 - GSI/PR/CH, de 13 de fevereiro de 2009, resolve

Nº 362 - **DISPENSAR**, a pedido,

o Cb PMDF WIBSAN LUIZ DE PAULA de exercer a função de AUXILIAR, código GR I, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República, a partir de 23 de agosto de 2012.

Nº 363 - **DESIGNAR**

os militares a seguir relacionados para exercerem a função de AUXILIAR, código GR I, no Escritório de Representação II da Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

- Cb Ex HAMILTON DOS SANTOS SILVA;
- Cb Ex VITOR DOS SANTOS FLORENTIN; e
- Cb Ex MILTON PEREIRA GOMES JUNIOR.

Nº 364 - **DESIGNAR**

o 3º Sgt Ex ROBERTO TOSHIHIRO TANNO para exercer a função de AUXILIAR, código GR I, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

ANTONIO SERGIO GEROMEL

**ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO
CORREGEDORIA-GERAL DA ADVOCACIA DA UNIÃO**

PORTARIA CONJUNTA Nº 189, DE 20 DE AGOSTO DE 2012

O CORREGEDOR-GERAL DA ADVOCACIA DA UNIÃO, o PROCURADOR-GERAL FEDERAL e a PRESIDÊNCIA DA FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO, com base no art. 152,

da Lei 8.112, de 11 de dezembro de 1990, e considerando o que consta do Processo Administrativo nº 00406.001443/2012-05, resolvem:

Art. 1º Prorrogar por 60 (sessenta) dias o prazo para conclusão dos trabalhos da Comissão de Processo Administrativo Disciplinar nº 00406.000324/2012-27, designada pela Portaria Conjunta CGAU/PGF/FUNAI nº 131, de 11 de junho de 2012, publicada no Boletim de Serviço de 22 de junho de 2012.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

ADEMAR PASSOS VEIGA

Corregedor-Geral da Advocacia da União

MARCELO DE SIQUEIRA FREITAS

Procurador-Geral Federal

MARTA MARIA DO AMARAL AZEVEDO

Presidente da Fundação Nacional do Índio

SECRETARIA-GERAL DE CONSULTORIA

PORTARIAS DE 24 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004933/2012-45, resolve

Nº 725 - **DESIGNAR**

DANIELE PLÁCIDO LENGROBER, Procuradora Federal, matrícula SIAPE nº 1585426, para exercer a função de Chefe de Setor de Dívida Ativa das Autarquias e Fundações Públicas, código FG-2, no Escritório de Representação da Procuradoria Regional Federal da 2ª Região, na cidade de Volta Redonda/RJ.

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 726 - **DISPENSAR**

PAULO SÉRGIO BUENO, Técnico do Seguro Social, matrícula SIAPE nº 0934712, da função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 727 - **DESIGNAR**

VINÍCIUS CAMATA CANDELLO, Procurador Federal, matrícula SIAPE nº 1480151, para exercer a função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00022012082800002

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a

Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

Petição 870190018405, de 22/02/2019, pág. 12/41

PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**, com sede na Avenida Antônio Carlos, nº 6.627, Belo Horizonte, Minas Gerais, inscrita no CNPJ sob o nº 17.217.985/0001-04, representada neste ato pelo Professor Gilberto Medeiros Ribeiro, Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica – CTIT, confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA** com sede na Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa - MG, CEP 36570-900, inscrita no CNPJ sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por seu procurador Afonso Sergio Correa de Faria, para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual face ao pedido de patente intitulado "**LEISHMANIA TARENTOLAE OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SINALIZADAS**", a ser depositado junto ao INPI, para mantê-lo em vigor com amplos poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso da invenção patenteada, apresentar oposições, recursos, réplicas, anotar, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil e no exterior, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados.

Belo Horizonte/MG, 21 de fevereiro de 2019.



Professor Gilberto Medeiros Ribeiro

Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica – CTIT
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Relatório descritivo

***Leishmania tarentolae* OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E
USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS**

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

01. A invenção refere-se ao processo de obtenção de *Leishmania tarentolae* transgênica assim como ao sistema de produção de glicoproteínas heterólogas sializadas por meio da *Leishmania tarentolae* transgênica. As glicoproteínas obtidas por meio do processo da presente invenção tem maior estabilidade e tempo de meia vida no organismo de mamíferos, podendo o processo ser usado para produção de glicoproteínas úteis para tratamento de patologias humanas ou animais. A invenção se refere ainda ao uso da *Leishmania tarentolae* transgênica para fabricação de glicoproteínas heterólogas sializadas.

ESTADO DA TÉCNICA

02. A produção industrial de proteínas é uma área em expansão que abrange diversos segmentos de mercado, como na produção de biocombustíveis mais sustentáveis, na indústria alimentícia, de papel e celulose e na terapêutica, representada por diversos fármacos (RABERT, C. et al. Recombinants proteins for industrial uses: Utilization of *Pichia pastoris* expression system. Brazilian Journal of Microbiology, 2013). (WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nat Biotech, v. 32, n. 10, p. 992-1000, out. 2014). Muitos dos medicamentos atuais, como anticorpos, antibióticos e hormônios, são compostos por proteínas e observa-se o uso crescente desses produtos terapêuticos no combate de diversas doenças (VEGA, M. C. (2016). "Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization." Anticancer Res 36(8): 4375). Esse mercado tem gerado uma receita de mais de 140 bilhões de dólares.

Glycoprotein production in mammalian cells." *J Biotechnol* 251: 128-140.), com mais de 240 proteínas aprovadas para uso terapêutico nos Estados Unidos e União Europeia e 500 em fase de triagem clínica. No passado, a produção de proteínas para suprir a necessidade das indústrias era realizada primariamente por processos laboriosos, caros e de baixo rendimento pela extração do produto de sua fonte natural como tecidos humanos, animais e vegetais (NEHETE, J. Y. et al. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy reviews*, v. 7, p. 107-116, 2013). O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e o progresso feito na otimização de organismos para produção heteróloga de proteínas oferecem uma variedade de alternativas para produção de proteína com alto rendimento para uso em processos industriais com novas ou melhores propriedades (GRÄSLUND, S. et al. Protein production and purification. *Nature methods*, v. 5, p. 135- 146, 2008).

03. Mais de um terço dos produtos proteicos terapêuticos são glicoproteínas (ALBRECHT, S. (2014). Therapeutic proteins: facing the challenges of glycobiology. *Journal of Health Policy & Outreach Research*.

1. 12-17 e estima-se que a taxa de crescimento anual deste mercado seja de 26% (GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature biotechnology*, v. 22, p. 1409-1414, 2004). Do ponto de vista de utilização terapêutica de proteínas, glicosilação é importante tanto para atividade biológica das mesmas como para alteração das propriedades farmacocinéticas de produtos de interesse médico. Por esse motivo, muitas proteínas glicosiladas são produzidas por sistemas de expressão eucarióticos, que possuem o padrão de glicosilação semelhante ao de humano, como células imortalizadas de rim de hamster neonato (BHK-21), linhagens de células de camundongos como mieloma e hibridoma (NS0 e Sp2/0) e células de ovário de hamster chinês (CHO), que são

responsáveis por cerca de 50% da produção das proteínas terapêuticas (GHADERI, D., M. ZHANG, N. HURTADO-ZIOLA AND A. VARKI (2012).

"Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation." *Biotechnol Genet Eng Rev* 28: 147-175).

04. Cada método ou sistema de expressão apresenta características, vantagens e limitações diferentes e na escolha de qual utilizar deve-se levar em consideração a natureza da proteína que se deseja expressar e a qualidade que se espera obter da molécula produzida. Um organismo com bom potencial de utilização como sistema de expressão de proteínas recombinantes deve ser eficiente e produzir a proteína de interesse em grandes quantidades, ter custo reduzido e possibilidade de cultivo em grandes quantidades em equipamentos de escala industrial, como fermentadores, além de permitir facilidade e rapidez de purificação do produto final.

05. Os sistemas mais favoráveis para cultivo em escala industrial, com alto rendimento do produto e curto período de produção, são baseados em bactérias e leveduras. Bactérias não são capazes de realizar glicosilação. Apesar de possuírem parcialmente a maquinaria necessária, leveduras produzem perfil de glicosilação diferente de eucariotos superiores e glicoproteínas que necessitem de um padrão de glicosilação específico de mamíferos produzidos neste organismo falham em atividade biológica e estabilidade. Além disso, ambos os sistemas podem produzir incorreto dobramento de proteínas que prejudiquem sua atividade. Células de mamíferos produzem proteínas com correto perfil de glicosilação e dobramento, porém ambas possuem dificuldade de cultivo em grande escala, longo tempo de cultivo necessário e baixa produtividade de proteínas. Dentro deste contexto, uma boa opção seria a utilização de *Leishmania tarentolae* para expressão heteróloga de glicoproteínas e proteínas oligoméricas.

- 06.** Recentemente, *L. tarentolae* tem sido sugerida como um sistema para expressão heteróloga de proteínas. *L. tarentolae* é um protozoário tripanossomatídeo parasito de lagartos *Tarentola mauritanica*, do mesmo gênero de espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose em mamíferos, incluindo humanos. O genoma de *L. tarentolae* foi sequenciado (RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 1131-1147, 2012) e, por ser eucarioto, este organismo possui maquinaria para diversas modificações de proteínas realizadas após o processo de tradução, inclusive com padrões de modificações pós-traducionais mais similares aos de células de mamíferos se comparado com leveduras.
- 07.** A principal vantagem de expressão heteróloga de proteínas em *L. tarentolae* é sua capacidade para gerar dobramento e modificações pós- traducionais de proteína como formação de pontes de dissulfeto e glicosilação semelhante a mamíferos (BASILE, G.; PETICCA, M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*, v. 43, p. 273–278, 2009).
- 08.** Entre proteínas que já foram expressas neste sistema e necessitam de modificações pós-traducionais para serem ativas estão eritropoietina (BREITLING, R., S. KLINGNER, N. CALLEWAERT, R. PIETRUCHA, A. GEYER, G. EHRLICH, R. HARTUNG, A. MULLER, R. CONTRERAS, S. M. BEVERLEY AND K. ALEXANDROV (2002). "Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production." *Protein Expr Purif* 25(2): 209-218), proteína ativadora de plasminogênio tecidual e fator VII da coagulação. Embora o perfil de glicosilação de proteínas expressas em *L. tarentolae* seja semelhante ao processo que ocorre em mamíferos, existem algumas diferenças no perfil de carboidratos presentes nas terminações das cadeias glicídicas devido

à ausência de enzimas de biossínteses e incorporação de ácido siálico nos tripanossomatídeos (GHOSHAL, A.; MANDAL, C. A Perspective on the Emergence of Sialic Acids as Potent Determinants Affecting *Leishmania* Biology. *Molecular Biology International*, 2011).

09. Por meio da otimização direcionada por modelos computacionais, com a adição dos genes de mamíferos importantes para a biossíntese e incorporação de ácido siálico e posterior validação experimental utilizando metodologias de engenharia genética, as linhagens de *L. tarentolae* geradas poderão ser utilizadas para produzir centenas de outras glicoproteínas em larga escala com aplicações nas mais diferentes áreas industriais como farmacêutica, de alimentos, de biocombustíveis, entre outras.

10. Não foi encontrada nenhuma tecnologia que compreenda a utilização do protozoário *L. tarentolae* como alvo a ser otimizado para expressão heteróloga de glicoproteínas sializadas. Portanto, a presente invenção apresenta aspectos e metodologias inovadoras que se baseiam no desenvolvimento de um sistema de expressão heteróloga de glicoproteínas sializadas e/ou com o padrão de glicosilação semelhante encontrado em humanos.

11. A geração e utilização de linhagens de *L. tarentolae* geneticamente otimizadas para síntese de glicoproteínas em alta escala, permite a produção de proteínas mais estáveis com incorporação de ácido siálico na extremidade da cadeia glicídica proporcionando assim, uma ação mais eficaz das proteínas, além de reduzir custos dos medicamentos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

12. Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da amplificação do gene da HST. Linha 1 (M bp): padrão 1Kb DNA ladder. Linha 2 (HST): Amplificação do gene HST demonstrado na banda de 1069 pb.

13. Figura 2. Gel de agarose 1% contendo a amplificação do gene clonado em pGEM-T. O plasmídeo recuperado após a clonagem foi utilizado para confirmação das colônias positivas. Linha 1 (M bp): padrão 1Kb Plus DNA ladder. Linha 2 (HST): produto da amplificação do gene HST com 1069 pb.

14. Figura 3. Gel de agarose 0,8% contendo os produtos de digestão do vetor pGEM-T. Linha 1 (M bp): padrão 1Kb Plus DNA ladder. Linha 2 (-): Controle negativo da reação de digestão. Linha 3 (pGEM-T + HST (*BglIII* e *NotI*)): Digestão do DNA plasmidial por *BglIII* e *NotI* gerando o fragmento de 1087 pb.

15. Figura 4. Gel de agarose 0,8% contendo os produtos de digestão do vetor PLEXY-egfp-SAT2 (A) e esquema do vetor digerido (B). Digestão do pLEXY-egfp-SAT2 por *BglIII* e *NotI* (para construção do Clone pLEXY-egfp-SAT2 + HST). Na linha 3 (pLEXY-egfp-SAT2 (*BglIII* e *NotI*)), o fragmento inferior de aproximadamente 731 pb corresponde à região egfp do plasmídeo, liberada após a dupla digestão e o fragmento superior linearizado de aproximadamente 7528 pb também foi purificado do gel para ser utilizado na reação de clonagem. Linha 1 (M bp): padrão de pares de bases 1 Kb DNA ladder.

16. Figura 5. PCR de verificação de integração do gene HST no plasmídeo pLEXY-egfp-SAT2 (B). Linha 1 (M bp): padrão 1Kb DNA ladder. Linha 2 (-): controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 3 (pLEXY): controle negativo tendo como amostra um plasmídeo vazio (com egfp). Linha 4 (pLEXY + HST): amplificação do vetor clonado demonstrada pela banda de 1259 pb.

17. Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com o resultado da digestão da construção pLEXY-egfp-SAT2+HST, extraída dos clones recombinantes, com a enzima de restrição *SwaI*. Linha 1 (m bp): padrão 1Kb plus DNA ladder. Linha 2 (pLEXY + HST): Controle negativo. Linha

3 (pLEXY + HST (*Swal*)): fragmentos oriundos da digestão da construção extraída de um clone recombinante com a enzima *Swal*.

18. Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto reação de PCR diagnóstico de integração genômica. Linha 1 (M bp): padrão 1Kb plus DNA ladder. Linha 2 a 4 estão os produtos da reação de PCR utilizando os *primers* específicos do gene HST. Linha 2 (-): controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 3 (Wt): controle negativo com produto da reação com o material extraído da *Leishmania* selvagem. Linha 4 (HST): Amplificação do gene HST em torno de 1000 pb. Linhas 5 a 7 representam os produtos das reações com o *primer* de recombinação na região 5' *ssu* e com o reverso do gene HST. Linha 5 (-): controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 6 (Wt): controle negativo com produto da reação com o material extraído de *Leishmania* selvagem. Linha 7 (HST): Amplificação da região onde corresponde a região 5' *ssu* cromossomal da *Leishmania* e a região 3' do gene HST, em torno de 3000 pb.

19. Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produto da amplificação da reação de PCR utilizando os *primers* específicos para o gene HST a partir do molde de cDNA obtido pelo RT-PCR usando o RNA total das células selvagens e dos transformantes. Linhas 1 (m bp): padrão 1Kb DNA ladder. Linhas 2 (-): controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linhas 3 (+): controle positivo. Linhas 4 (Wt): amplificação obtida tendo com molde o cDNA das culturas de *L. tarentolae* selvagens. Linha 5 (HST): amplificação obtida tendo com molde o cDNA das culturas de *L. tarentolae* clonadas com o gene HST.

20. Figura 9. SDS-PAGE 12,5% e Western Blot com marcação específica para cauda de histidina com as amostras de extratos celulares de culturas clonais (HST) e selvagens (WT).

21. Figura 10. Ensaio de SDS-PAGE com posterior marcação com lectina de *Triticum vulgare* conjugada com FITC. É possível verificar que

nas linhas onde foram aplicados extratos celulares de linhagens de *L. tarentolae* otimizada houve uma maior marcação para glicosilação (N-acetilglicosamina e ácido siálico) em comparação àquelas onde foram aplicados extratos celulares de *L. tarentolae* selvagem.

22. Figura 11. Espectrometria de massas por LC-MS evidenciando a diferenças de massas obtidas dos extratos celulares de *L. tarentolae* otimizada com HST (D) e selvagem (C). A diferença de massas indica a inserção de um ácido siálico na extremidade da cadeia.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

23. A invenção refere-se ao processo de obtenção de *Leishmania tarentolae* transgênica assim como ao sistema de produção de glicoproteínas heterólogas sializadas por meio da *Leishmania tarentolae* transgênica. As glicoproteínas obtidas por meio do processo da presente invenção tem maior estabilidade e tempo de meia vida no organismo de mamíferos, podendo o processo ser usado para produção de glicoproteínas úteis para tratamento de patologias humanas ou animais. A invenção se refere ainda ao uso da *Leishmania tarentolae* transgênica para fabricação de glicoproteínas heterólogas sializadas.

24. A *Leishmania tarentolae* transgênica da presente invenção é caracterizada por compreender a enzima sialiltransferase humana cuja sequência compreende a SEQ ID Nº 1.

25. O processo de obtenção de *Leishmania tarentolae* transgênica da presente invenção é caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- Síntese química com adição de cauda de histidina;
- Síntese química;
- Amplificação do gene de interesse a partir do gene sintético utilizando os pares de *primers* (SEQ ID nº2 e SEQ ID nº3);

- Digestão dos plasmídeos de expressão pLEXY-egfp-SAT2 com as enzimas de restrição correspondente a digestão do plasmídeo pGEM-T + HST (BglII e NotI);
- Reação de ligação dos genes purificados da digestão dos plasmídeos pGEM-T e do produto linear da digestão dos plasmídeos pLEXY, e inserção no gene do vetor;
- Transformação em células de *Escherichia coli* e posterior extração;
- Digestão do vetor com a enzima *SwaI* e o fragmento linearizado contendo o gene da HST que foi transfectado em *L. tarentolae* por eletroporação;
- Recuperação das células após a eletroporação com o DNA;
- Seleção com antibiótico NTC para obtenção dos clones resistentes.

26. O processo de produção de glicoproteínas heterólogas sializadas da presente invenção proposto ocorre por meio de *Leishmania tarentolae* transgênica compreendendo a enzima sialiltransferase humana cuja sequência compreende a SEQ ID Nº 1, obtida por meio do processo definido na reivindicação 2.

27. A *Leishmania tarentolae* transgênica, da presente invenção, obtida por meio do processo definido acima, pode ser usada para fabricação de glicoproteínas terapêuticas sializadas.

28. A presente invenção é melhor compreendida pelas informações a seguir, não limitantes.

Síntese dos genes otimizados e desenho de *primers*

29. A sequência do gene de interesse correspondente a enzima sialiltransferase humana (HST) foi recuperada do banco de dados de vias metabólica KEGG (KANEHISA, M. The KEGG database. Novartis Foundation symposium, v. 247, p. 91–101; discussion 101–103, 119–128, 244–252, 2002) (código de entrada: 6480). A sequência foi projetada com os códons otimizados (SEQ ID Nº1) para serem expressos em *L. tarentolae* utilizando a ferramenta *Codon Optimization Tool* da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), utilizando como espécie de referência *Leishmania donovani*. Estudos já demonstraram que a otimização de códons pode dobrar a concentração proteica expressa no meio de cultivo, portanto barateando a produção, já que aumenta o rendimento mantendo-se as mesmas condições (KIANMEHR, A., A. MAHROOZ, M. OLADNABI, Y. SAFDARI, J. ANSARI, K. VEISI, M. EVAZALIPOUR, H. SHAHBAZMOHAMMADI AND E. OMIDINIA (2016). "Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*." Mol Biotechnol 58(8-9): 566-572). Para o desenho das sequências também foi planejada adição de cauda de histidina (por síntese química) que permite que a proteína seja identificada por anticorpos específicos. Essa estratégia é utilizada para facilitar e otimizar a purificação das proteínas expressas. Os *primers* específicos (direto, SEQ ID Nº2 e reverso, SEQ ID Nº3) para o gene foram desenhados adicionando os sítios de restrição estratégicos para a ligação do gene de interesse nos plasmídeos de expressão utilizando o *software* OligoExplorer 1.2 (GeneLink). As sequências resultantes dos genes e dos *primers* foram encaminhadas para síntese química.

Amplificação por PCR do gene sintético otimizado da HST

30. O gene de interesse foi amplificado a partir do gene sintético utilizando os pares de *primers* (SEQ ID Nº2 e SEQ ID Nº3) desenhados. O amplicon obtido através de PCR resultou em uma banda única e definida de 1068 pb, observada após a eletroforese (Figura 1). O material

purificado dessas bandas foi utilizado nas subseqüentes reações de clonagem.

Clonagem em pGEM-T e vetor de expressão pLEXY

31. Após a etapa de amplificação do gene de interesse, o amplicon purificado do gel correspondente ao gene da HST foi submetido a reação de ligação com o plasmídeo linear pGEM-T. Os produtos de reação de clonagem foram utilizados para transformar células *Escherichia coli* DH5 α . As colônias crescidas em meio sólido em placa de LB-ágar foram inoculadas em meio LB-líquido e posteriormente foi realizada a extração de plasmídeos para verificação das colônias positivas por PCR (Figura 2).

32. A confirmação de amplificação dos genes de interesse com os plasmídeos clonados permitiu prosseguir com a digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição BglII e NotI (Figura 3).

33. Com a obtenção do fragmento purificado decorrentes da digestão dos plasmídeo pGEM-T, o próximo passo foi digerir o plasmídeo de expressão pLEXY-egfp-SAT2 com as mesmas enzimas de restrição correspondente a digestão do plasmídeo pGEM-T + HST (BglII e NotI). Como esse vetor possui entre os sítios de clonagem uma sequência egfp de 731 pb, liberada quando a dupla digestão ocorre corretamente, nos permite confirmar a eficácia do processo, observando esses fragmentos por eletroforese. A digestão dupla realizada com o plasmídeo LEXY demonstrou em gel de agarose dois fragmentos, como esperado (Figura 4).

34. O fragmento maior de aproximadamente 7500 pb corresponde aos vetores digeridos e sem a sequência egfp. O vetor digerido foi extraído do gel e purificado para posterior uso nas reações de clonagem. O fragmento menor correspondente à sequência egfp foi descartado. Como controle negativo, utilizou-se uma amostra do vetor não digerido.

- 35.** O gene purificado decorrente da digestão dos plasmídeo pGEM-T eo produto linear obtido na digestão do plasmídeo pLEXY, foram submetidos a reação de ligação para inserção do gene no vetor.
- 36.** Após a reação de ligação os vetores foram utilizados como amostras para um PCR de verificação de integração dos genes utilizando os *primers* direto P1442 (PM-110) e reverso A264 (PM-101) (Figura 5).
- 37.** Após a confirmação da clonagem o vetor foi inserido por transformação em *E. coli* (DH5 α) para multiplicação plasmidial e, posteriormente, extração. Os testes para verificação da eficácia da clonagem foram realizados utilizando PCR com os *primers* específicos do gene e tendo com DNA molde os plasmídeos extraídos dos clones, digestão para observar a liberação do fragmento clonado e sequenciamento. Após a extração plasmidial dos clones selecionados como positivos, os mesmos foram submetidos à reação de linearização pela digestão com a enzima de restrição *SwaI*. Após a eletroforese em gel de agarose 0,8% observou-se a formação de duas bandas no gel. A de aproximadamente 3000 pb, correspondente a origem de replicação de *E. coli* e do gene de resistência a ampicilina e a outra banda de aproximadamente 5395 pb representando fragmento linearizado do cassete de expressão que será integrado por recombinação homóloga no hospedeiro (Figura 6).
- 38.** O fragmento linearizado contendo o gene da HST foi transfectado em *L. tarentolae* (10 μ g). Após a eletroporação com o DNA, as células depois de recuperadas foram selecionadas com antibiótico de seleção NTC para obtenção dos clones resistentes.

PCR diagnóstico para verificação de recombinação homóloga

- 39.** Foram utilizadas duas reações de PCR que serviram para constatar a inserção do cassete de expressão do gene HST no locus gênico das células transfectadas com as construções linearizadas.

Existem algumas vantagens para se utilizar a expressão gênica de forma integrativa constitutiva. No caso da inserção gênica no locus ssu de tripanossomatídeos, podemos citar a presença de muitas cópias de genes do 18S rDNA permitindo a integração de sequências exógenas e ainda mantendo a função e expressão dos genes de origem. Além disso, genes ribossomais geralmente são muito expressos, portanto há a possibilidade de uma alta taxa de expressão do gene recombinado. (INGA, R., S. DE DONCKER, J. GOMEZ, M. LOPEZ, R. GARCIA, D. LE RAY, J. AREVALO AND J. C. DUJARDIN (1998). "Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus Viannia." Mol Biochem Parasitol 92(2): 219-228), (MISSLITZ, A., J. C. MOTTRAM, P. OVERATH AND T. AEBISCHER (2000). "Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes." Mol Biochem Parasitol 107(2): 251-261), (SOYSA, R., K. D. TRAN, B. ULLMAN AND P. A. YATES (2015). "Integrating ribosomal promoter vectors that offer a choice of constitutive expression profiles in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol 204(2): 89-92).

40. Em uma reação utilizaram-se os pares de oligonucleotídeos específicos forward F3001 (PM-105) e o reverse específico para o gene HST e em outra utilizou-se o par de *primers* específicos para o gene. Como um dos controles negativos foi utilizado água no lugar de DNA e como outro controle foi utilizado o material genômico extraído de células de *L. tarentolae* selvagens da cepa P10. O oligonucleotídeo forward F3001 é específico para a região 5' ssu presente apenas no cromossomo do hospedeiro, e espera-se para validar a inserção observar a formação de um fragmento de aproximadamente 3000 pb que corresponde a essa região até a região 3' do gene inserido. Foram observadas as bandas de interesse, tanto a que comprova a inserção quanto a da presença do gene (Figura 7).

EXPERIMENTOS DE DEMONSTRAÇÃO

Análise da presença de transcritos por RT-PCR

41. Foi possível detectar que o gene integrado ao genoma dos clones selecionados até o momento produzia de fato as moléculas de RNA mensageiro correspondentes a proteína HST clonada.

42. Após a extração de RNA total e síntese do cDNA em uma reação de RT-PCR, os *primers* específicos para as sequências nucleotídicas referentes às proteínas desejadas foram utilizados para o PCR diagnóstico (Figura 8). O teste foi realizado após o cultivo das células recombinantes e selvagens para posterior extração do RNA e digestão com a enzima DNase para ter certeza de que todo o DNA das amostras de RNA celular total teria sido degradado. Os resultados mostraram a presença de transcritos em todos os clones positivos testados. Como controle negativo, ambas as reações tiveram o material genético substituído por RNA de células selvagens ou água.

Avaliação da expressão proteica da HST por SDS-PAGE e WesternBlot

43. Para verificar a expressão proteica da HST foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 14% (figura 9) as amostras proteicas obtidas do pellet celular de culturas de *L. tarentolae* selvagens e dos transformadas (20 µg de proteínas totais). Foi adicionado tampão às amostras e então estas foram submetidas à fervura por 5 min antes da aplicação no gel de poliacrilamida 14%. O SDS-PAGE mostra a banda característica de aproximadamente 39,5 KDa do controle positivo que é compatível aotamanho molecular teórico da enzima sialiltransferase humana. Para o ensaio de Western Blot as mesmas amostras utilizadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas ao bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 3%. Após incubação com os anticorpos (inicialmente o primário anti-His e depois o secundário

conjugado à peroxidase). A revelação da membrana com DAB e peróxido de hidrogênio identificou a produção de sinal positivo no tratamento, sendo indicada a presença da proteína HST contendo cauda de histidina no extrato aplicado (Figura 9).

Validação da sialização pelo ensaio utilizando lectina de *Triticum vulgare* (WGA) conjugada com FITC e espectrometria de massas

44. Para validação da sialização foi realizado um ensaio de SDS-PAGE com os pellets obtidos das células correspondentes à cepa de *L. tarentolae* otimizada com a enzima sialiltransferase e selvagem. Além disso, cada cepa foi cultivada com e sem o substrato CMP-N- acetilneuraminato (ácido siálico). Como controle negativo utilizou-se extrato celular de *E. coli* (ausência de glicosilação) e como controle positivo extrato celular de células humanas HEK293 (presença sialização). Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com BSA 3% *overnight* e então incubada por 2h com uma solução de TBS-T com a lectina de *Triticum vulgare* conjugada com FITC na diluição de 1:1000. A lectina é uma proteína que interage especificamente com carboidratos e resíduos de carboidratos N-acetilglicosamina e ácido siálico. Após a revelação foi possível validar a presença de maior sinal de glicosilação sializada nos tratamentos com a *L. tarentolae* otimizada (Figura 10).

45. Os extratos celulares também foram submetidos a análise de espectrometria de massas por LC-MS após serem submetidos a incubação com a enzima PNGase para retirada do glicano da proteína. Foi observado um padrão de massas diferente para o controle (*L. tarentolae* selvagem) e para o extrato celular obtido da *L. tarentolae* otimizado com a HST (Figura 11). A diferença de massas dos glicanos indica a inserção de um ácido siálico.

CONCLUSÃO

46. A geração e utilização de linhagens de *L. tarentolae* geneticamente otimizadas para síntese de glicoproteínas em alta escala, permite a produção de proteínas mais estáveis com incorporação de ácido siálico na extremidade da cadeia glicídica proporcionando assim, uma ação mais eficaz das proteínas, além de reduzir custos dos medicamentos.

Reivindicações

1. ***Leishmania tarentolae* otimizada caracterizada por** conter a enzima sialiltransferase humana cuja sequência compreende a SEQ ID Nº1.

2. **Processo de produção de *Leishmania tarentolae* otimizada caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- Recuperação da sequência do gene correspondente a enzima sialiltransferase humana (HST) no banco de dados de vias metabólicas KEGG database;
- Projeção da sequência com os códons otimizados (SEQ ID Nº1) para serem expressos em *L. tarentolae*, utilizando a ferramenta *Codon Optimization Tool*, usando como espécie de referência *Leishmania donovani*;
- Síntese química com adição de cauda de histidina;
- Desenho dos *primers* específicos para o gene (HST) adicionando os sítios de restrição estratégicos para a ligação do gene de interesse ao plasmídeo de expressão pLEXY-egfp-sat2, utilizando o software OligoExplorer 1.2, de forma que a proteína final seja mantida no meio intracelular;
- Síntese química do gene;
- Amplificação do gene de interesse a partir do gene sintético e utilizando os pares de *primers* desenhados (SEQ ID nº2 e SEQ ID nº3) resultando em uma banda única e definida;
- Digestão dos plasmídeos de expressão pLEXY-egfp-SAT2 com as enzimas de restrição correspondente a digestão do plasmídeo pGEM-T + HST (BglII e NotI);

- Reação de ligação dos genes purificados da digestão dos plasmídeos pGEM-T e do produto linear da digestão dos plasmídeos pLEXY, e inserção no gene do vetor;
- Confirmação da clonagem do gene (HST) no vetor de expressão por PCR;
- Transformação em células de *Escherichia coli* e posterior extração;
- Digestão do vetor com a enzima *SwaI* e o fragmento linearizado contendo o gene da HST foi transfectado em *L. tarentolae* por eletroporação;
- Recuperação das células após a eletroporação com o DNA;
- Seleção com antibiótico NTC para obtenção dos clones resistentes;
- Validação da expressão da HST através de duas reações de PCR, com a primeira reação utilizando pares de oligonucleotídeos específicos *forward* F3001 e o reverse específico para o gene HST, e a segunda reação utilizando par de *primers* específicos para o gene;
- Validação da expressão por meio de um RT-PCR e posteriormente com ensaios de SDS-PAGE e Western Blot utilizando as amostras proteicas obtidas do pellet celular de *L. tarentolae* selvagens e das transformadas;
- Validação do processo de sialização com um ensaio de eletroforese e posterior revelação com uma lectina (WGA), utilizando as amostras proteicas obtidas do pellet celular de *L. tarentolae* selvagens e das transformadas;

- Validação do processo de sialização por espectrometria de massas (LC-MS) utilizando as amostras proteicas obtidas do pellet celular de *L. tarentolae* selvagens e das transformadas.

3. Uso de *Leishmania tarentolae* otimizada caracterizada por expressar a enzima sialitransferase humana, capaz de incorporar a molécula de ácido siálico na extremidade da cadeia glicídica para produção de glicoproteínas terapêuticas sializadas.

Desenhos

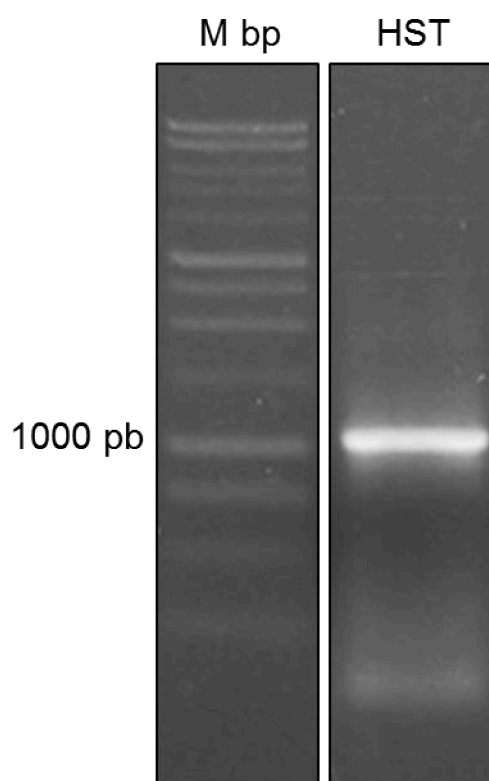


Figura 1

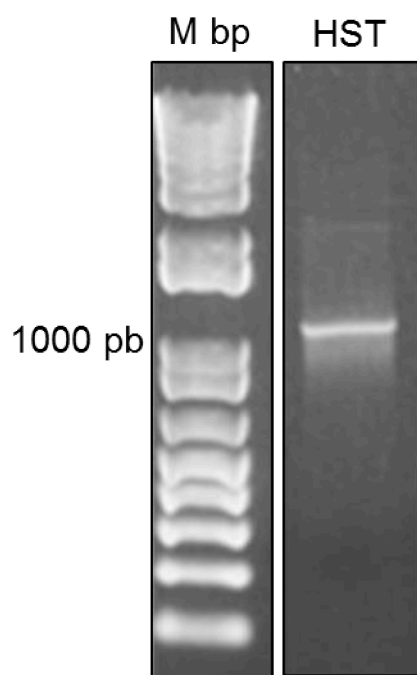
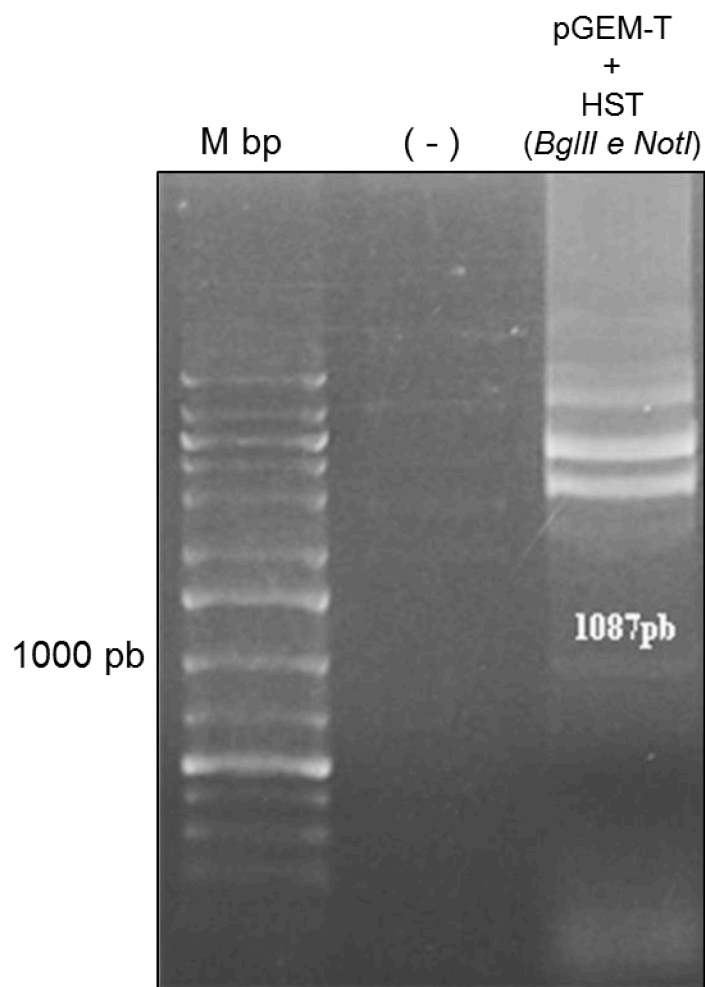


Figura 2

**Figura 3**

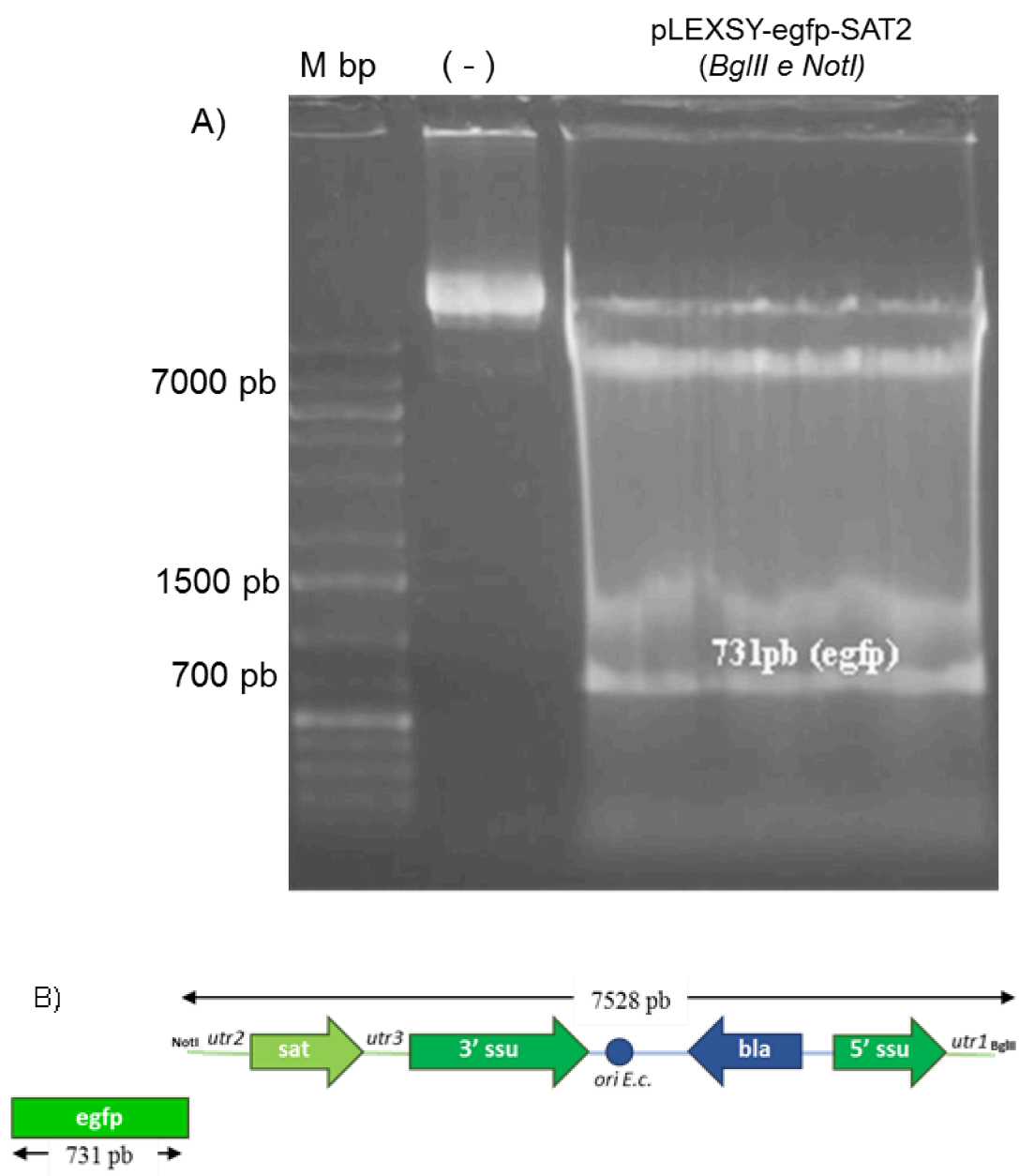


Figura 4

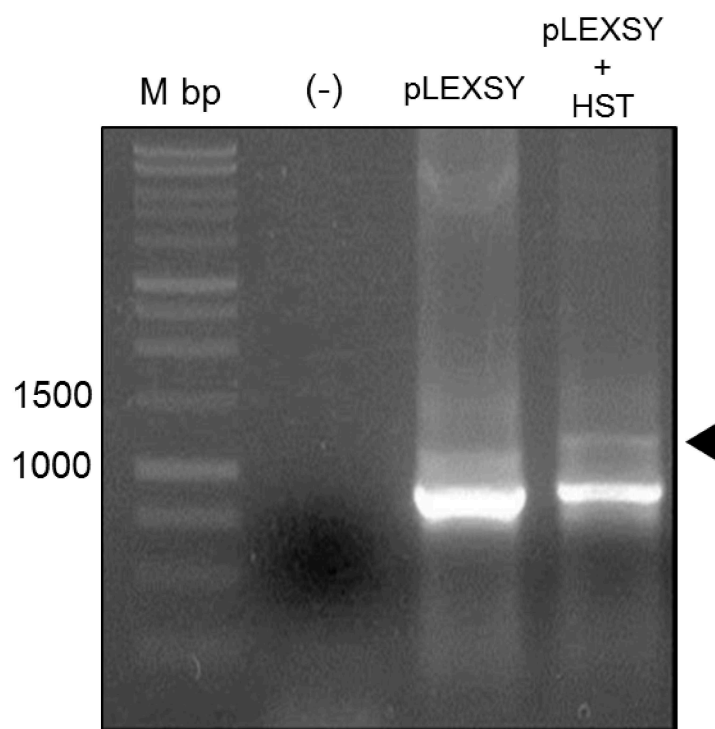


Figura 5

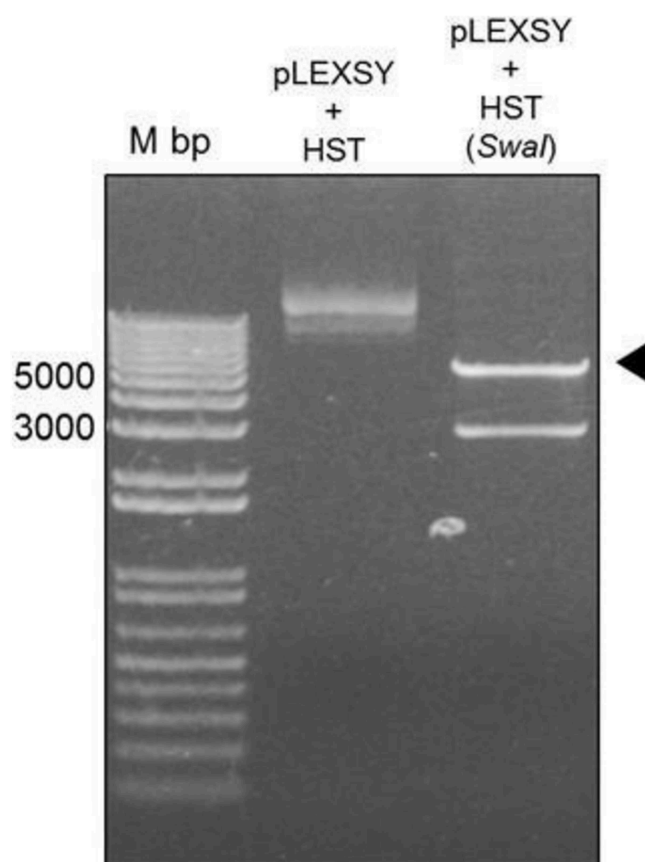


Figura 6

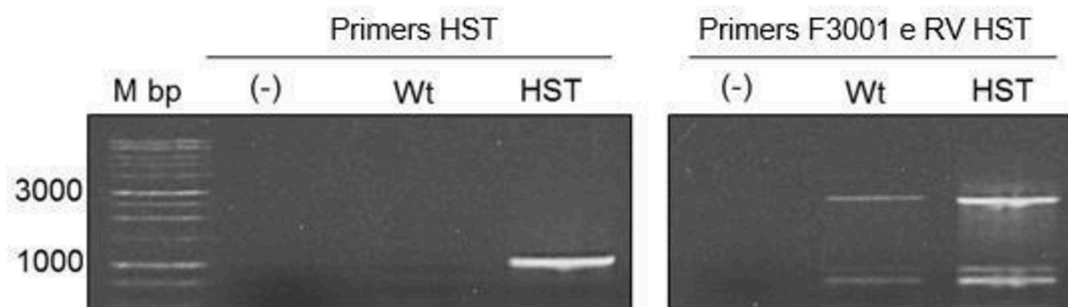


Figura 7

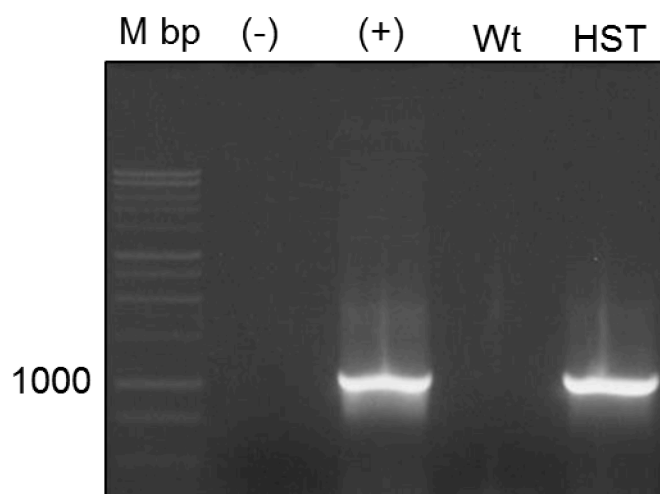


Figura 8

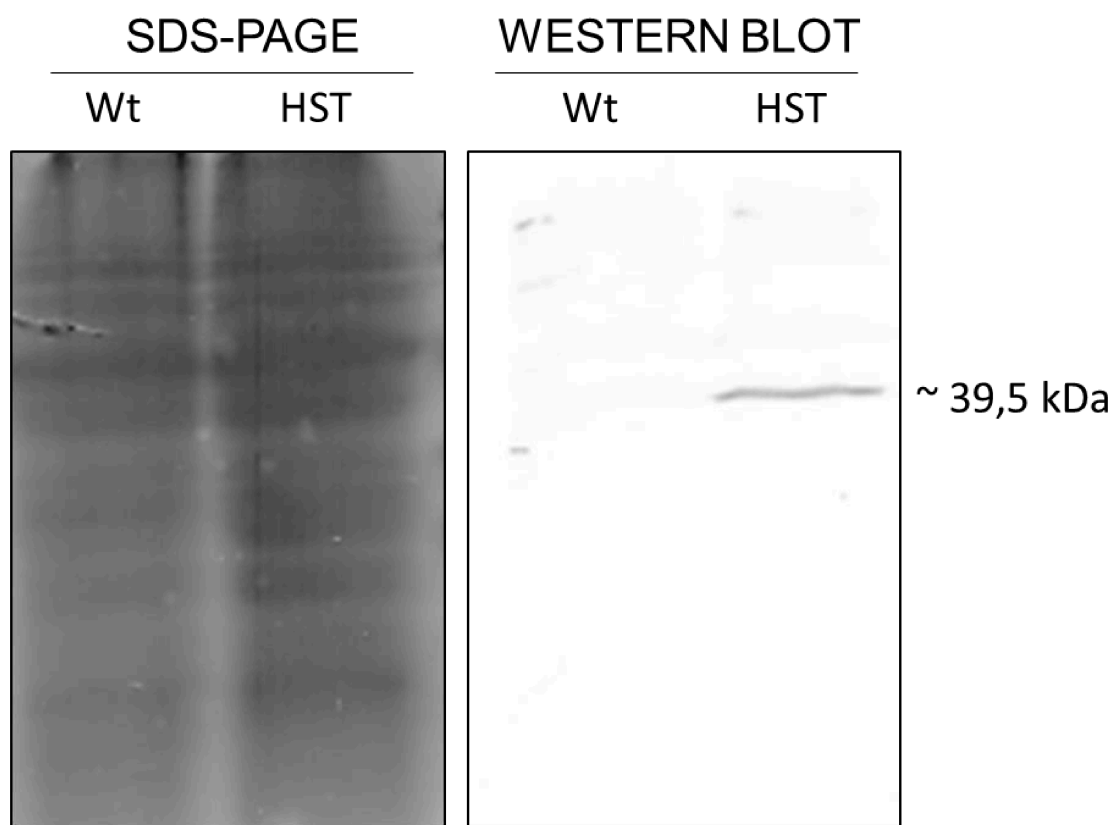


Figura 9

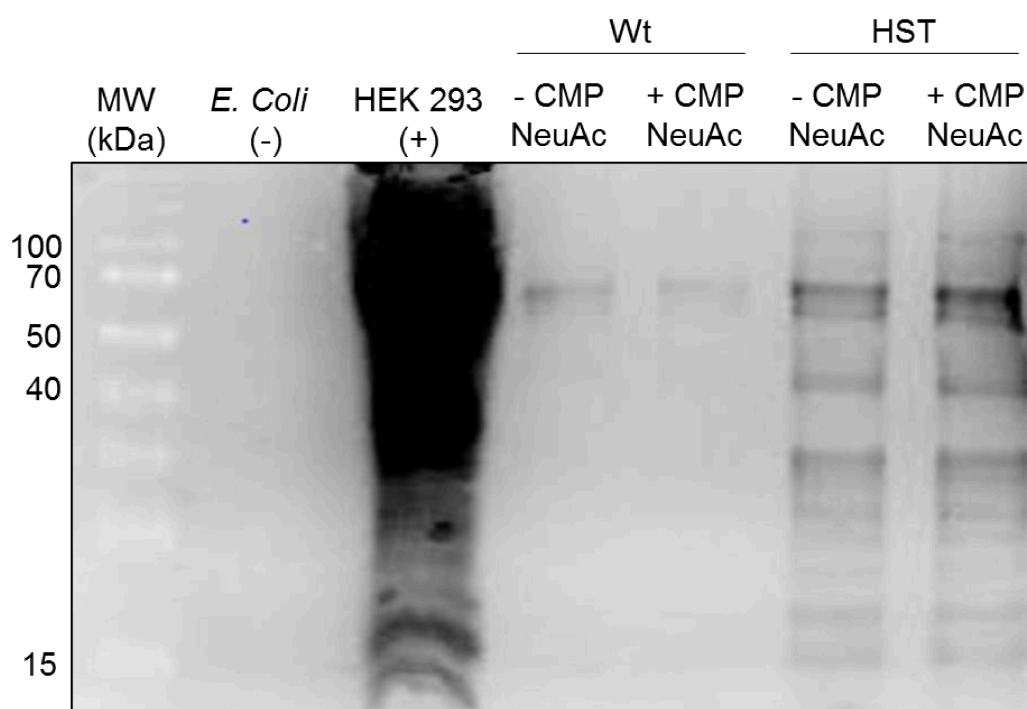


Figura 10

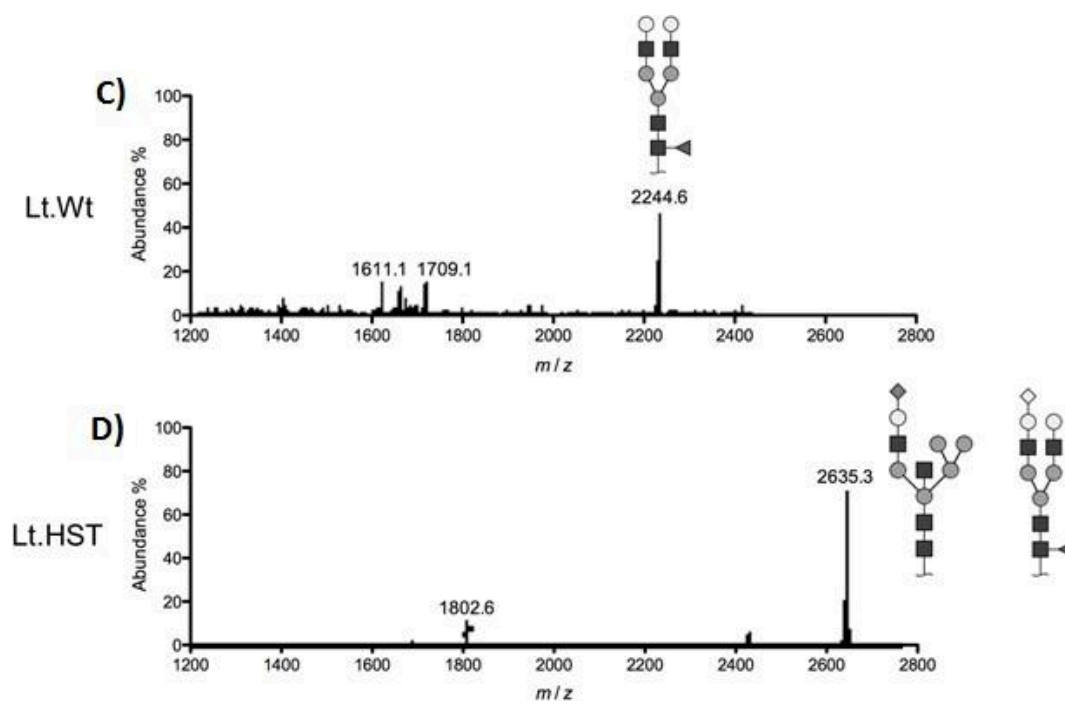


Figura 11

Resumo

***Leishmania tarentolae* OTIMIZADA, PROCESSO DE PRODUÇÃO, E USO PARA PRODUÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS SIALIZADAS**

A invenção refere-se ao processo de obtenção de *Leishmania tarentolae* transgênica assim como ao sistema de produção de glicoproteínas heterólogas sializadas por meio da *Leishmania tarentolae* transgênica. As glicoproteínas obtidas por meio do processo da presente invenção tem maior estabilidade e tempo de meia vida no organismo de mamíferos, podendo o processo ser usado para produção de glicoproteínas úteis paratratamento de patologias humanas ou animais. A invenção se refere ainda ao uso da *Leishmania tarentolae* transgênica para fabricação de glicoproteínas heterólogas sializadas

- Campo 1: D2F0A1AD33849BE9

- Campo 2: 13111337B0AE3597



Anexo II - Depósito de patente: Processo de produção da proteína interferon- β humano em *Leishmania tarentolae* e uso.



29409161812853393

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 003699 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosá

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3899 1421

Fax: (31) 3899 2148

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 16:34, Petição 870190018476

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Antônio Carlos, nº 6.627

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA

Utilidade (54): HUMANO EM Leishmania tarentolae E USO

Resumo: A tecnologia descrita no atual pedido de patente trata-se do processo de produção da proteína interferon-beta (IFN- β) humana em *Leishmania tarentolae*. A expressão dessa proteína em *L. tarentolae* é uma alternativa mais barata para os sistemas de expressão atuais, como por exemplo, células de mamíferos, e com maior atividade e estabilidade do que a expressão em sistemas bacterianos. Essa proteína é utilizada para o tratamento de doenças que causam impacto econômico para os sistemas públicos e privados de saúde devido à alta demanda e a seu alto custo de produção. Como depende de glicosilação com padrão específico de mamíferos para estabilidade e aumento da atividade da proteína, sua correta síntese utilizando uma plataforma de expressão otimizada proporcionará uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos, além de reduzir custos do produto na indústria farmacêutica.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 11

Nome: TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA MENDES

CPF: 07954090604

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Vereador Jose Valentino da Cruz, nº 54 Bloco A, ap. Centro,

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 984 520167

Fax:

Email: tiagoamendes@ufv.br

Inventor 2 de 11

Nome: RENATO LIMA SENRA

CPF: 11699893659

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Dr. Milton Bandeira, nº 230, ap. 403- Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 986 489447

Fax:

Email: rlsenra@gmail.com

Nome: JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

CPF: 88979881649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA JOAO LOPES ROSADO, 176, BAIRRO QUINTAS DOS
QUIMARAES

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 987 442347

Fax:

Email: jufietto@gmail.com

Inventor 4 de 11

Nome: ANDREA DE OLIVEIRA BARROS RIBON

CPF: 83035486620

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Condomínio Residencial Bosque Acamari 55, Bairro Acamari

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 995 059311

Fax:

Email: abribon@ufv.br

Inventor 5 de 11

Nome: HIGOR SETTE PEREIRA

CPF: 11033174661

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Bueno Brandao, numero 182, apartamento 802, Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 988 520133

Fax:

Email: higor.pereira@ufv.br

Inventor 6 de 11

Nome: TATIANA APARECIDA DE OLIVEIRA

CPF: 08456487643

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Alex Dorofeff, 501102, Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (37) 988 024376

Fax:

Email: tatianabiotec@gmail.com

Inventor 7 de 11

Nome: LETHICIA KELLY RAMOS ANDRADE

CPF: 08731475612

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Nasser Simao Muanis, numero 157, apto 202, bairro santo Antonio

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 986 441980

Fax:

Email: lethramosa@gmail.com

Inventor 8 de 11

Nome: GÉSSICA CABRAL BARROS

CPF: 09940522606

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Ph. Rolfes nº216 ap. 301 Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (32) 998 019477

Fax:

Email: gessicacbarros@gmail.com

Inventor 9 de 11

Nome: DANIEL MENEZES SOUZA

CPF: 05792889600

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Bernardo Guimaraes, 630, apto. 402, bairro Funcionários

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 996 017609

Fax:

Email: dmsouza@ufmg.br

Inventor 10 de 11

Nome: JACQUELINE ARAUJO FIUZA

CPF: 05070524631

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Joaquim Jose Diniz, 20- apt 100113. Bairro Fernao Dias

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 995 817543

Fax:

Email: jacfiuza2@hotmail.com

Inventor 11 de 11

Nome: AMANDA BONOTO GONÇALVES

CPF: 09756541601

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Padre Anchieta no 40 apt 101, bairro Ramos

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 995 555477

Fax:

Email: amandabonoto@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento.pdf
Procuração	Procuração UFV e DOU Dr. Afonso e Reitora.pdf
Procuração	procuracao ufmg-ufv2-1.pdf
Portaria	Portaria Gilberto UFMG.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicac_ão.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Sequências Biológicas



Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

[bb.com.br] - Boleto gerado pelo sistema MPAG. 06/12/2018 09:00:41

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.](#)

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.](#)

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CPF/CNPJ: 25944455000196

Sacador/Avalista

Nosso Número: 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000
 Nr. Documento: 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000
 Data de Vencimento: 04/01/2019
 Valor do Documento: 70,00 (=) Valor Pago

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço

29409161812853393 29409161812853393 04/01/2019 70,00

Agência/Código do Beneficiário

Autenticação Mecânica

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37

RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS, RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000

Local de Pagamento

PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO

Data de Vencimento

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ

Agência/Código do Beneficiário

Data do Documento: 06/12/2018 Nr. Documento: 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000
 Espécie DOC: N Aceite: Quantidade x Valor: 70,00
 Data do Processamento: 06/12/2018 Nosso Número: 00190.00009 02940.916188 12853.393176 5 77590000007000
 Uso do Banco: N Carteira: 06/12/2018 Espécie: DS (=) Valor do Documento

Informações de Responsabilidade do Beneficiário

(-) Desconto/Abatimento

04/01/2019

(+ Juros/Multa

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37 06/12/2018

29409161812853393 DS

N

06/12/2018

(-) Valor Cobrado

29409161812853393/Endereço

R\$

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do

Sacador/Avalista

Autenticação Mecânica

Ficha de Compensação

nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

___ SIAFI2018-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
20/12/18 15:52 USUARIO : CELMAR
DATA EMISSAO : 14Dez18 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2018GR800345
UG/GESTAO EMITENTE : 154051 / 15268 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 154051 GESTAO : 15268
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: DEZ18 VENCIMENTO: 14Dez18
DOC. ORIGEM: 154051 / 15268 / 2018NP003413 PROCESSO : 18-012217
RECURSO : 1
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161812853393
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
PAGAMENTO PEDIDO NACIONAL DE INVENCAO, NOSSO NUMERO 29409161812853393, PROCESS
O 18-012217.
LANCADO POR : 07787438614 - MARA UG : 154051 14Dez2018 09:35
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional

Em circulação desde 1º de outubro de 1862



ISSN 1677-7050

Sumário

Atos do Poder Executivo

Atos do Poder Executivo.....	1
Presidência da República.....	1
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	5
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.....	7
Ministério da Cultura.....	7
Ministério da Defesa.....	8
Ministério da Educação.....	14
Ministério da Fazenda.....	35
Ministério da Integração Nacional.....	45
Ministério da Justiça.....	46
Ministério da Pesca e Aquicultura.....	48
Ministério da Previdência Social.....	48
Ministério da Saúde.....	49
Ministério das Comunicações.....	51
Ministério das Relações Exteriores.....	51
Ministério de Minas e Energia.....	52
Ministério do Desenvolvimento Agrário.....	52
Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome.....	53
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.....	53
Ministério do Esporte.....	53
Ministério do Meio Ambiente.....	53
Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.....	54
Ministério do Trabalho e Emprego.....	55
Ministério do Turismo.....	57
Ministério dos Transportes.....	57
Conselho Nacional do Ministério Público.....	58
Ministério Público da União.....	58
Tribunal de Contas da União.....	60
Poder Legislativo.....	60

Poder Judiciário.....	61
Edital e Avisos.....	70

NOMEAR

ÂNGELA MARIA PAIVA CRUZ, Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.

Brasília, 19 de maio de 2015; 194ª da Independência e 127ª da República.

DILMA ROUSSEFF

Luiz Cláudio Costa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

DECRETOS DE 19 DE MAIO DE 2015

A **PRESIDENTA DA REPÚBLICA**, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, **caput**, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, **caput**, inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve

A **PRESIDENTA DA REPÚBLICA**, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, **caput**, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, **caput**, inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve

TABELA DE PREÇOS DE JORNAIS AVULSOS		
Páginas	Distrito Federal	Demais Estados
de 02 a 28	R\$ 0,30	R\$ 1,80
de 32 a 76	R\$ 0,50	R\$ 2,00
de 80 a 156	R\$ 1,10	R\$ 2,60
de 160 a 250	R\$ 1,50	R\$ 3,00
de 254 a 500	R\$ 3,00	R\$ 4,50

- Acima de 500 páginas = preço de tabela mais excedente de páginas multiplicado por R\$ 0,0107

NILDA D. Universidade Federal de Pernambuco, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.

Luiz Cláudio Costa

Presidência da República

DESPACHOS DA PRESIDENTA DA REPÚBLICA

ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

Exposição de Motivos

Nº 19, de 13 de maio de 2015. Afastamento do País do Advogado-Geral da União, com ônus, no período de 20 a 24 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para proferir palestra na Conferência **Courts and the Rule of Law in Democratic Brazil**. Autorizo. Em 19 de maio de 2015.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Exposição de Motivos

Nº 20, de 14 de maio de 2015. Afastamento do País do Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação, com ônus, no período de 25 a 29 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para participar da IV Reunião da Comissão Mista Brasil Estados Unidos de Cooperação Científica e Tecnológica, de Fórum de Inovação organizado pelo Conselho Empresarial Brasil-Estados Unidos e de reuniões no Banco Interamericano de Desenvolvimento, na Administração Nacional de Aero-náutica e do Espaço, nos Institutos Nacionais de Saúde e no Museu Smithsonian. Autorizo. Em 19 de maio de 2015.

MINISTÉRIO DA FAZENDA

Exposição de Motivos

CASA CIVIL**PORTARIAS DE 19 DE MAIO DE 2015****CONTROLADORIA-GERAL DA UNIÃO****O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL**

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 911 - NOMEAR

RENATO DE LIMA FRANÇA, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Controladoria-Geral da União, código DAS 102.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA

**MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO
AGRÁRIO**

O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 912 - EXONERAR

RAILDY AZEVÉDO COSTA MARTINS do cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

Nº 913 - NOMEAR

LUCIMAR CEVALLOS MIJAN, para exercer o cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA

**MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO,
INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR**

O MINISTRO DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 914 - EXONERAR, a pedido,

HELDER SILVA CHAVES do cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 915 - NOMEAR

FERNANDO DE MAGALHÃES FURLAN, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 916 - EXONERAR

ALEXANDRE COMIN do cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5, a partir de 1º de abril de 2015.

Nº 917 - NOMEAR

IGOR NOGUEIRA CALVET, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5.

ALOIZIO MERCADANTE OLIVA

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00022015052000001

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a

Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

Petição 870190018476, de 22/02/2019, pág. 12/37



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
REITORIA

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3899-2100 -- E-mail: reitoria@ufv.br

PROCURAÇÃO

OUTORGANTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, pessoa jurídica de direito público, criada pelo Poder Público Federal, na forma de fundação pública de cunho educacional, com sede na Avenida P.H. Rolfs, s/n, campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por sua Reitora, Prof^ª. Nilda de Fátima Ferreira Soares, brasileira, portadora da Carteira de Identidade de nº MG 1.516.297, expedida pela SSP/MG, inscrita no CPF sob o nº 423.581.916-04;

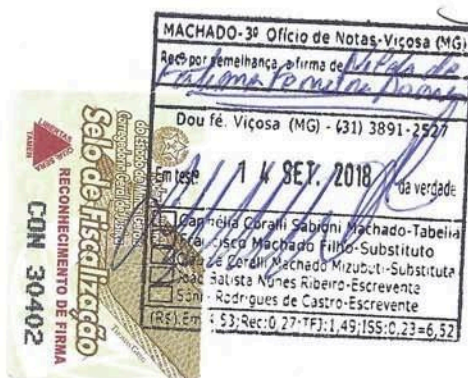
OUTORGADO: AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, brasileiro, casado, servidor público federal da carreira de Procurador Jurídico Federal, inscrito no CPF sob o nº: 137.424.346-91 e OAB/MG nº 21.972, com domicílio legal na Procuradoria Jurídica junto à Universidade Federal de Viçosa, localizada à Avenida P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais, CEP 36.570-900;

PODERES: A **OUTORGANTE** confere ao **OUTORGADO** os poderes contidos na cláusula “AD NEGOTIA”, objetivando representar a Universidade Federal de Viçosa junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI**, com poderes amplos e gerais, podendo o **OUTORGADO**: assinar formulários e termos de autorização para cópia, promover, perante autoridade competente, prova ou contraprova pertinentes à titularidade de direitos de propriedade industrial e, ainda, tudo o mais que se fizer necessário para o bom e fiel cumprimento do presente mandato, podendo substabelecer, no todo ou em parte, a presente procuração, que terá a validade de 03 (três) anos.

Viçosa, 12 de setembro de 2018.

3º OFÍCIO
VIÇOSA (MG)

Nilda de Fátima Ferreira Soares
Nilda de Fátima Ferreira Soares
Reitora





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

, a pedido,

Nº 704 - **EXONERAR**, a pedido,

PAULO AUGUSTO MALTA MOREIRA do cargo de Procurador-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Viçosa, código CD-3, a partir de 1º de julho de 2012.

Nº 705 - **NOMEAR**

AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, para exercer o cargo de Procurador-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Viçosa, código CD-3.

Nº 706 - **NOMEAR**

IRACI DE OLIVEIRA VAZ, para exercer o cargo de Procuradora-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal Rural da Amazônia, código CD-3.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 707 - **NOMEAR**

ORLANDO MAGALHÃES DA CUNHA, para exercer o cargo de Diretor de Programa da Secretaria-Executiva do Ministério da Justiça, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DAS CIDADES

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 708 - **EXONERAR**

VIVIANA SIMON do cargo de Diretora do Departamento de Articulação Institucional da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

Nº 709 - **NOMEAÇÃO**

ERNANI CIRÍACO DE MIRANDA, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Articulação Institucional da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

Nº 710 - **NOMEAR**

YURI RAFAEL DELLA GIUSTINA, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Políticas de Acessibilidade e Planejamento Urbano da Secretaria Nacional de Acessibilidade e Programas Urbanos do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO,
ORÇAMENTO E GESTÃO

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL

DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 1º do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 711 - **EXONERAR**, a pedido,

ALIOMAR ARAPIRACA DA SILVA do cargo de Chefe do Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria do Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5, a partir de 15 de agosto de 2012.

Nº 712 - **NOMEAR**

CLEIDE ANTONIA DE SOUZA, para exercer o cargo de Chefe do Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria do Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIA Nº 207, DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CASA CIVIL DA

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso da competência que lhe foi subdelegada pelo inciso I do art. 1º da Portaria nº 590, de 13 de junho de 2007, da Ministra de Estado Chefe da Casa Civil da Presidência da República, e tendo em vista o disposto no Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

NOMEAR

CARLOS HENRIQUE DE AZEVEDO MOREIRA para exercer o cargo de Assessor na Subchefia de Articulação e Monitoramento da Casa Civil da Presidência da República, código DAS 102.4.

BETO FERREIRA MARTINS VASCONCELOS

GABINETE DE SEGURANÇA INSTITUCIONAL
AGÊNCIA BRASILEIRA DE INTELIGÊNCIASECRETARIA DE PLANEJAMENTO ORÇAMENTO E
ADMINISTRAÇÃO

DEPARTAMENTO DE GESTÃO DE PESSOAL

RETIFICAÇÃO

Na Portaria nº 14/DGP/SPOA/ABIN/GSIPR, publicada no DOU nº 22, de 01/02/2010, referente à concessão de aposentadoria do ex-servidor, matrícula Abin nº 007036, incluir na fundamentação legal a menção ao "inciso III, do artigo 3º, da Emenda Constitucional nº 47/2005".

Publicada de acordo com o Art. 9º, da Lei 9.883/99.

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIAS DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DO GABINETE DE SE-
GURANÇA INSTITUCIONAL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA

BLICA, no uso da subdelegação de competência que lhe foi conferida pelo art. 1º da Portaria nº 9 - GSI/PR/CH, de 13 de fevereiro de 2009, resolve

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
CASA CIVIL
IMPrensa NACIONAL

DILMA VANA ROUSSEFF
Presidenta da República

GLEISI HELENA HOFFMANN
Ministra de Estado Chefe da Casa Civil

FERNANDO TOLENTINO DE SOUSA VIEIRA
Diretor-Geral da Imprensa Nacional

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

SEÇÃO 1

Publicação de atos normativos

SEÇÃO 2

Publicação de atos
relativos a pessoal da
Administração Pública Federal

SEÇÃO 3

Publicação de contratos,
editais, avisos e ineditoriais

JORGE LUIZ ALENCAR GUERRA
Coordenador-Geral de Publicação e Divulgação

ALEXANDRE MIRANDA MACHADO
Coordenador de Editoração e
Divulgação Eletrônica dos Jornais Oficiais

FRANCISCO DAS CHAGAS PINTO
Coordenador de Produção

Nº 362 - **DISPENSAR**, a pedido,

o Cb PMDF WIBSAN LUIZ DE PAULA de exercer a função de AUXILIAR, código GR I, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República, a partir de 23 de agosto de 2012.

Nº 363 - **DESIGNAR**

os militares a seguir relacionados para exercerem a função de AUXILIAR, código GR I, no Escritório de Representação II da Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

- Cb Ex HAMILTON DOS SANTOS SILVA;
- Cb Ex VITOR DOS SANTOS FLORENTIN; e
- Cb Ex MILTON PEREIRA GOMES JUNIOR.

Nº 364 - **DESIGNAR**

o 3º Sgt Ex ROBERTO TOSHIHIRO TANNO para exercer a função de AUXILIAR, código GR I, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

ANTONIO SERGIO GEROMEL

ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO
CORREGEDORIA-GERAL DA ADVOCACIA DA
UNIÃO

PORTARIA CONJUNTA Nº 189, DE 20 DE AGOSTO DE 2012

O CORREGEDOR-GERAL DA ADVOCACIA DA UNIÃO, o PROCURADOR-GERAL FEDERAL e a PRESIDENTE DA FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO, com base no art. 152,

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00022012082800002

da Lei 8.112, de 11 de dezembro de 1990, e considerando o que consta do Processo Administrativo nº 00406.001443/2012-05, resolvem:

Art. 1º Prorrogar por 60 (sessenta) dias o prazo para conclusão dos trabalhos da Comissão de Processo Administrativo Disciplinar nº 00406.000324/2012-27, designada pela Portaria Conjunta CGAU/PGF/FUNAI nº 131, de 11 de junho de 2012, publicada no Boletim de Serviço de 22 de junho de 2012.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

ADEMAR PASSOS VEIGA

Corregedor-Geral da Advocacia da União

MARCELO DE SIQUEIRA FREITAS

Procurador-Geral Federal

MARTA MARIA DO AMARAL AZEVEDO

Presidente da Fundação Nacional do Índio

SECRETARIA-GERAL DE CONSULTORIA

PORTARIAS DE 24 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA AD-

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004933/2012-45, resolve

Nº 725 - **DESIGNAR**

DANIELE PLÁCIDO LENGGRUBER, Procuradora Federal, matrícula Sipa nº 1585426, para exercer a função de Chefe de Setor de Dívida Ativa das Autarquias e Fundações Públicas, código FG-2, no Escritório de Representação da Procuradoria Regional Federal da 2ª Região, na cidade de Volta Redonda/RJ.

- **O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA AD-**

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 726 - **DISPENSAR**

PAULO SÉRGIO BUENO, Técnico do Seguro Social, matrícula Sipa nº 0934712, da função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA AD-

VOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 727 - **DESIGNAR**

VINÍCIUS CAMATA CANDELLO, Procurador Federal, matrícula Sipa nº 1480151, para exercer a função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a

Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.



Coordenadoria de
Transferência e
Inovação Tecnológica
UFMG



UFMG

PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**, com sede na Avenida Antônio Carlos, nº 6.627, Belo Horizonte, Minas Gerais, inscrita no CNPJ sob o nº 17.217.985/0001-04, representada neste ato pelo Professor Gilberto Medeiros Ribeiro, Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica – CTIT, confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA** com sede na Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa - MG, CEP 36570-900, inscrita no CNPJ sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por seu procurador Afonso Sergio Correa de Faria, para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual face ao pedido de patente intitulado "**PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO EM Leishmania tarentolae E USO**", a ser depositado junto ao INPI, para mantê-lo em vigor com amplos poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso da invenção patenteada, apresentar oposições, recursos, réplicas, anotar, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil e no exterior, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados.

Belo Horizonte/MG, 21 de fevereiro de 2019.

Professor Gilberto Medeiros Ribeiro

Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica – CTIT
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2008/2017
CEP: 31270-901 - Belo Horizonte - MG - Fone: (31) 3409-4033/3931 - Fax: 3409-6430
E-mail: info@ctit.ufmg.br - <http://www.ufmg.br/ctit>

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Gabinete da Reitora



PORTARIA Nº 174, DE 8 DE AGOSTO DE 2018

A REITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, no uso de suas atribuições legais e estatutárias, considerando o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, bem como no Decreto nº 7.689, de março de 2012; na Portaria nº 249, de 13 de junho de 2012, do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão (MPOG), no Decreto nº 9.189, de 1º de novembro de 2017, e no inciso II do art. 2º, combinado com o art. 3º, ambos da Portaria MEC nº 36, de 18 de janeiro de 2018, do Ministério da Educação (MEC),

RESOLVE:

Art. 1º Delegar competência ao Diretor da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT), professor GILBERTO MEDEIROS RIBEIRO, inscrição UFMG nº 247405, matrícula SIAPE nº 1964486, para, no âmbito da CTIT:

a) assinar, por meio eletrônico ou físico, documentos ou instrumentos jurídicos concernentes ao exercício das atividades de competência da CTIT, no âmbito da Lei 10.973/04 – Lei de Inovação Tecnológica, da Política de Inovação da UFMG e suas resoluções específicas, tais como Contrato de Transferência de *Know-How*, Contrato de Licenciamento de Tecnologia, Contrato de Partilhamento de Titularidade de Tecnologia, Acordos de Confidencialidade e Termos de Sigilo, Termos de Autorização de Teste e documentos afins;

b) assinar, por meio eletrônico ou físico, documentação necessária para depósito, processamento, adição, retificação, substituição, modificação, ampliação e resposta de relatórios referentes a objeto de proteção de propriedade intelectual junto aos órgãos competentes, em âmbito nacional e internacional;

c) autorizar a realização de despesas dentro dos limites orçamentários da CTIT;

b) autorizar a concessão de suprimento de fundos a servidores da Unidade, bem como determinar a baixa de responsabilidade;

c) requisitar passagens e transportes em geral, por quaisquer vias, nos limites da dotação orçamentária da CTIT;

d) autorizar viagens de servidores, a serviço da Unidade, arbitrando-lhes as respectivas diárias, obedecidas as disposições legais pertinentes;

e) assinar contratos, decorrentes de licitação, de sua dispensa ou inexigibilidade, no âmbito da CTIT;

f) prover arrecadação de receitas em geral no âmbito da CTIT;

g) apurar dívidas de terceiros para com a Universidade, oriundas de contratos de cotitularidade, licenciamento, transferência, dentre outros, adotando as medidas necessárias à regularização delas, no âmbito da CTIT.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Gabinete da Reitora



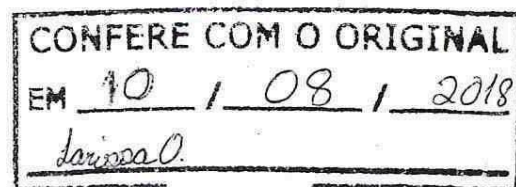
Art. 2º Subdelegar competência ao Diretor da CTIT para:

- a) celebrar novos contratos administrativos decorrentes de licitação, de sua dispensa ou de inexigibilidade ou prorrogar contratos em vigor relativos a atividades de custeio cujos valores sejam inferiores a R\$500.000,00 (quinhentos mil reais); e
- b) autorizar a realização de despesas relativas a atividades de custeio cujos valores sejam inferiores a R\$500.000,00 (quinhentos mil reais).

Art. 3º A presente Portaria entra em vigor nesta data.

Belo Horizonte, 8 de agosto de 2018.

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida
Reitora



Larissa Silva Oliveira
Assistente em Administração
Inscrição 32115X

Relatório descritivo

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA
HUMANO EM *Leishmania tarentolae* E USO**

Campo Técnico da Invenção

01. A tecnologia descrita no atual pedido de patente trata-se do processo de produção da proteína interferon-beta (IFN- β) humana em *Leishmania tarentolae*. A expressão dessa proteína em *L. tarentolae* é uma alternativa mais barata para os sistemas de expressão atuais, como por exemplo, células de mamíferos, e com maior atividade e estabilidade do que a expressão em sistemas bacterianos. Essa proteína é utilizada para o tratamento de doenças que causam impacto econômico para os sistemas públicos e privados de saúde devido à alta demanda e a seu alto custo de produção. Como depende de glicosilação com padrão específico de mamíferos para estabilidade e aumento da atividade da proteína, sua correta síntese utilizando uma plataforma de expressão otimizada proporcionará uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos, além de reduzir custos do produto na indústria farmacêutica.

Estado da Técnica

02. A produção de glicoproteínas terapêuticas possui alto custo devido à necessidade de utilização de cultura de células de mamíferos que dependem de meios de cultivo complexos, caros e que possuem baixo rendimento de produção. O elevado custo de medicamentos baseados em glicoproteínas onera os gastos familiares e de sistemas públicos de saúde. A *Leishmania tarentolae*, um protozoário tripanossomátideo não patogênico para mamíferos, tem sido sugerido como um sistema alternativo para expressão heteróloga de

glicoproteínas devido à existência de métodos eficientes de expressão heteróloga, por ser

facilmente adaptado para produção em alta escala e depender de meios de cultura de baixo custo. Além disso, este protozoário apresenta modificações pós-traducionais ausentes em bactérias e leveduras, organismos mais utilizados para produção industrial de proteínas recombinantes.

03. Os Interferons (IFNs) são proteínas glicosiladas da família das citocinas produzidas como resposta do organismo de muitos vertebrados a diversos agentes como vírus, bactérias, parasitas e células oncogênicas. Das três principais classes de interferon, o Interferon-beta (IFN- β) se inclui na do tipo I e é conhecido por exercer diversas funções como antiviral, antisséptica, antioncogênica, antiproliferativa e imunomoduladora (DISSING-OLESEN, L., M. THAYSEN-ANDERSEN, M. MELDGAARD, P. HOJRUP AND B. FINSEN (2008). "The function of the human interferon-beta 1a glycan determined in vivo." **J Pharmacol Exp Ther** 326(1): 338-347).

04. O uso terapêutico dessa proteína inclui a forma glicosilada ou IFN- β 1a (Rebif® ou Avonex®), produzida por células de ovário de hamster chinês (CHO), e a forma não glicosilada IFN- β 1b (Betaferon®) produzida por bactérias (HAN, Y. K., T. Y. KOO AND G. M. LEE (2009). "Enhanced interferon-beta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature." **Biotechnol Prog** 25(5): 1440-1447).

05. Ambas as formas variantes do interferon-beta recombinante humano ((hr)IFN- β) são aprovadas e utilizadas para tratamento de doenças neurodegenerativas inflamatórias e auto imunes como esclerose múltipla e artrite reumatoide (HOLTEN, J. VAN; PLATER-ZYBERK, C.; TAK, P. P. Interferon-beta for treatment of rheumatoid arthritis? **Arthritis research**, v. 4, p. 346–352, 2002). Entretanto, a forma não glicosilada demanda uma quantidade muito maior de proteína quando comparada com a forma glicosilada para alcançar o mesmo efeito e eficácia. Observou-se uma redução significativa de 10 vezes na resposta de IFN- β

glicosilado nativo quando submetido a diferentes glicosidases (DISSING-OLESEN, L., M. THAYSEN-ANDERSEN, M. MELDGAARD, P. HOJRUP AND B. FINSEN (2008). "The function of the human interferon-beta 1a glycan determined in vivo." **J Pharmacol Exp Ther** 326(1): 338-347). Estudos comprovam que frações de IFN- β sem a sialização na extremidade da glicosilação tem sua atividade reduzida quando comparada com a sua forma inicial, sendo relacionado com esse efeito a dependência desse carboidrato na interação com os receptores de IFN- β (MASTRANGELI, R., M. ROSSI, M. MASCIA, W. PALINSKY, A. DATOLA, M. TERLIZZESE AND H. BIERAU (2015). "In vitro biological characterization of IFN-beta-1a major glycoforms." **Glycobiology** 25(1): 21-29).

06. A proteína IFN- β possui em torno de 18 kDa sem a glicosilação e aproximadamente 25 kDa quando glicosilada. É composta por 166 resíduos de aminoácidos na sua forma madura e contém um único sítio de glicosilação na posição 80 em um resíduo de asparagina e uma ponte dissulfeto entre a cisteínas nas posições 31(Cys31) e 141 (Cys141) (LENNON, D. R., J. D. CHERRY, A. MORGENSTEIN, J. G. CHAMPION AND Y. J. BRYSON (1983). "Longitudinal study of influenza B symptomatology and interferon production in children and college students." **Pediatr Infect Dis** 2(3): 212-215).

07. Quanto à melhoria de propriedades farmacocinéticas, a produção de interferon- β glicosilado proporciona o aumento da meia vida da proteína comparada com a isoforma não glicosilada devido ao aumento do volume hidrodinâmico e consequente diminuição da eliminação renal (GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. **Nature biotechnology**, v. 22, p. 1409–1414, 2004). Além disso, foi observado um aumento na termoestabilidade quando comparadas na mesma concentração, com a forma glicosilada desnaturando em cerca de 5°C a mais que a forma não

glicosilada (RUNKEL, L., W. MEIER, R. B. PEPINSKY, M. KARPUSAS, A. WHITTY, K. KIMBALL, M. BRICKELMAIER, C. MULDOWNNEY, W. JONES AND S. E. GOELZ (1998). "Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta)." **Pharm Res** 15(4): 641-649). Esse aumento da estabilidade pode melhorar o rendimento na produção e reduzir a frequência na qual a proteína deve ser injetada no paciente, reduzindo custos e efeitos adversos que são comumente observados.

08. Embora o perfil de glicosilação de proteínas expressas em *L. tarentolae* seja semelhante ao perfil de glicosilação de proteínas expressas em mamíferos, existem algumas diferenças no perfil de carboidratos presentes nas terminações das cadeias glicídicas devido à ausência de enzimas de biossíntese e incorporação de ácido siálico.

09. Nesse sentido, o atual pedido de patente propõe um processo de expressão de interferon- β utilizando linhagens de *L. tarentolae* para síntese dessa molécula em alta escala, mais estável, proporcionando uma ação mais eficaz da proteína e reduzindo custos do medicamento.

10. As linhagens de *L. tarentolae* utilizadas no processo são a *L. tarentolae* geneticamente modificada, objeto de proteção do pedido de patente BR 10 2019 003674 5 e a selvagem

11. Como citado acima a proteína Interferon-beta atualmente é produzida por dois principais sistemas de expressão CHO (Rebif® ou Avonex®) e *E. coli* (Betaferon®), mas ainda não foi relatado a expressão em *L. tarentolae*. A vantagem da expressão dessa proteína utilizando esta plataforma de expressão é uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos, além de reduzir custos do produto na indústria farmacêutica.

Descrição das figuras

12. Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da amplificação do gene do Interferon-beta (IFN- β). Linha 1 (M pb): padrão 1Kb DNA ladder (Promega). Linha 2 (-): Controle negativo. Linha 3 (INF- β): Amplificação do gene IFN- β demonstrado na banda de 496pb.

13. Figura 2. Gel de agarose 0,8% contendo os produtos de digestão do vetor pLEXY-NEO2 (A) e esquema do vetor digerido (B). Digestão do pLEXY-NEO2 por *KpnI* e *XbaI* (para construção do Clone pLEXY-NEO2+ IFN- β). Na linha 3 (pLEXY-NEO2 (*KpnI* e *XbaI*)), o fragmento inferior de aproximadamente 1000 pb corresponde à região *stuffer* do plasmídeo, liberada após a dupla digestão e o fragmento superior linearizado de aproximadamente 7907 pb também foi purificado do gel para ser utilizado na reação de clonagem. Linha 1(M pb): padrão de pares de bases 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

14. Figura 3. PCR de verificação de integração do gene IFN- β no plasmídeo pLEXY-NEO2. Linha 1 (M pb): padrão 1Kb DNA ladder (Promega). Linha 2 (-): controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 3 (pLEXY): controle negativo tendo como amostra um plasmídeo vazio (com *stuffer*). Linha 4 (pLEXY + IFN- β): amplificação do vetor clonado demonstrada pela banda de 872 pb.

15. Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com o resultado da digestão da construção pLEXY-NEO2+IFN- β , extraída dos clones recombinantes, com a enzima de restrição *SwaI* (C). Linha 1 (M pb): padrão 1Kb plus DNA ladder (Cellco). Linha 2 (-): Controle negativo. Linha 3 (pLEXY + IFN- β (*SwaI*)): fragmentos oriundos da digestão da construção extraída de um clone recombinante com a enzima *SwaI*. Esquema do vetor digerido (D)

16. Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da reação de PCR diagnóstico. Linha 1: padrão 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Linha 2 a 4 estão os produtos da reação de PCR utilizando os primers específicos do gene IFN- β . Linha 2: controle negativo onde o

DNA foi substituído por água. Linha3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da *Leishmania* selvagem. Linha 4: Amplificação do gene IFN- β em torno de 496 pb Linhas 5, a 7 representam os produtos das reações com o primer de recombinação na região 5'ssu (forward F3001) e com o reverso do gene IFN- β . Linha 5: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 6: controle negativo com produto da reação com o material extraído de *Leishmania* selvagem. Linha 7: Amplificação da região onde corresponde a região 5'ssu cromossomal da *Leishmania* e a região 3' do gene IFN- β , em torno de 1847pb.

17. Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da amplificação da reação de PCR utilizando os primers específicos para o gene IFN- β a partir do molde de cDNA obtido pelo RT-PCR usando o RNA total das células selvagens e dos transformantes. Linhas 1: padrão 1Kb DNA ladder (Promega). Linhas 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linhas 3: controle positivo. Linhas 4: amplificação obtida tendo com molde o cDNA das culturas de *L. tarentolae* selvagens. Linha 5: amplificação obtida tendo com molde o cDNA das culturas de *L. tarentolae* clonadas com o gene IFN- β .

18. Figura 7. SDS-PAGE 12,5% e Western Blot com marcação específica para cauda de histidina com as amostras de extratos celulares de culturas clonais (IFN- β) e selvagens (WT).

Descrição da invenção

19. A tecnologia aqui descrita trata-se do processo de produção da proteína Interferon-beta humana, que engloba as etapas de seleção e otimização de gene, clonagens em vetores, expressão heteróloga e purificação em *Leishmania tarentolae* selvagem e na geneticamente modificada, objeto do pedido de patente BR 10 2019 003674 5.

20. O processo de produção da proteína interferon-beta humano da presente invenção é caracterizado por compreender as etapas:

- a) Síntese química do gene;
- b) Ligação do gene de interesse ao plasmídeo de expressão pLEXY-NEO2;
- c) Amplificação do gene de interesse utilizando os pares de *primers* (SEQ ID nº2 e SEQ ID nº3);
- d) Clonagem do material purificado na etapa anterior, primeiramente em vetor de clonagem pGEM-Teasy e posteriormente em vetor de expressão em *Leishmania* pLEXY-NEO2;
- e) Digestão do vetor com a enzima *SwaI* e fragmento linearizado contendo o gene do IFN- β que foi transfectado em *L. tarentolae* por eletroporação;
- f) Recuperação das células após a eletroporação com o DNA;
- g) Seleção com antibiótico neomicina para obtenção dos clones resistentes;
- h) Expressão heteróloga da proteína em *Leishmania tarentolae*;
- i) Purificação por cromatografia de afinidade.

21. A presente invenção pode ser melhor compreendida pelas informações seguintes, não limitantes.

Síntese dos genes otimizados e desenho de *primers*

22. A sequência do gene de interesse correspondente a proteína interferon-beta humana (IFN- β) foi recuperada do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência foi projetada com os códons otimizados (SEQ ID nº1) para serem expressos em *L. tarentolae* utilizando a ferramenta *Codon Optimization Tool* da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) utilizando como espécie de referência *Leishmania donovani*. Estudos já demonstraram que a otimização de códons pode dobrar a concentração proteica expressa no meio de cultivo, portanto barateando a produção, já que aumenta o rendimento mantendo-se as mesmas condições (KIANMEHR, A., A. MAHROOZ, M. OLADNABI, Y. SAFDARI, J. ANSARI, K. VEISI, M.

EVAZALIPOUR, H. SHAHBAZMOHAMMADI AND E. OMIDINIA (2016). "Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*." **Mol Biotechnol** 58(8-9): 566-572). Para o desenho das sequências também foi planejada adição de cauda de histidina (por adição no vetor) que permite que a proteína seja identificada por anticorpos específicos. Essa estratégia é utilizada para facilitar e otimizar a purificação das proteínas expressas. Os *primers* específicos (direto, SEQ ID nº2 e reverso, SEQ ID nº3) para o gene foram desenhados adicionando os sítios de restrição estratégicos para a ligação do gene de interesse nos plasmídeos de expressão utilizando o software OligoExplorer 1.2 (GeneLink). As sequências resultantes dos genes e dos *primers* foram encaminhadas à empresa Integrated DNA Technologies (IDT) para síntese química.

Amplificação por PCR do gene sintético otimizado da IFN- β

23. O gene de interesse foi amplificado a partir do gene sintético utilizando os pares de *primers* (SEQ ID nº2 e SEQ ID nº3) desenhados. O amplicon obtido através de PCR resultou em uma banda única e definida de 496 pares de bases observada após a eletroforese (**Figura 1**). O material purificado dessas bandas foi utilizado nas subseqüentes reações de clonagem.

Clonagem em pGEM-T e vetor de expressão pLEXY

24. Após a etapa de amplificação do gene de interesse, o amplicon purificado do gel correspondente ao gene da IFN- β foi submetido à reação de ligação com o plasmídeo linear pGEM-Teasy (Promega - A3600). Os produtos de reação de clonagem foram utilizados para transformar células

E. coli DH5 α . As colônias crescidas em meio sólido em placa de LB-ágar foram inoculadas em meio LB-líquido e posteriormente foi realizada a extração de plasmídeos para verificação das colônias positivas por PCR.

25. A confirmação de amplificação dos genes de interesse com os plasmídeos clonados permitiu prosseguir com a digestão do plasmídeo

com as enzimas de restrição *KpnI* (Thermofisher/Fermentas - ER0521) e *XbaI* (Promega - ER0681).

26. Com a obtenção do fragmento purificado decorrentes da digestão dos plasmídeo pGEM-Teasy o próximo passo foi digerir o plasmídeo de expressão pLEXY-NEO2 (Jena Bioscience — EGE233) com as mesmas enzimas de restrição correspondente a digestão do plasmídeo pGEM-Teasy + IFN- β (*KpnI* e *XbaI*). Como esse vetor possui entre os sítios de clonagem uma sequência *stuffer* de aproximadamente 1000 pb, liberada quando a dupla digestão ocorre corretamente, nos permite confirmar a eficácia do processo, observando esses fragmentos por eletroforese. A digestão dupla realizada com o plasmídeo LEXSY demonstrou em gel de agarose dois fragmentos, como esperado (**Figura 2**).

27. O fragmento maior de aproximadamente 7900 pb corresponde aos vetores digeridos e sem a sequência *stuffer*. O vetor digerido foi extraído do gel e purificado para posterior uso nas reações de clonagem. O fragmento menor correspondente à sequência *stuffer* foi descartado. Como controle negativo, utilizou-se uma amostra do vetor não digerido.

28. O gene purificado decorrente da digestão dos plasmídeo pGEM- Teasy e o produto linear obtido na digestão do plasmídeo pLEXY, foram submetidos a reação de ligação para inserção do gene no vetor.

29. Após a reação de ligação os vetores foram utilizados como amostras para um PCR de verificação de integração dos genes utilizando os *primers* direto P1442 (PM-110) e reverso A264 (PM-101) fornecidos pela empresa Jena Bioscience (**Figura 3**).

30. Posterior a confirmação da clonagem o vetor foi inserido por transformação em *E.coli* (DH5 α) para multiplicação plasmidial e posteriormente extraído. Os testes para verificação da eficácia da clonagem foram realizados utilizando PCR (com os *primers* específicos dogene e tendo como DNA molde os plasmídeos extraídos dos clones),

digestão (para observar a liberação do fragmento clonado) e sequenciamento. Após a extração plasmidial dos clones selecionados como positivos, os mesmos foram submetidos à reação de linearização pela digestão com a enzima de restrição *SwaI* Thermofisher/Fermentas – ER1241). Após a eletroforese em gel de agarose 0,8% observou-se a formação de duas bandas no gel. A de aproximadamente 2800 pb, correspondente a origem de replicação de *E. coli* e do gene de resistência a ampicilina e a outra banda de aproximadamente 6000 pb representando fragmento linearizado do cassete de expressão que será integrado por recombinação homóloga no hospedeiro (**Figura 4**).

31. O fragmento linearizado contendo o gene do IFN- β foi transfectado em *L. tarentolae* seguindo as recomendações do protocolo fornecido pela Jena Bioscience. Após a eletroporação com o DNA, as células depois de recuperadas foram selecionadas com antibiótico de seleção neomicina para obtenção dos clones resistentes.

PCR diagnóstico para verificação de recombinação homóloga

32. Neste ensaio foram utilizadas duas reações de PCR que serviram para constatar a inserção do cassete de expressão do gene IFN- β no locus gênico das células transfectadas com as construções linearizadas. Existem algumas vantagens para se utilizar a expressão gênica de forma integrativa constitutiva. No caso da inserção gênica no locus ssu de tripanossomatídeos, podemos citar a presença de muitas cópias de genes do 18S rDNA permitindo a integração de sequências exógenas e ainda mantendo a função e expressão dos genes de origem. Além disso, genes ribossomais geralmente são muito expressos, portanto há a possibilidade de uma alta taxa de expressão do gene recombinado. (INGA, R., S. DE DONCKER, J. GOMEZ, M. LOPEZ, R. GARCIA, D. LE RAY, J. AREVALO AND J. C. DUJARDIN (1998). "Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*." **Mol Biochem Parasitol** 92(2): 219-

228), (MISSLITZ, A., J. C. MOTTRAM, P. OVERATH AND T. AEBISCHER (2000). "Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania amastigotes*." **Mol Biochem Parasitol** 107(2): 251-261), (SOYSA, R., K. D. TRAN, B. ULLMAN AND P. A. YATES (2015). "Integrating ribosomal promoter vectors that offer a choice of constitutive expression profiles in *Leishmania donovani*." **Mol Biochem Parasitol** 204(2): 89-92).

33. Em uma reação utilizou-se os pares de oligonucleotídeos específicos forward F3001 (PM-105) e o reverse específico para o gene IFN- β e em outra utilizou-se o par de *primers* específicos para o gene. Como um dos controles negativos foi utilizado água no lugar de DNA e como outro controle foi utilizado o material genômico extraído de células de *L. tarentolae* selvagens da cepa P10. O oligonucleotídeo forward F3001 é específico para a região 5' ssu presente apenas no cromossomo do hospedeiro, e espera-se para validar a inserção observar a formação de um fragmento de aproximadamente 1800 pb que corresponde a essa região até a região 3' do gene inserido. Foram observadas as bandas de interesse, tanto a que comprova a inserção quanto a da presença do gene (**Figura 5**).

Experimento de demonstração

Análise da presença de transcritos por RT-PCR

34. Nesse ensaio foi possível detectar que o gene integrado ao genoma dos clones selecionados até o momento produzia de fato as moléculas de RNA mensageiro correspondentes a proteína IFN- β clonada.

35. Após a extração de RNA total e síntese do cDNA em uma reação de RT-PCR, os *primers* específicos para as sequências nucleotídicas referentes à proteína desejada foram utilizados para o PCR diagnóstico (**Figura 6**). O teste foi realizado após o cultivo das células recombinantes

12/13

e selvagens para posterior extração do RNA e digestão com a enzima DNase para ter certeza de que todo o DNA das amostras de RNA celular total teria sido degradado. Os resultados mostraram a presença de transcritos em todos os clones positivos testados. Como controle negativo ambas as reações tiveram em comum o RNA de células selvagens ou o material genético substituído por água.

Avaliação da expressão proteica de IFN β por SDS-PAGE e Western Blot

36. Para verificar a expressão proteica da IFN- β foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12,5% as amostras proteicas obtidas do meio de cultivo celular de *L. tarentolae* selvagens e das transformadas submetidas a purificação por cromatografia de afinidade (20 μ g de proteínas totais). Foi adicionado tampão às amostras e então submetidas à fervura por 5 min antes da aplicação. O SDS-PAGE mostra a banda característica de aproximadamente 25 KDa que é compatível ao tamanho molecular teórico do IFN- β . Para o ensaio de Western Blot as mesmas amostras utilizadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas ao bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 3%. Após incubação com os anticorpos, inicialmente o primário anti-His e depois o secundário conjugado à peroxidase, a revelação da membrana com DABe peróxido de hidrogênio identificou a produção de sinal positivo no

tratamento, sendo indicada a presença da proteína IFN- β contendo cauda de histidina no extrato aplicado (**Figura 7**).

Conclusão

37. A produção de glicoproteínas terapêuticas como o interferon-beta, possui alto custo devido à necessidade de utilização de cultura células de mamíferos que dependem de meios de cultivo complexos e caros e possuem baixo rendimento de produção. O elevado custo de medicamentos baseados em glicoproteínas onera os gastos familiares e o próprio sistema de saúde público. A expressão de interferon- β utilizando

linhagens de *L. tarentolae* selvagens geneticamente otimizadas, proporciona a produção dessas proteínas de forma mais estável, proporcionando uma ação mais eficaz e reduzindo custos dos medicamentos.

Reivindicações

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO caracterizado por ser em *Leishmania tarentolae*.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO caracterizado por compreender as etapas:

- Síntese química do gene;
- ligação do gene de interesse ao plasmídeo de expressão pLEXY- NEO2;
- Amplificação do gene de interesse utilizando os pares de *primers* (SEQ ID nº2 e SEQ ID nº3);
- clonagem do material purificado na etapa anterior, primeiramente em vetor de clonagem pGEM-Teasy e posteriormente em vetor de expressão em *Leishmania* pLEXY-NEO2;
- Digestão do vetor com a enzima *SwaI* e fragmento linearizado contendo o gene do IFN- β que foi transfectado em *L. tarentolae* por eletroporação;
- Recuperação das células após a eletroporação com o DNA;
- Seleção com antibiótico neomicina para obtenção dos clones resistentes;
- Expressão heteróloga da proteína em *Leishmania tarentolae*;
- Purificação por cromatografia de afinidade.

1/4

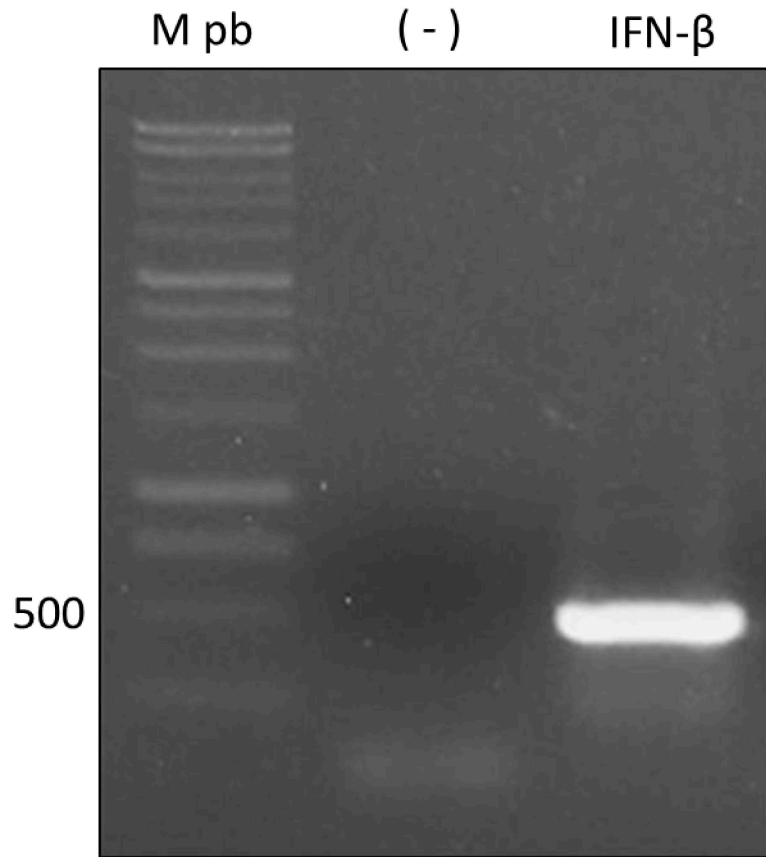


Figura 1

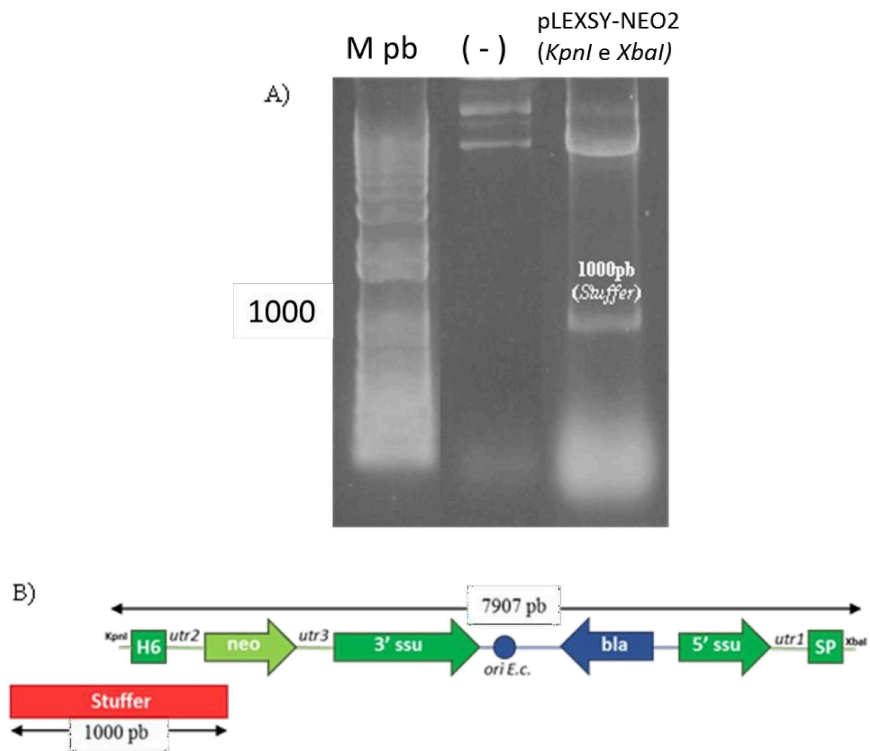


Figura 2

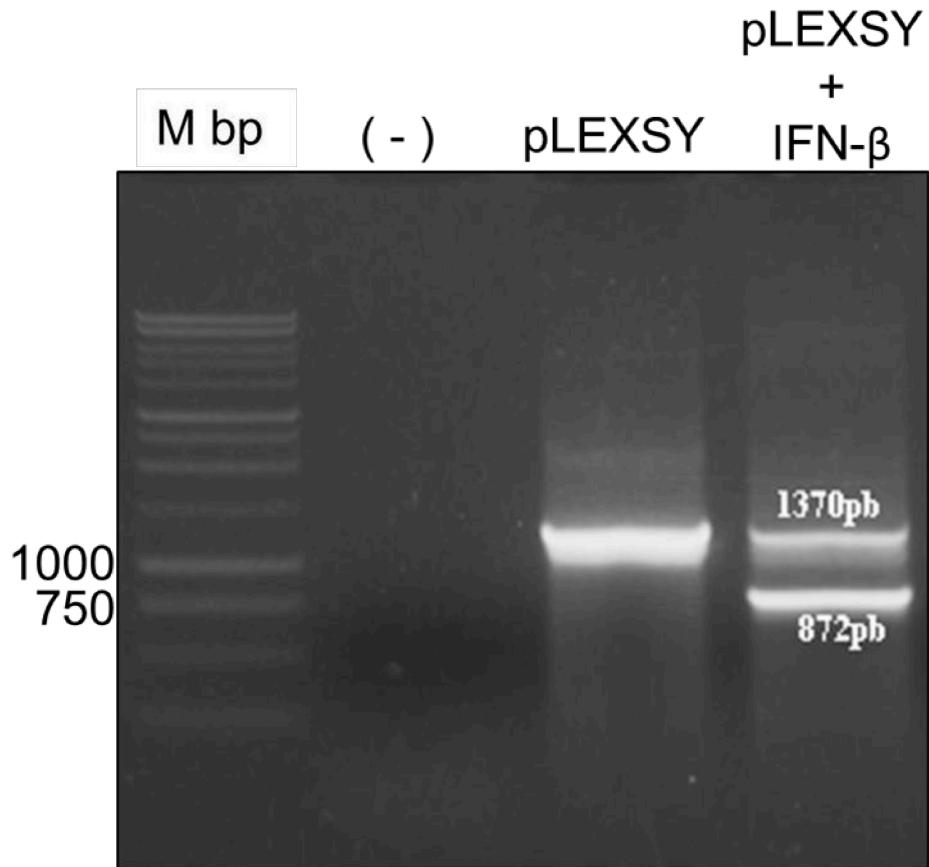


Figura 3

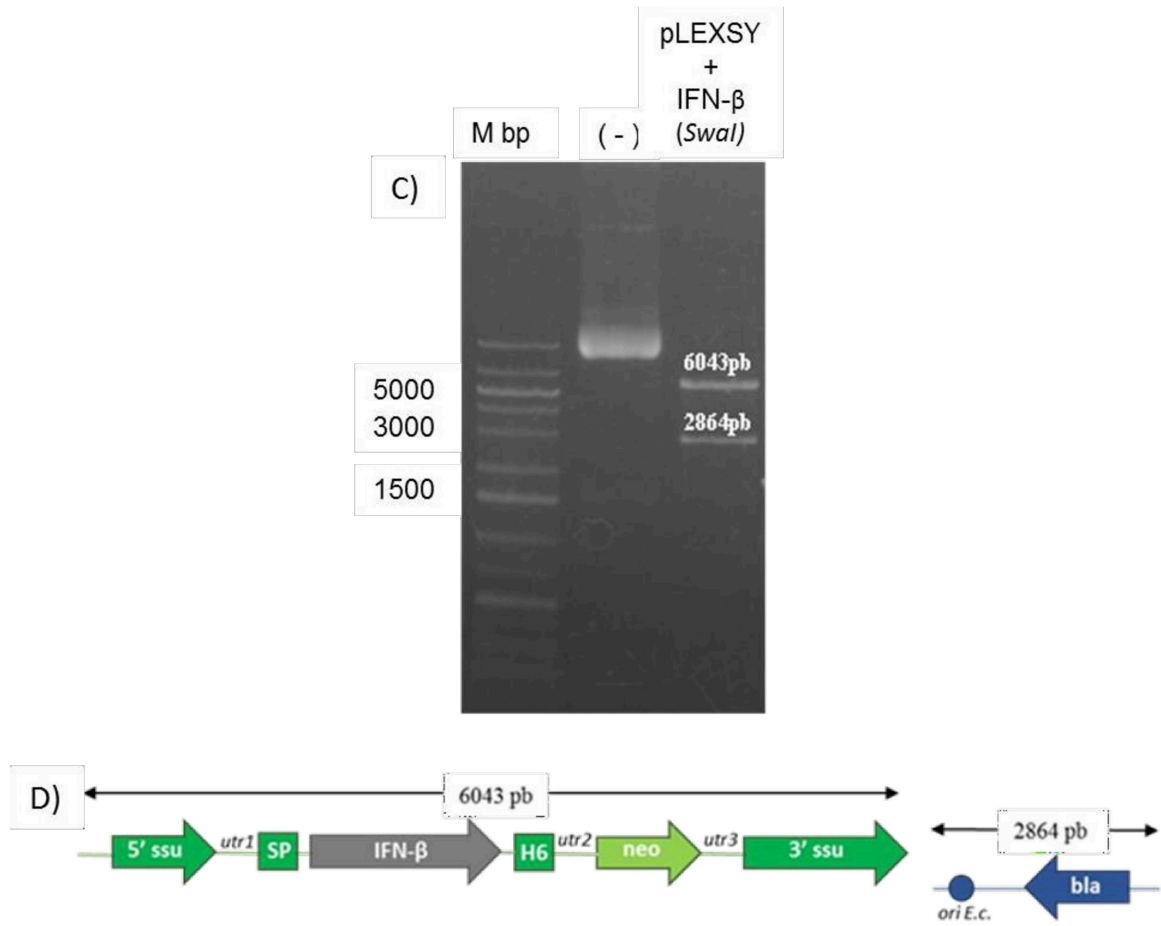


Figura 4

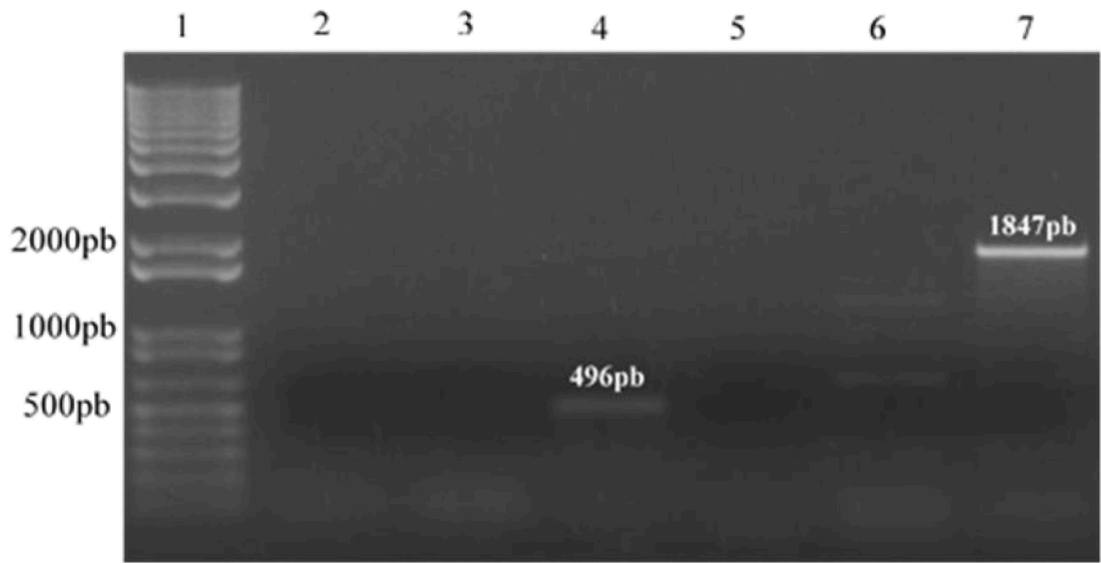


Figura 5

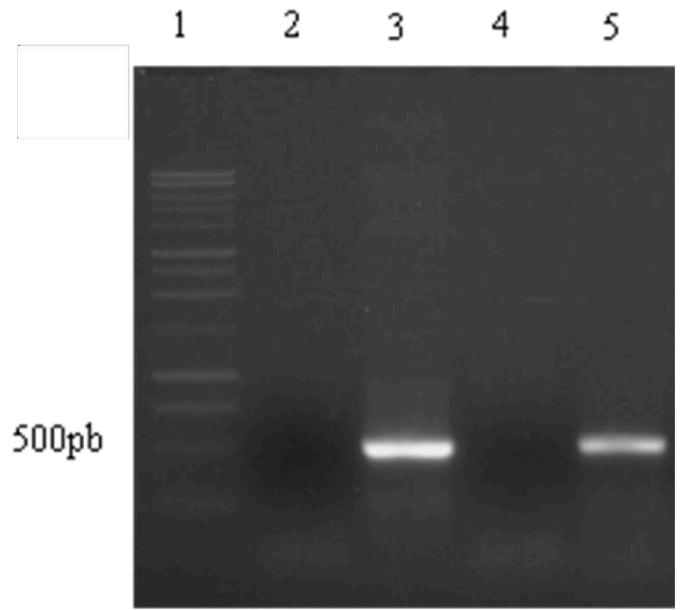


Figura 6

4/4

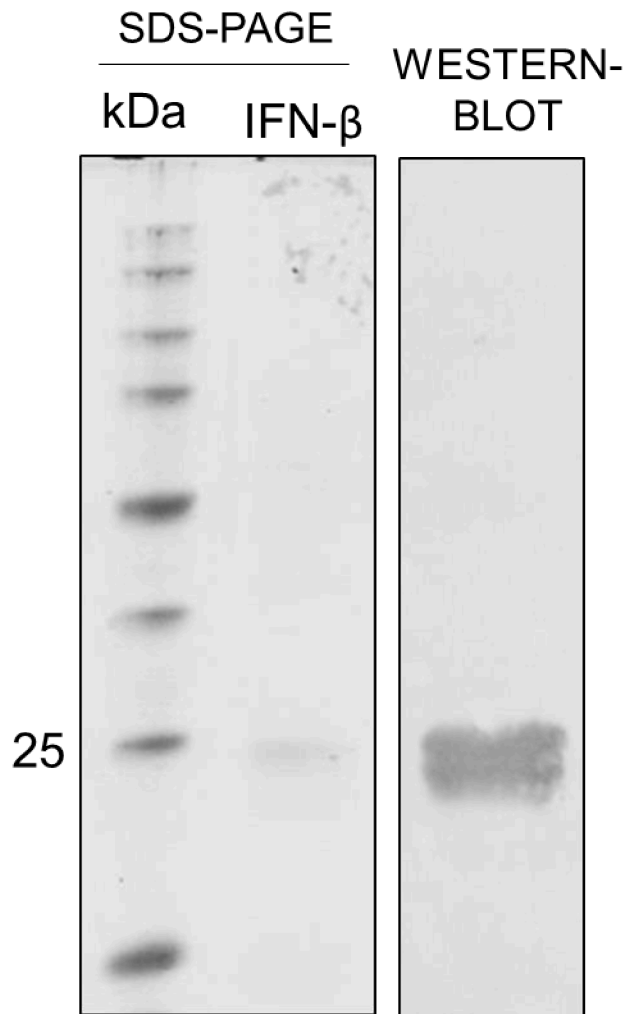


Figura 7

Resumo

PROCESSO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA INTERFERON-BETA HUMANO EM *Leishmania tarentolae* E USO

A tecnologia descrita no atual pedido de patente trata-se do processo de produção da proteína interferon-beta (IFN- β) humana em *Leishmania tarentolae*. A expressão dessa proteína em *L. tarentolae* é uma alternativa mais barata para os sistemas de expressão atuais, como por exemplo, células de mamíferos, e com maior atividade e estabilidade do que a expressão em sistemas bacterianos. Essa proteína é utilizada para o tratamento de doenças que causam impacto econômico para os sistemas públicos e privados de saúde devido à alta demanda e a seu alto custo de produção. Como depende de glicosilação com padrão específico de mamíferos para estabilidade e aumento da atividade da proteína, sua correta síntese utilizando uma plataforma de expressão otimizada proporcionará uma ação mais eficaz nos tratamentos que utilizam esse medicamento, aumentando o bem-estar de pacientes por diminuir efeitos adversos, além de reduzir custos do produto na indústria farmacêutica.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência.txt
- Data de Geração do Código: 22/02/2019
- Hora de Geração do Código: 16:34:04
- Código de Controle:

- Campo 1: 3F5395A2A294CCEE
- Campo 2: 0D351C3D137C38FA



Anexo III - Artigo de revisão publicado como co-autor na revista Process Biochemistry intitulado: "Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review".

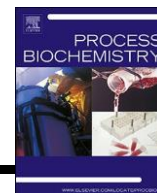


Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Process Biochemistry

journal homepage:

Review



Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review

Tatiana Aparecida de Oliveira^{a,*}, Walmir da Silva^a, Nancy da Rocha Torres^b, João Victor Badaró de Moraes^b, Renato Lima Senra^a, Tiago Antônio de Oliveira Mendes^a, Abelardo Silva Júnior^c, Gustavo Costa Bressan^a, Juliana Lopes Rangel Fietto^a

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-900, Brazil

^b Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-900, Brazil

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-900, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

LEXSY SYSTEM
Recombinant proteins
Leishmania tarentolae
Glycoproteins

ABSTRACT

The production of recombinant proteins is a rapidly expanding industrial field. Several proteins that previously were extracted from their natural source by expensive and time-consuming processes can now be produced in various organisms, including bacteria, yeast, insect cells, and mammalian cells. These traditional systems have their advantages and disadvantages, but one of the major problems is related to post-translational modifications that mostly differ from those in mammals. The LEXSY system was developed for the expression of recombinant proteins in *Leishmania tarentolae* a non-pathogenic protozoan species isolated from the lizards *Tarentolae annularis* and *Tarentolae mauritanica* it is a biosafety level I protist with high biomass production that is well-suited for cultivation on an industrial scale. The system has advantages for the expression of several proteins, including glycosylated proteins, and for the homogenous glycosylation of mammalian proteins. In this review, we have compared the classical systems and LEXSY, and presents a historical review of heterologous expression in *Leishmania*. We also list the specific characteristics, advantages, and problems with LEXSY in a work-oriented perspective to facilitate the use of this eukaryotic expression platform.

Introduction

Proteins are a group of macromolecules with diverse biochemical functions that, mainly because of biotechnological advances, have been widely used for research and practical applications in such areas as healthcare and the food industry [1-3]. Obtaining proteins from natural sources is laborious and expensive and results in low yields however, advances in DNA technology have enabled the use of expression systems for recombinant protein production using more efficient processes [4-6]. Several proteins have been approved for use in the healthcare field. According to Global Data, in 2015, approximately 400 proteins were obtained *via* recombinant technologies [6].

Bacterial prokaryotic systems and eukaryotic systems involving mammalian cells, insect cells, plants, yeasts, and trypanosomatids are some examples of expression platforms for recombinant proteins [7-12].

Although the bacterial systems are the mostly commonly used because of their simplicity, low cost, and high yield, they are not always

the most suitable method for recombinant protein expression, especially when the protein requires post-translational modifications, such as glycosylation, that are not performed by prokaryotes. Thus, more recently, protozoa have emerged as organisms of interest for heterologous expression of eukaryotic proteins with proper post-translational

modifications [8,10,13-15]. A system based on *Leishmania tarentolae*, a unicellular eukaryotic protozoan isolated from the lizard species *Tarentola mauritanica* and *Tarentola annularis*, was developed in 2002. The

L. tarentolae is a good candidate for a potential eukaryotic expression system, because in addition to possessing the characteristics common in the family Trypanosomatidae it is a nonpathogenic species for mammals [13,16-18]. The evolution of methods for the cultivation and genetic manipulation as well as the improvement of transfection techniques have enabled the creation of an expression system called LEXSY (Leishmania expression system) by the German company Jena Bioscience, and it has been used to express various proteins since 2002 [8,12,13,19,20].

modifications similar those in mammalian cells [8,13,15,21,22]. The N-glycosylation in this parasites is exceptionally homogeneous with biantennary complex-type oligosaccharides having the Man(3)GlcNAc

(2) core structure with α -linked galactose residues [8,13,19,21-23].

This is an important advantage because the vast majority of therapeutic proteins of interest are glycosylated [24-26].

This literature review is focused on applications of the unicellular

LEXSY eukaryotic system, the premise of which is to precisely combine the advantages of a prokaryotic system (robustness and low cost) with the post-translational modifications of eukaryotic cells and to provide a more advantageous system for the expression of proteins with post-translational modifications, especially glycosylated proteins [13,27].

1. Glycosylation in proteins

Glycosylation is the most common but complex post-translational modification of many eukaryotic therapeutic proteins [20,24,28,29].

Glycosylation is mediated by enzymes that add oligosaccharides to the side chains of a protein backbone. Depending on the location of the attachment two major types of glycosylation may occur: N-glycosylation and O-glycosylation. In N-glycosylation, carbohydrates are added to the amino group of asparagine residues, whereas during O-glycosylation, carbohydrates are attached to the hydroxyl groups of serine or threonine [24,26,29-32].

Glycosylation is critical in proteins intended for human use because

such modifications generally influence or determine their pharmacological properties, including stability, solubility/bioavailability, *in vivo* activity, pharmacokinetics, and immunogenicity [24,29].

Various therapeutic proteins available for clinical use are glycosylated and the composition of linked glycans potentially influences their therapeutic efficacy and immunogenicity [28]. Monoclonal antibodies, for example, represent the vast majority of approved and produced biopharmaceuticals [33], and their glycosylation-based modifications are important for structure, stability, serum half-life, and complement recruitment [34].

Post-translational modifications vary from one organism to another the glycosylation patterns observed in yeasts, insects, and plants are significantly different than those in

human cells and may generate biologically inactive proteins after heterologous expression [24,26,35]. Fig. 1 depicts the major patterns of N-glycans and O-glycans in mammalian cells.

Glycosylation can affect the stability, resistance to proteolysis, and thermostability of proteins, as well as increase their solubility and inhibition protein aggregation. In general, this post-translational may modulate protein-protein interactions and an understanding of such modifications is extremely important to elucidate the activity of a protein in an organism [24,36].

2. A brief review of the major systems of heterologous proteinexpression

Among the various hosts used for the production of proteins, bacteria are the most frequently used for industrial applications

E. coli is the most common expression system for the production of several recombinant proteins, including some therapeutics and several industrial enzymes [40]. This microorganism is often the initial choice for protein expression because of its high doubling rate in low-cost culture media [37,39]. The genome of *E. coli* has been extensively studied since the 1980s when the first recombinant insulin was produced [36] and it has been explored further over the years [9,10,37,41]. The characteristics of *E. coli*, such as easy handling, availability of optimized expression plasmids, and ease of incorporating exogenous DNA, allows prokaryotic and eukaryotic proteins to be produced in amounts much greater than those obtained from natural

sources such as tissues, cells, or fluids [40,42-44].

Nonetheless, *E. coli* is not an ideal host for several reasons, such as the absence of common post-translational modifications, formation of insoluble aggregates (inclusion bodies) in the cytoplasm, and inactivity or toxicity of the produced protein [38,44-47]. Among these problems, post-translational modifications represent a major problem for this prokaryotic system because the bacterial gene expression machinery

cannot perform glycosylation, thereby often leading to the production of biologically inactive proteins [38].

The limitations of prokaryotic systems have spurred the development of other expression systems. Among eukaryotic systems, yeasts stand out for their capacity for high expression levels and containing the machinery for various post-translational modifications, including chaperones that aid in polypeptide folding, glycosylation, methylation, acylation, proteolytic maturation and targeting to subcellular compartments [2,9,35]. Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* are highly adaptable to large-scale, endotoxin-free production, and are second only to *E. coli* in terms of popularity in the field of recombinant protein production [2,3,5,9,48].

Because it contains all the advantages of yeast-based systems, *P. pastoris* has been used by biotechnologists for the large-scale production of foreign proteins. The expression in this

microorganism has been extensively studied to overcome difficulties involving the glycosylation pattern and levels of expression [49].

This type of expression often results in the production of adequately folded soluble recombinant proteins but with a glycosylation pattern very different from that seen in mammals. Particularly, *S. cerevisiae* may add excess mannoses, leading to the hyperglycosylation of proteins, which may render a target glycoprotein unable to perform its biological function [9,12,35,50].

For the production of therapeutic proteins, mammalian cells remain the expression host most often employed to produce human-like glycans and two-thirds of marketed therapeutic proteins, including monoclonal antibodies, are glycoproteins [3,14,23,24].

Systems involving the expression of proteins in insect and mammalian cells arose from the need to obtain folded proteins and post-translational modifications similar to those in the mammalian systems. Nevertheless, the insect cell system does not produce a glycosylation pattern similar to that of mammals (see Fig. 2), and both systems have a

low yield and are costly and difficult to use on an industrial scale [9,51-53].

3. Trypanosomatids as a system for protein expression

The protozoan *L. tarentolae*, a member of the Trypanosomatidae family, emerged for use in the expression of recombinant proteins because it is easily manipulated and inexpensive. One of the advantages of the LEXSY system is that it can express proteins with a homogeneous and mammalian-like glycosylation pattern [13,19,27].

The protozoan family Trypanosomatidae, in which the *Trypanosoma cruzi* parasites and *Leishmania* species stand out, is one of the oldest groups of eukaryotes that are extracellular and intracellular parasites in humans and animals causing various diseases [8,10,13,55,56].

Trypanosomatidae among eukaryotes are very well studied mainly because of their relevance in public health [8]. Over the years, the mechanisms of gene expression control and some unique characteristics of these organisms have been described, creating interest in their application for the protein expression [13,55]. These microorganisms are notorious for finding unique solutions to general processes in the eukaryotic cell. For example, during RNA editing the mRNAs are transcribed as polycistronic precursors that are post-transcriptionally processed into individual mRNAs by trans-splicing and polyadenylation. Thus, the regulation of protein expression predominantly occurs at the post-transcriptional level through intergenic untranslated regions (UTRs) [8,13,15,55,57,58].

The first attempt at protein expression using these organisms was

made in the 1990s when *Leishmania major* was chosen to express the membrane glycoprotein (GP46A/M-2) of *Leishmania amazonensis* by

Examples- Mature N-glycans patterns

Examples- Mature O-glycans (mucin-type)

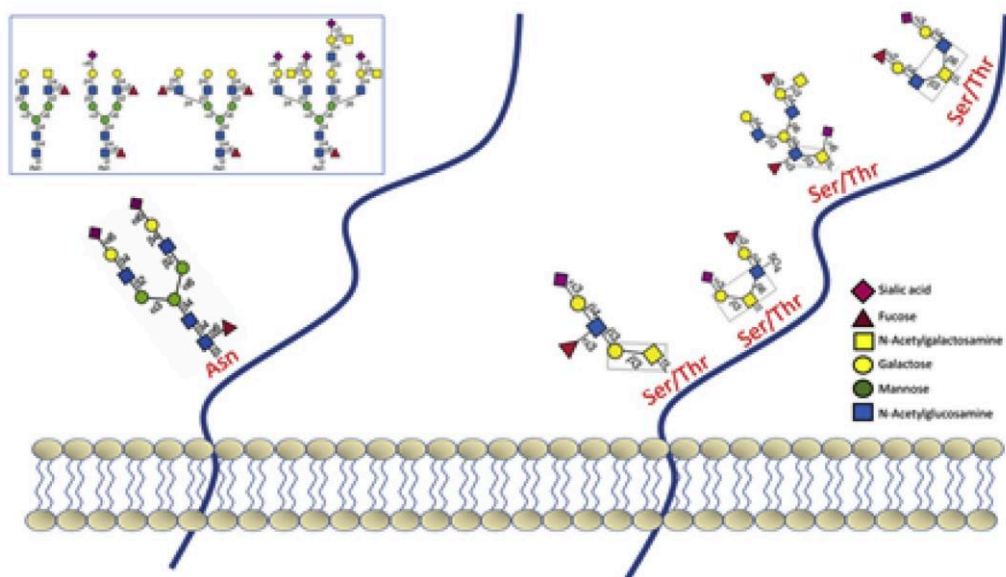


Fig. 1. Major patterns of N-glycans and O-glycans in mammalian cells. The blue lines represent transmembrane glycoproteins as well as those that are secreted and GPI anchored. Left panel: An example of a major pattern of N-glycan linked to an asparagine (Asn) residue of a glycoprotein. The inset shows other examples of mammalian mature N-glycans. Right panel: Examples of the main patterns of O-glycans linked to serine (Ser) or threonine (Thr) in a glycoprotein. The carbohydrates inside the grey box represent the common core structures of O-glycans. The geometric symbols represent each type of carbohydrate found in the glycans. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

LeBowitz et al., with the objective of studying parasite surface antigens [59]. In the year 1993, Tobin et al. engineered *L. major* to express IFN- γ from mice *in vivo* infection studies [60]. In 1995, Zhang and colleagues used *Leishmania donovani* to express the human p53 protein, which turned out to be biologically active [61]. In 1995, Voorhis et al. showed that *T. cruzi* was effective for the expression of mammalian cytokines

such as IL-2 and IFN- γ , and in that work, the proteins were correctly folded and bioactive [62]. Tovar et al. carried out a study on the in-tracellular survival of a parasite, wherein the *T. cruzi* trypanothione reductase enzyme was expressed in *L. donovani* [63]. In 2000, Misslitz et al. reported that β -galactosidase and green fluorescent protein (GFP) were abundantly expressed in a stable form in amastigotes of *L. major*



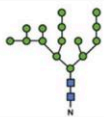

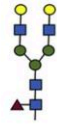



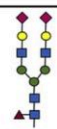
Expression system	Classification	N-Glyc Main Pattern	Membrane Protein	Complex Protein
Bacteria- <i>E. coli</i> 	Prokaryote	No	Possible but limited	Possible but limited
Yeast- <i>P. pastoris</i> 	Eukaryote		Yes	Yes
Protozoa- <i>L. tarentolae</i> 	Eukaryote		Yes	Yes
Insect cells 	Eukaryote		Yes	Yes
Mammalian cells 	Eukaryote		Yes	Yes

Fig. 2. Comparison of various expression systems. N-glycans vary among organisms [54]. The main N-glycan (N-Gly) patterns of different expression systems are highlighted in the third column. The carbohydrate symbols are the same as those presented in Fig. 1.

and *L. mexicana* [64]. Also in 2000, the trans-sialidase enzyme of *T. cruzi* was expressed in *L. major* [65]. All these studies were important because they led to a better understanding of how these microorganisms functioned as an expression system; these studies showed that although bioactive proteins were produced, yields were still very low. Another important issue is that these species of parasites are pathogenic to humans, a property that limits their handling because of biosafety issues [13]. Thus, the need has arisen for a trypanosomatid species that is not pathogenic to mammals and can be optimized for the large-scale expression of recombinant proteins.

4. *L. tarentolae* as an expression system

The protozoan *L. tarentolae* is a nonpathogenic species that was isolated from the blood of the gecko species *T. annularis* and *T. mauritanica* in 1921 in Sudan and in 1934 in Algeria, respectively; these parasites were found living in the lumen of these animals in the promastigote form but they did not manifest the ability to infect mammalian cells [17–19,66].

Studies of the genome of *L. tarentolae*, made by Raymond and

coworkers in 2012, and revealed 90% homology of this parasite with other pathogenic species like *L. major*, *L. infantum*, and *L. braziliensis*. The missing genes (~250) were mostly those involved in the intracellular survival of these species; further tests indicated that the parasite efficiently targets antigen-presenting cells. The *L. tarentolae* is not able to exert any pathogenic effect was not able to replicate within the cell, even in immunocompromised mice, the parasite is eliminated after several days [12,16,19,66].

The development of genetic manipulation techniques and the cultivation of trypanosomatids led to the creation of an expression system based on *L. tarentolae* by Jena Bioscience (Germany). The LEXSY system was devised to combine the advantageous characteristics of each expression platform and to produce functional glycosylated proteins in a quickly and inexpensively manner [8,13].

The publication of the genome of *L. tarentolae* has led to a better understanding of the genetic potential of this organism [16]. Nevertheless, no deep analysis of the gene content of glycosylation-related enzymes has been performed. The BLASTp algorithm version 2.8.1 [67] was employed with the default parameters to search for human 'like'

enzymes associated with N- and O-glycosylation in *L. tarentolae* (Fig. 3).

After, the KEGG database release 89.1 and the *L. tarentolae* genome release 41 from TriTrypDB was used to detect the absence of some key genes encoding enzymes in the two glycosylation processes (Tables 1 and 2) [68]. The N-glycosylation process is very similar to that in

Table 1
Similarities between human enzymes of N-glycosylation retrieved from the KEGG database and proteins encoded in the *L. tarentolae* genome.

Number ¹	Gene code ²	KEGG ID	<i>L. tarentolae</i> protein ID	BLASTp identity(%)	BLASTp e-value
1	FUT8	K00717	LtaP02.0260	75.17	2e-59
2	ALG13	K07432	LtaP30.0600	60.74	1e-171
3	ALG1	K03842	LtaP18.0910	83.16	0.0
4	ALG2	K03843	LtaP34.2270	45.04	2e-131
5	MGAT3	K00737	LtaP36.1700	88.90	0.0
6	MGAT5	K00744	LtaP36.4890	87.97	8e-81
7	MGAT4C	K13748	LtaP36.0150	74.81	0.0
8	MGAT2	K00736	LtaP36.2160	85.37	0.0
9	MGAT4 A,B,D	K00738	LtaP36.3920	81.91	3e-52
10	MGAT1	K00726	LtaP02.0150	70.25	8e-110
11	B4GALT1	K07966	LtaP07.0150	60.20	0.0
12	SIAT1 ST6GAL1	K00778	No significant hit	-	-

¹ Numbers represent proteins in Fig. 3.

² Gene codes are described in Fig. 3.

humans with the absence of only the sialyltransferase. Expression of this enzyme in *L. tarentolae* is a promising approach to produce completely humanized glycoproteins. On the other hand, the high complexity of O-glycosylation in terms of variability of structure and homogeneity reflects greater differences from human enzymes, as compared to the N-glycosylation machinery.

5. The lexsy system: characteristics, advantages, and challenges

One of the advantages of the *L. tarentolae*-based expression system is that this unicellular eukaryote is easily cultivable and does not require large biosafety facilities for its manipulation because it is not

pathogenic to mammals (level 1); in addition, the parasite exhibits high growth rates over short periods, especially when compared to that mammalian cells [8,13,19]. The cultivation is carried out in simple inexpensive nutrient media, and BHI (brain heart infusion) medium supplemented with hemin is most often used; nevertheless, the promastigotes appear fit in various nutrient media, with comparable growth characteristics both in static culture and during agitation [1,15,69]. The cultivation of the parasite does not require a CO₂ incubator; it can be kept at 26 °C and can reach high cell density (> 10⁸ cells/mL) because of its short multiplication period (approximately 5–6 h) [1,10,13,69–71].

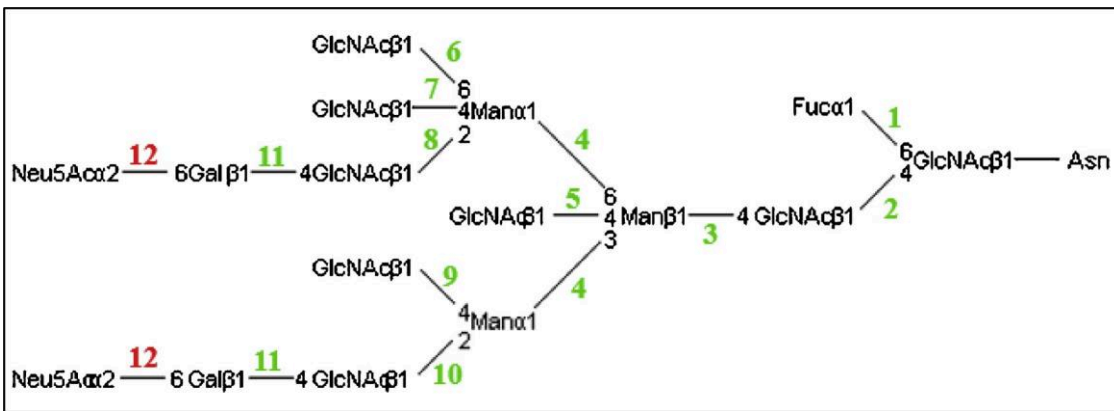


Fig. 3. Reconstruction of the N-glycosylation pathway based on BLASTp searches in the predicted proteome of *L. tarentolae*. Green numbers represent *L. tarentolae* enzymes with high similarity to human proteins. The red number represents an enzyme absent in *L. tarentolae* according to the sequence alignment methodology. Legend: 1, fucosyltransferase; 2, acetyl-glucosamine transferase; 3, mannosyltransferase; 4, mannosyltransferase; 5, acetyl-glucosamine transferase; 6, acetyl-glucosamine transferase; 7, acetyl-glucosamine transferase; 8, acetyl-glucosamine transferase; 9, acetyl-glucosamine transferase; 10, acetyl-glucosamine transferase; 11, galactosyltransferase; 12, sialyltransferase. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2

Similarities between human enzymes of O-glycosylation retrieved from the KEGG database and proteins encoded in the *L. tarentolae* genome.

Gene code ¹	KEGG ID	<i>L. tarentolae</i> protein ID	BLASTp identity (%)	BLASTp e-value
GALNT	K00710	No significant hits	-	-
SIAT7A	K03479	No significant hits	-	-
C1GALT1 C1GALT1C1	K00731	No significant hits	-	-
B3GNT6	K00739	No significant hits	-	-
GCNT1	K00727	No significant hits	-	-
SIAT4	K00780	No significant hits	-	-
GCNT3	K09662	No significant hits	-	-
B4GALT5	K09905	No significant hits	-	-
SIAT7A	K03479	No significant hits	-	-

¹ GALNT, polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase; SIAT7A, sialyltransferase 7A; C1GALT1/C1GALT1C1, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase; B3GNT6, acetylgalactosaminyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase; GCNT1, beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase; SIAT4, sialyltransferase 4; GCNT3, beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase; B4GALT5, beta-1,4-galactosyltransferase 5.

L. tarentolae has been engineered to produce all types of proteins, including glycosylated and membrane proteins (Table 2). Several proteins have been expressed in *L. tarentolae*, as reported on the website of Jena Bioscience as well as in the review paper by Basile and coworkers (2009); however, complete information on quantities or under what conditions the expression occurred was not provided [8,72].

The main purpose of this system is to combine the characteristics of a bacterial system (rapid proliferation) with the advantages of eu-

karyotes (post-translational modifications), thus eliminating undesirable characteristics such as yeast hyperglycosylation and endotoxin

contamination in the case of bacteria [1,12]

Proteins can be expressed intracellularly or extracellularly. In the latter case, the low level of endogenous protein secretion in *L. tarentolae* facilitates the purification of a recombinant protein because most of it is present in the medium [1,16]. Extracellular production in the LEXSY system is directed by the use of specific vectors integrated with the *L. mexicana* LmSAP (*L. Mexicana* secreted acid phosphatase) signal peptide (SP) [13,15,73].

Trypanosomatids can be transfected efficiently with several types of DNA vectors. In the case of *L. tarentolae*, plasmid constructs are amplified in *E. coli* and introduced into the parasite by electroporation, resulting in the creation of stable recombinant strains [19,74-76].

At present, only Jena Bioscience offers commercial products for

LEXSY. The company has developed several options: an episomal system (autonomous replicons) and an integrative-constitutive system (stably incorporated into the genomic DNA) for the intracellular or extracellular production of proteins [13,19,77]. Expression cassettes may be chosen within various available vectors. A summary of expression vectors, resistance genes, and reporter genes is given in Table 3 [77].

Some options for constitutive-expression vectors include pLEXSY: ble 2.1, hyg 2.1, neo 2.1, sat 2.1, bsd 2.1, and pac 2.1. Integrative and inducible vectors include pLEXSY_ible3, pLEXSY_I-blecherry3, and pLEXSY_I-neo3;

Table 3

Expression vectors for the LEXSY system.

Vector	Expression Cassette	Expression	Resistance	Promoter	Strain
pLEXSY_I-blecherry3*	Integrative	Inducible-Tet	Bleo	T7RNApol	T7
pLEXSY_I-ble3	Integrative	Inducible-Tet	Bleo	T7RNApol	T7
pLEXSY_I-neo3	Integrative	Inducible-Tet	Neo	T7RNApol	T7
pLEXSY_IE-T7	Episomal	Inducible-Tet	Bleo	T7RNApol	
blecherry4*					
pLEXSY_pac2.1	Integrative	Constitutive	Puro	RNApol	I
pLEXSY_bsd2.1	Integrative	Constitutive	Bsd	RNApol	
I P10pLEXSY-neo2.1	Integrative	Constitutive	Neo	RNApol	
I P10pLEXSY-sat2.1	Integrative	Constitutive	Ntc	RNApol	
I P10pLEXSY-hyg2.1	Integrative	Constitutive	Hygro	RNApol	
I P10pLEXSY-ble2.1	Integrative	Constitutive	Bleo	RNApol	
I P10					

Tet: a tetracycline induction system, Bleo: bleomycin, Neo: Neomycin, Puro: puromycin, Bsd: blasticidin, Ntc: nourseothricin. T7 RNA pol: T7 RNA polymerase. RNA pol I: RNA polymerase I.

* This vector carries fluorescent reporter Cherry (the Cherry fluorescent protein).

target gene integrated into the 18S locus of the ribosomal DNA subunit (ssu), where the gene is flanked by two fragments of the locus of the minor subunit of the rRNA (5' and 3'ssu) for homologous recombination; the genes are transcribed under the control of RNA

polymerase I of the protozoan host [19,71]. For episomal

expression,

the T7 strain that coexpresses T7 bacteriophage RNA polymerase and a tetracycline repressor is employed for transfection, and specific transcription of the target gene is activated after the addition of tetracycline to the culture medium. The advantage of this type of expression is that transcription is under the control of a very strong promoter because the T7 RNA polymerase is known to be ~10-fold more efficient than Pol I RNA in trypanosomatids [13,19,76].

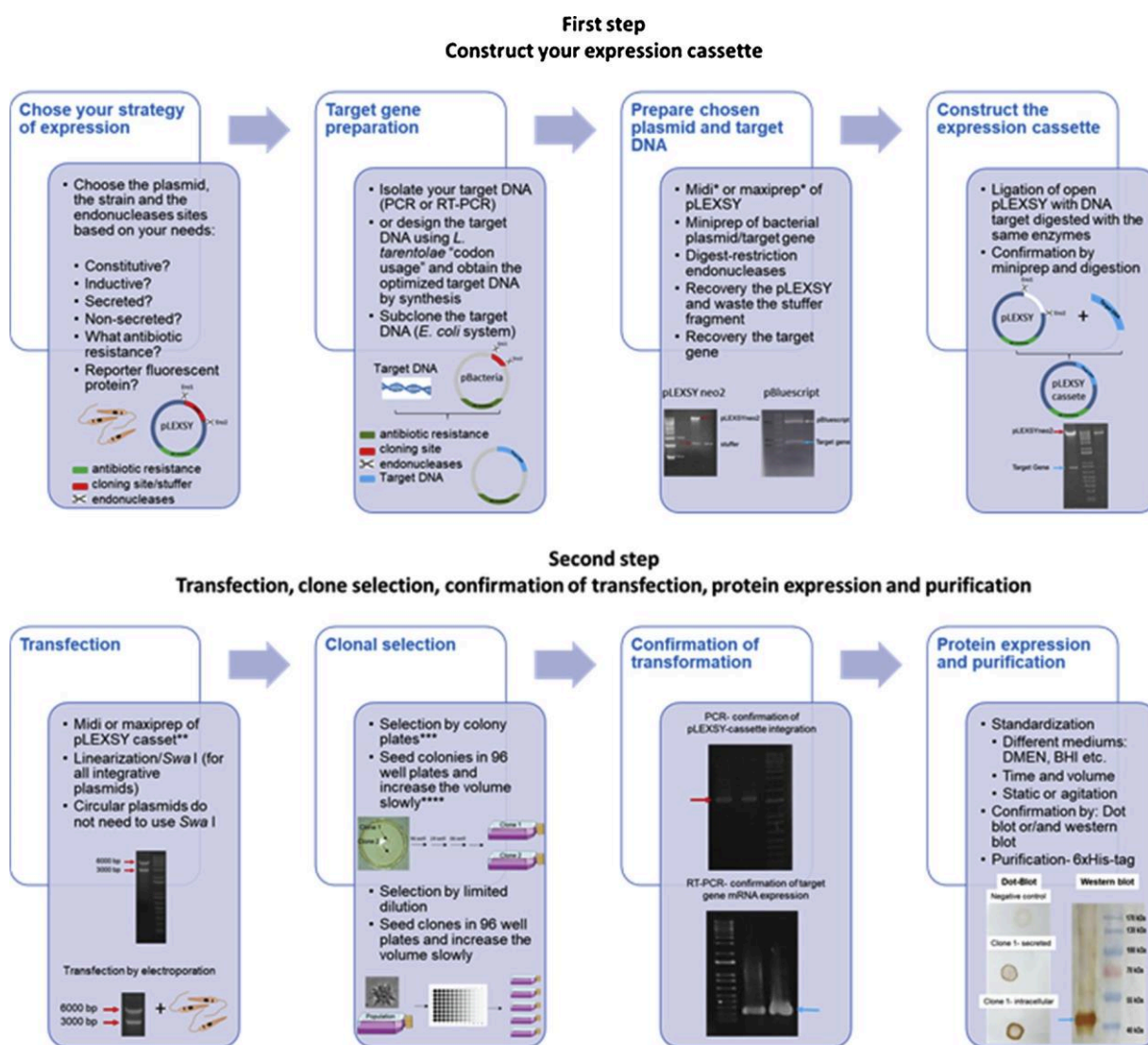
The diagram below (Fig. 4), a schematic illustration of cultivation of

L. tarentolae is illustrated from cloning (choosing vectors and cassetteexpression) to expression of the protein of interest.

Recombinant strains, either episomal or constitutive constructs, were found even after successive cultivation. Kushnir and collaborators in 2011 demonstrated that transfections performed with linear DNA support approximately 90 generations, whereas those with circular DNA support at least 50 generations without the addition of the anti-biotic after clonal selection [75]. In addition, when one of the clones was kept in culture under antibiotic pressure, no significant differences in expression or inducibility were observed over a period of ~2 years (> 1000 generations). Moreover, Bolhassani and coworkers also 2011 observed no changes in the expression of green fluorescent protein (GFP) for up to 6 months even in the absence of antibiotic selection [1,75,78].

In terms of productivity, *Leishmania* can produce larger amounts of

proteins than the mammalian system. Using the LEXSY system, a human subunit of major histocompatibility complex II (MHC II- β) was expressed *via* secretion with a yield of 500 mg/L [72]. With cytoplasmic expression, Kushnir and collaborators in 2011 were able to obtain large



*The yields of LEXSY plasmids and expression cassettes (more than 9Kb) are significant lower in comparison with common bacterial plasmids

**To transform *L. tarentolae* its necessary high amount of circular or linearized DNA (if possible more up to 5 µg)

***Cell grow –selection by colony plates is slowly because the cell grow is to slow (possible contamination with other microorganisms is a problem)

*****L. tarentolae* is sensible to low number of cells, it is necessary to be careful in this step and increase the volume of cultivation slowly

Fig. 4. Schematic of the conditions for growth and selection in LEXSY.

amounts of cytoplasmic EGFP (300 mg/L) [27].

The expression levels achieved to date still need to be improved, mainly to compete directly with other expression systems in use; after all, as the expression levels in many cases are between 0.1 and 30 mg/L [72].

Monoclonal antibodies are a class of proteins that would benefit from expression in the LEXSY system, as these proteins require glycosylations and for this reason, they continue to be expressed efficiently in mammalian systems [14].

Some variations can be adopted to increase the yield of the protein produced. Kianmehr and collaborators, in 2016, reported that codon optimization can have a positive effect in this context [79,80]. Another way to improve expression is to increase the number of copies of the

gene of interest in the *Leishmania* genome and using additional expression vectors [81]. The gene of interest may also be placed under a stronger promoter such as T7 which has been shown to be 10-fold more potent than Pol I RNA [13,75,82].

Trypanosomatids are rich in glycoproteins, which account for more than 10% of their total protein [8,13]. The characteristics of the secretory endocytic pathways are very similar to those of higher eukaryotic expression systems, such as mammalian cell lines [8,57]. These characteristics make *L. tarentolae* highly advantageous for the expression of glycoproteins [13]. In addition, N-glycans are the closest to the

type of glycosylation in mammals with the same α -linked galactose and

fucose [8,13,19].

One of the main advantages of the LEXSY system is the wide range

Table 4
Examples of the many recombinant proteins expressed in *L. tarentolae*.

Cytoplasmic proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	References
DsRed, <i>Discosoma</i> sp.	160	28	[19,72]
EGFP, Green Fluorescent Protein	300	28	[72]
EGFP-SOD1, Superoxide Dismutase	100	63	[75]
Erythropoietin	-	35	[13,27]
Fc-region of rabbit IgG	2.95	28/55	[84]
IFN γ , Interferon	9.5	19	[81]
Laminin (LM)-332 (3 α 3 β 2 γ)	0.5	150/135/ 135	[85]
Luciferase	-	-	[86]
p85 (of PI3 kinase) kinase accessory protein	3	85	[19]
SmyHC, heavy chain of human smooth muscle myosin	1	154	[72]
SOD1, Cu/Zn superoxide dismutase	6.5	16	[87]
SOD1, Cu/Zn superoxide dismutase	30	16	[19]
Nuclear Proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
T7 RNA polymerase	1	100	[19]
Secreted Proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
CRP, Human C-reactive protein	44	23	[88]
hsGPVI domains of human glycoprotein VI (GPVI)	6.5	19.7	[80]
KLK2, kallikrein-related peptidase 2	0.9	~27	[89]
MDP1, Magnesium Dependent Phosphatase 1	6	45	[19]
MHC II, major histocompatibility complex	500	30	[19]
PC4	-	~53-62	[90]
PC4, Proprotein convertase	15	72	[19]
rRAGE, receptor for advanced glycation endproducts	36	1.5	[80]
sAPPalpha, Soluble amyloid precursor protein alpha	0.1-0.5	68.6	[83]
tPA (tissue plasminogen activator)	-	~64	[91]
tPA (tissue plasminogen activator)	0.17	72	[82]
Truncade serine protease domains (K2S) and (tPA)	-	39	[92]
Membrane Proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
ABCB6 transporter	-	90	[93]
EGFP-Rab7 (mb associated)	12	52	[27]
	3.5		[75]
PDM9 (Type I), human transmembrane protein	0.5	43	[19]
Structural Proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
HIV-1, human immunodeficiency virus 1	-	55	[56]
Antibodies	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
A10 scFv, murine laminin	2.95 mg/l		[84]
LOB7 scFv, single chain antibody	2.95 mg/l		[84]
In vivo	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
PpSP15, <i>Phlebotomus papatasi</i> salivary protein	In vivo	15	[94]
Viral proteins	Amount (mg/L)	Size (kDa)	Reference
Hendra virus (HeV)	0.5	70	[95]
Viral like particles (VLPs)	4	60	[96]

of post-translational modifications produced; the glycosylation-based modifications have shown to be homogeneous and to produce the core Man3GlcNAc2 structure, but without sialic acid [13,19,23,34,83]. On the other hand, *L. tarentolae* lacks higher branched N-glycans (tri- and tetra-antennary), probably because of the absence of N-acetylglucosaminyltransferase IV activity as suggested recently [34].

In 2002, Breitling et al. first tested *L. tarentolae* as an expression system to produce recombinant human erythropoietin through intracellular and extracellular pathways. The obtained protein was N-glycosylated and biologically active. In addition, N-glycosylation performed had greater similarity with mammalian N-glycosylation than with that carried out in yeast and insect cells; only the addition of a terminal sialic acid residue was lacking [13].

Regarding O-glycosylation, additional studies are required because the current system proceeds only through the first steps of this process. Klatt and coworkers, in 2012, demonstrated for the first time the O-glycosylation of a recombinant protein expressed in *L. tarentolae* (human sAPPalpha) and it was N- and O-glycosylated on similar sites as described for sAPPalpha expressed in mammals and had a similar biological activity [83].

Since the first protein produced by Breitling in 2002 (erythropoietin), *L. tarentolae* has been employed to express several proteins, according to data from Jena Bioscience and the scientific literature. The LEXSY system is versatile and is being used to express various proteins including enzymes such as superoxide dismutase, cytoplasmic proteins, nuclear proteins, viral proteins, antibodies, and even proteins to be expressed *in vivo* (Table 4).

Incorrect folding and low solubility have been demonstrated to be the main problems in prokaryotic expression systems. Most proteins from eukaryotic organisms expressed in LEXSY are correctly folded and processed; therefore, they are obtained in a fully functional state. Just like the mammalian system, this protein expression system can produce recombinant proteins rich in glycosylation. One of the main advantages of the *L. tarentolae* expression system is the mammalian-type post-translational modification of proteins. In fact, this characteristic makes LEXSY an attractive alternative to mammalian cells [13]. Moreover, LEXSY has been used to express a large heterotrimeric glycoprotein and an essential component of the epithelial basal lamina that promotes cell adhesion and migration: human laminin 332 [85]. This achievement indicates the efficiency of this system for producing oligomers with more than one polypeptide chain.

LEXSY has also been evaluated for the production of human IgG

chains, single chain antibodies, and Fc fusion proteins [73,84] but full-length antibodies have not been expressed to date (Table 2) [34]. Recombinant Fc fusion proteins have been efficiently expressed and found to be completely secreted into the culture medium. In addition, electrophoretic analysis showed that these proteins are secreted in the native conformation as dimers [14,77]. In relation to levels of expression

in mammalian cells, the yield is still low, ranging 0.04–3.83 mg/L [34]. The LEXSY *in vivo* system enables amino acid labeling in protein

structural studies. Specifically, Niculae in the work of 2006 achieved full assignment of all 18 valine residues using ¹⁵NMR (nuclear magnetic resonance) analysis of a ¹⁵N-Val labeled EGFP [21].

Finally, because of the evolutionary proximity between *L. tarentolae* and other trypanosomatids, the LEXSY technology can be used to effectively express trypanosomatid parasite proteins and produce trypanosomatids expressing foreign reporter proteins. One example is the production of *L. braziliensis* green fluorescent cells by constitutive overexpression of eGFP using pLEXSY-egfp [97]. These cells have been applied for drug screening. In this context, the expression vectors from LEXSY can be used for the creation of transgenic strains of several *Leishmania* species, such as *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, and *L. braziliensis* [97]. These species enable the functional characterization of unknown parasite proteins, investigation of parasite-host interactions, *in vivo* and *in vitro* screening of anti-

leishmanial drugs, and vaccine development [78,86,98–100].

All these applications demonstrate the many advantages of the *L. tarentolae* expression system. These advantages include the easy handling of cultures, a fast growth rate, cell densities (up to 10⁸ cells/ml), the choice of a constitutive or inducible systems, the intracellular or secretory expression of target proteins, the possibility of scaling up, the ability to produce stable cell lines, and a complete eukaryotic protein folding and post-translational modification machinery, including a mammalian glycosylation profile [13,27].

6. Conclusion

The LEXSY system emerged as an alternative platform for the production of proteins with post-translational modifications, especially for glycosylated proteins that require specific glycosylation patterns to ensure a desired biological effect. Several proteins including enzymes, cytokines, surface antigens, toxins, antibodies, and different classes of membrane proteins have been expressed in the LEXSY system, for various purposes including for use in structural studies.

Nevertheless, this system has to overcome some challenges such as low expression levels. Researchers have been working actively in this direction, and there have been studies to optimize of codons and on increase the number of heterologous genes in the *Leishmania* genome to increase yields. Another issue is that the O-glycosylation profiles in these organisms still require additional research because this type of

modification appears to stall at the initial stages.

Another challenge is the absence of the addition of sialic acid residues to a glycan. This process is not performed by the parasite naturally, and this drawback may lead to the production of recombinant proteins with altered characteristics. A possible solution is to take advantage of *T. cruzi* trans-sialidase, which has been reported to be expressed in the active form in *Leishmania* cells [13,65], or to add the absent genes (see Table 1). Thus, further studies in these areas are necessary to introduce new genetic modifications into *L. tarentolae* host cells in order to overcome these obstacles.

In summary, the LEXSY system shows great potential as a platform for the expression of recombinant proteins, with *L. tarentolae* being a promising host for the production of proteins with necessary post-translational modifications, especially glycosylated proteins.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Universidade Federal de Viçosa (UFV).

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001.