FREDERICO GUILHERME FREITAS LOBÃO RODRIGUES GOMES

**Geração de vetor lentiviral sintético
para terapia gênica *ex vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

**São Paulo
2016**

RESUMO

GOMES, F. G. F. L. R. **Geração de vetor lentiviral sintético para terapia gênica *ex vivo***. [Generation of synthetic lentiviral vector for *ex vivo* gene therapy]. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A terapia gênica consiste em introduzir uma sequência de nucleotídeos, codificante ou não-codificante, que tenha a capacidade de interferir na progressão de uma doença por ativação, inativação ou modulação da expressão de um gene alvo. Uma das rotas de transferência gênica é a *ex vivo*. Essa rota consiste em realizar a modificação gênica *ex vivo* de um tipo celular do organismo afetado, seguida do transplante celular no indivíduo para a correção do fenótipo. Dentre os vários vetores virais utilizados para transferência gênica, o sistema lentiviral é considerado um dos mais eficazes, visto que é capaz de manter altos níveis de expressão a longo prazo. Além disso, dentre os vetores virais que se integram no genoma, esse é considerado o mais seguro, tendo apresentado apenas um caso com relatado de efeito colateral sem reação adversa. Uma nova tecnologia utilizada para padronizar sistemas biológicos é a biologia sintética. Essa tecnologia pode ser utilizada como ferramenta para produzir e/ou otimizar sistemas de expressão para produção de proteínas de interesse terapêutico. O objetivo desse trabalho é gerar um vetor lentiviral sintético, para terapia gênica *ex vivo*, para reposição enzimática. Foram geradas quatro linhagens celulares humanas com produção transiente das proteínas terapêuticas Prot_Ctr e Prot_Mut sob controle dos promotores CMV e HeF1a. Para padronização do ensaio de transfecção, foram geradas duas linhagens celulares humanas que expressão da proteína fluorescente verde (*GFP*) sob controle dos mesmos promotores citados acima. Como controle negativo das linhagens produtoras da proteína terapêutica, foi gerada uma linhagem como vetor plasmidial vazio pLV_GTW_Mock. O nível de expressão do mRNA relativo às proteínas terapêuticas variou de $3.581,95 \pm 1.322$ a $10.377,18 \pm 2.562$ URE, não havendo diferenças significativas entre as linhagens produzidas ($p > 0,05$). O nível de produção da proteínas terapêuticas variou de 30,98 UI/mL a 241,1 UI/mL. A linhagem com maior produção dessa proteína foi a 293T/HeF1a_Prot_Mut, e essa diferença é significativa ($p < 0,05$). A partir da transfecção dos plasmídeos auxiliares e plasmídeo portador do cDNA que codifica a Prot_Mut na linhagem celular 293-T foi obtido o vetor lentiviral com título de $1,68 \times 10^7$ pLV/mL. Em conclusão, é possível gerar um vetor lentiviral funcional portador da Prot_Mut para utilização em terapia gênica *ex vivo*. Espera-se que o produto desse projeto de pesquisa gere uma

patente. Para evitar a quebra de novidade, atividade inventiva e suficiência descritiva, requisitos mínimos de patenteabilidade, os resultados foram apresentados sem mencionar a doença e o gene em estudo.

Palavras-chave: Lentivírus. Proteína terapêutica. Biologia sintética. Terapia gênica.

ABSTRACT

GOMES, F. G. F. L. R. **Generation of synthetic lentiviral vector for *ex vivo* gene therapy.** [Geração de vetor lentiviral sintético para terapia gênica *ex vivo*]. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Gene therapy involves introducing a nucleotide sequence, coding or non-coding that can to interfere with the progression of a disease by activating, inactivating or modulating the expression of a target gene. One of the gene transfer routes is the *ex vivo*. This route consists in producing a *ex vivo* gene modification of a cellular kind of the affected organismo, following the transplant of those cells to correct the fenotype. Among the various viral vectors used for gene transfer, the lentiviral system is considered one of the most effective, since it is able to maintain high levels of long-term expression. Between the viral vectors that integrate into the genome, the lentiviral system is considered the safest, and It has only filed a case with reported side effect without adverse reaction. A new technology used to standardize biological systems is the synthetic biology. This technology can be used as a tool to produce and/or optimize expression systems for production of proteins of therapeutic interest. The aim of this study is to generate a synthetic lentiviral vector for *ex vivo* gene therapy, for enzyme replacement therapy. It were generated four human cell lines with transient production of therapeutic proteins Prot_Ctr and Prot_Mut under the control of CMV and HeF1a promoters. To standardize the transfection assay were generated two human cell lines expressing green fluorescent protein (GFP) under control of the same promoters cited above. As a negative control of the producing cell lines, It was generated a human cell line with an empty plasmid vector pLV_GTW_Mock. The level of mRNA expression relative to the therapeutic proteins ranged from $3581,95 \pm 1322$ to $10377,18 \pm 2562$ REU, there were no significant differences among the produced cell lines ($p > 0.05$). The production level of therapeutic proteins ranged from 30.98 IU/mL to 241.1 IU/mL. The cell line with the highest production of the therapeutic protein was 293T/HeF1a_Prot_Mut⁺, and this difference is significant ($p < 0.05$). From the transfection of the plasmid containing the cDNA encoding the Prot_Mut and packing plasmid It was obtained lentiviral vector with the titer $1,68 \times 10^7$ pLV/mL. In conclusion, it is possible to generate a functional lentiviral vector carrying the Prot_Mut for use in *ex vivo* gene therapy. It is expected that the product of this research project generates a patent. To avoid breaking

novelty, inventive activity and descriptive sufficiency, minimum requirements for patentability, the results were presented without mentioning the disease and the gene under study.

Keywords: Lentivirus. Therapeutic protein. Synthetic biology. Gene therapy.

1 INTRODUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes faz parte de uma indústria multibilionária, e compreende produtos biofarmacêuticos e enzimas industriais. As vendas anuais globais de medicamentos recombinantes estão na faixa de 120 bilhões de dólares, e a expectativa é que tenham atingido 150 bilhões em 2015 (BUTLER E MENESES-ACOSTA, 2012).

Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, no final da década de 70, a utilização de proteínas recombinantes na terapêutica tornou-se uma estratégia atrativa para tratar a progressão da doença (FERRER-MIRALES et al., 2009). Em 1982, o *Food and Drug Administration* autorizou a produção de insulina humana recombinante produzida de *Escherichia coli*, a primeira proteína recombinante terapêutica para entrar no mercado (referência sem lista de autores – FDA DRUG BULL, 1982). A quadro 1 representa a linha do tempo da primeira publicação sobre a produção das proteínas recombinantes nos vários sistemas de expressão e a primeira aprovação pelo FDA.

Quadro 1 – Linha do tempo com a data de expressão de proteínas recombinantes e a data de aprovação por agência regulatória

	Bactéria	Leveduras	Células de Insetos	Células de Plantas	Animais Transgênicos	Células Animais
Primeira publicação sobre o uso do sistema	1977 Somatostatina	1981 Interferon	1983 Interferon β	1986 hGH	1988 Fator IX	1980 Eritropoietina
Ano da primeira aprovação pelo FDA	1982 Insulina	1986 HBsAg	2012 Vacina contra Influenza	2013 Taliglucerase	2009 Anticoagulante Antitrombina	1986 Ativador de Plasminogênio Tecidual
Referências	Itakure et al., 1977; FDA Drug Bull, 1982	Hitzeman et al., 1981; Walsh, 2003	Smith et al., 1983; Protein Sciences Corporation (2012)	Barta et al., 1986; FDA, 2013	Fu-Kuen et al., 1985; Tate et al., 1987	Simons et al., 1988; FDA, 2009

Fonte: Gomes, F. G. F. L. R. (2016)

Embora a engenharia genética ofereça uma riqueza de oportunidades comerciais, ao trazer uma proteína recombinante para o mercado, exige um investimento de tempo, recursos humanos e financeiros, porque os processos de síntese e purificação são tecnicamente complexos e tendem a variar de acordo com cada proteína. Os sistemas de expressão de proteínas recombinantes incluem bactérias, leveduras, células de insetos,

células vegetais, animais transgênicos, células animais e células humanas. Cada um desses sistemas de produção tem vantagens e desvantagens específicas, as quais serão descritas abaixo (DEMAIN; VAISHNAV 2009; FERRER-MIRALLES et al., 2009; CORCHERO et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foram geradas quatro linhagens celulares humanas com produção transiente de dois genes terapêuticos (Prot_Ctr e Prot_Mut) sob controle de dois diferentes promotores (CMV e HeF1a). Foram geradas também duas linhagens celulares com produção transiente do gene marcador que codifica a proteína fluorescente verde para a padronização do ensaio de modificação gênica utilizando vetores plasmidiais lentivirais também sob controle dos mesmos promotores.

Foi demonstrado que a tecnologia da biologia sintética é uma estratégia viável para a geração de vetores plasmidiais lentivirais uma vez que os seis vetores gerados permitiram a expressão do gene terapêutico ou do gene que codifica a proteína fluorescente verde na linhagem celular humana. Observou-se ainda que esses vetores lentivirais são bicistrônicos e permitiram a expressão de um segundo gene que confere resistência à puomicina sob controle do promotor da ubiquitina.

Os níveis de expressão do mRNA terapêutico sob controle dos promotores CMV e HeF1a nas linhagens celulares 293T/CMV_Prot_Ctr e 293T/HeF1a_Prot_Ctr foram similares ($p > 0.05$). O mesmo foi observado com relação as linhagens celulares 293T/CMV_Prot_Mut e 293T/HeF1a_Prot_Mut.

Foi demonstrado também que a biologia sintética associado ao uso do sistema lentiviral é uma estratégia viável para a produção de um biofármaco para terapia celular *ex-vivo*. Os vetores lentivirais sintéticos gerados permitiram a geração de 4 linhagens celulares com produção transiente do gene terapêutico.

Demonstrou-se ainda, que a nível de proteína, a produção do biofármaco sintético é promotor dependente. As linhagens celulares geradas cujos genes terapêuticos estão sob controle do promotor HeF1a apresentam maior quantidade das proteínas sintéticas (293T/HeF1a_Prot_Ctr e 293T/HeF1a_Prot_Mut) quando comparada com as linhagens celulares cujos genes terapêuticos estão sob controle do promotor CMV (293T/CMV_Prot_Ctr e 293T/CMV_Prot_Mut). Essas diferenças são significativas ($p < 0.05$). Entre as quatro linhagens celulares geradas, a linhagem 293T/HeF1a_Prot_Mut mostrou maiores níveis da proteína terapêutica, da ordem de $241,1 \pm 15,8$ U/mL.

Por fim, o vetor lentiviral sintético é também funcional em termos de formação de partículas lentivirais, conforme demonstrado pela produção de título viral da ordem de $1,68 \times 10^7$ pLV/mL. Portanto, a plataforma estabelecida durante o desenvolvimento desse

projeto de pesquisa permitiu o desenvolvimento de vetores virais que poderão ser utilizados em futuros protocolos de terapia gênica para doenças genéticas que apresentam padrão de herança clássica.

REFERÊNCIAS

- HUMAN insulin receives FDA approval. **FDA Drug Bull**, v. 12, n. 3, p. 18-19, 1982.
- AGATHOS, S. N. Production Scale Insect Cell Culture. **Biotech. ADV.**, v. 9, p. 17, 1991.
- ALBESIANO, E.; MESSMER, B. T.; DAMLE, R. N.; ALLEN, S. L.; RAI, K. R.; CHIORAZZI, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3333-3339, 2003.
- ALDRIDGE, S. Downstream processing needs a boost. **Gen Eng News**, v. 26, n. 1, p. 51, 2006.
- ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: AL., M. E. (Ed.). **Tecnologia do cultivo de células animais**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 1, p. 2-14.
- ANDERSEN, D. C. K. L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 6, 2002.
- ARICESCU, A. R.; LU, W.; JONES, E. Y. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 62, pt. 10, p. 1243-1250, 2006.
- AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Adv Drug Deliv Rev**, Epub 2016.
- BAERTLING, S. J. Innocuity testing of foot-and-mouth disease vaccines II. Aziridine-inactivated antigen produced in baby hamster kidney cells. **Journal of Biological Standardization**, v. 13, p. 7, 1983.
- BARTA, A.; SOMMERGRUBER, K.; THOMPSON, D.; HARTMUTH, K.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. **Plant Molecular Biology**, v. 6, p. 10, 1986.
- BISBEE, C. A. Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. **Gen Eng News**, v. 13, p. 3, 1993.
- BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 96, n. 4, p. 885-894, 2012.
- BYUN, H. M.; SUH, D.; JEONG, Y.; WEE, H. S.; KIM, J. M.; KIM, W. K.; KO, J. J.; KIM, J. S.; LEE, Y. B.; OH, Y. K. Plasmid vectors harboring cellular promoters can induce prolonged gene expression in hematopoietic and mesenchymal progenitor cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, n. 2, p. 518-523, 2005.
- CACHIANES, G.; HO, C.; WEBER, R. F.; WILLIAMS, S. R.; GOEDDEL, D. V.; LEUNG, D. W. Epstein-Barr virus-derived vectors for transient and stable expression of recombinant proteins. **Biotechniques**, v. 15, n. 2, p. 255-259, 1993.

CHAN, L. Y.; KOSURI, S.; ENDY, D. Refactoring bacteriophage T7. **Mol Syst Biol**, v. 1, p. 2005 0018, 2005.

CHOI, B. K.; BOBROWICZ, P.; DAVIDSON, R. C.; HAMILTON, S. R.; KUNG, D. H.; LI, H.; MIELE, R. G.; NETT, J. H.; WILDT, S.; GERNGROSS, T. U. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 9, p. 5022-5027, 2003.

COCO-MARTIN, J., HARMSSEN, M. M. A Review of Therapeutic protein expression by mammalian cells. **Bioprocess International**, p. 4, 2008.

CORCHERO, J. L.; GASSER, B.; RESINA, D.; SMITH, W.; PARRILLI, E.; VAZQUEZ, F.; ABASOLO, I.; GIULIANI, M.; JANTTI, J.; FERRER, P.; SALOHEIMO, M.; MATTANOVICH, D.; SCHWARTZ, S., JR.; TUTINO, M. L.; VILLAVARDE, A. Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 2, p. 140-153, 2013.

COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Perspectivas da terapia gênica. **Rev Med**, v. 4, p. 12, 2015.

DALE, C.; ALLEN, A.; FORGATY, S. *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. **Biopharm**, v. 12, n. 1, p. 7, 1999.

DANIELL, H.; STREATFIELD, S. J.; WYCOFF, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 5, p. 8, 2001.

DARTAR, R. V.; CARTWRIGHT, T.; ROSEN, C. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 9, 1993.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DESAI, P. N.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 4, p. 427-435, 2010.

DOSAY-AKBULUT, M. Advantages and disadvantages of transgenic animal technology with genetic engineering. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 4, p. 11, 2014.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Crit Rev Biotechnol**, v. 13, p. 1-13, 2015.

DYCK, M. K.; LACROIX, D.; POTHIER, F.; SIRARD, M.-A. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 394-399, 2003.

DYMOND, J. S.; RICHARDSON, S. M.; COOMBES, C. E.; BABATZ, T.; MULLER, H.; ANNALURU, N.; BLAKE, W. J.; SCHWERZMANN, J. W.; DAI, J.; LINDSTROM, D. L.; BOEKE, A. C.; GOTTSCHLING, D. E.; CHANDRASEGARAN, S.; BADER, J. S.; BOEKE, J. D. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by

design. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 471-476, 2011.

EBISU, S.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; YAMAGATA, H.; UDAKA, S. Production of human epidermal growth factor by *Bacillus brevis* increased with use of a stable plasmid from *B. brevis* 481. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 56, n. 5, p. 812-813, 1992.

ECHELARD, Y.; MEADE, H. M. Protein production in transgenic animals. v. 38, p. 625-639, 2003.

FERNANDES, A. C.; FONTES, A. M.; ROSA, N. G.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; FAÇA, S.; COVAS, D. T. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. **Biotech. and Applied Bioch**, v. 58, p. 243-249, 2011.

FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPIN, J.; CORCHERO, J. L.; VAZQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 17, 2009.

FONTES, A. M.; MELO, F. U. F. G.; GREENE, J. L.; FAÇA, V. M.; LIN, Y.; GERSON, S. L.; COVAS, D. T. Production of human Factor VIII-FL in 293-T cells using the bicistronic MGMT(P140K)-retroviral vector. **Genetics Mol. Res.**, v. 11, p. 15, 2012.

FU, P. Introduction. In: (Ed.). **Systems biology and synthetic biology**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2009. p.1-7.

FU-KUEN, L.; SUGGS, S.; CHI-HWEI, L.; BROWNE, J. K.; SMALLING, R.; EGRIE, J. C.; CHEN, K. K.; FOX, G. M.; MARTIN, F.; STABINSKY, Z.; BADRAWI, S. M.; LAI, P.; GOLDWASSER, E. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proc . Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 5, 1985.

GEISSE, S.; GRAM, H.; KLEUSER, B.; KOCHER, H. P. Eukaryotic expression systems: a comparison. **Protein Expr Purif**, v. 8, n. 3, p. 271-282, 1996.

GELLISEN, G.; JANOWICZ, Z. A.; WEYDEMANN, U.; MELBER, K.; STRASSER, A. W. M.; HOLLENBERG, C. P. High-level expression of foreign genes in *Saccharomyces cerevisiae* polymorpha. **Biotech. Adv.**, v. 10, p. 11, 1992.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 11, p. 1409-1414, 2004.

GIBSON, D. G.; GLASS, J. I.; LARTIGUE, C.; NOSKOV, V. N.; CHUANG, R. Y.; ALGIRE, M. A.; BENDERS, G. A.; MONTAGUE, M. G.; MA, L.; MOODIE, M. M.; MERRYMAN, C.; VASHEE, S.; KRISHNAKUMAR, R.; ASSAD-GARCIA, N.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; DENISOVA, E. A.; YOUNG, L.; QI, Z. Q.; SEGALL-SHAPIRO, T. H.; CALVEY, C. H.; PARMAR, P. P.; HUTCHISON, C. A., 3RD; SMITH, H. O.; VENTER, J. C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science**, v. 329, n. 5987, p. 52-56, 2010.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 5, 2000.

GOMORD, V.; FAYE, L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 7, n. 2, p. 171-181, 2004.

GOODRICK, J. C.; XU, M.; FINNEGAN, R.; SCHILLING, B. M.; SCHIAVI, S.; HOPPE, H.; WAN, N. C. High-Level Expression and Stabilization of Recombinant Human Chitinase Produced in a Continuous Constitutive *Pichia pastoris* Expression System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 6, 2001.

GOPALKRISHNAN, R. V.; CHRISTIANSEN, K. A.; GOLDSTEIN, N. I.; DEPINHO, R. A.; FISHER, P. B. Use of the human EF-1 α promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 24, p. 8, 1999.

GORMAN, C. M. Mammalian cell expression. **Curr Opin Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 36-47, 1990.

HAMILTON, S. R.; DAVIDSON, R. C.; SETHURAMAN, N.; NETT, J. H.; JIANG, Y.; RIOS, S.; BOBROWICZ, P.; STADHEIM, T. A.; LI, H.; CHOI, B. K.; HOPKINS, D.; WISCHNEWSKI, H.; ROSER, J.; MITCHELL, T.; STRAWBRIDGE, R. R.; HOOPES, J.; WILDT, S.; GERNGROSS, T. U. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. **Science**, v. 313, n. 5792, p. 1441-1443, 2006.

HITZEMAN, R. A.; HAGIE, F. E.; LEVINE, H. L.; GOEDDEL, D. V.; AMMERER, G.; HALL, B. D. Expression of a human gene for interferon in yeast. **Nature**, v. 293, n., p. 6, 1981.

HOUDEBINE, L. M. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic Res**, v. 9, n. 4-5, p. 305-320, 2000.

HOUDEBINE, L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 16, 2002.

HOUDEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 2, p. 107-121, 2009.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-1278, 2014.

HUTCHISON, C. A.; CHUANG, R. Y.; NOSKOV, V. N.; ASSAD-GARCIA, N.; DEERINCK, T. J.; ELLISMAN, M. H.; GILL, J.; KANNAN, K.; KARAS, B. J.; MA, L.; PELLETIER, J. F.; QI, Z. Q.; RICHTER, R. A.; STRYCHALSKI, E. A.; SUN, L.; SUZUKI, Y.; TSVETANOVA, B.; WISE, K. S.; SMITH, H. O.; GLASS, J. I.; MERRYMAN, C.; GIBSON, D. G.; VENTER, J. C. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. **Science**, v. 351, n. 6280, p. aad6253, 2016.

ITAKURA, K.; HIROSE, T.; CREA, R.; RIGGS, A. D. Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. **Science**, v. 198, p. 8, 1997.

JARVIS, L. M. A technology bet. DSM's pharma product unit leverages its biotech strength to survive in a tough environment. **Chem Eng News**, v. 86, n. 29, p. 2, 2008.

JENKINS, N.; CURLING, E. M. A. Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. **Enzyme Microb. Technology**, v. 16, p. 11, 1994.

JONES, D. Genetic Engineering of a Mouse Dr. Frank Ruddle and Somatic Cell Genetics. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 84, p. 8, 2011.

KERR, D. E.; LIANG, F.; BONDIOLI, K. R.; ZHAO, H.; KREIBICH, G.; WALL, R. J.; SUN, T. The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 5, 1998.

KHALIL, A. S.; COLLINS, J. J. Synthetic biology: applications come of age. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 5, p. 367-379, 2010.

KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **FEMS Yeast Res**, p., 2014.

KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n., p. 1-16, 2015.

KIM, S.; KIM, G. J.; MIYOSHI, H.; MOON, S. H.; AHN, S. E.; LEE, J. H.; LEE, H. J.; CHA, K. Y.; CHUNG, H. M. Efficiency of the elongation factor-1 α promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. **Stem Cells Dev**, v. 16, n. 4, p. 537-545, 2007.

KNIGHT, P. Baculovirus vectors for making proteins in insect cells. **ASM News**, v. 57, p. 567-570, 1991.

KRIVORUCHKO, A.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. **Biotechnol J**, v. 6, n. 3, p. 262-276, 2011.

KUTNER, R. H.; ZHANG, X. Y.; REISER, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nature Protocols**, v. 4, p. 11, 2009.

LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metab Eng**, v. 4, n. 1, p. 67-79, 2002.

LI, Y.; PFEIFER, B. A. Heterologous production of plant-derived isoprenoid products in microbes and the application of metabolic engineering and synthetic biology. **Curr Opin Plant Biol**, v. 19, p. 8-13, 2014.

LIENERT, F.; LOHMUELLER, J. J.; GARG, A.; SILVER, P. A. Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 95-107, 2014.

LILLICO, S. G.; SHERMAN, A.; MCGREW, M. J.; ROBERTSON, C. D.; SMITH, J.; HASLAM, C.; BARNARD, P.; RADCLIFFE, P. A.; MITROPHANOUS, K. A.; ELLIOT, E. A.; SANG, H. M. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. **PNAS**, v. 104, n. 6, p. 6, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUCKOW, V. A.; SUMMERS, M. D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Nature Biotechnology**, v. 6, p. 9, 1988.

MAIORELLA, B.; INLOW, D.; SHAUGER, A.; HARANO, D. Large-scale insect cell-culture for

recombinant protein production. **Nature Biotechnology**, v. 6, p. 5, 1988.

MARKAKI, M.; DRABEK, D.; LIVADARAS, I.; CRAIG, R. K.; GROSVELD, F.; SAVAKIS, C. Stable expression of human growth hormone over 50 generations in transgenic insect larvae. **Transgenic Res**, v. 16, n. 1, p. 99-107, 2007.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Capítulo 16- Proteínas Recombinantes Terapêuticas. In: AL., M. E. (Ed.). **Tecnologia do Cultivo de Células Animais**. São Paulo: Roca, 2008. p. 384-402.

MIAO, X. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 5, p. 815-828, 2013.

MILLER, L. K. Baculoviruses as gene expression vectors.. **Ann. Rev. Microbial.**, v. 42, p. 23, 1988.

MORROW J. R., K. J. Improving protein production processes. **Gen Eng News**, v. 27, n. 5, p. 5, 1996.

MOURA, R. R.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Production of Recombinant Proteins in Milk of Transgenic and Non-transgenic Goats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 12, 2011.

MULLER, K. B.; RODRIGUES, M. D.; PEREIRA, V. G.; MARTINS, A. M.; D'ALMEIDA, V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 65, 2010.

MURASHIMA, K.; CHEN, C. L.; KOSUGI, A.; TAMARU, Y.; DOI, R. H.; WONG, S. L. Heterologous Production of Clostridium cellulovorans engB, Using Protease-Deficient Bacillus subtilis, and Preparation of Active Recombinant Cellulosomes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6, 2002.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263-267, 1996.

NIELSEN, J.; JEWETT, M. C. Impact of systems biology on metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 1, p. 122-131, 2008.

NORRMAN, K.; FISCHER, Y.; BONNAMY, B.; WOLFHAGEN SAND, F.; RAVASSARD, P.; SEMB, H. Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12413, 2010.

PABORSKY, L. R.; FENDLY, B. M.; FISHER, K. L.; LAWN, R. M.; MARKS, B. J.; MCCRAY, G.; TATE, K. M.; VEHAR, G. A.; GORMAN, C. M. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. **Protein Eng**, v. 3, n. 6, p. 547-553, 1990.

PICANÇO-CASTRO V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S. F.; FONTES. A. M.; FERNANDES, A. C.; COVAS, D. T. An enhancer/promoter combination strenghtens the expression of blood-coagulation factor VIII in non-viral expression vectors. **Genetics Mol. Res.**, v. 314-315, , p. 12, 2008.

PICKENS, L. B.; TANG, Y.; CHOOI, Y. H. Metabolic engineering for the production of natural products. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, v. 2, p. 211-236, 2011.

PLATIS, D.; DROSSARD, J.; FISCHER, R.; MA, J. K.; LABROU, N. E. New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. **J Chromatogr A**, v. 1211, n. 1-2, p. 80-89, 2008.

RABINOW, P.; BENNETT, G. Synthetic biology: ethical ramifications 2009. **Syst Synth Biol**, v. 3, n. 1-4, p. 99-108, 2009.

ROSA, N. G.; SWIECH, K.; PICANCO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; SOARES NETO, M. A.; DE CASTILHO-FERNANDES, A.; FACA, V. M.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 8, p. 1435-1443, 2012.

ROYER, C.; JALABERT, A.; ROCHA, M. D.; GRENIER, A.-M.; MAUCHAMP, B.; COUBLE, P.; CHAVANCY, G. Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. **Transgenic Research**, v. 14, n. 4, p. 463-472, 2005.

RUDER, W. C.; LU, T.; COLLINS, J. J. Synthetic biology moving into the clinic. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1248-1252, 2011.

RYLL, T. Antibody production using mammalian cell culture—how high can we push productivity? In: SIM ANNUAL MEETING AND EXHIBITION, 2008, San Diego, CA. **Abstract...** San Diego, CA, 2008. p. 101. S146.

SCHEKMAN, R. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 15, p. 7113, 2010. Editorial expression of concern for Choi et al.

SEON, J. H.; SZARKA, J. S.; MOLONEY, M. M. A Unique Strategy for Recovering Recombinant Proteins from Molecular Farming: Affinity Capture on Engineered Oilbodies. **Plant Biotechnol Japan**, v. 4, p. 7, 2002.

SETHURAMAN, N.; STADHEIM, T. A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 17, n. 4, p. 341-346, 2006.

SILVA, J. B. G.; PAULILLO, L. C. M. S. Biologia Sintética: possibilidades e desafios. **Revista da Biologia**, v. 14, n. 1, p. 33-39, 2015.

SIMONS, J. P.; WILMUT, I.; CLARK, A. J.; ARCHIBALD, A. L.; BISHOP, J. O.; LATHE, R. Gene transfer into sheep. **Nature Biotechnology**, v. 6, p. 5, 1988.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 12, p. 2156-2165, 1983.

SPENGER, A.; ERNST, W.; CONDREAY, J. P.; KOST, T. A.; GRABHERR, R. Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. **Protein Expr Purif**, v. 38, n. 1, p. 17-23, 2004.

SWARTZ, J. R. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.).

Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. Washington DC: American Society of Microbiology Press, 1996. p.1693-1711.

TATE, K. M.; HIGGINS, D. L.; HOLES, W. E.; WINKLER, M. E.; HEYNEKER, H. L.; VEহার, G. A. Functional Role of Proteolytic Cleavage at Arginine-275 of Human Tissue Plasminogen Activator As Assessed by Site-Directed Mutagenesis. **Biochemistry**, v. 26, p. 6, 1987.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 2, p. 211-222, 2006.

TESCHENDORF C, K. W.; SIEMANN, D. W.; MUZYCZKA, N. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. **Anticancer Res**, v. 22, p. 6, 2002.

TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. **Expert Opinion. Emerging Drugs**, v. 10, n. 1, p. 34, 2004.

TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends Biotechnol**, v. 21, n. 12, p. 570-578, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Approves new orphan drug to treat a form of Gaucher disease.** Fda News Release. May 1, 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302549.htm> Acesso em: 11 jul. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Approves orphan drug atryn to treat rare clotting disorder.** Fda News Release. February 6, 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm109074.htm> Acesso em: 11 jul. 2016.

VAN DE LAVOIR, M. C.; DIAMOND, J. H.; LEIGHTON, P. A.; MATHER-LOVE, C.; HEYER, B. S.; BRADSHAW, R.; KERCHNER, A.; HOOL, L. T.; GESSARO, T. M.; SWANBERG, S. E.; DELANY, M. E.; ETCHE, R. J. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. **Nature**, v. 441, n. 7094, p. 766-769, 2006.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks--2003. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 8, p. 865-870, 2003.

WANG, Y.; ZHAO, S.; BAI, L.; FAN, J.; LIU, E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 580463, 2013.

WEATHERS, P. J.; TOWLER, M. J.; XU, J. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 5, p. 1339-1351, 2010.

WEAVER, B.; ROSENTHAL, S. Viral risk mitigation for Mammalian cell culture media. **Pham Sci Technol**, v. 64, n. 5, p. 4, 2010.

WILKEN, L. R.; NIKOLOV, Z. L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 2, p. 419-433, 2012.

WRIGHT, G.; CARVER, A.; COTTOM, D.; REEVES, D.; SCOTT, A.; SIMONS, P.; WILMUT,

I.; GARNER, I.; COLMAN, A. High level expression of active human alpha-a-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. **Nature Biotechnology**, v. 9, p. 5, 1991.

WROTHOWSKI, C. Animal cell culture; novel systems for research and production. **Biotechnol Adv**, v. 18, n. 3, p. 24, 1998.

WURM, F.; BERNARD, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, , p. 4, 1999.

XU, H.; LI, Z.; SI, J. Nanocarriers in gene therapy: a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 3483-3507, 2014.

XU, J.; GE, X.; DOLAN, M. C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 3, p. 278-299, 2011.

YANLI, W.; ZHAO, S.; BAI, L.; FAN, J.; LIU, E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 580463, 2013.

ZHU, L.; VAN DE LAVOIR, M. C.; ALBANESE, J.; BEENHOUWER, D. O.; CARDARELLI, P. M.; CUISON, S.; DENG, D. F.; DESHPANDE, S.; DIAMOND, J. H.; GREEN, L.; HALK, E. L.; HEYER, B. S.; KAY, R. M.; KERCHNER, A.; LEIGHTON, P. A.; MATHER, C. M.; MORRISON, S. L.; NIKOLOV, Z. L.; PASSMORE, D. B.; PRADAS-MONNE, A.; PRESTON, B. T.; RANGAN, V. S.; SHI, M.; SRINIVASAN, M.; WHITE, S. G.; WINTERS-DIGIACINTO, P.; WONG, S.; ZHOU, W.; ETCHES, R. J. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 9, p. 1159-1169, 2005.