

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2019/010551 A1**

(43) Data de Publicação Internacional  
17 de Janeiro de 2019 (17.01.2019)

(51) Classificação Internacional de Patentes:

C12N 15/67 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional:

PCT/BR2017/050184

(22) Data do Depósito Internacional:

10 de Julho de 2017 (10.07.2017)

(25) Língua de Depósito Internacional: Português

(26) Língua de Publicação: Português

(71) Requerentes: INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP [BR/BR]; Rua Professor Algayr Munhoz Mader, 3775, Cidade Industrial, 81350-010

Curitiba (BR). S.P.L. EVOLUTION LTD [—/US]; Edson Way, 3475, Suite B, Menlo Park, California (US).

(72) Inventores: **KRIEGER, Marco Aurélio**; Rua Anita Garibaldi, 31, ap. 1002, 80540-180 Curitiba (BR). **KESSELER, Rafael Luis**; Antonio Dalmarco, 444 ap 404 Fazendinha, 81320-420 Curitiba (BR). **SOARES, Luis Roberto Benghi**; 335 12th ave. Santa Cruz, CA, Santa Cruz, Califórnia (US). **PRETI, Henrique**; Rua Rouxinol, 342, loteamento Montpamasse, 83508-200 Almirante Tamandaré (BR). **SU, Leon**; 1161 Bruckner Circle. Mountain View, CA, Mountain View, Califórnia (US).

(74) Mandatário: **ZANON, Marcus Julius**; Rua Clemente Albini, 51 - Pilarzinho, 82100-500 Curitiba - Paran[a (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM,

(54) Title: GENETIC PLATFORM FOR HETEROLOGOUS OVEREXPRESSION IN COMBINATION WITH THE SELECTION OF CELLS THAT PRODUCE HIGH LEVELS OF PROTEINS

(54) Título: PLATAFORMA GENÉTICA PARA SUPEREXRESSÃO HETERÓLOGA ASSOCIADA À SELEÇÃO DE CÉLULAS ALTAMENTE PRODUTORAS DE PROTEÍNAS

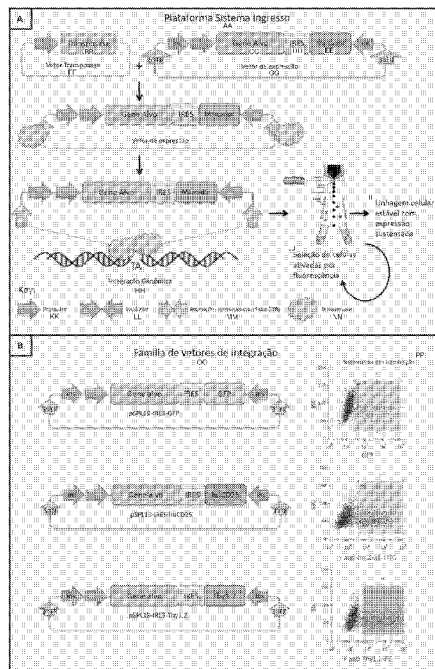


Figura 1

- AA Integrated System Platform
- BB Transposase
- CC Target Gene
- DD IRES
- EE Marker
- FF Transposase Vector
- GG Expression Vector
- HH Genome Integration
- II Stable cell line with sustained expression
- JJ Selection of activated cells by means of fluorescence
- KK Promoter
- LL Insulator
- MM Inverted terminal repeats (ITR)
- NN Transposase
- OO Integration vector family
- PP Second day post-transfection

(57) Abstract: The present invention describes i) the construction of integration vectors for heterologous overexpression in combination with a system for selecting cells and for real-time monitoring of productivity by the co-expression of reporter proteins, ii) the selection of cells that secrete high levels of the protein of interest by labelling with fluorescent probes specific for the endoplasmic reticulum (ER), iii) the construction of a genetically modified CHO cell line for conditional expression of proteins of interest under tetracycline/doxycycline control (TetON system), iv) the development of a synthetic gene containing the active forms of proteins Atf6 and Xbp1 fused together



WO 2019/010551 A1

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declarações sob a Regra 4.17:**

- *relativa à identidade do inventor (Regra 4.17(i))*

**Publicado:**

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

---

in a single polypeptide and CHO cell lines expressing the Atf6-Xbp1 fusion under optional tetracycline control, v) the overexpression and production of high levels of recombinant proteins by the regulated co-expression of Atf6-Xbp1.

**(57) Resumo:** A presente invenção descreve i) a construção de vetores de integração para superexpressão heteróloga associados a um sistema de seleção de células e monitoramento em tempo real da produtividade pela co-expressão de proteínas repórteres, ii) a seleção de células altamente secretoras da proteína de interesse pela marcação com sondas fluorescentes específicas para o retículo endoplasmático (RE), iii) construção de uma linhagem geneticamente modificada de células CHO para expressão condicional de proteínas de interesse sobre o controle de tetraciclina/doxiciclina (sistema TetON), iv) desenvolvimento de um gene sintético contendo as formas ativas das proteínas Atf6 e Xbp1 fusionadas em um único polipeptídeo e de linhagens de células CHO expressando a fusão Atf6-Xbp1 sob o controle (ou não) de tetraciclina, v) super expressão e alta produtividade de proteínas recombinantes pela co-expressão regulada de Atf6- Xbp1.

## RELATÓRIO DESCRITIVO

### Plataforma genética para superexpressão heteróloga associada à seleção de células altamente produtoras de proteínas

#### ***Campo da aplicação***

**[0001]** A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia, mais especificamente no campo da mutação ou engenharia genética, mais especificamente manipulação genética de células eucarióticas.

#### ***Histórico da invenção e análise do estado da técnica***

**[0002]** Para a produção de proteínas recombinantes, os procedimentos tradicionais de obtenção de linhagem e bancos celulares consistem na avaliação aleatória dos níveis de produção de clones celulares, obtidos após ciclos de seleção com marcadores presentes nos sistemas de transformação genética utilizado (antibióticos, complementação funcional de vias essenciais, entre outros). Estes procedimentos são normalmente demorados e onerosos e dependem de vários ciclos de replicação celular para obtenção dos bancos celulares (bancos master e de trabalhos). Podem demorar de seis a oito meses, dependendo da estratégia utilizada. O maior problema deste tipo de procedimento é que as principais linhagens utilizadas para estas finalidades são perpetuadas por alterações e transformações em sua função gênica. Estas alterações tornam estas células muito instáveis, podendo sofrer alterações cumulativas a cada ciclo de replicação.

**[0003]** Na prática, o que se observa é que inexistem métodos que permitam prever o comportamento destas células durante os processos de seleção e elaboração dos bancos celulares (Porter AJ, Racher AJ, Preziosi R, Dickson AJ. *Biotechnology Progress* 26(5):1455-64 (2010) *Strategies for selecting recombinant CHO cell lines for cGMP manufacturing: improving the efficiency of cell line generation.*). Este tipo de comportamento imprevisível de

células geneticamente modificadas, utilizando as metodologias tradicionais, demonstram claramente as principais dificuldades tecnológicas encontradas neste campo que, conforme mencionado, são inerentes, pois estão diretamente associadas à baixa estabilidade genética das células utilizadas, com implicações negativas na produtividade industrial de proteínas recombinantes.

**[0004]** Visando aumentar a capacidade de monitoramento em tempo real dos níveis de expressão em células individualizadas, assim como aumentar a estabilidade destes níveis de expressão em diferentes ciclos de replicação celular, foi desenvolvido um sistema de manipulação genética de células eucarióticas, composto de linhagens celulares proprietárias, associados a um sistema de transformação genética composto por 3 características críticas: i) sistema de integração, baseado em transposons, ii) sistema de regulação de expressão epigenético por insuladores, iii) co-expressão de um gene repórter através de um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES, mRNA bi-cistrônico) ou dois promotores independentes. Juntamente com o desenvolvimento de linhagens de células CHO modificadas para aumento de produtividade proteica, foi criada uma plataforma para superexpressão heteróloga associada à seleção de células altamente produtoras de proteínas. No estado da arte são conhecidos sistemas e métodos para aumento de expressão, mas o presente método difere dos já existentes principalmente pela conjugação dos seguintes fatos: (i) uso de vetores de integração genômica mediada por transposase (*sleeping beauty*) associados à seleção de células positivas por FACS que permitem alcançar populações celulares 100% transfectantes e altamente estáveis para expressão do transgene de interesse, (ii) co-expressão de proteínas reguladoras da via de stress do retículo endoplasmático, UPR (*unfolded protein response*), (Atf6 e Xbp1) por meio de um único mRNA, de maneira a gerar uma proteína de fusão contendo os domínios ativos de ambas proteínas (fusão Atf6-Xbp1), (iii) expressão condicional da fusão Atf6-Xbp1 por meio da regulação mediada por tetraciclina em um sistema tipo Tet-ON e (iv) seleção de células com retículo endoplasmático proeminente (aqui denominadas células "Gordo") por FACS após marcação com sondas fluorescentes específicas para tal organela celular. Esse sistema contendo diversos vetores de DNA Recombinante, métodos baseados em FACS para seleção e formação de banco de células expressoras

e ainda linhagens celulares modificadas geneticamente constitui o que chamamos de Sistema Ingresso.

**[0005]** A invenção **EP2316955A1** revela sistemas e métodos para produção de proteínas de interesse. Emprega células de animais ou de plantas geneticamente modificadas que têm capacidade aumentada para processar proteínas devido co-expressão de Atf6 ou Xbp1. Embora a ideia seja similar à plataforma genética em questão, não adianta o objeto de análise, pois as proteínas Atf6 e Xbp1 foram expressas individualmente, de maneira transiente e sem controle condicional. Já a presente invenção utiliza um gene sintético para expressar uma fusão de Atf6-Xbp1 por integração ao genoma da célula alvo e de maneira condicional (regulada por tetraciclina), o que permite a produção de banco de células altamente secretoras para a produção e proteínas de impacto comercial. A fusão Atf6-Xbp1 facilita o impacto positivo da ativação da via UPR na produtividade de proteínas recombinantes, visto que diferentes proteínas podem ter aumento especificamente mediado por Atf6 e/ou Xbp1.

**[0006]** A invenção **NZ544335A** revela um método para aumento de expressão e secreção proteica baseado em co-expressão de Atf-6 e Xbp-1. Não adianta o objeto de análise por usar vetores diferentes para alcançar maiores níveis de expressão, incluindo seleção com antibióticos e amplificação gênica mediada por metatrexato, o que implica em instabilidade genética. A presente invenção, por sua vez, faz uso de FACS para seleção de células positivas altamente estáveis, além de expressar a fusão Atf6-Xbp1.

**[0007]** A invenção **WO201099296** apresenta a patente do sistema de transposição comercial do piggybac, sendo a estrutura dos vetores parecida com a do objeto de análise. Não adianta a invenção da plataforma genética porque o transposon é distinto. A presente invenção usa a transposase Sleeping Beauty (SB), a qual já se encontra em domínio público (WO1999025817A2).

### ***Problemas no estado da técnica***

**[0008]** Tradicionalmente, a expressão de proteínas recombinantes se dá por meio de clonagem de genes heterólogos em plasmídeos contendo

elementos genéticos necessários à expressão em células hospedeiras, tais como promotores compatíveis, sinais de terminação de transcrição e elementos selecionáveis, como genes de resistência a antibióticos etc. Isso permite a seleção das células contendo o gene heterólogo de outras células negativas na população. No entanto, é necessário que o conjunto genético contendo o gene heterólogo e o gene de seleção sejam transmissíveis através das gerações celulares e, para isto, é necessária a integração de tal conjunto genético no genoma da célula hospedeira.

**[0009]** Como a integração no genoma é normalmente um evento raro e de caráter randômico (Curr Opin Struct Biol. 2015 Jun;32:81-90), se torna necessária a geração de clones, uma vez que integrações distintas apresentam variabilidades de alta escala na capacidade de produzir proteínas heterólogas, em razão da resistência do genoma em absorver novas integrações, fato geralmente associado a infecções virais ou câncer. Esta resistência causa inativação progressiva do conjunto genético heterólogo por processos de metilação do DNA, a exceção sendo integrações adjacentes a genes essenciais. Como consequência dos fatos citados acima, é muito difícil prever o comportamento de células transfectadas durante os processos de seleção e elaboração dos bancos celulares, o que pode acarretar em perdas financeiras na produção industrial de proteínas recombinantes.

### ***Solução da presente invenção***

**[0010]** A presente invenção soluciona os problemas citados acima para produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos de duas maneiras complementares:

- i - desenvolvimento de vetores de integração para expressão estável do transgene;
- ii - desenvolvimento de linhagens de células CHO modificadas geneticamente com intuito de controlar e aumentar a expressão da proteína de interesse.

**[0011]** Os vetores de integração para expressão estável do transgene em células eucarióticas, resumidamente, consistem em:

1. Garantir alta taxa de integração do cassete de expressão no cromossomo da célula hospedeira, mediada por transposase.
2. Isoladores que garantem alto nível de transcrição, independentemente do sítio de integração cromossômica.
3. Co-expressão do repórter fluorescente que permite monitoramento da expressão em tempo real e seleção de clones ou populações homogêneas altamente produtoras, independente de seleção por antibióticos.
4. Seleção de células altamente produtoras da proteína de interesse por *fluorescence-activated cell sorter* (FACS).

**[0012]** No que concerne ao desenvolvimento de linhagens de células CHO modificadas, a presente invenção consiste em:

1. Seleção por FACS de populações altamente secretoras pela presença de um retículo endoplasmático (RE) proeminente marcado com sondas específicas para esta organela.
2. Construção de uma linhagem geneticamente modificada de células CHO para expressão condicional de proteínas de interesse sobre o controle de tetraciclina/doxiciclina (sistema TetON).
3. Superexpressão e alta produtividade de proteínas recombinantes pela co-expressão regulada de Atf6-Xbp1 (TetON Gordo).

**[0013]** A inovação aqui apresentada trata da resolução das dificuldades do estado da técnica para estabelecimento e manutenção de bancos de células por meio da introdução de um conjunto genético, que incorpora elementos conhecidos como “isoladores” (do inglês “*insulators*”), que garante a expressão inalterada de cassetes de expressão inclusos entre dois isoladores, independente do sítio de integração no genoma (Mol Cell. 2013 May 23;50(4):461-74). O cassete de expressão consiste em um promotor viral citomegalovírus (CMV) ou CAG promovendo a expressão do gene de interesse e de um IRES (Mountford, P.S. and Smith, A.G. *Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis*. Trends Genet. 11, 179-184. 1995),

que permite a tradução do gene repórter, normalmente proteína fluorescente verde (GFP, GI: 375332228), amarela (YFP, GI: 384875628) ou vermelha (RFP, GI:359950697) flanqueados por dois isoladores. As células expressando o transgene são selecionadas por FACS. A omissão de antibióticos para isolamento de linhagens celulares possibilita maior homogeneidade e estabilidade de expressão do transgene (Structure. 2004 Aug;12(8):1355-60; *Nucleic Acids Res.* 2008 Oct;36(17):e111).

**[0014]** O cassete inteiro é flanqueado por dois sítios de recombinação de transposase *Sleeping Beauty* (SB) que mediam a transposição de todo o cassete para o genoma da célula alvo na presença da transposase. A transposase SB é expressa de maneira transiente pela co-transfecção de um segundo plasmídeo contendo o gene da transposase, mas incapaz de ser integrado no genoma da célula. Com diferentes genes repórteres, é possível um indeterminado número de integrações independentes usando-se a recombinação mediada pela transposase *Sleeping Beauty* (*Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016 Oct 4:1-27). Em teoria, tal plataforma genética pode ser usada para expressão heteróloga em células CHO de qualquer proteína, incluindo proteínas complexas compostas por diversas cadeias polipeptídicas e/ou extensivamente modificadas pós-traducionalmente. O sistema de plataforma genética por superexpressão heteróloga já foi usado com sucesso para expressão recombinante de diversas proteínas, incluindo fibrinogênio (3 cadeias), trombina, eritropoietina, anticorpos monoclonais (2 cadeias), dentre outras.

**[0015]** Visando aumentar a capacidade de monitoramento em tempo real dos níveis de expressão em células individualizadas, assim como aumentar a estabilidade destes níveis de expressão em diferentes ciclos de replicação celular, foi desenvolvido um sistema de manipulação genética de células eucarióticas, composto de um sistema de transformação genética mediado por integração com transposons, um sistema de regulação de expressão epigenética e, adicionalmente, ligado a um sistema repórter (proteína fluorescente). Além disso, a co-expressão de proteínas acessórias que conferem maior produtividade da proteína de interesse (Atf6-Xbp1) pode ser regulada em um sistema indutível tipo TetON em células CHO modificadas. Este sistema será detalhado a seguir.

### ***Descrição das figuras***

**[0016]** A Figura 1 contém um esquema dos diferentes tipos de vetores disponíveis no Sistema Ingresso juntamente com o vetor episomal usado para expressão transiente da transposase após a transfecção.

**[0017]** A Figura 2 apresenta as variantes de construção do vetor de integração ("Vetor de expressão") do sistema ingresso; em "A", dois promotores independentes e em "B", mRNA bicistrônico com IRES.

**[0018]** A Figura 3 apresenta os dois sistemas induzíveis por tetraciclina (TetON). Em "A" usando TetR (CHO TetR Gordo) ou em "B" um promotor bidirecional para rtTA (CHO rtTA Gordo).

**[0019]** A Figura 4 mostra a seleção de células altamente secretoras utilizando a marcação do retículo endoplasmático (sistema Gordo).

**[0020]** A Figura 5 mostra a correlação direta entre nível de expressão do gene repórter e produtividade da proteína de interesse (nesse caso, para expressão de um anticorpo monoclonal).

**[0021]** A Figura 6 mostra a expressão de Trombina usando RFP como gene repórter e as duas etapas tipicamente usadas para seleção de populações homogêneas expressando altos níveis do transgene.

### ***Metodologia detalhada***

**[0022]** O desenvolvimento da plataforma genética para superexpressão heteróloga baseou-se na construção de vetores de integração para expressão estável do transgene, que possuem 3 componentes essenciais. O primeiro componente destes vetores consiste na utilização do elemento de transposição (transposon), que é uma sequência de DNA capaz de se movimentar de uma região para outra em um genoma de uma célula. Este fenômeno, chamado transposição, foi descoberto por Barbara McClintock nos

anos 1950, o que lhe valeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1983. Os transposons de ácido desoxirribonucleico atuam através da excisão da sequência de ácido desoxirribonucleico da sua posição inicial e inserção em uma nova localização, por meio da ação de uma enzima denominada transposase. Por estas características, os transposons de DNA são muito utilizados no campo da biotecnologia para marcação de genes, principalmente para a inserção de novos genes em determinado genoma.

**[0023]** O segundo componente presente nos vetores de integração do Sistema Ingresso é denominado de insulator (isoladores), que são elementos presentes na sequência de DNA que impedem as interações entre domínios de cromatina adjacentes (Miklos Gaszner & Gary Felsenfeld *Nature Reviews Genetics* 7, 703-713, 2006; Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms). Estes elementos mantêm uma configuração ativa da cromatina e, desta forma, o(s) gene(s) por ele regulado(s) apresenta(m) altas taxas de transcrição.

**[0024]** O terceiro componente utilizado nos vetores desenvolvidos consiste na utilização de repórteres fluorescentes. O principal repórter utilizado neste sistema são as proteínas fluorescentes derivadas da GFP (*green fluorescent protein*). A proteína verde fluorescente é uma proteína produzida pelo cnidário *Aequorea victoria*, que emite fluorescência na zona verde do espectro visível. O gene que codifica esta proteína foi isolado e é atualmente largamente utilizado em técnicas de engenharia genética.

**[0025]** Esta aplicação acabou sendo fundamental para a outorga do prêmio Nobel de 2008 para Osamu Shimomura, Roger Tsien e Martin Chalfie. Recentemente, outras proteínas fluorescentes foram identificadas como, por exemplo, a proteína fluorescente amarela (abreviatura do inglês: YFP) e vermelha (RFP), entre outras. As proteínas fluorescentes têm sido utilizadas com sucesso para monitorar, por exemplo, a expressão transiente (ou temporária) de transgenes, substituindo outros genes repórter ou a seleção de transfectantes com base em antibióticos. Devido ao fato de a expressão da proteína repórter fluorescente poder ser monitorada *in vivo*, a expressão dos genes em estudo pode ser avaliada em tempo real. Além de proteínas fluorescentes, as proteínas

superfície CD20 (NM\_021950.3), CD25 (NM\_000417) e CD90/Thy1.2 (NM\_001311160.1) podem ser usadas como repórter associadas à detecção com anticorpos específicos conjugados à fluoróforos, o que propicia uma maior abrangência do uso da técnica em relação ao gene repórter e espectros fluorescentes de detecção. A presença do gene repórter permite a seleção das células produtoras de proteínas recombinantes através da separação das células com maior intensidade de fluorescência em equipamento de citometria de fluxo tipo FACS.

**[0026]** A Fig. 1 mostra um panorama geral do funcionamento da plataforma do sistema ingresso e suas diferentes construções. Este sistema possui basicamente dois vetores diferentes: um contendo o gene codificador da transposase *Sleeping Beauty* e um segundo contendo o gene de interesse a ser expresso juntamente com um marcador. O primeiro vetor ("Vetor transposase") tem como objetivo a expressão transiente da transposase, que será responsável por integrar a sequência alvo, construída no segundo vetor ("Vetor de expressão") no genoma através da recombinação das ITRs (*inverted terminal repeat sequences*, sequências reconhecidas pela transposase). O "Vetor de expressão" é composto por sequências de recombinação 5' ITR e 3' ITR, insuladores para regulação epigenética, promotor CAG (CA 2733104 C) ou CMV, o gene de interesse seguido da sequência IRES para ligação interna ao ribossomo. O gene repórter pode variar como pode-se observar na Fig. 1B. Após a transfecção com ambos vetores, as células são selecionadas por FACS (Fig. 1A e Fig. 1B).

**[0027]** São apresentadas duas formas de expressão do gene repórter nos vetores da plataforma genética para superexpressão heteróloga (Fig. 2): I) sistema genético de expressão que contém dois promotores independentes, híbridos, não proprietários (PI) de alta eficiência (Fig. 2A); II) sistema que permite a expressão de dois genes em um mesmo mRNA (mRNA bicistrônico), com a utilização de sequência interna de ligação a ribossomos (IRES) (Fig. 2B). Tal elemento é uma sequência de nucleotídeos que permite a iniciação da tradução no meio de uma sequência de RNA mensageiro (Jerry Pelletier & Nahum Sonenberg Nature 334, 320 – 325, 1988 *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*). Na

Fig. 2 há duas representações esquemáticas dos sistemas genéticos desenvolvidos (dois promotores independentes ou utilizando IRES).

**[0028]** Além do desenvolvimento dos vetores de integração descritos, a plataforma genética também possibilita um incremento nos níveis de expressão da proteína de interesse pela utilização de células CHO modificadas geneticamente. Como a síntese, dobramento e modificações pós-traducionais de proteínas secretadas ocorre no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, existe uma relação direta entre o tamanho do RE, o número de ribossomos e a capacidade de síntese da célula. Células altamente secretoras, como plasmócitos, tipicamente possuem um RE muito proeminente e um fenótipo celular e molecular voltado à expressão e secreção de proteínas. Esse fenótipo altamente secretor é aqui denominado de "Gordo". O aumento da capacidade de produção proteica pelo sistema RE-Golgi depende da capacidade da célula em lidar com alta demanda de processamento proteico. Para tal, as células devem se adaptar ao estado de stress do RE-Golgi. Caso contrário, podem entrar em via de morte celular (apoptose). A adaptação ao stress do RE-Golgi dispara a via de proteínas mal-dobradas (*unfolded protein response* - UPR), que envolve a ativação de proteínas reguladoras da expressão gênica (dentre elas Atf6 e Xbp1) que, por sua vez, induzem a expressão de um conjunto de enzimas (chaperonas, enzimas envolvidas na glicosilação, formação de pontes dissulfeto e tráfego de vesículas) capazes de lidar com a alta demanda de síntese proteica. As proteínas Atf6 e Xbp1 são as principais transdutoras de sinal conhecidas na via UPR, sendo que plasmócitos secretores de anticorpos *in vivo* expressam altos níveis dessas proteínas (Nat Immunol. 2016 Mar;17(3):323-30).

**[0029]** A co-expressão dessas proteínas em sistemas recombinantes pode aumentar significativamente o nível de expressão de um transgene (Mol Immunol. 2004 Jul;41(9):919-27; EP2316955A1, US2005106222 (A1)). O componente central da plataforma genética aqui apresentada reside na capacidade de modificação controlada de linhagem de células eucarióticas por meio da introdução de um gene sintético modificado contendo o código de síntese de duas proteínas fusionadas (Atf6 e Xbp1), que induzem o fenótipo adaptativo ao stress do retículo endoplasmático da célula, o que chamamos de indução do fenótipo Gordo. A expressão desses genes favorece o trânsito, em

larga escala, de proteínas através do retículo endoplasmático, implicando, por um lado, elevação de produtividade e, por outro, garantindo as propriedades biológicas das proteínas expressadas. Como diferentes proteínas têm produção otimizada pela co-expressão de Atf6 e/ou Xbp1, a fusão destas proteínas em um único polipeptídeo agiliza o processo de produção independentemente do fator indutor ideal ser Atf6 ou Xbp1. Os genes ATF6 e XBP1 sintéticos, em versões otimizadas não contendo íntrons, foram clonados na plataforma genérica e células CHO modificadas, expressando a fusão Atf6-Xbp1 (SEQ ID NO: 1) sob controle de tetraciclina (doxiciclina), selecionados por *cell sorting*.

**[0030]** Como a ativação da via UPR está atrelada à parada do ciclo celular em G1 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12625-30) e possível ativação de vias de morte celular (Expert Opin Drug Discov. 2009 Sep;4(9):907-21), a expressão contínua das proteínas Atf6 e Xbp1, ou a fusão Atf6-Xbp1, acaba por inibir o crescimento celular, afetando a produtividade do sistema devido à diminuição da biomassa celular máxima. Dessa forma, embora a co-expressão dessas reguladoras da via UPR favoreça grandemente o aumento da síntese e tráfego proteico pelo sistema RE-Golgi, a diminuição da biomassa tem um efeito contrário na produção industrial de proteínas recombinantes. Para solucionar esse problema, colocamos a expressão de Atf6-Xbp1 sobre o controle de tetraciclina, usando uma linhagem de células CHO, que expressa o repressor de tetraciclina (NC\_005211.1), TetR (Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jul 2;61(7-8):527-41).

**[0031]** A linhagem “CHO TetR Gordo” (Fig. 3A) foi produzida utilizando os vetores de integração do Sistema Ingresso descritos anteriormente, mas nesse caso utilizando um promotor CMV (WO2012099540A1). Após obtenção de uma linhagem estável expressando TetR (linhagem CHO TetR), foi realizada a transfecção da fusão Atf6-Xbp1. Para expressão regulada por tetraciclina (ou doxiciclina) de Atf6-Xbp1, a fusão foi clonada numa versão modificada do vetor ingresso contendo 8 repetições do operador de tetraciclina (TetO, US5654168A) acima do promotor do cassete de expressão, gerando o cassete de expressão 8TetO-Atf6-Xbp1, o qual foi integrado na linhagem CHO-TetR, produzindo então a linhagem aqui denominada como CHO TetR Gordo (Fig. 3A), na qual a expressão condicional da fusão Atf6-Xbp1 é regulada pela adição de tetraciclina

(ou o análogo doxíciclina). Dessa forma, após a cultura celular atingir a fase estacionária de crescimento (ponto de maior densidade celular,  $\sim 10^7$  células / ml) induz-se a expressão de Atf6-Xbp1. Assim, a indução de um metabolismo celular focado na síntese e tráfego proteico, ou fenótipo Gordo (CHO Tet-ON Gordo), ocorre após atingir-se uma biomassa de interesse, o que culmina em um aumento de 5 a 20 vezes de produtividade em relação à utilização dos vetores do sistema em células CHO não modificadas.

**[0032]** Também é apresentado um segundo método de expressão regulada baseado em um promotor bidirecional transcrito por rtTA (*reversed tetracycline trans-activator*) (Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jul 2;61(7-8):527-41). Nesse caso, a linhagem CHO modificada, CHO rtTA Gordo, foi construída usando o esquema apresentado na Fig. 3B. A linhagem "CHO rtTA" foi construída após a transfecção de um vetor do sistema, que expressa o regulador rtTA (*reversed tetracycline trans-activator*). A linhagem rtTA foi usada em seguida para transfecção do vetor contendo um promotor bi-direcional para rtTA e gene repórter. Na presença de tetraciclina, rtTA ativada transcreve o promotor bidirecional, levando a expressão da fusão Atf6-Xbp1 e do gene repórter (Fig. 3B). Em ambos sistemas, Fig. 3A e 3B, a adição de tetraciclina, ou doxíciclina, ativa a expressão da fusão Atf6-Xbp1 e do gene repórter.

**[0033]** As linhagens modificadas de células CHO descritas acima (CHO TetR e CHO rtTA), em conjunto com as versões modificadas dos vetores do sistema ingresso contendo promotores induzíveis específicos a tetraciclina também podem ser usados como base para expressão regulada de qualquer transgene de interesse.

**[0034]** Além da utilização das linhagens CHO Gordo para indução regulada do fenótipo Gordo, também é apresentada a seleção direta dessas células altamente produtoras por FACS. Como já descrito, células altamente secretoras de proteínas possuem um retículo endoplasmático proeminente, existindo uma relação direta entre o tamanho dessa organela e a capacidade de síntese da célula. Dentro de populações celulares selecionadas por FACS expressando o transgene de interesse por intermédio de vetores de integração da plataforma genética, uma pequena porcentagem de células (<5%) apresenta naturalmente maior expressão do gene repórter e, paralelamente, um maior

retículo endoplasmático (Fig. 4). Algumas ureias sulfonadas fluorescentes marcam especificamente componentes do retículo endoplasmático (RE) e mostram intensidade de fluorescência diretamente proporcional ao tamanho do RE. Utilizando-se tal corante fluorescente específico para o RE (ER-Tracker Green ou ER-Tracker Red), pode-se selecionar células com grande RE (forte marcação para ER-Tracker) e, simultaneamente, expressando altos níveis da proteína repórter. Análises de produtividade por ELISA evidenciaram um aumento de aproximadamente três vezes nos níveis de expressão em células positivas para ER-Tracker (Fig. 4, Gordo+). Assim sendo, após a indução de expressão de Atf6-Xbp1, ainda é possível fazer mais um passo de seleção de células positivas para ER-Tracker (fenótipo Gordo induzido).

**[0035]** Em suma, a plataforma genética (Sistema Ingresso) consiste na utilização de sistema de expressão heteróloga para otimização de processo industrial de produção e controle de qualidade de proteínas recombinantes, a partir de (a) utilização de linhagens celulares otimizadas, (b) utilização de sistema de integração cromossômica eficiente, (c) favorecimento de altos níveis de transcrição devido presença de insuladores (independente do sítio de integração), (d) possibilidade de monitoramento em tempo real dos níveis de expressão (proteína repórter), (e) capacidade de seleção de população de células altamente produtoras e (f) capacidade de indução de um fenótipo secretor de alta produtividade pela expressão regulada de Atf6-Xbp1.

**[0036]** A utilização destes sistemas genéticos permite a transfecção e inserção genômica mediada por transposons, que aumentam significativamente a percentagem de incorporação do cassete íntegro no genoma da célula alvo. O sistema genético Insulator propicia altos níveis de expressão dos genes inseridos no sistema (gene de interesse e gene repórter) e, além disso, a seleção de células pela intensidade de fluorescência permite selecionar populações (subpopulações altamente homogêneas ou clones) em um tempo significativamente menor do que as metodologias tradicionais, adicionalmente com rendimento de expressão consideravelmente maior devido à utilização das linhagens Tet-ON Gordo. A funcionalidade do sistema fica evidente na correlação direta do nível de expressão do gene repórter com a produtividade da proteína de interesse. Na Fig. 5 é mostrado um exemplo usando a produção de

um anticorpo monoclonal. Após separação por FACS de duas populações expressando níveis menores (GFP Baixo) e maiores (GFP alto) do gene repórter (transfectado juntamente com o gene da cadeia pesada do anticorpo), culturas independentes de cada população foram mantidas e o nível de expressão de IgG analisada por Elisa. A Fig. 5 mostra claramente que células com maiores níveis de fluorescência produzem maior quantidade da proteína recombinante. Tal correlação permite um monitoramento em tempo real dos níveis de expressão do transgene por FACS, agilizando os processos de seleção de populações de interesse.

### ***Exemplo utilizando o gene de trombina***

**[0037]** Inicialmente, as células foram transformadas utilizando como gene repórter a proteína RFP. Após onze dias de crescimento, a cultura transformada sofreu o primeiro ciclo de seleção, onde foram coletadas as células que estavam com fluorescência detectável em relação às células não transfectadas. Neste momento, menos de 5% das células da cultura apresentavam este perfil de expressão. Todavia, após 18 dias da transformação (7 dias após primeiro ciclo de seleção por *cell sorting*), mais de 50 % das células apresentam elevados níveis de produção das proteínas exógenas, conforme aferição pelo gene repórter. Estes resultados podem ser avaliados na Fig. 6.

**[0038]** Após o segundo ciclo de seleção celular, mantendo estas células por mais de 12 dias em crescimento (vida média deste tipo de células em biorreatores), os resultados mostraram que mais de 96% das células apresentavam altos índices de expressão aferidos pelo sistema repórter utilizado (Figura 6). Tal estabilidade nos níveis de expressão do gene repórter (e da proteína de interesse) são mantidos após vários ciclos de congelamento e descongelamento ou manutenção das células em cultura por diversas passagens, representado portanto um sistema ideal para obtenção de bancos de células para expressão de proteínas de interesse industrial.

**[0039]** Comparativamente à tecnologia tradicional, o sistema genético apresentou:

I- Rápida obtenção de bancos celulares altamente produtivos (cerca de um mês contra 6 a 8 meses pelas metodologias tradicionais de seleção por antibiótico ou complementação genética).

II- Aumento do rendimento da expressão de 5 a 20x em relação à tecnologia tradicional.

III- Possibilidade de controle dos níveis de expressão e acompanhamento das dinâmicas populacionais da cultura em tempo real.

IV- Possibilidade de utilização de linhagens celulares modificadas (Atf6-Xbp1) caso a expressão proteica não alcance níveis satisfatórios em células CHO não modificadas.

**[0040]** Esta plataforma já foi utilizada até o momento com mais de 6 diferentes proteínas recombinantes, incluindo anticorpos, proteínas da via de coagulação e fatores de crescimento, e em todos os casos as vantagens acima puderam ser evidenciadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de manipulação genética de células eucarióticas para superexpressão e secreção de proteínas de interesse, caracterizado por conter linhagens celulares proprietárias associadas a um sistema de transformação genética composto por:
  - sistema de integração baseado em transposons;
  - sistema de regulação de expressão epigenético por insuladores;
  - co-expressão de um gene repórter por meio de (i) um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES) presente do mRNA do transgene (mRNA bi-cistrônico) ou (ii) um promotor adicional para expressão do gene repórter (sistema de dois promotores);
  - transfecção e seleção de populações homogêneas superexpressoras da proteína de interesse e proteína repórter, por meio de FACS (*fluorescence activated cell sorting*);
  - seleção adicional por FACS de células contendo retículo endoplasmático proeminente utilizando marcação com sondas fluorescentes específicas à organela em questão, utilizando células pré-selecionadas de acordo com item anterior.
2. Método para superexpressão e secreção de proteínas, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender pelo menos um cassete de integração do transgene (vetor de expressão) de interesse e pelo menos um cassete de expressão transiente da transposase SB (vetor da transposase).
3. Vetor de integração genômica, de acordo com reivindicação 2, caracterizado por promover expressão estável de proteínas recombinantes em células de mamíferos e conter:
  - duas cópias de sequências de reconhecimento e integração mediada por transposase (3'-ITR e 5'-ITR) franqueando o cassete de integração;
  - sequências insuladoras (HS4 de *Gallus gallus*) em ambas extremidades dos cassetes de expressão;

- sítio de clonagem do transgene de interesse, contendo um promotor forte a montante (promotor CAG ou CMV) e um sítio de ligação interna ao ribossomo (IRES, mRNA bi-cistrônico) ou segundo promotor (sistema de dois promotores) a jusante do transgene para expressão do gene repórter;
  - um gene de repórter codificando uma proteína fluorescente (GFP, RFP, YFP) ou proteína de superfície (CD20, CD25, CD90) para seleção por FACS.
4. Linhagens celulares proprietárias, de acordo com reivindicação 3, caracterizadas por expressar tetR ou rtTA e compreender pelo menos um cassete de integração de tetR ou rtTA e um cassete de expressão transiente da transposase SB.
  5. Vetor de integração genômica, de acordo com reivindicação 3, caracterizado por conter sequência codificadora de tetR ou rtTA a montante de um sítio de ligação interna ao ribossomo (IRES) a montante e um sítio de ligação interna ao ribossomo (IRES);
  6. Sequência de DNA recombinante, caracterizada por conter a fusão de formas ativas dos genes Atf6-Xbp1, expressa na forma de SEQ ID NO: 1.
  7. Linhagens celulares proprietárias, de acordo com reivindicação 3 e 6, caracterizadas por expressar a fusão Atf6-Xbp1 (SEQ ID NO: 1) sobre controle de tetraciclina ou doxíciclina, compreendendo, pelo menos:
    - uma linhagem celular, de acordo com reivindicações 4 e 5;
    - um cassete de expressão de Atf6-Xbp1 contendo de uma a dez cópias do operador de tetraciclina (tetO) a montante do promotor;
    - um cassete de expressão transiente da transposase SB.
  8. Vetor de integração genômica, de acordo com reivindicação 3, contendo sequência codificadora de Atf6-Xbp1 (SEQ ID NO: 1) a montante de um sítio de ligação interna ao ribossomo (IRES), caracterizado por promover expressão condicional de Atf6-Xbp1 em células de mamíferos, adicionalmente contendo entre uma a dez cópias do operador de tetraciclina (tetO) a montante do promotor.
  9. Sistema para expressão regulada por tetraciclina ou doxíciclina de um gene de interesse, tipo tetON, caracterizado por:

- linhagem celular, de acordo com reivindicações 4 e 5;
  - vetor de expressão regulável contendo entre uma a dez cópias de tetO a montante do promotor do transgene;
  - um cassete de expressão transiente da transposase SB.
10. Expressão regulável de gene de interesse, de acordo com reivindicação 9, contendo, adicionalmente, expressão regulável de Atf6-Xbp1 (reivindicações 6 e 7).

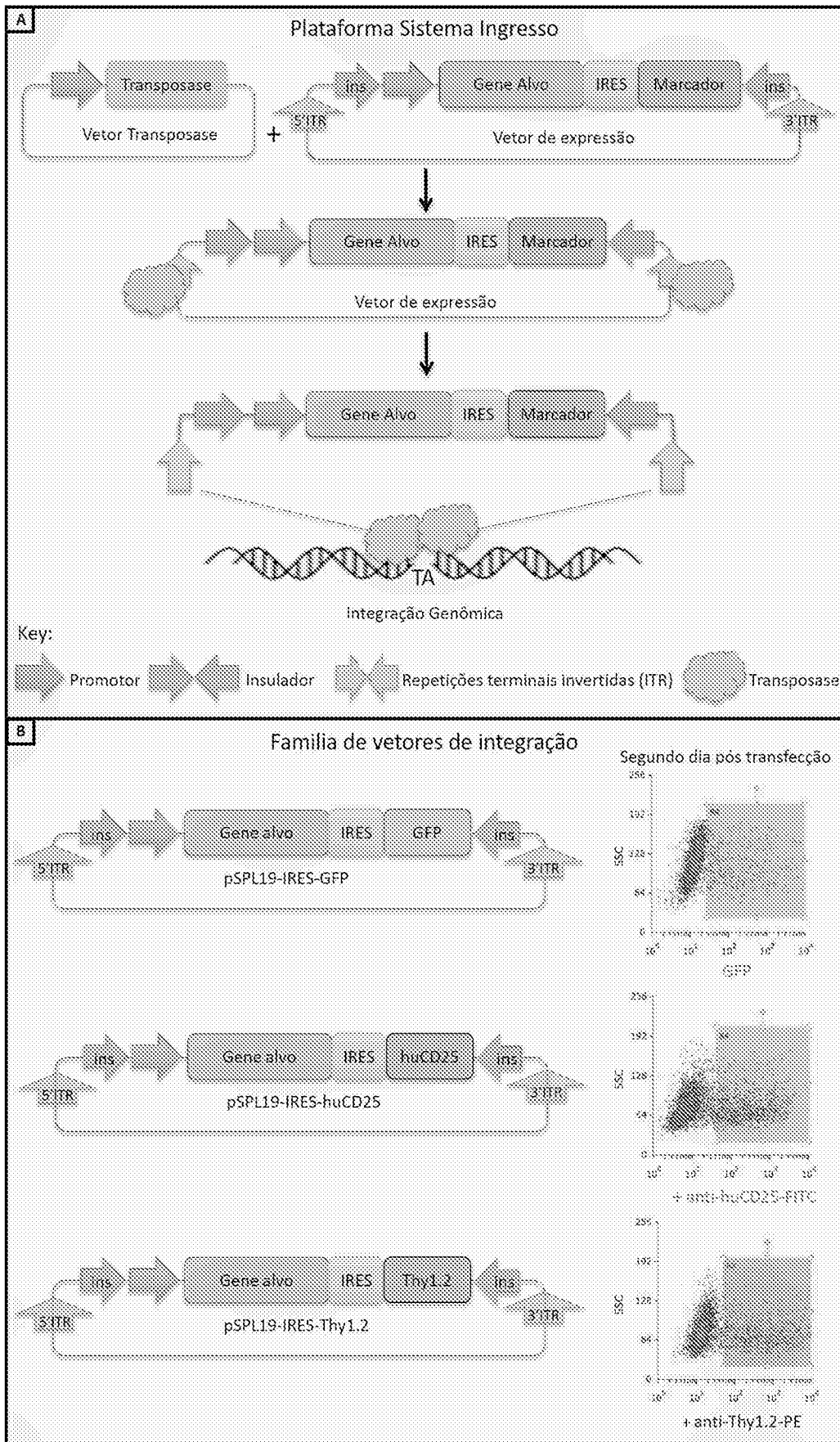


Figura 1

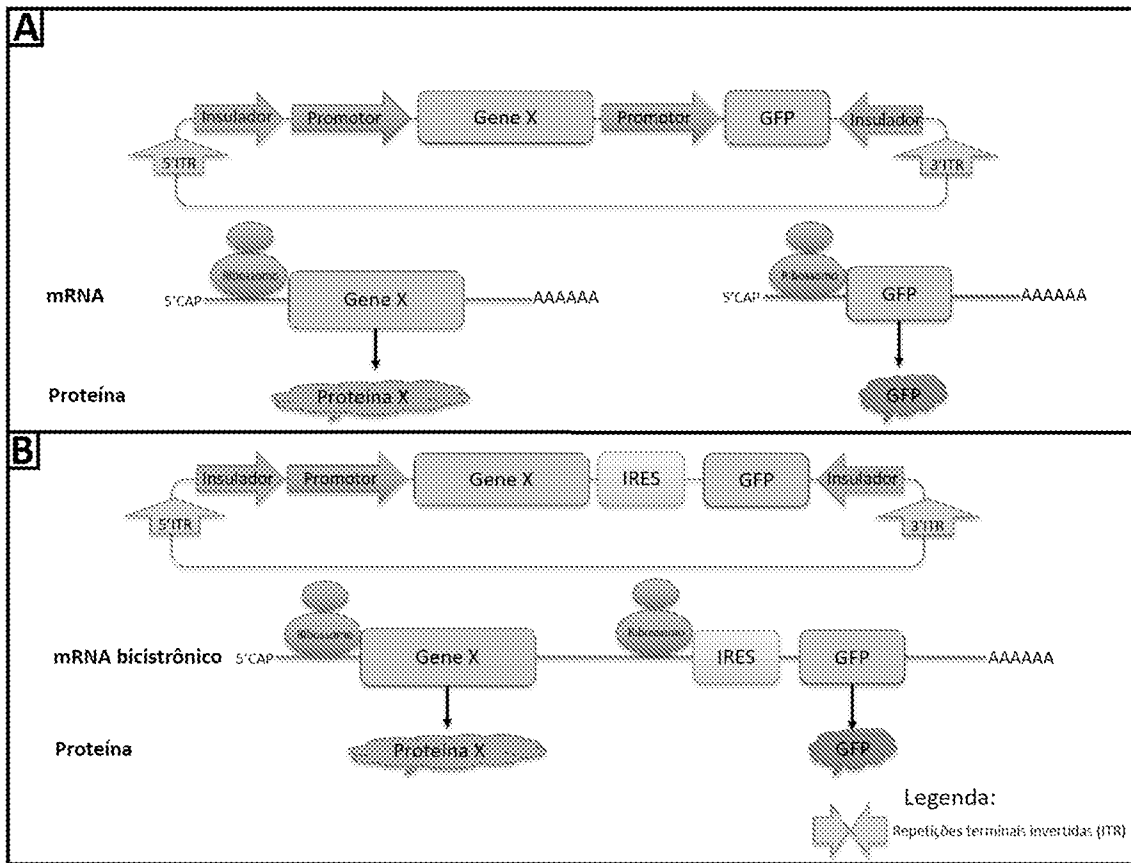


Figura 2

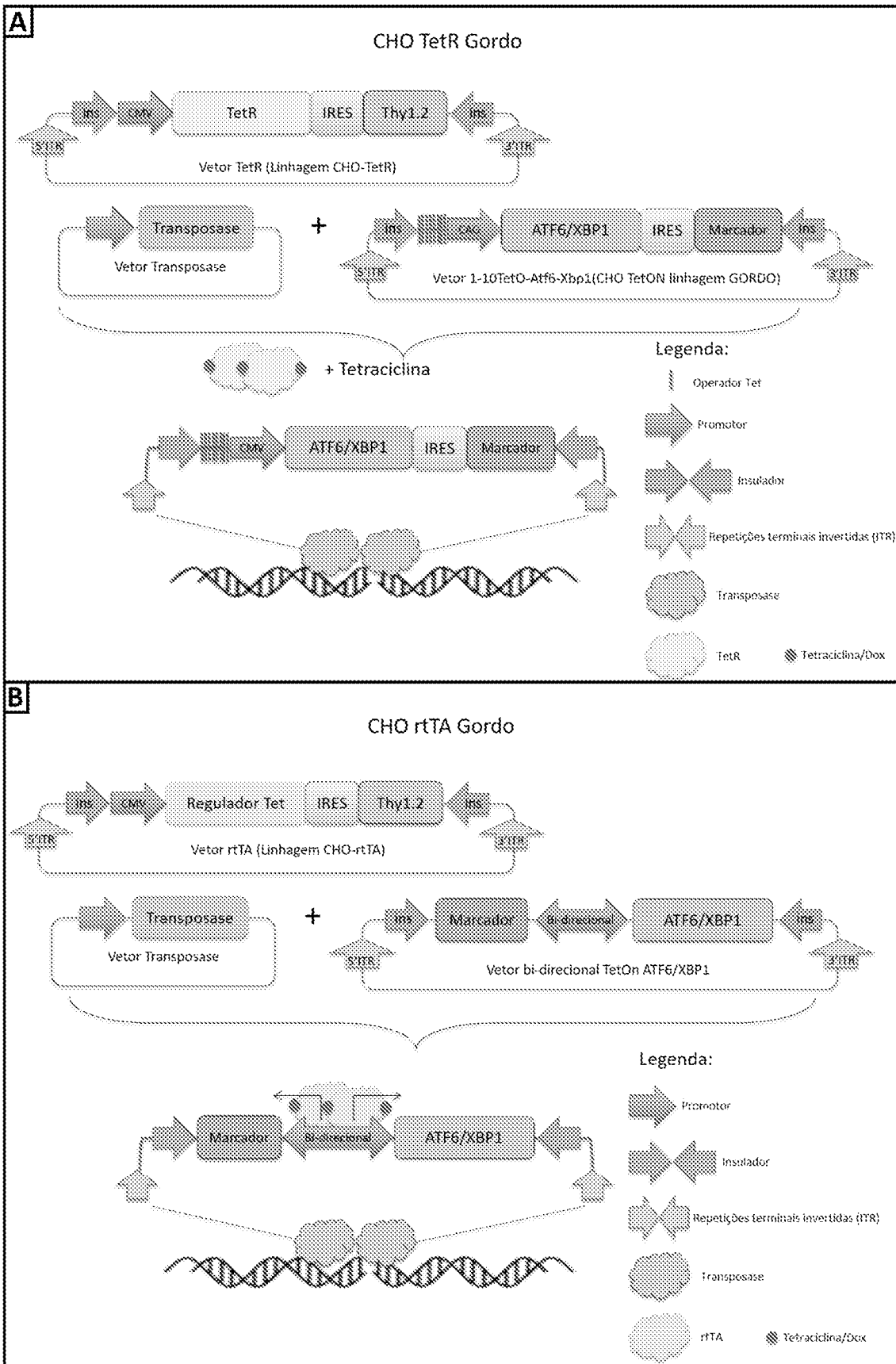


Figura 3

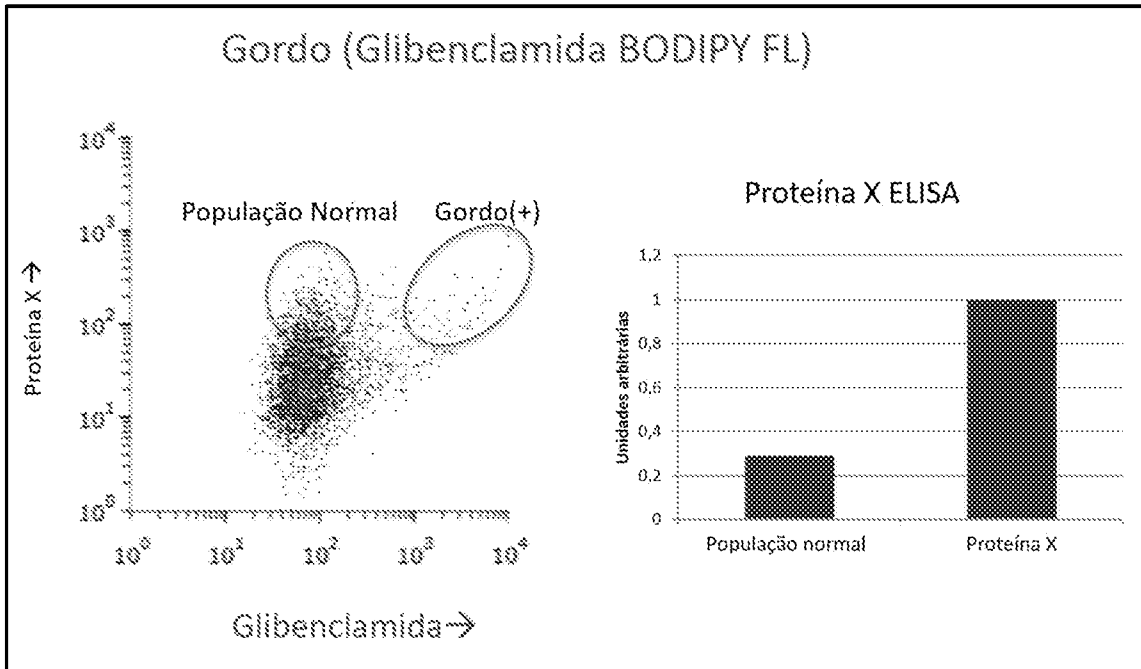


Figura 4

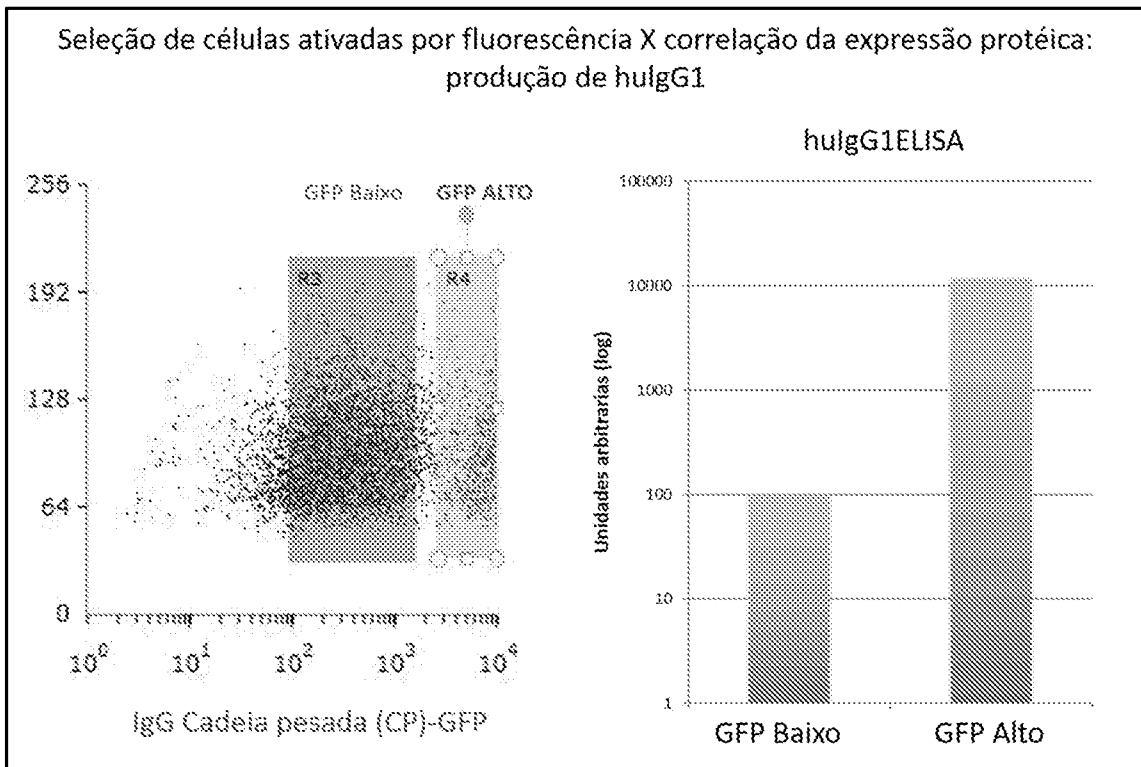


Figura 5

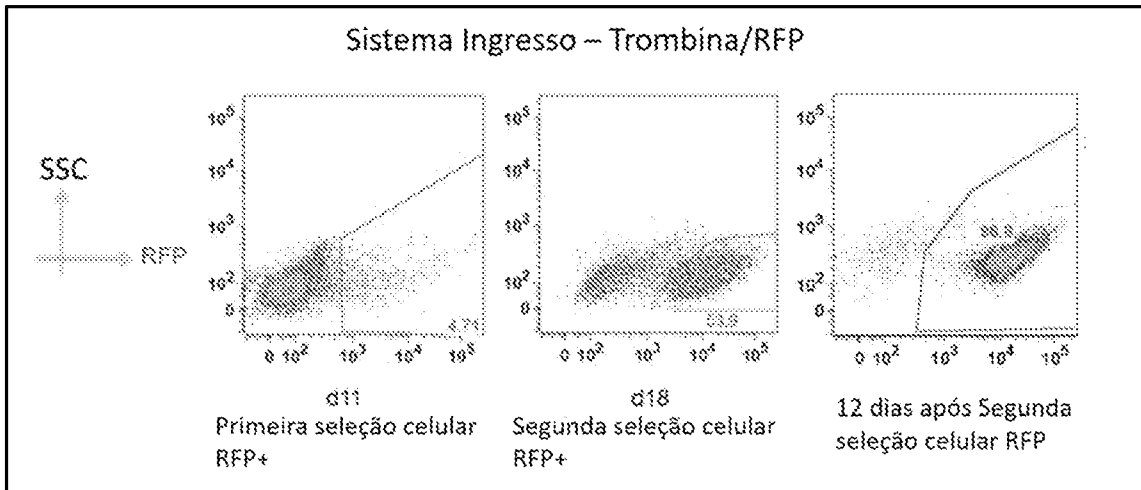


Figura 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2017/050184

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N15/67 (2006.01), C12N15/62 (2006.01), C12N 15/85 (2006.01), C12N 5/10 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12N**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

**Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)**

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, NPL, MEDLINE** (continued on additional sheet)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2010099296 A1 ( MADISON BLAIR [US]) 02 September 2010 (02.09.2010) Cited in description Abstract; line 28 from page 4 to line 8 from page 5; line 15 from page 18 to line 5 from page 20; lines 6 to 11 from page 27; Exemple 3; Figures 1 and 2	3 4, 5 and 9 1, 2, 6 to 8 and 10
Y A	EP 2316955 A1 (WYETH LLC [US]) 04 May 2011 (04.05.2011) Cited in description Abstract; Paragraphs [0017], [0044] to [0053], [0063], [0074], [0076], Exemples 3 to 6	4, 5 and 9 1, 2, 3, 6 to 8 and 10
A	WO 2004111194 A2 ( REFF MITCHELL E [US] ) 23 December 2004 (23.12.2004) Abstract; paragraphs [0017] to [0018], [0026] to [0032], [0068], [0128]; claims 8 to 12	1 to 10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2018 (21.02.2018)

Date of mailing of the international search report

15 March 2018 (15.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar

Facsimile No. cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Authorized officer

**Flávia Riso Rocha**

Telephone No.

**+55 21 3037-3493/3742**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2017/050184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	<p><b>WO 9925817 A2 (UNIV MINNESOTA [US])</b>            27 May 1999 (27.05.1999)            Cited in description            Abstract; line 25 from page 4 to line 31 from page 5; line 14 to line 29 from page 7; lines 1 and 2 from page 21; Exemples 6 and 9; figure 15</p>	3 4, 5 and 9 1, 2, 6 to 8 and 10
Y A	<p><b>GULIS, G. <i>et al.</i> Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein. BMC Biotechnology. 2014. Vol. 14:26. <a href="https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-26">https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-26</a>.</b>            Abstract; second and fourth paragraphs of page 2, section "Methods"; Figures 1 and 4</p>	4, 5 and 9 1, 2, 3, 6 to 8 and 10
A	<p><b>GUNN, K. E. <i>et al.</i> A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion. Molecular Immunology. 2004, Vol. 41. No. 9, pages : 919-927. doi: 10.1016/j.molimm.2004.04.023.</b>            Abstract; section "Materials and Methods"</p>	1 to 10
A	<p><b>LEE, A. <i>et al.</i> XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. Mol. Cell. Biol. 2003. Vol. 23, No. 21, pages: 7448-7459. doi: 10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003.</b>            Abstract; section "Materials and Methods"</p>	1 to 10
A	<p><b>YOSHIDA, H. <i>et al.</i> XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. Cell. 2001. Vol. 107, No. 7, pages: 881-891. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0">https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0</a>.</b>            Abstract; section "Experimental Procedures"; Figure 7</p>	1 to 10
A	<p><b>WO 03089622 A2 ( KAZUTOSHI MORI [JP])</b>            30 October 2003 (30.10.2003)            Abstract, lines 1 to 7 from page 3, set of claims</p>	1 to 10
P, A	<p><b>WO 2017075729 A1 (UNIV CHILE [CL])</b>            11 May 2017 (11.05.2017)            Line 22 from page 6 to line 22 from page 9; line 29 from page 23 to line 29 from page 24, set of claims</p>	1 to 10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/BR2017/050184**

WO 2010099296 A1	2010-09-02	EP 2401367 A1	2012-01-04
		EP 3184632 A2	2017-06-28
		US 2010287633 A1	2010-11-11
		US 8399643 B2	2013-03-19
		US 2013160152 A1	2013-06-20
		US 9546382 B2	2017-01-17
		US 2017166874 A1	2017-06-15
-----			
EP 2316955 A1	2011-05-04	EP 2316955 B1	2017-10-04
		AU 2005282746 A1	2006-03-16
		BR PI0514870 A	2008-06-24
		CA 2577073 A1	2006-03-16
		CN 101048509 A	2007-10-03
		CR 8927 A	2007-08-28
		EC SP077295 A	2007-04-26
		EP 1784490 A2	2007-05-16
		ES 2649862 T3	2018-01-16
		ES 2653843 T3	2018-02-09
		IL 181278 D0	2007-07-04
		JP 2012161318 A	2012-08-30
		JP 5508460 B2	2014-05-28
		JP 2008511335 A	2008-04-17
		KR 20070053732 A	2007-05-25
		MX 2007002379 A	2007-04-23
		NO 20071221 A	2007-03-30
		RU 2007106442 A	2008-10-10
		US 2006053502 A1	2006-03-09
		US 7514237 B2	2009-04-07
US 2009221035 A1	2009-09-03		
US 8173394 B2	2012-05-08		
US 2012322104 A1	2012-12-20		
WO 2006028889 A2	2006-03-16		
-----			
WO 2004111194 A2	2004-12-23	WO 2004111194 A3	2005-03-24
		AU 2004248165 A1	2004-12-23
		CA 2528418 A1	2004-12-23
		EP 1639095 A2	2006-03-29
		JP 2007500016 A	2007-01-11
		NZ 544335 A	2009-01-31
		US 2005106222 A1	2005-05-19
-----			
WO 9925817 A2	1999-05-27	WO 9925817 A3	1999-08-05
		AT 466948 T	2010-05-15
		AU 6456998 A	1998-09-29
		AU 745049 B2	2002-03-07
		AU 1410399 A	1999-06-07
		CA 2280997 A1	1998-09-17
		CA 2309000 A1	1999-05-27
		DE 69841648 D1	2010-06-17
		DK 0973928 T3	2010-08-09
		EP 1034258 A2	2000-09-13
		JP 2001523450 A	2001-11-27
		JP 2002511741 A	2002-04-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/BR2017/050184**

		JP 2008271981 A	2008-11-13
		KR 20000076157 A	2000-12-26
		US 2002016975 A1	2002-02-07
		US 6489458 B2	2002-12-03
		US 2003124668 A1	2003-07-03
		US 7148203 B2	2006-12-12
		WO 9840510 A1	1998-09-17
-----	-----	-----	-----
WO 03089622 A2	2003-10-30	WO 03089622 A3	2004-04-29
		AU 2003234198 A1	2003-11-03
		US 2005250182 A1	2005-11-10
		US 2011207801 A1	2011-08-25
-----	-----	-----	-----
WO 2017075729 A1	2017-05-11	NONE	
-----	-----	-----	-----

Continuation of: Electronic data base consulted during international search

TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPEU, TXPEY,  
TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, XP3GPP, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC,  
XPOAC, XPTK, TDB.

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C12N15/67 (2006.01), C12N15/62 (2006.01), C12N 15/85 (2006.01), C12N 5/10 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de patentes do INPI-BR (SINPI), Plataforma Lattes (<http://lattes.cnpq.br/>)

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, GENESEQ, USGENE, WOGENE, GenBank, NPL, MEDLINE (continua em folha suplementar)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X Y A	WO 2010099296 A1 ( MADISON BLAIR [US]) 02 setembro 2010 (2010-09-02) Citado na descrição. Resumo; linha 28 da página 4 à linha 8 da página 5; linha 15 da página 18 à linha 5 da página 20; linhas 6 a 11 da página 27; Exemplo 3; Figuras 1 e 2.	3 4, 5 e 9 1, 2, 6 a 8 e 10
Y A	EP 2316955 A1 (WYETH LLC [US]) 04 maio 2011 (2011-05-04) Citado na descrição. Resumo, parágrafos [0017], [0044] a [0053], [0063], [0074], [0076], Exemplos 3 a 6.	4, 5 e 9 1, 2, 3, 6 a 8 e 10
A	WO 2004111194 A2 ( REFF MITCHELL E [US]) 23 dezembro 2004 (2004-12-23) Resumo, parágrafos [0017] a [0018], [0026] a [0032], [0068], [0128]; reivindicações 8 a 12.	1 a 10

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

21/02/2018

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

15/03/2018

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA  
PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

N° de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

N° de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X Y A	<p>-----</p> <p>WO 9925817 A2 (UNIV MINNESOTA [US]) 27 maio 1999 (1999-05-27) Citado na descrição. Resumo; linha 25 da página 4 à linha 31 da página 5; linha 14 à linha 29 da página 7; linhas 1 e 2 da página 21; Exemplos 6 e 9; Figura 15.</p>	3 4, 5 e 9 1, 2, 6 a 8 e 10
Y A	<p>-----</p> <p>GULIS, G. <i>et al.</i> Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein. BMC Biotechnology. 2014. Vol. 14:26. <a href="https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-26">https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-26</a>. Resumo, segundo e quarto parágrafos da página 2, seção “Métodos”; Figuras 1 e 4.</p>	4, 5 e 9 1, 2, 3, 6 a 8 e 10
A	<p>-----</p> <p>GUNN, K. E. <i>et al.</i> A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion. Molecular Immunology. 2004, Vol. 41. No. 9, páginas: 919-927. doi: 10.1016/j.molimm.2004.04.023. Resumo, seção “Materiais e Métodos”.</p>	1 a 10
A	<p>-----</p> <p>LEE, A. <i>et al.</i> XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. Mol. Cell. Biol. 2003. Vol. 23, No. 21, páginas: 7448-7459. doi: 10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003. Resumo, seção “Materiais e Métodos”.</p>	1 a 10
A	<p>-----</p> <p>YOSHIDA, H. <i>et al.</i> XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. Cell. 2001. Vol. 107, No. 7, páginas: 881–891. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0">https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0</a>. Resumo, seção “Procedimentos Experimentais”, Figura 7.</p>	1 a 10
A	<p>-----</p> <p>WO 03089622 A2 ( KAZUTOSHI MORI [JP]) 30 outubro 2003 (2003-10-30) Resumo, linhas 1 a 7 da página 3, quadro reivindicatório.</p>	1 a 10
P, A	<p>-----</p> <p>WO 2017075729 A1 (UNIV CHILE [CL]) 11 maio 2017 (2017-05-11) Linha 22 da página 6 à linha 22 da página 9; linha 29 da página 23 à linha 29 da página 24, quadro reivindicatório.</p>	1 a 10
	<p>-----</p>	

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL  
 Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2017/050184

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 2010099296 A1	2010-09-02	EP 2401367 A1	2012-01-04
		EP 3184632 A2	2017-06-28
		US 2010287633 A1	2010-11-11
		US 8399643 B2	2013-03-19
		US 2013160152 A1	2013-06-20
		US 9546382 B2	2017-01-17
		US 2017166874 A1	2017-06-15
-----	-----	-----	-----
EP 2316955 A1	2011-05-04	EP 2316955 B1	2017-10-04
		AU 2005282746 A1	2006-03-16
		BR PI0514870 A	2008-06-24
		CA 2577073 A1	2006-03-16
		CN 101048509 A	2007-10-03
		CR 8927 A	2007-08-28
		EC SP077295 A	2007-04-26
		EP 1784490 A2	2007-05-16
		ES 2649862 T3	2018-01-16
		ES 2653843 T3	2018-02-09
		IL 181278 D0	2007-07-04
		JP 2012161318 A	2012-08-30
		JP 5508460 B2	2014-05-28
		JP 2008511335 A	2008-04-17
		KR 20070053732 A	2007-05-25
		MX 2007002379 A	2007-04-23
		NO 20071221 A	2007-03-30
RU 2007106442 A	2008-10-10		
US 2006053502 A1	2006-03-09		
US 7514237 B2	2009-04-07		
US 2009221035 A1	2009-09-03		
US 8173394 B2	2012-05-08		
US 2012322104 A1	2012-12-20		
WO 2006028889 A2	2006-03-16		
-----	-----	-----	-----
WO 2004111194 A2	2004-12-23	WO 2004111194 A3	2005-03-24
		AU 2004248165 A1	2004-12-23
		CA 2528418 A1	2004-12-23
		EP 1639095 A2	2006-03-29
		JP 2007500016 A	2007-01-11
		NZ 544335 A	2009-01-31
		US 2005106222 A1	2005-05-19
-----	-----	-----	-----
WO 9925817 A2	1999-05-27	WO 9925817 A3	1999-08-05
		AT 466948 T	2010-05-15
		AU 6456998 A	1998-09-29
		AU 745049 B2	2002-03-07
		AU 1410399 A	1999-06-07
		CA 2280997 A1	1998-09-17
		CA 2309000 A1	1999-05-27
		DE 69841648 D1	2010-06-17
		DK 0973928 T3	2010-08-09
		EP 1034258 A2	2000-09-13
		JP 2001523450 A	2001-11-27
		JP 2002511741 A	2002-04-16



**Quadro Suplementar**

**No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.**

Continuação de: Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional

TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPEU, TXPEY,  
TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA, XP3GPP, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC,  
XPOAC, XPTK, TDB.