



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0913475-1 B1



(22) Data do Depósito: 15/09/2009

(45) Data de Concessão: 16/04/2019

(54) Título: VETOR

(51) Int.Cl.: C12N 15/12; C12N 15/63; C12N 5/10.

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2008 US 61/097,149.

(73) Titular(es): GENENTECH, INC..

(72) Inventor(es): LAETITIA MALPHETTES; ANDREW SNOWDEN; INN H. YUK.

(86) Pedido PCT: PCT US2009057031 de 15/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/031074 de 18/03/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/03/2011

(57) Resumo: VETOR A presente invenção está relacionada a composições e métodos para regulação de osmolalidade intracelular em células, por exemplo, em células cultivadas, incluindo em células cultivadas em biorreatores. A invenção fornece ácidos nucleicos compreendendo pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) e células, vetores, produtos de manufatura, órgãos artificiais ou implantes e semelhantes contendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE).

“VETOR”**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. 61/097.149, depositado em 15 de setembro de 2008, o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência na íntegra.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se, de modo geral, à biologia molecular e celular, sistemas de cultura de célula e biorreatores e à produção recombinante de produtos, tais como polipeptídeos em cultura de célula. Em particular, a presente invenção proporciona composições e métodos para regulação de osmolalidade intracelular em células, por exemplo, em células cultivadas, incluindo em células cultivadas em biorreatores.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Biorreatores para cultura de células de mamífero são usados para produzir fármacos de proteína recombinante, tais como fatores de crescimento, agentes trombolíticos, interferons, interleucinas, eritropoietinas, fatores de estimulação de colônia e várias outras citocinas e anticorpos. Contudo, em biorreatores, a osmolalidade da cultura aumenta como um resultado da adição de base para controlar o pH, bem como alimentações de nutrientes e suplementos para fornecer a energia necessária para a cultura. Tipicamente, por toda uma operação em um biorreator alimentado em batelada, a osmolalidade aumenta de cerca de 300 miliosmoles/kg (mOsm) para valores algumas vezes tão altos quanto cerca de 600 mOsm. Foi mostrado que, comparado com culturas de célula a 300 mOsm, dentro de uma faixa de osmolalidade (acima de 340 mOsm e abaixo de um limiar compreendido entre 400 a 450 mOsm), a produtividade específica de células de mamífero aumenta, enquanto que a taxa de crescimento das células diminui e a taxa de morte das células não sofre um impacto. Para a maioria das linhagens de célula, parece

existir um limiar de osmolalidade acima do qual a taxa de morte celular aumenta dramaticamente com a osmolalidade (muitas vezes, esse limiar parece estar compreendido entre 400 e 450 mOsm).

[004] Em biorreatores, a osmolalidade aumentada está correlacionada a uma tonicidade aumentada (NaCl aumentado). Alto teor de NaCl ativa o fator de transcrição proteína de ligação a elemento de resposta osmótica/intensificador responsivo à tonicidade (TonEBP/OREBP, onde TonE é também denominado "intensificador de tonicidade" ou "elemento de resposta osmótica"), a qual ativa o TonE, resultando em transcrição aumentada de vários genes protetores cujos promotores são controlados por seus sítios de ligação cognatos: o intensificador ORE/TonE.

[005] A regulação de atividade transcricional de TonEBP/OREBP é complexa. Dentro de 30 min de hipertonicidade, o TonEBP/OREBP se torna fosforilado e transloca para o núcleo. Horas depois, o mRNA de TonEBP/OREBP e a abundância de proteína aumentam. Também, a hipertonicidade aumenta a atividade de transativação do TonEBP/OREBP, associada à fosforilação de seu domínio de transativação. Mais lentamente, a hipertonicidade aumenta a abundância de TonEBP/OREBP mediante indução de seu mRNA e síntese de proteína.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[006] A invenção proporciona moléculas de ácido nucleico isoladas, sintéticas ou recombinantes compreendendo: (a) pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) compreendendo pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou NFTAc-responsivo operacionalmente ligado a uma sequência regulatória transcricional; (b) a molécula de ácido nucleico de (a), em que a sequência regulatória transcricional é transcionalmente ativa em uma célula eucariota ou a sequência regulatória transcricional é derivada de uma célula eucariota; (c) a

molécula de ácido nucleico de (a) ou (b), em que a sequência regulatória transcricional é transcricionalmente ativa em um vertebrado, um mamífero, um ser humano, um inseto, uma planta, um levedo ou uma célula fúngica ou um vírus ou uma sequência regulatória transcricional é derivada de um vertebrado, um mamífero, um ser humano, um inseto, uma planta, um levedo ou uma célula fúngica ou um vírus ou a sequência regulatória transcricional é uma sequência sintético; ou (d) a molécula de ácido nucleico de (a), em que a sequência regulatória transcricional compreende um promotor e/ou intensificador.

[007] Em modalidades alternativas, a pelo menos uma molécula (sequência) intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva está posicionada 5' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou a pelo menos uma sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva está posicionada 3' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou a pelo menos uma sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva está posicionada 5' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense* e uma segunda, terceira e/ou sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva adicional está posicionada 3' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense*.

[008] Em modalidades alternativas, o OR-TRE ainda compreende pelo menos um intensificador transcricional responsivo a Proteína-1 Ativadora (AP-1) operacionalmente ligado à sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva. O intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) pode estar posicionado 5' ao OR-TRE em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou o intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) pode estar posicionado 3' ao OR-TRE em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) pode estar posicionado 5' ao OR-TRE

em uma orientação *sense* ou *antisense* e um segundo, terceiro e/ou intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) adicional está posicionado 3' ao OR-TRE em uma orientação *sense* ou *antisense*.

[009] Em aspectos alternativos, o intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' ao promotor, em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou o intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 3' ao promotor, em uma orientação *sense* ou *antisense*; ou um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense* e um segundo intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 3' ao promotor em uma orientação *sense* ou *antisense*.

[010] Em uma modalidade, pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou NFATc-responsivo e/ou pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) tem (compreende) ou compreende adicionalmente, uma sequência de molécula de ácido nucleico eucariota (por exemplo, um vertebrado, um mamífero, um ser humano, um inseto, um levedo ou fúngica), um procariota, uma planta, viral e/ou sintética.

[011] Em modalidades alternativas, pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo compreende a sequência de ácido nucleico de 5'-T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1), em que N pode ser qualquer resíduo de ácido nucleico; e/ou o pelo menos um intensificador transcricional NFATc-responsivo compreende a sequência de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3' (SEQ ID NO: 2) ou 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4), em que N pode ser qualquer resíduo de ácido nucleico; e/ou o pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) compreende a sequência

de ácido nucleico de 5'-TGA(C/G)TCA-3' (SEQ ID NO: 3).

[012] Em modalidades alternativas, pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo compreende a sequência de nucleotídeo de 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4); e/ou o pelo menos um intensificador transcricional NFATc-responsivo compreende a sequência de ácido nucleico de 5'-TGGAAATTTGT-3' (SEQ ID NO: 5); e/ou o pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) compreende a sequência de nucleotídeo de 5'-TGA^{CT}CA-3' (SEQ ID NO: 6).

[013] Em uma modalidade, o OR-TRE compreende a sequência de nucleotídeo de 5'-TT**GGAAAATCACCAGA**ATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTC**CTGACTCA**TT-3' (SEQ ID NO: 7), ou os resíduos 2 a 12 de (SEQ ID NO: 7) (os quais correspondem a 5'-T**GGAAAATCAC**-3') (SEQ ID NO: 9) ou 5'-TTGACTAGTT**GGAAAATCACCAGA**ATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTC**CTGACTC**ATTGCTAGCTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAG-3' (SEQ ID NO: 8), onde os sítios de ligação à TonE e AP1 em (SEQ ID NO: 7) e (SEQ ID NO: 8) estão em negrito.

[014] Em uma modalidade, um elemento (sequência) intensificador transcricional TonEBP-responsivo usado na construção osmo-responsiva da invenção compreende um ácido nucleico que se liga especificamente a uma proteína compreendendo o motivo de resíduo de aminoácido RAHYETEG (SEQ ID NO: 41).

[015] Em uma modalidade, o pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo está posicionado 5' a pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1), ou pelo menos um intensificador transcricional responsivo à sequência da Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' a pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo.

[016] Em modalidades alternativas, pelo menos uma sequência de intensificador transcricional TonEBP-responsivo está posicionada dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 500 ou mais resíduos de nucleotídeo de pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1).

[017] Em modalidades alternativas, pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo está posicionado dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 500 ou mais resíduos de nucleotídeo do promotor.

[018] Em modalidades alternativas, pelo menos um intensificador transcricional responsivo à sequência de Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 500 ou mais nucleotídeos do promotor.

[019] Em modalidades alternativas, o promotor é um promotor constitutivo, um promotor induzível, um promotor sintético, um promotor de mamífero, um promotor bacteriano, um promotor de planta, um promotor de levedo, um promotor fúngico, um promotor viral ou um promotor de citomegalovírus (CMV).

[020] Em modalidades alternativas, o OR-TRE compreende um a dez (1 a 10) ou mais intensificadores transcricionais TonEBP-responsivos e/ou o OR-TRE compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais intensificadores transcricionais responsivos à Proteína-1 Ativadora (AP-1).

[021] Em modalidades alternativas, a molécula de ácido nucleico ainda compreende uma ou mais moléculas (sequências) de ácido nucleico adicionais operacionalmente ligadas ao promotor transcricionalmente ativo em

uma célula, por exemplo, uma célula eucariota. A molécula ou moléculas (sequências) de ácido adicionais podem compreender uma ou mais moléculas de ácido nucleico de codificação de proteína ou um ou mais ácidos nucleicos regulatórios (um ácido nucleico tendo uma função ou efeito inibitório, de estabilização ou sobre-regulação). Por exemplo, um ácido nucleico regulatório pode ser uma ou mais moléculas (sequências) de ácido nucleico *sense* ou *antisense*. Em modalidades alternativas, a molécula de ácido adicional compreende: (a) uma molécula de ácido nucleico de codificação de proteína; (b) uma molécula de ácido nucleico regulatório; ou (c) a molécula de ácido nucleico de (b), em que a molécula de ácido nucleico regulatória é uma molécula de ácido nucleico inibitória, de estabilização ou sobre-regulação ou uma sequência *sense* ou *antisense*.

[022] Em modalidades alternativas, a molécula de ácido adicional compreende uma molécula (sequência) de ácido nucleico que codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor; ou a molécula de ácido adicional compreende uma molécula (sequência) de ácido nucleico que codifica: uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação do ciclo celular; uma enzima de glicosilação ou qualquer combinação dos mesmos.

[023] Em modalidades alternativas, o ácido nucleico regulatório, por exemplo, molécula de ácido nucleico inibitória, compreende uma sequência *sense*, uma sequência *antisense*, uma ribozima, um RNA curto de interferência (siRNA) ou um microRNA (miRNA). A molécula de ácido adicional pode compreender uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de NFATc ou TonEBP.

[024] A invenção proporciona moléculas de ácido nucleico

isoladas, sintéticas ou recombinantes osmo-responsivas compreendendo: (a) pelo menos um OR-TRE da invenção operacionalmente ligado a um ácido nucleico, em que o OR-TRE regula ou aciona a transcrição do ácido nucleico; (b) a molécula de ácido nucleico de (a), em que o ácido nucleico transcrito codifica (compreende) um polinucleotídeo que codifica a molécula de ácido nucleico; (c) a molécula de ácido nucleico de (b), em que o ácido nucleico transcrito codifica: (i) uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou uma proteína que protege uma célula em um ambiente de osmolalidade aumentada ou protege uma célula sob condições de hiperosmolalidade ou hiperosmolalidade aumentada; (ii) uma proteína anti-apoptótica; (iii) uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; (iv) uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; (v) uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; (vi) uma enzima glicolítica; (vii) uma proteína de regulação do ciclo celular; (viii) uma enzima de glicosilação; ou (ix) qualquer combinação de (i) a (viii); (d) a molécula de ácido nucleico de (a), em que o ácido nucleico transcrito compreende um ácido nucleico regulatório, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico inibitória, de estabilização ou sobre-regulação ou uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência *sense* ou *antisense*; (e) a molécula de ácido nucleico de (d), em que o ácido nucleico regulatório, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico inibitória, de estabilização ou sobre-regulação, compreende uma sequência *sense*, uma sequência *antisense*, uma ribozima, um RNA curto de interferência (siRNA) ou um microRNA (miRNA); (f) a molécula de ácido nucleico que codifica polipeptídeo de (b), em que o ácido nucleico transcrito codifica um polipeptídeo de NFTAc, um polipeptídeo de AP-1, um polipeptídeo de TonEBP, um polipeptídeo de calcineurina ou uma combinação dos mesmos.

[025] Em modalidades alternativas, a proteína ou peptídeo osmo-protetor é uma prolina ou uma glicina-betaína, um transportador de taurina, um

transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, um cotransportador de sódio-*mio*-inositol, uma proteína de choque térmico, uma aquaporina ou uma aldose redutase. A proteína anti-apoptótica pode ser uma Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 ou Bcl-w. A proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula pode ser uma superóxido dismutase, uma catalase, uma glutathione peroxidase, uma peroxiredoxina, uma sulfiredoxina, tioredoxina, tioredoxina redutase, tioredoxina peroxidase, tioltransferase, glutaredoxina ou uma glutathione redutase.

[026] Em modalidades alternativas, a proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína é uma proteína de ligação à imunoglobulina (BiP), calnexina, calreticulina, ERp57 ou uma proteína isomerase de dissulfeto (PDI).

[027] A enzima glicolítica pode ser uma carboxilase de piruvato ou uma quinase de piruvato. A proteína de regulação de ciclo celular pode ser uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente ou um inibidor de uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente.

[028] A invenção proporciona moléculas de ácido nucleico isoladas, sintéticas ou recombinantes compreendendo pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo operacionalmente ligado a pelo menos uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma molécula de ácido nucleico de objetivação. A molécula de ácido nucleico de objetivação pode compreender uma molécula de ácido nucleico para objetivação de um gene lactogênico ou uma mensagem lactogênica ou uma proteína lactogênica para diminuir a expressão de um gene lactogênico ou uma mensagem lactogênica ou uma proteína lactogênica. O gene lactogênico pode ser uma dehidrogenase de lactato. O ácido nucleico compreendendo uma molécula de ácido nucleico que objetiva um gene lactogênico ou mensagem de gene lactogênico pode compreender um RNA curto de interferência (siRNA), um microRNA (miRNA),

um RNA *antisense* e/ou um RNA com atividade de ribozima. Em uma modalidade, o pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo compreende um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da invenção.

[029] Em um aspecto, a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva ainda compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica um transcrito (mensagem) compreendendo uma região 5' não traduzida, uma região 3' não traduzida ou uma região 5' não traduzida e uma região 3' não traduzida. Em um aspecto, a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva ainda compreende pelo menos uma sequência regulatória transcricional ou traducional a qual, em uma modalidade, pode estar posicionado dentro da região 5' não traduzida ou posicionado dentro da região 3' não traduzida ou ambos.

[030] A invenção proporciona vetores compreendendo (a) a molécula de ácido nucleico da invenção, (b) o ácido nucleico da invenção; e/ou (c) o ácido nucleico osmo-responsivo da invenção. Em modalidades alternativas, o vetor é um cassete de expressão, um vírus recombinante, um plasmídeo, um fago, um fagemídeo, um cromossomo artificial ou um veículo de clonagem; ou o vetor é um vetor derivado de bacteriófago P1, um cromossomo artificial bacteriano, um cromossomo artificial de levedo ou um cromossomo artificial de mamífero; ou o vetor é um epissoma extra-cromossômico. Em um aspecto, o vetor é um vetor de integração.

[031] A invenção proporciona células compreendendo: (a) o ácido nucleico da invenção, (b) o ácido nucleico da invenção; e/ou (c) o ácido nucleico osmo-responsivo da invenção; ou (b) um vetor da invenção. Em modalidades alternativas, a célula é uma célula de mamífero, uma célula de ser humano, uma célula de camundongo, uma célula de inseto, uma célula fúngica, uma célula bacteriana, uma célula de planta, uma célula imortal ou uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO). O vetor na célula pode ser um epissoma extra-

cromossômico ou o vetor pode ser estavelmente integrado no genoma de uma célula. Um ácido nucleico da presente invenção pode ser uma construção de expressão transitória episomal ou uma construção de expressão genomicamente integrada o qual, alternativamente, pode ser um inserto genômico estável.

[032] A invenção proporciona biorreatores, discos de cultura, discos de Petri, tubos de ensaio, garrafas giratórias e semelhantes compreendendo uma célula da invenção.

[033] A invenção proporciona métodos para proteção de uma célula em um ambiente de osmolalidade aumentada ou sob condições de hiperosmolalidade ou hiperosmolalidade aumentada ou manutenção de osmolalidade ou osmolalidade em uma célula, compreendendo expressão de uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou uma molécula de ácido nucleico regulatória osmo-responsiva, em que o método compreende: (a) introdução de um polinucleotídeo em uma célula, em que o referido polinucleotídeo compreende: uma molécula de ácido nucleico da invenção e/ou uma molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção; em que o polinucleotídeo codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou é, em si, uma molécula de ácido nucleico osmo-protetora ; e (b) cultura da célula, de modo que a proteína ou peptídeo osmo-protetor ou o ácido nucleico regulatório osmo-protetor seja expresso, desse modo, protegendo a célula em um ambiente de osmolalidade aumentada ou sob condições de hiperosmolalidade ou hiperosmolalidade aumentada.

[034] Em aspectos alternativos desses métodos, a proteína ou peptídeo osmo-protetor compreende: (i) uma proteína que protege uma célula em um ambiente de osmolalidade aumentada (*e.g.*, protege uma célula sob condições de hiperosmolalidade ou hiperosmolalidade aumentada); (ii) uma proteína anti-apoptótica; (iii) uma proteína que confere resistência ao estresse

oxidativo a uma célula; (iv) uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; (v) uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; (vi) uma enzima glicolítica; (vii) uma proteína de regulação do ciclo celular; (viii) uma enzima de glicosilação; ou (ix) qualquer combinação de (i) a (viii).

[035] A invenção proporciona métodos para aumento de produção ou regulação de produção de uma proteína recombinante em uma célula (incluindo células cultivadas, por exemplo, as células em um biorreator) ou aumento da produção de proteínas corretamente enoveladas ou proteínas corretamente glicosiladas sob condições de hiperosmolalidade em uma célula (incluindo células cultivadas, por exemplo, as células em um biorreator), compreendendo: (a) fornecimento de uma molécula de ácido nucleico recombinante ou heteróloga que codifica a proteína recombinante; e (b) inserção, estável ou transitoriamente em uma célula, de um polinucleotídeo compreendendo: um ácido nucleico da invenção e/ou o ácido nucleico osmo-responsivo da invenção, em que a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou um ácido nucleico regulatório osmo-protetor; e (c) cultura da célula sob condições em que a proteína ou peptídeo osmo-protetor ou ácido nucleico regulatório osmo-protetor de (b) e a proteína recombinante de (a) são expressos, desse modo, aumentando a produção ou regulação de produção da proteína recombinante na célula ou aumentando a produção ou regulação de produção de proteínas corretamente enoveladas ou proteínas corretamente glicosiladas sob condições de hiperosmolalidade na célula.

[036] A invenção proporciona métodos para aumento de produção ou regulação de produção de uma proteína recombinante ou aumentando a produção ou regulação de produção de proteínas corretamente enoveladas ou proteínas corretamente glicosiladas sob condições de

hiperosmolalidade em uma célula, em um biorreator, um implante ou um órgão artificial, compreendendo: (a) fornecimento de um biorreator, um implante ou um órgão artificial compreendendo uma célula da invenção, em que a célula compreende um ácido nucleico da invenção e/ou a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção; e a molécula de ácido nucleico ou vetor codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor; e (b) cultura da célula sob condições em que a proteína ou peptídeo osmo-protetor ou o ácido nucleico regulatório osmo-protetor e a proteína recombinante são expressos ou colocação do biorreator, implante ou órgão artificial em condições que permitem a expressão da proteína ou peptídeo osmo-protetor ou do ácido nucleico regulatório osmo-protetor e da proteína recombinante pela célula.

[037] A invenção proporciona métodos para adição ou intensificação da adaptabilidade ou resistência de uma célula a estresse osmótico ou choque osmótico compreendendo introdução, em uma célula, de um polinucleotídeo compreendendo: um ácido nucleico da invenção e/ou a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção; em que a molécula de ácido nucleico ou vetor codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou um ácido nucleico regulatório osmo-protetor. Em aspectos alternativos, conforme usado aqui, estresse osmótico é diferente de choque osmótico pelo fato de que estresse osmótico abrange uma alteração gradual na osmolalidade (estresse) de um sistema de cultura, uma célula, *etc.*, versus choque osmótico, o qual abrange osmolalidade (estresse) por alteração aguda (choque) de um sistema de cultura, uma célula, *etc.*

[038] Em aspectos alternativos desses métodos, o método adiciona ou intensifica a adaptabilidade ou resistência de uma célula a estresse osmótico hipertônico ou choque osmótico hipertônico ou o método adiciona ou intensifica a adaptabilidade ou resistência de uma célula a estresse osmótico hipotônico ou choque osmótico hipotônico.

[039] A invenção proporciona métodos para aumento de produção ou regulação de produção de uma proteína recombinante em uma célula ou aumento da produção de proteínas corretamente enoveladas ou proteínas corretamente glicosiladas sob condições de hiperosmolalidade em uma célula, compreendendo: (a) fornecimento de uma molécula de ácido nucleico recombinante ou heteróloga que codifica a proteína recombinante; e (b) inserção, estável ou transitoriamente em uma célula, de um polinucleotídeo compreendendo: um ácido nucleico da invenção e/ou a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção; em que a molécula de ácido nucleico ou vetor codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor; e (c) cultura da célula sob condições em que a proteína ou peptídeo ou ácido nucleico osmo-protetor de (b) e a proteína recombinante de (a), são expressos.

[040] A invenção proporciona métodos para aumento de produção ou regulação de produção de uma proteína recombinante em um implante ou um órgão artificial ou aumento da produção de proteínas corretamente enoveladas ou proteínas corretamente glicosiladas sob condições de hiperosmolalidade em um implante ou um órgão artificial, compreendendo: (a) fornecimento de uma célula compreendendo uma molécula de ácido nucleico recombinante ou heteróloga que codifica a proteína recombinante; e (b) inserção, estável ou transitoriamente em uma célula, de um polinucleotídeo compreendendo: um ácido nucleico da invenção e/ou a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção, em que a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou uma molécula de ácido nucleico osmo-protetora; e (c) inserção da célula no implante ou órgão artificial e manutenção do implante ou órgão artificial em condições que permitem expressão da proteína ou peptídeo osmo-protetor ou molécula de ácido nucleico osmo-protetora e proteína recombinante na célula,

desse modo, aumentando a produção ou regulação de produção da proteína recombinante no implante ou órgão artificial.

[041] A invenção proporciona métodos para a produção eficiente de biomolécula em sistemas de produção de célula em estágio tardio ou denso ou que permitem maiores rendimentos de total biomolécula ou maiores rendimentos de proteínas pós-traducionalmente processadas em sistemas de produção de célula em estágio tardio ou denso, compreendendo: (a) inserção, estável ou transitoriamente em uma célula capaz de geração da biomolécula, de um polinucleotídeo compreendendo: um ácido nucleico da invenção e/ou a molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção ou o vetor da invenção, em que a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou uma molécula de ácido nucleico osmo-protetora; (b) o método de (a), em que a biomolécula é uma pequena molécula, um polipeptídeo e/ou ácido nucleico; ou (c) o método de (a) ou (b), em que o método resulta em maiores rendimentos de polipeptídeos apropriadamente enovelados ou preferencialmente enovelados (por exemplo, um enovelamento do tipo silvestre, um enovelamento com padrão do tipo silvestre) ou glicosilados.

[042] A invenção proporciona órgãos artificiais ou implantes compreendendo uma célula da invenção, um vetor da invenção e/ou uma molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção. A invenção proporciona produtos de manufatura compreendendo uma célula da invenção, um vetor da invenção e/ou uma molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção. A invenção proporciona kits compreendendo uma célula da invenção, uma molécula de ácido nucleico da invenção, um vetor da invenção e/ou uma molécula de ácido nucleico osmo-responsiva da invenção. Em um aspecto, o kit ainda compreende instruções para prática de um método da invenção.

[043] Assim, em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo pelo

menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) compreendendo pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou intensificador transcricional NFATc-responsivo operacionalmente ligado a um regulador transcricional e pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) operacionalmente ligado ao referido intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou intensificador transcricional NFATc-responsivo. Um regulador transcricional pode ser, por exemplo, um promotor, um intensificador ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um primeiro intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou intensificador transcricional NFATc-responsivo posicionado 5' a um promotor e um segundo intensificador transcricional TonEBP-responsivo ou intensificador transcricional NFAT-responsivo posicionado 3' ao promotor. Em algumas modalidades, um primeiro intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' do OR-TRE e um segundo intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) posicionado 3' do OR-TRE. Em algumas modalidades, o intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' de um regulador transcricional e um regulador transcricional é um promotor. Em outras modalidades, o intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 3' de um regulador transcricional o qual é um promotor. Em ainda outras modalidades, um primeiro intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 5' a um regulador transcricional e um segundo intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) está posicionado 3' a um regulador transcricional, em que o primeiro regulador transcricional e o segundo regulador transcricional são ambos promotores. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico contém (a) pelo menos um intensificador transcricional TonEBP-responsivo compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1; ou (b) pelo menos um intensificador transcricional

NFATc-responsivo compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4; ou (c) pelo menos um intensificador transcricional responsivo à Proteína-1 Ativadora (AP-1) compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 (em que N pode ser qualquer nucleotídeo).

[044] Em determinadas modalidades, o OR-TRE da invenção compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 9.

[045] A molécula de ácido nucleico da invenção pode ainda compreender uma molécula de ácido nucleico adicional operacionalmente ligada a um regulador transcricional, em que um regulador transcricional é um promotor que é transcionalmente ativo em uma célula eucariota. A molécula de ácido adicional pode ser uma molécula de ácido nucleico que codifica proteína (por exemplo, que codifica uma proteína de interesse) ou molécula de ácido nucleico regulatória (por exemplo, uma molécula inibitória, uma molécula de estabilização, uma molécula de ácido nucleico de sobre-regulação ou uma que produz uma molécula *antisense*). Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inibitória compreende uma sequência *antisense*, uma ribozima, um RNA curto de interferência (siRNA) ou um microRNA (miRNA). Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico adicional codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor tal como, por exemplo, uma prolina ou uma glicina-betaína, um transportador de taurina, um transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, um cotransportador de sódio-mio-inositol, uma proteína de choque térmico, uma aquaporina, uma aldose redutase ou uma esterase que objetiva neuropatia (NTE). Em outras modalidades, a molécula de ácido adicional codifica uma proteína ou peptídeo que confere uma propriedade benéfica às proteínas expressas em células. Uma proteína que confere um benefício pode ser, por exemplo, uma proteína anti-apoptótica (por exemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 ou Bcl-w); uma proteína que confere

resistência ao estresse oxidativo a uma célula (por exemplo, superóxido dismutase, uma catalase, uma glutathione peroxidase, uma peroxiredoxina, uma sulfiredoxina, tioredoxina, tioredoxina redutase, tioredoxina peroxidase, tioltransferase, glutaredoxina ou uma glutathione redutase); uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína (por exemplo, proteína de ligação à imunoglobulina (BiP), calnexina, calreticulina, ERp57 ou uma proteína isomerase de dissulfeto (PDI)); uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica (por exemplo, carboxilase de piruvato ou uma quinase de piruvato); uma proteína de regulação do ciclo celular (por exemplo, ciclina ou uma quinase ciclina-dependente ou um inibidor de uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente); uma enzima de glicosilação ou qualquer combinação dos mesmos. Em outras modalidades, a molécula de ácido adicional codifica um polipeptídeo de NFATc ou TonEBP.

[046] Em algumas modalidades, o OR-TRE é operacionalmente ligado a pelo menos uma molécula de ácido nucleico de objetivação tal como, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico para objetivação de um gene lactogênico, uma mensagem lactogênica ou uma proteína lactogênica para diminuir a expressão do referido gene lactogênico (por exemplo, dehidrogenase de lactato), mensagem lactogênica ou uma proteína lactogênica. Em algumas modalidades, essas moléculas de ácido nucleico que objetivam um gene lactogênico ou mensagem lactogênica compreendem um RNA curto de interferência (siRNA), um microRNA (miRNA), um RNA *antisense* e/ou um RNA com atividade de ribozima.

[047] A invenção inclui vetores compreendendo os ácidos nucleicos da invenção e células hospedeiras contendo tais vetores.

[048] Em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico da invenção ainda compreende (i) molécula de ácido nucleico adicional que codifica um polipeptídeo que confere uma propriedade benéfica a proteínas

expressas em células operacionalmente ligadas a um regulador transcricional, em que o referido regulador transcricional é um promotor que é transcricionalmente ativo em uma célula eucariota e (ii) uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de interesse a ser expressa em células, em que a expressão da molécula de ácido nucleico de (i) confere a referida propriedade benéfica ao polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de (ii).

[049] Em tais modalidades, a molécula de (i) codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo de uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação do ciclo celular; uma enzima de glicosilação ou qualquer combinação dos mesmos.

[050] A invenção também proporciona um método para proteção de uma célula sob condições de hiperosmolalidade compreendendo:

(a) introdução de um polinucleotídeo em uma célula, em que o referido polinucleotídeo compreende:

(i) uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor ou uma molécula de ácido nucleico regulatória e

(ii) um polinucleotídeo que codifica uma segunda proteína de interesse operacionalmente ligada a um promotor; e

(b) cultura da célula, de modo que a proteína ou peptídeo osmo-protetor ou o ácido nucleico regulatório osmo-protetor e a proteína de interesse sejam expressos, desse modo, protegendo a célula sob condições de hiperosmolalidade e permitindo expressão da segunda proteína de interesse.

[051] Nessas modalidades, a proteína ou peptídeo osmo-protetor pode ser, por exemplo, uma prolina ou uma glicina-betaína, um transportador de

taurina, um transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, um cotransportador de sódio-mio-inositol, uma proteína de choque térmico, uma aquaporina, uma aldose redutase ou uma esterase que objetiva neuropatia (NTE).

[052] A invenção também proporciona um método para expressão de uma proteína de interesse em uma célula sob condições de hiperosmolalidade compreendendo:

(a) introdução de um polinucleotídeo em uma célula, em que o referido polinucleotídeo compreende:

(i) uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína que confere uma propriedade benéfica às proteínas expressas e

(ii) um polinucleotídeo que codifica uma segunda proteína de interesse operacionalmente ligada a um promotor; e

(b) cultura da célula, de modo que a expressão da molécula de ácido nucleico de (i) confere a referida propriedade benéfica ao polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo de (ii) quando as referidas são crescidas sob condições de hiperosmolalidade.

[053] Nessas modalidades, a proteína ou peptídeo que confere uma propriedade benéfica a proteínas expressas em células pode ser, por exemplo, uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação do ciclo celular; uma enzima de glicosilação; ou qualquer combinação dos mesmos.

[054] Nos métodos da invenção, células podem ser cultivadas inicialmente sob condições de cultura normais (isto é, com condições padrões de tonicidade) e subsequentemente as condições de cultura podem ser alteradas para aumentar a osmolalidade em uma quantidade suficiente para aumentar a

expressão da referida segunda proteína de interesse. Isso pode ser realizado colocando na cultura um composto que aumenta a referida osmolalidade.

[055] Em algumas modalidades, a expressão de proteínas tardias na cultura (quando as condições de cultura tenham aumentado a osmolalidade) é benéfica para produzir tais proteínas, como proteínas que são tóxicas para uma célula, proteínas que são instáveis ou proteínas que são difíceis de expressar sob condições de cultura normais.

[056] Em outras modalidades, as condições de cultura iniciais são condições de cultura padrões e a cultura é deixada se tornar hiperosmótica no curso da cultura de célula, desse modo, aumentando a expressão da referida segunda proteína de interesse a qual está sob o controle de um OR-TRE. Essas proteínas podem ser proteínas que são tóxicas para uma célula, proteínas que são instáveis ou proteínas que são difíceis de expressar sob condições de cultura normais.

[057] A invenção ainda proporciona um método para adição ou intensificação da adaptabilidade ou resistência de uma célula a estresse osmótico ou choque osmótico compreendendo introdução, em uma célula, de um polinucleotídeo compreendendo a molécula de ácido nucleico da invenção na qual a molécula de ácido adicional é (a) uma proteína ou peptídeo osmo-protetor; ou (b) um ácido nucleico regulatório osmo-protetor.

[058] A invenção ainda proporciona um método para expressão de uma proteína de interesse em uma célula sob condições de hiperosmolalidade compreendendo introdução de um polinucleotídeo em uma célula, em que o referido polinucleotídeo compreende:

(a) uma molécula de ácido nucleico de codificação de proteína que codifica TonEBP; e

(b) um polinucleotídeo que codifica uma segunda proteína de interesse operacionalmente ligada a um segundo OR-TRE; em que, sob

condições de osmolalidade aumentada, a molécula de ácido nucleico de (a) é expressa, desse modo, expressando a proteína TonEBP e em que a proteína TonEBP regula positivamente a expressão de TonEBP e a referida segunda proteína de interesse. Isso cria um sistema com *loop* de feedback positivo. Nessa modalidade, a segunda proteína de interesse pode ser, por exemplo, uma proteína osmo-protetora (por exemplo, uma prolina ou uma glicina-betaína, um transportador de taurina, um transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, um cotransportador de sódio-mio-inositol, uma proteína de choque térmico, uma aquaporina, uma aldose redutase ou uma esterase que objetiva neuropatia (NTE)); uma proteína que confere uma propriedade benéfica a polipeptídeos expressos pelas referidas células (por exemplo, uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação de enovelamento de proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação do ciclo celular; uma enzima de glicosilação; ou qualquer combinação dos mesmos). Em algumas modalidades, o método pode compreender expressão de uma terceira proteína de interesse operacionalmente ligada a um promotor, em que a proteína que confere uma propriedade benéfica atua sobre a terceira proteína de interesse.

[059] Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são apresentados nos desenhos em anexo e na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção se tornarão evidentes a partir da descrição e desenhos e das reivindicações.

[060] Todas as publicações, patentes, pedidos de patente, sequências do GenBank e depósitos na ATCC citados aqui são expressamente incorporados por referência para todas as finalidades.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[061] A Figura 1a e Figura 1b ilustram esquematicamente como

os elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos (OR-TREs) da presente invenção aumentam a osmo-tolerância, conforme discutido em detalhes, abaixo.

[062] A Figura 2 ilustra esquematicamente um experimento demonstrando a atividade sobre-regulatória de transcrição de uma construção da presente invenção medindo-se um marcador em sobrenadantes de células transfectadas, conforme descrito em detalhes no Exemplo 1, abaixo.

[063] A Figura 3 ilustra esquematicamente elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos (OR-TREs) exemplificativos da presente invenção, conforme descrito em detalhes no Exemplo 1, abaixo.

[064] A Figura 4 ilustra esquematicamente a eficácia osmo-protetora *in vivo* dos elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos (OR-TREs) exemplificativos da presente invenção ilustrados na Figura 3, conforme descrito em detalhes no Exemplo 1, abaixo.

[065] A Figura 5 ilustra esquematicamente os níveis de expressão POR3- e POR7-acionada normalizados com seus níveis de expressão constitutiva, conforme descrito em detalhes no Exemplo 1, abaixo. Símbolos de referência semelhantes nos vários desenhos indicam elementos semelhantes.

[066] A Figura 6 mostra os efeitos de um, três ou sete ORE sobre a produção de proteína em meio hipertônico.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[067] A invenção proporciona composições e métodos para regulação de osmolalidade intracelular em células, por exemplo, em células cultivadas, tais como as células usadas em biorreatores. Em um aspecto, a invenção proporciona composições e métodos para regulação de osmolalidade intracelular em células de mamífero cultivadas. Em uma modalidade, a invenção proporciona sistemas artificiais de expressão gênica (recombinantes) osmo-sensíveis ou “osmo-responsivos” e métodos para produção e uso dos mesmos.

Em outra modalidade, mediante incorporação desses sistemas de expressão gênica osmo-sensíveis ou “osmo-responsivos” em células, a invenção também proporciona células manipuladas tendo um mecanismo intensificado de osmo-resposta ou osmo-sensibilidade. Assim, em um aspecto, quando essas células são usadas em sistemas de cultura, por exemplo, em biorreatores, sua osmo-responsividade intensificada (por exemplo, resistência intensificada a estresse osmótico hipertônico ou hipotônico) resulta em melhor saúde e sobrevivência celular e em uma produção de produto aumentada em um sistema de cultura ou biorreator.

[068] Em uma modalidade, as construções da invenção são usadas como sistemas de expressão de ácido nucleico e/ou polipeptídeo induzíveis, onde o sinal que induz ou diminui a transcrição de uma construção da invenção (por exemplo, um ácido nucleico em uma construção da invenção) é uma alteração na osmolalidade, osmolalidade e/ou tonicidade no ambiente intracelular e/ou extracelular da célula (por exemplo, uma alteração que causa condições de hiperosmolalidade ou aumento do grau de hiperosmolalidade), por exemplo, em um fluido de cultura, como em um biorreator, disco de cultura, disco de Petri, tubo de ensaio, garrafa giratória, implante, órgão artificial e semelhantes.

[069] Em modalidades alternativas, em virtude do fato de as composições e métodos da presente invenção conferirem um fenótipo osmo-protetor a uma célula, essas composições e métodos podem ser usados para aumentar ou reforçar a geração (fabricação) de moléculas, polipeptídeos e/ou ácidos nucleicos “difíceis de expressar”, por exemplo, moléculas, polipeptídeos e/ou ácidos nucleicos que são tóxicos para uma célula, por exemplo, têm toxicidade inerente para a célula hospedeira. Composições e métodos, conforme proporcionado aqui, também são usadas para aumentar ou reforçar a expressão (fabricação) polipeptídeos que são “difíceis de expressar” no contexto de “difíceis

de expressar" apropriadamente ou como preferidos/desejados (por exemplo, um padrão de enovelamento do tipo silvestre), por exemplo, para aumentar ou reforçar processamento pós-traducional apropriado, por exemplo, para aumentar ou reforçar enovelamento apropriado e/ou glicosilação preferida/desejada (por exemplo, padrão de glicosilação do tipo silvestre) de polipeptídeos em células tendo mecanismos pós-traducionais que são sensíveis a condições de estresse osmótico (por exemplo, condições de hiperosmolalidade), por exemplo, conforme em uma cultura sob condições de estresse osmótico ou em um biorreator, por exemplo, como em ambientes de cultura de célula densa ou em estágio posterior. Em outra modalidade, composições e métodos, conforme proporcionado aqui, também são usados para aumentar ou reforçar a expressão de polipeptídeos "difíceis de expressar" que são "difíceis de expressar" no contexto das proteínas que não podem ser pós-traducionalmente processadas apropriadamente ou em rendimentos suficientes em condições de estresse osmótico (por exemplo, condições de hiperosmolalidade), por exemplo, conforme em condições de uma cultura sob estresse osmótico ou em um biorreator, por exemplo, como em ambientes de cultura de células densa ou em estágio posterior, por exemplo, proteínas que não enovelam ou se tornam glicosiladas anormalmente ou em rendimentos suficientes sob condições de estresse osmótico. Em modalidades alternativas, em virtude do fato de maiores rendimentos de polipeptídeos pós-traducionalmente corretor modificados, por exemplo, glicosilados ou enovelados, serem gerados pela prática dos métodos e composições conforme proporcionado aqui, a qualidade do produto é mantida em ambientes de cultura de célula densa ou em estágio posterior, tais como biorreatores. Por exemplo, em um aspecto, a prática dos métodos e composições conforme proporcionado aqui resulta em manutenção de qualidade da proteína recombinante em um processo de fabricação, por exemplo, manutenção de qualidade de uma proteína recombinante aprovada pelo FDA em

um processo de fabricação, particularmente quando a qualidade do produto é comprometida em ambientes de cultura de célula densa ou em estágio posterior, tais como biorreatores.

[070] Em outras modalidades, também em virtude do fato de as composições e métodos da presente invenção conferirem um fenótipo osmo-protetor a uma célula, essas composições e métodos podem ser usados para aumentar ou reforçar a geração (fabricação) em um sistema de produção de célula em estágio posterior ou denso incluindo, por exemplo, uma cultura de célula ou células em crescimento em estágio posterior ou densas em um biorreator, disco de cultura, disco de Petri, tubo de ensaio, garrafa giratória, implante, órgão artificial e semelhantes. Consequentemente, uso de composições e métodos conforme proporcionado aqui permite a produção eficiente de biomolécula em sistemas de produção de célula em estágio tardio ou denso, incluindo permitindo maiores rendimentos de total biomolécula (por exemplo, pequenas moléculas, polipeptídeos e/ou ácido nucleicos) ou maiores rendimentos de proteínas pós-traducionalmente processadas, por exemplo, maiores rendimentos de polipeptídeos apropriadamente enovelados ou preferencialmente enovelados (por exemplo, enovelamento do tipo silvestre) ou glicosilados.

[071] Da mesma forma, as composições e métodos da presente invenção podem ser usados para induzir à expressão de proteína recombinante ou aumentar o grau de enovelamento e/ou glicosilação apropriado da proteína em uma célula, durante condições de cultura, incluindo condições de cultura após a densidade celular ótima ter sido obtida; indução – por exemplo, um aumento na transcrição por um OR-TRE da presente invenção, é disparada por uma alteração (por exemplo, um aumento) na osmolalidade, osmolalidade e/ou tonicidade no ambiente intracelular e/ou extracelular da célula (por exemplo, uma alteração que causa condições de hiperosmolalidade ou aumento do grau de

hiperosmolalidade). As composições e métodos da presente invenção podem ser usados para desacoplar o crescimento celular e expressão de proteína recombinante em um sistema de expressão de célula, por exemplo, um implante, um órgão artificial, um biorreator, um meio de cultura e semelhantes. As composições e métodos da presente invenção podem ser usados como um sistema transcricional induzível ou promotor sob condições de hiperosmolalidade ou condições de alta osmolalidade, osmolalidade e/ou tonicidade.

[072] Produtos produzidos pelas células cultivadas cuja produção pelas células em cultura é aumentada por meio de prática dos métodos e/ou composições da presente invenção incluem polipeptídeos recombinantes, polissacarídeos, pequenas moléculas, tais como policetídeos (por exemplo, antibióticos), ácidos nucleicos, vírions e partículas virais engolfadas (por exemplo, conforme com "células produtoras" sendo as células cultivadas) e semelhantes.

[073] As células manipuladas da presente invenção podem resistir a estresses osmóticos (por exemplo, condições de hiperosmolalidade, incluindo resistência aumentada a estresses osmóticos hipertônicos ou hipotônicos), elas são protegidas na face de aumento de osmolalidade (por exemplo, condições de hiperosmolalidade) e, em modalidades alternativas, podem manter o crescimento e viabilidade altos em osmolalidades maiores ou menores do que o normal (fisiológicas). Em uma modalidade, uso dos sistemas de expressão gênica osmo-sensíveis ou "osmo-responsivos" ou "hiperosmolalidade-responsivos" e células da presente invenção permitem melhores rendimentos da cultura ou biorreator para proteínas "difíceis de expressar", por exemplo, diminuindo a toxicidade celular em condições de estresse osmótico e assegurando uma quantidade suficiente e qualidade consistente de um produto de uma célula cultivada, o qual pode ser um produto de proteína recombinante e/ou proteína apropriadamente enovelada ou

preferencialmente enovelada (por exemplo, enovelamento do tipo silvestre) ou glicosilada.

[074] Em uma modalidade, a invenção proporciona uma solução para a diminuição dos rendimentos de produto em células em condições de cultura sob estresse osmótico mediante o fornecimento de um sistema de expressão gênica hiperosmolalidade-sensível, osmo-sensível ou osmo-responsivo; e a invenção proporciona células que compreendem esses sistemas hiperosmolalidade-sensíveis, osmo-sensíveis, osmo-responsivos da invenção, onde as células da invenção têm sobrevivência e resistência intensificadas aos efeitos negativos de condições de hiperosmolalidade, hipo-osmolalidade ou quaisquer condições de estresse osmótico, incluindo estresse osmótico hipertônico ou hipotônico. A invenção proporciona composições, células e métodos para prevenir ou aliviar os problemas causados por hiperosmolalidade ou osmolalidade aumentada, por exemplo, hiperosmolalidade correlacionada (associada com) condições aumentadas de ou tonicidade (por exemplo, concentração aumentada de sal, tal como sais sódio ou potássio aumentados, por exemplo, NaCl), em sistemas de cultura, tais como biorreatores. A invenção proporciona composições, células e métodos para prevenir ou aliviar problemas causados por hipo-osmolalidade ou osmolalidade diminuída, por exemplo, osmolalidade diminuída correlacionada (associada com) à tonicidade diminuída (por exemplo, concentração diminuída de sal, sais sódio ou potássio diminuídos, por exemplo, NaCl), em sistemas de cultura, tais como biorreatores.

[075] Em aspectos alternativos, a invenção proporciona composições, células e métodos para prevenir ou aliviar problemas causados por hiper-osmolalidade ou osmolalidade aumentada ou problemas causados por hipo-osmolalidade ou osmolalidade diminuída, em que a hiperosmolalidade ou hipo-osmolalidade é causada por níveis (quantidades) aumentados ou diminuídos, respectivamente, de componentes, ingredientes ou elementos de

qualquer sistema de cultura ou tampão incluindo por exemplo: sais inorgânicos e minerais tais como, por exemplo, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, sulfato cúprico, nitrato férrico, sulfato ferroso, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e/ou sulfato de zinco; ou elementos residuais tais como, por exemplo: paramolibdato de amônio, óxido de vanádio amônio, sulfato de manganês, cloreto de níquel, ácido selênico, meta-silicato de sódio e/ou cloreto estanoso; ou um tampão ou ingrediente tampão tal como, por exemplo: um fosfato (incluindo, por exemplo, fosfato monossódico, fosfato dissódico), um carbonato e/ou um bicarbonato (por exemplo, um carbonato de sódio e/ou bicarbonato de sódio), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico) e/ou butirato de sódio; ou qualquer ingrediente ou componente de cultura que pode aumentar e/ou diminuir a osmolalidade tal como, por exemplo, um carboidrato, tal como uma glicose e/ou uma galactose, qualquer aminoácido natural ou sintético, um nucleotídeo e/ou um co-fator, um intermediário metabólico tal como, por exemplo: hipoxantina, ácido linoleico, ácido lipóico, dihidroclorato de putrescina, piruvato de sódio e/ou timidina ou uma vitamina ou quaisquer outros compostos orgânicos requeridos em uma baixa concentração, tais como: biotina, pantotenato de D-cálcio, cloreto de colina, cianocobalamina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, piridoxal, piridoxina, riboflavina, tiamina, um hormônio e/ou um co-fator, por exemplo, insulina, transferrina e fator de crescimento epidérmico ou um peptídeo, uma proteína e/ou um hidrolisato tecidual (por exemplo, uma peptona) ou um antibiótico, por exemplo, sulfato de gentamicina ou um ácido graxo, tal como ácido linoleico, alfa tocoferol, lipídio/EtOH ou um copolímero em bloco, por exemplo, um polímero baseado em óxido de etileno e óxido de propileno, por exemplo, PLURONIC™ (BASF, Florham Park, N.J.), que pode funcionar como um agente anti-espumação, um agente de umedecimento, um dispersante, um espessante, um emulsificante, um tensoativo, um osmoprotetor, por exemplo,

prolina, glutamato, sorbitol, betaína, inositol, taurina e/ou glicerol-fosfocolina.

[076] Em uma modalidade, um ou mais compostos osmo-protetores são usados quando de prática das composições e/ou métodos da presente invenção para aumentar o efeito osmo-protetor da prática da presente invenção; por exemplo, composições e/ou métodos da presente invenção incluem (compreendem) o uso de um ou mais compostos osmoprotetores, tais como prolina, glutamato, sorbitol, betaína, inositol, taurina e/ou glicerol fosfocolina.

[077] Composições da invenção, por exemplo, os elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos (OR-TREs) da invenção, compreendem pelo menos uma proteína de ligação a uma sequência intensificadora transcricional responsiva a intensificador de tonicidade (TonEBP) (também conhecida como "proteína de ligação a elemento de resposta osmótica" (OREBP)" ou "NFAT5") (uma sequência intensificadora ORE/TonE) e/ou um OR-TRE da invenção pode compreender um fator transcricional NFATc tonicidade-responsivo. Estresse osmótico, incluindo condições de hiperosmolalidade causadas, por exemplo, por condições de alta concentração de sal (altos teores de sais sódio ou potássio, por exemplo, NaCl), ativa um fator de transcrição intensificador responsivo a tonicidade/proteína intensificadora de ligação a elemento de resposta (NFATc ou TonEBP/OREBP) através de fosforilação (embora a invenção não esteja limitada por qualquer mecanismo de ação particular) e a TonEBP/OREBP fosforilada transloca do citoplasma para o núcleo, resultando em transcrição aumentada dos elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos (OR-TREs) da invenção e elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos endógenos.

[078] Ativação de elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos endógenos aumenta a expressão (transcrição) de vários ácidos nucleicos protetores, por exemplo, genes, cujos promotores são controlados pelo

intensificador ORE/TonE, incluindo os genes do transportador de taurina (*TauT*), o transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), o cotransportador de sódio-mio-inositol, proteína 70 de choque térmico (*HSP70*), aquaporina 2 (*AQP2*) e/ou aldose redutase (*AR*); e, em modalidades alternativas, os ácidos nucleicos osmo-responsivos da presente invenção compreendem sequência(s) de codificação para esses ácidos nucleicos osmo-responsivos endógenos, por exemplo, genes. Assim, em um aspecto, as composições e métodos da invenção conferem osmo-resistência a células mediante expressão osmo-responsiva de ácidos nucleicos osmo-responsivos endógenos, por exemplo, genes, incorporados (manipulados) nas composições da invenção; por exemplo, incluindo os genes do transportador de taurina (*TauT*), o transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), o cotransportador de sódio-mio-inositol, proteína 70 de choque térmico (*HSP70*), aquaporina 2 (*AQP2*) e/ou aldose redutase (*AR*).

[079] Contudo, em aspectos alternativos, as composições e métodos da invenção conferem osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de ácido nucleicos, por exemplo, genes (e proteínas) heterólogos às células nas quais eles tenham sido inseridos. Por exemplo, os genes do transportador de taurina (*TauT*), o transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), o cotransportador de sódio-mio-inositol, proteína 70 de choque térmico (*HSP70*), aquaporina 2 (*AQP2*) e/ou aldose redutase (*AR*) podem ser heterólogos à célula. As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de uma proteína ou peptídeo osmo-protetor endógeno ou heterólogo, tal como uma prolina ou uma glicina-betaína ou um transportador de taurina ou um transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico ou um cotransportador de sódio-mio-inositol ou uma proteína de choque térmico ou uma proteína de choque térmico 70 ou uma aquaporina (uma

proteína do poro de membrana que atua como um canal de água) ou uma aquaporina 2 ou uma aldose redutase.

[080] As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de uma proteína anti-apoptótica osmo-protetora endógena ou heteróloga, tal como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 ou Bcl-w.

[081] As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de uma proteína endógena ou heteróloga que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula, tal como uma superóxido dismutase, uma catalase, uma glutathione peroxidase, uma peroxiredoxina, uma sulfiredoxina, tioredoxina, tioredoxina redutase, tioredoxina peroxidase, tioltransferase, glutaredoxina ou uma glutathione redutase.

[082] As composições e métodos da invenção protegem as células contra estresse osmótico, por exemplo, contra condições de hiperosmolalidade, para aliviar ou prevenir consequências adversas tais como, mas não limitado a, proteínas erroneamente enoveladas ou não enoveladas, *etc.* Assim, em modalidades alternativas, as composições e métodos da invenção permitem que uma célula, incluindo células cultivadas, gere e secrete mais produto endógeno, incluindo proteínas ou proteínas em um estado de enovelamento correto e/ou tendo melhores perfis de glicosilação (normal, tipo silvestre), *etc.* Em um aspecto, as composições e métodos da invenção podem conferir osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de uma proteína chaperona endógena ou heteróloga envolvida na facilitação de enovelamento de proteína, incluindo a assim denominada resposta de proteína não enovelada (ou “UPR,” a qual é ativada em resposta a um acúmulo de proteínas não enoveladas ou erroneamente enoveladas para impedir morte celular programada ou apoptose disparada por um acúmulo de proteínas não

enoveladas ou erroneamente enoveladas), tal como uma proteína de imunoglobulina de ligação (BiP) (também denominada proteína regulada por glicose 78 ou Grp78), calnexina, calreticulina, ERp57 ou uma proteína isomerase de dissulfeto (PDI).

[083] As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante expressão osmo-responsiva de uma proteína endógena ou heteróloga envolvida em secreção extracelular de proteínas.

[084] As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante a expressão osmo-responsiva de uma enzima glicolítica endógena ou heteróloga, por exemplo, uma carboxilase de piruvato ou uma quinase de piruvato.

[085] As composições e métodos da invenção também podem conferir osmo-resistência a células mediante expressão osmo-responsiva de uma proteína de regulação de ciclo celular endógena ou heteróloga, por exemplo, uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente (a CDK) ou um inibidor de uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente.

[086] Em um aspecto, as sequências de ácido nucleico osmo-responsivas da presente invenção podem ser usadas para intensificar/aumentar a produção de proteína recombinante em culturas de célula de mamífero, por exemplo, aliviando o estresse celular subsequente a estresse osmótico. A invenção também proporciona métodos de uso dessas sequências de ácido nucleico osmo-responsivas da presente invenção.

[087] A invenção também proporciona ácido nucleicos nos quais expressão de genes de interesse está sob o controle de elementos de osmo-resposta, de modo que proteínas de interesse podem ser expressas sob condições de osmolalidade aumentada. Nesses casos, o OR-TRE é operacionalmente ligado ao ácido nucleico que codifica o gene de interesse.

Nessa modalidades, os ácidos nucleicos também podem conter genes ou ácidos nucleicos osmo-resistentes controlados por OR-TRE e/ou ácidos nucleicos que codificam proteínas ou peptídeos que conferem um efeito benéfico às proteínas expressas o qual poderia ser, por exemplo, um efeito sobre o metabolismo, secreção, viabilidade ou crescimento da célula ou pode ser algo que tenha um efeito benéfico sobre a qualidade da proteína expressa, tal como enovelamento correto, modificações pós-traducionais e semelhantes.

[088] A invenção também proporciona um mecanismo de feedback positivo no qual o OR-TRE dirige a expressão de TonEBP, de modo que a proteína possa, então, acionar expressão adicional de TonEBP. Quando usado em conjunto com outros genes sob o controle do OR-TRE, o feedback positivo tem o efeito de acionar a expressão desses genes também. O feedback positivo pode conferir adaptabilidade intensificada das células à hiperosmolalidade.

[089] Pode-se aumentar artificialmente a osmolalidade da cultura para acionar a expressão de genes sob o controle dos OR-TRE's de um modo regulado, previsível para sincronizar a produção de proteína a fim de otimizar determinadas propriedades. Alternativamente, colocando a expressão de genes sob o controle de OR-TRE, genes podem ser expressos posteriormente nos estágios de cultura à medida que a osmolalidade aumenta naturalmente. Esses métodos podem ser úteis na expressão de proteínas que são tóxicas para as células, proteínas que são instáveis e proteínas que são simplesmente difíceis de expressar sob condições de cultura padrões.

[090] A invenção também proporciona uma variedade de novos promotores artificiais que permitem expressão gênica tonicidade-responsiva e suas possíveis aplicações para a produção de proteínas recombinantes. Em um aspecto, os ácidos nucleicos da invenção compreendem promotores de mamífero osmo-responsivos; e, alternativamente, em um aspecto, os ácidos

nucleicos da invenção compreendem uma região não traduzida osmo-responsiva do mRNA de TonEBP para expressão osmo-sensível de uma sequência de ácido nucleico de interesse.

[091] Em uma modalidade, os ácidos nucleicos da invenção compreendem promotores responsivos a TonEBP/OREBP compreendendo um ou múltiplos módulos operadores específicos do endossoma de TonEBP/OREBP clonados a *upstream* de um promotor eucariota mínimo. Em um aspecto, a sequência de nucleotídeo -1053 a -1007 do promotor de aldose redutase de camundongo (vide, por exemplo, Daoudal (1997) J. Biol. Chem. Jan 31; 272(5): 2615-2619), o qual contém TonE na posição -1053 e uma proteína 1 ativadora (AP-1) na posição -1014, é usado.

[092] Em aspectos alternativos, os ácidos nucleicos que reagem aos efeitos de osmolalidade em produção de proteína recombinante através da inserção de um dos múltiplos elementos responsivos à osmose *upstream* ou na sequência promotora que ativa a expressão de um transgene, aumentando assim sua atividade transcricional conforme a osmolalidade aumenta. Por exemplo, em sistemas naturais, quase todos os genes responsivos à tonicidade têm sítios responsivos à proteína ativadora 1 (AP-1) em 35 bp de um TonE; e em aspectos alternativos, os ácidos nucleicos desta invenção compreendem um ou uma pluralidade de sítios AP-1 (sequências de ligação AP-1) em uma distância similar (mais, menos ou a mesma) de um sítio TonE. A presença de um ou mais motivos responsivos a AP-1 nos ácidos nucleicos desta invenção contribui para alta responsividade induzida por NaCl, por exemplo, neste aspecto, os elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos que compreendem motivo responsivo a AP-1 (ORTRE) desta invenção são mais sensíveis ou mais responsivos a condições intensas de cultura de sal (por exemplo, sais de potássio ou sódio, por exemplo, NaCl). Esta invenção usa uma variedade de alternativas de expressão de transgene, ou janelas, possíveis através da

variação do número de elementos de resposta osmótica, por exemplo, TonE e/ou AP-1, ligado de modo operacional a uma sequência promotora para níveis de expressão de transgene de sintonia fina (um “gene de interesse”) para um nível desejado, por exemplo, a partir de uma expressão basal para uma expressão máxima ou superior em condições osmoticamente estressadas (por exemplo, hipotônica ou hipertônica).

[093] Em uma modalidade, um aumento na responsividade de uma célula à hiperosmolalidade (por exemplo, responsividade à tonicidade) é mediada por um ácido nucleico da invenção que aumenta a taxa de transcrição de uma molécula de ácido nucleico, tal como um transgene ou “gene de interesse”, conforme mediado/controlado por um promotor de unidade de transcrição. Por exemplo, em um aspecto, um aumento na resposta à atividade de transativação do gene responsivo à hiperosmolalidade (por exemplo, responsivo à tonicidade) NFATc/OREBP ou TonEBP/OREBP é mediado pelo promotor do elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da invenção. Em modalidades alternativas, qualquer promotor transcricionalmente ativo em uma célula eucariota pode ser usado em um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção, por exemplo, um promotor compreendendo ou consistindo de um promotor constitutivo ou um promotor induzível ou um promotor sintético ou um promotor de mamífero, planta, inseto, bacteriano, de levedo, fúngico ou viral ou um promotor de citomegalovírus (CMV), por exemplo, um promotor mínimo consistindo de um fragmento de um promotor de CMV humano. Em um aspecto, uma unidade de transcrição mínima é usada, por exemplo, uma versão mínima ou menor de um vetor de expressão, por exemplo, conforme descrito aqui, para expressar mais eficientemente a molécula de ácido nucleico (por exemplo, transgene ou gene de interesse).

[094] Embora a invenção não esteja limitada por qualquer

mecanismo de ação em particular, em um aspecto, os elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (OR-TREs) da presente invenção aumentam a osmo-tolerância em virtude do loop de feedback positivo TonEBP-acionado da célula para expressão de TonEBP, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 1a e Figura 1b.

[095] As composições e métodos da invenção aliviam a osmolalidade aumentada correlacionada com tonicidade aumentada (concentração aumentada de sal, tal como sais sódio ou potássio, por exemplo, NaCl). Em um aspecto, alta concentração de sal (sais sódio ou potássio) no ambiente de cultura ativa um fator de transcrição intensificador tonicidade-responsivo/proteína de ligação a elemento de resposta osmótica (TonEBP/OREBP) da invenção, resultando em transcrição aumentada dos genes osmo-protetores incorporados nas construções da invenção. Nessas construções, promotores são controlados, por exemplo, por um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) ou o intensificador ORE/TonE o qual, em um aspecto, inclui uma ou mais sequências de ligação à proteína AP-1.

[096] Embora a invenção não seja limitada por qualquer mecanismo particular de ação, uma regulação de aspecto de atividade transcricional de TonEBP/OREBP é conforme descrito conforme esquematicamente representado na Figura 1a; este esquema envolve o tráfico núcleo-citoplásmico, transativação e fosforilação. Em um aspecto, em 30 minutos de hipertonicidade, o TonEBP/OREBP se torna fosforilado e sua distribuição nuclear, isto é, a razão de quantidade na fração nuclear para a quantidade na fração citoplasmática aumenta. Em um aspecto, a transativação de TonEBP depende da tonicidade: a atividade transcricional de TonEBP é positiva sob condições isotônicas, diminui em hipotonicidade e aumenta em hipertonicidade.

[097] A Figura 1a representa esquematicamente como TonEBP é estimulado por hipertonicidade e induz a transcrição de promotores que contêm um ou múltiplos sítios de ligação de cognato de TonEBP: ORE/TonE. Em uma modalidade, qualquer TonE endógeno (intensificador de tonicidade, também chamado de elemento de resposta osmótica) que contém promotor pode ser usado para ativar a expressão de uma proteína recombinante para produção biofarmacêutica intensificada.

[098] A Figura 1b representa esquematicamente um exemplo de aplicação da atividade osmo-dependente de TonEBP: um enlace de retroalimentação osmo-responsivo. Entretanto, observando que a invenção não está limitada a qualquer mecanismo particular de ação, a Figura 1b apresenta um dos muitos mecanismos exemplificativos possíveis de ação: um enlace de retroalimentação positivo responsivo a TonEBP onde TonEBP transativa sua própria expressão de modo que quando a tonicidade aumenta, TonEBP amplifica sinteticamente seu próprio estímulo: quanto maior a ativação osmo-responsiva de TonEBP, mais TonEBP é produzido resultando em maior retroalimentação.

[099] No projeto de construções desta invenção, o elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) desta invenção pode transativar uma variedade de genes osmoprotetores, possibilitando, assim, que as células se adaptem a alta osmolalidade. Em um mecanismo exemplificador, tal ciclo de retroalimentação positivo osmo-responsivo poderia tanto acelerar como amplificar a adaptação de células mamíferas ao estresse osmótico. Isto aumentaria sua tolerância à alta osmolalidade sem as desvantagens da sobre-expressão constitutiva.

[0100] Em alguns aspectos, uma sobre-expressão constitutiva de TonEBP poderia representar uma drenagem supérflua de energia para as células em condições isotônicas; no entanto, devido ao fato de que a invenção abrange os elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (OR-TREs)

capazes de criar um fenótipo osmo-resistente a qualquer célula que expressa qualquer proteína recombinante, sob algumas circunstâncias, é previsto que uma construção ou uma célula da invenção possa ser projetada para expressar de maneira constitutiva um gene que concede algum grau de osmo-resistência a uma célula. Em modalidades alternativas, as construções desta invenção são osmo-responsivas pelo fato de que podem ser responsivas a aumentos ou diminuições na osmolalidade intracelular e/ou extracelular, osmolalidade e/ou tonicidade. Em modalidades alternativas, osmo-responsiva se refere a qualquer alteração em osmolalidade ou osmolalidade, por exemplo, qualquer diminuição ou aumento em osmolalidade ou osmolalidade, por exemplo, qualquer alteração em molalidade, que inclui qualquer alteração em (por exemplo, condições de diminuição ou aumento de) hiperosmolalidade ou hipo- osmolalidade. Em um aspecto, “osmolalidade” consiste em uma medida da pressão osmótica de partículas de soluto dissolvidas em uma solução aquosa. As partículas de soluto incluem tanto íons como moléculas não-ionizadas.

[0101] A osmolalidade é expressa como a concentração de partículas osmoticamente ativas (isto é, osmoles) dissolvidas em 1kg de água (1 mOsm/kg de H₂O a 38 °C é equivalente a uma pressão osmótica de 19 mm Hg). A “osmolalidade” se refere ao número de partículas de soluto dissolvidas em 1 litro de solução. Os solutos que podem ser adicionados ao meio de cultura a fim de aumentar a osmolalidade do mesmo incluem proteínas, peptídeos, aminoácidos, polímeros não-metabolizados, vitaminas, íons, sais (por exemplo, sais de potássio ou sódio), açúcares, metabolitos, ácidos orgânicos, lipídeos, etc. Em uma modalidade, a concentração de aminoácidos e sais, por exemplo, sais de potássio e sódio (por exemplo, NaCl) no meio de cultura é aumentada a fim de se obter as faixas de osmolalidade desejadas apresentadas no presente documento. Quando usada no presente documento, a abreviação “mOsm) se refere a “miliosmoles/kg de H₂O”.

[0102] Por exemplo, em uma modalidade, as composições e métodos fornecidos no presente documento são usados para manter um meio de cultura de célula, por exemplo, um encontrado em um biorreator, para ter osmolalidade na faixa de entre cerca de 210 e 350 miliosmoles (mOsm), ou na faixa de entre cerca de 260 e 320 miliosmoles (mOsm) ou, em uma modalidade alternativa, almejando uma osmolalidade de cerca de 280, 290, 300 ou 310 mOsm/kg.

[0103] Em uma modalidade alternativa, as composições e métodos fornecidos aqui são usados para manter um meio de cultura celular de osmolalidade relativamente baixa, por exemplo, para manter um meio de cultura celular que tem uma osmolalidade de cerca de 248 mOsm a cerca de 280 mOsm, consulte, por exemplo, Patente nº (USPN) U.S. 5,747,341. Em uma modalidade alternativa, as composições e métodos fornecidos aqui são usados para manter um meio de cultura celular dentre cerca de 280 a 330 mOsm, ou entre cerca de 400 a 600 mOsm, por exemplo, conforme descrito na Publicação do Pedido de Patente nº U.S.20050272124. Em uma modalidade alternativa, as composições e métodos aqui fornecidos são usados para manter um meio de cultura celular dentre cerca de 250 a cerca de 600 mOsm, conforme descrito, por exemplo, em USPN 5.705.364.

PROTEÍNAS RESISTENTES A AMBIENTE OU TENSÃO

[0104] A invenção fornece ácidos nucleicos osmo-responsivos que compreendem pelo menos um dentre os elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos da invenção operacionalmente ligada a um ácido nucléico que codifica uma proteína ou peptídeo osmo-protetor; uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência à tensão oxidativa a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação da flexão da proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação de ciclo de célula; ou qualquer combinação das mesmas.

GENES OSMO-PROTETORES

[0105] A invenção fornece ácidos nucleicos osmo-responsivos que codificam proteínas que afetam favoravelmente o teor de água e/ou o potencial osmótico de células de mamífero. Por exemplo, o ácido nucleico dessa invenção pode expressar de modo osmo-responsivo os ácidos nucleicos que codificam a biossíntese de qualquer proteína que afeta o teor de água e/ou o potencial osmótico de células de mamífero, por exemplo, prolina e glicina-betaína, e/ou proteínas que afetam níveis de outros solutos osmoticamente ativos, como açúcares.

[0106] Os ácidos nucleicos dessa invenção podem expressar osmo-responsivamente uma pluralidade de genes que melhoram a resistência osmótica e têm modos complementares de ação. As combinações desses genes expressos por ácidos nucleicos dessa invenção podem ter efeitos aditivos e/ou sinérgicos no aperfeiçoamento da resistência osmótica em uma célula, por exemplo, em uma célula de mamífero. Em modalidades alternativas, o benefício é conferido por meio de expressão constitutiva de um ou mais desses genes, e/ou também por meio da expressão de um ou mais de uma maneira osmo-responsiva, por exemplo, com o uso de um sistema de expressão transcricional osmo-responsivo e/ou pós-transcricional dessa invenção. Através do fornecimento de uma variedade de combinações tanto do aumento constitutivo quanto osmo-induzido na expressão de proteínas que fornecem às células geneticamente desenvolvidas uma osmo-resposta aperfeiçoada, ou um mecanismo de osmo-deteção, a invenção pode ser projetada ou ajustada para ter padrões de expressão osmo-sensível adequados para qualquer célula, por exemplo, para qualquer célula de mamífero, que expressa qualquer proteína recombinante, para melhor resistir à tensão de hiper ou hipo-osmolalidade. Por exemplo, as composições e métodos da invenção podem ser usados para melhorar ou impedir a produção de lactato que acidifica as condições de cultura,

por exemplo, em um sistema de cultura ou um biorreator. Na maioria dos sistemas de cultura e biorreatores, a fim de manter o pH do meio, a base é bombeada e a osmolalidade aumenta como resultado.

[0107] Existe uma correlação entre o acúmulo de lactato e o crescimento celular reduzido e viabilidade nos biorreatores que operam em batelada alimentada. Dessa forma, a sobreexpressão osmo-responsiva de enzimas glicolíticas como piruvato carboxilase, piruvato cinase e outras enzimas pelas composições e métodos da invenção permite uma célula transformada, por exemplo, uma célula mamífera, para mudar da produção de lactato para o consumo de lactato. O resultado dessa sobreexpressão de enzima(s) glicolítica(s) é a manutenção da viabilidade pela célula e a produção de proteína recombinante aumentada pela célula, por exemplo, a célula mamífera.

GERAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E VETORES

[0108] A invenção fornece ácidos nucleicos que compreendem um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE), ácidos nucleicos osmo-responsivos e cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagomídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem que compreendam os mesmos. A invenção pode ser praticada em conjunto com qualquer método ou protocolo ou dispositivo conhecido na técnica, que são bem descritos na literatura de patente e científica.

[0109] A invenção fornece “ácidos nucleicos” ou “sequências de ácido nucléico” que compreendem um elemento transcricional osmo-responsivo (OR-TRE), ou ácidos nucleicos osmo-responsivos e, também, incluem RNAi como siRNA ou miRNA, oligonucleotídeos, nucleotídeos, polinucleotídeos ou quaisquer fragmentos desses, incluindo DNA ou RNA (por exemplo, mRNA, rRNA, tRNA) de origem genômica ou sintética, que pode ser de filamento único ou de filamento duplo e pode representar um filamento de sentido ou anti-sentido para o ácido nucléico peptídico (PNA) ou para qualquer material semelhante ao

DNA ou semelhante ao RNA, natural ou sintético na origem, por exemplo, iRNA, ribonucleoproteínas (por exemplo, iRNPs). Os ácidos nucleicos da invenção podem codificar polipeptídeos conforme descrito no presente documento e podem compreender não apenas a sequência de codificação, mas também as sequências líder ou sequências de propeptídeos e sequências não codificadoras, como íntrons ou sequências não codificadoras 5' e/ou 3' de uma sequência de codificação. Assim, um polinucleotídeo usado para praticar essa invenção pode incluir a sequência de codificação para um polipeptídeo, bem como um polinucleotídeo que inclui codificação adicional e/ou sequência não codificadora.

TÉCNICAS GERAIS

[0110] Os ácidos nucleicos usados para praticar esta invenção, ou o elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE), os ácidos nucleicos osmo-responsivos desta invenção, ou o RNA, iRNA, os ácidos nucleicos regulatórios (um ácido nucléico que tem um efeito ou função de regulação ascendente, estabilizante ou inibitória), cDNA, DNA genômico, vetores, vírus ou híbridos dos mesmos usados para praticar esta invenção, podem ser isolados de uma variedade de fontes, geneticamente modificadas, amplificadas, e/ou expressadas/ geradas de maneira recombinante.

[0111] Os polipeptídeos e/ou os ácidos nucleicos recombinantes podem ser individualmente isolados ou clonados e testados para uma atividade desejada. Qualquer sistema de expressão recombinante pode ser usado, incluindo sistemas de expressão de célula de planta, inseto, levedura, de mamífero ou de bactéria.

[0112] Alternativamente, os ácidos nucleicos usados para praticar esta invenção podem ser sintetizados *in vitro* através de técnicas de síntese química conhecidas, conforme descrito em, por exemplo, Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440 a 3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373 a -380; Blommers (1994)

Biochemistry 33:7886 a 7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; USPN 4.458.066.

[0113] As técnicas para adaptação de ácidos nucleicos, como, por exemplo, subclonagem, sondas de identificação (por exemplo, identificação de iniciador aleatório com o uso de polimerase Klenow, transferência Nick, amplificação), sequenciamento, hibridização e similares são descritas em detalhes na literatura de patente e científica, vide, por exemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Segunda Edição.), Volumes 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); Current Protocols In Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nova York (1997); Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

[0114] Outro meio útil para obtenção e manipulação de ácidos nucleicos usados para praticar esta invenção é clonar amostras genômicas, e, se for desejado, efetuar a varredura e re-clonar insertos isolados ou amplificados de, por exemplo, clones genômicos ou clones de cDNA. As fontes de ácido nucléico usado para praticar esta invenção incluem bibliotecas de cDNA ou genômicas contidas em, por exemplo, cromossomos artificiais de mamífero (MACs), vide, por exemplo, Patente U.S. N°5.721.118; 6.025.155; cromossomos artificiais humanos, vide, por exemplo, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333 a 335; cromossomos artificiais de levedura (YAC); cromossomos artificiais de bactéria (BAC); cromossomos artificiais de P1, vide, por exemplo, Woon (1998) Genomics 50:306 a 316; vetores derivados de P1 (PACs), vide, por exemplo, Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; cosmídeos, plasmídeos, fagos ou vírus recombinante.

SEQUÊNCIAS DE CONTROLE TRANSCRICIONAIS E TRANSLACIONAIS

[0115] As sequências de ácido nucléico da invenção

compreendem promotores e intensificadores operacionalmente ligados às sequências de codificação de proteínas ou ácidos nucleicos regulatórios, por exemplo, moléculas de ácido nucléico inibitórias, estabilizantes ou reguladoras ascendentes, que servem para direcionar ou modular a síntese/expressão de RNA. Por exemplo, em um aspecto, a invenção proporciona pelo menos uma sequência intensificadora transcricional responsiva à proteína de ligação intensificadora por tonicidade (TonEBP) *upstream* (5) e operacionalmente ligada a uma sequência promotora transcricionalmente ativa em uma célula eucariótica. A sequência intensificadora adicional também pode ser operacionalmente ligada a elementos regulatórios transcricionais responsivos por osmose (OR-TREs) da invenção.

[0116] Qualquer sequência regulatória transcricional, por exemplo, uma sequência promotora ou intensificadora, operável em uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de mamífero, pode ser usada para praticar a presente invenção, por exemplo, ser usada em uma construção de ácido nucléico da presente invenção. Por exemplo, em modalidades alternativas, um promotor usado para praticar a presente invenção consiste em um promotor mínimo (também denominado como um “promotor de núcleo”), um promotor induzível, ou um promotor constitutivo. Uma sequência regulatória transcricional, por exemplo, uma sequência promotora e intensificadora, é “operacionalmente ligada a” uma sequência a ser transcrita, por exemplo, uma sequência de codificação de proteína, quando a polimerase de RNA que inicia a transcrição no promotor transcrever a sequência de codificação em um RNA, por exemplo, um mRNA. Em uma modalidade, conforme o uso em questão, um promotor é uma região regulatória de um ácido nucléico, por exemplo, um DNA ou gene, que possa ser localizada *upstream* (isto é, em direção à região 5 do filamento de captação) do ácido nucléico ou gene a ser transcrito, portanto, o promotor inicia (permite) a transcrição do ácido nucléico ou gene.

[0117] Em modalidades alternativas, uma sequência regulatória transcricional, por exemplo, uma sequência promotora ou intensificadora, pode ser “operacionalmente ligada a” uma sequência a ser transcrita, por exemplo, uma sequência de codificação de proteína, ou um ácido nucléico regulatório, tal como uma molécula de ácido nucléico inibitória, estabilizante ou reguladora ascendente, ou uma sequência anti-captção ou outra sequência inibitória (tal como miRNA ou siRNA) mesmo se o promotor ou intensificador não estiverem próximos à sequência a ser transcrita; em outras palavras, não há limite em relação à distância de uma sequência regulatória transcricional (por exemplo, como um intensificador, tal como um intensificador transcricional responsivo a AP-1 ou TonEBP) que está para (está posicionada em relação à) sequência a ser transcrita (por exemplo, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 500 ou mais resíduos), e não há limite em sua colocação em uma construção (em ou dentro de uma construção); nota-se que em algumas modalidades, a sequência regulatória transcricional é *cis* à sequência a ser transcrita, enquanto em outros aspectos, é *trans* à sequência a ser transcrita.

[0118] Em modalidades alternativas, a sequência regulatória transcricional, por exemplo, uma sequência promotora ou intensificadora (por exemplo, um intensificador transcricional responsivo a AP-1 ou TonEBP), pode estar em uma orientação de captção ou anti-captção à sequência a ser transcrita, ou no mesmo filamento ou em um filamento oposto à sequência a ser transcrita.

[0119] Pode-se utilizar qualquer promotor mínimo, por exemplo, um promotor de núcleo ou um promotor mínimo que seja a porção mínima de uma sequência promotora ou o motivo necessário para iniciar apropriadamente a transcrição. Em um aspecto, um promotor mínimo ou um promotor de núcleo usado para praticar a invenção compreendem um fragmento de um promotor CMV de ser humano; promotores mínimos (promotores de núcleo) e métodos de

identificá-los e torná-los bem conhecidos na técnica, por exemplo, consulte Baliga (2001) Biol. Proceed. Online 3:64-69; Hettiarachchi (2003) Nucleic Acids Res. 31(18):5256-5265. Por exemplo, parte do domínio A do promotor CaMV 35S contendo uma caixa TATA e estendendo-se a partir da posição 90 até o local inicial de transcrição +1, pode ser usada como um “promotor mínimo”. Com exceção da caixa TATA, que é o local de aglutinação para polimerase de RNA II, este promotor mínimo contém ao menos três caixas tipo CAAT; sendo que essas sequências potencializam a atividade das sequências *upstream* e influenciam na eficiência da atividade do promotor. Em um aspecto, essas caixas tipo CAAT são usadas sozinhas ou são fixadas a regiões promotoras heterólogas para conduzir a expressão das construções da invenção. Outros “promotores mínimos” exemplificadores que podem ser usados para praticar a presente invenção incluem um promotor que compreende uma sequência CCCACCCCC (caixa CCAC) conforme descrito, por exemplo, por Bassel-Duby (1992) Mol. Cell Biol. 12(11): 5024-5032; ou um promotor de núcleo de polimerase de RNA II conforme descrito, por exemplo, por Juven-Gershon (2008) Curr. Opin. Cell Biol. 20(3):253-9. Epub 2008 Apr 22; Juven-Gershon (2006) Biochem. Soc. Trans. 34(Pt 6):1047-50; ou o promotor mínimo a partir do gene de cadeia pesada de miosina (-164 a +16); consulte, por exemplo, Smith (1998) Am. J. Physiol. 274(5 Pt 1):C1188-95.

[0120] Os promotores eucarióticos exemplificadores que podem ser usados para praticar esta invenção incluem CMV imediato precoce, timidina quinase, SV40 precoce e tardio, LTRs de retrovírus, e o promotor de metalotioneína-I de camundongo. Quaisquer promotores conhecidos para controlar expressão de genes em células eucariótica e procarióticas, ou seu vírus, podem ser usados. Os promotores que podem ser usados para praticar esta invenção também incluem promotores *trp* ou *lac* de *E.coli*, o promotor *lacI*, o promotor *lacZ*, o promotor *T3*, o promotor *T7*, o promotor *gpt*, o promotor

lambda PR, o promotor *lambda PL*, os promotores de operóns que codificam enzimas glicolíticas como 3-fosfoglicerato quinase (PGK) e o promotor de ácido fosfatase, promotores fúngicos e similares.

[0121] Promotores de planta exemplificadores que podem ser usados para praticar essa invenção incluem ambos os promotores induzíveis e constitutivos, por exemplo, promotores constitutivos tais como a região 35S de iniciação de transcrição de vírus do mosaico da couve-flor (*cauliflower mosaic virus*, CaMV), o promotor 1'- ou 2'- derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*; e/ou promotores induzíveis, por exemplo, mediante a exposição a hormônios de planta, tais como auxinas; e outras regiões de iniciação de transcrição a partir de genes de plantas conhecidas.

[0122] Quaisquer intensificadores e/ou promotores conhecidos por controlarem a expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus podem ser usados. Em modalidades alternativas, conforme usado neste documento, um intensificador é uma região pequena de ácido nucléico, por exemplo, DNA, que pode unir especificamente uma proteína, que pode ser chamada de um ativador, ou uma proteína de união intensificadora. Em um aspecto, a união de ativadores a essa região intensificadora pode iniciar a transcrição de uma sequência de codificação de proteína, por exemplo, um gene, ou afetar (iniciar, parar, aumentar ou diminuir) a atividade de um promotor. O promotor e/ou gene afetado por, ou "ligado de forma operável a," o intensificador pode estar consideravelmente distante do intensificador, ou até mesmo pode estar em um cromossomo ou vetor diferente. Em modalidades alternativas, o aumento ou a diminuição na transcrição afetada por meio do intensificador no promotor pode ser devido aos ativadores ligados ao intensificador afetando diretamente ou indiretamente o recrutamento de "fatores de transcrição" adicionais ao intensificador no promotor, que pode intensificar a união de outras proteínas necessárias para transcrição, tais como RNA ou DNA polimerases.

[0123] Em um aspecto, cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem da invenção expressos em células eucarióticas também podem conter intensificadores adicionais para aumentar níveis de expressão. Os intensificadores são elementos que atuam em cis de DNA, usualmente de cerca de 10 a cerca de 300 bp de comprimento que agem em um promotor para aumentar sua transcrição. Os exemplos incluem o intensificador de SV40 no último lado da origem de replicação bp 100 a 270, o intensificador de promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de polioma no último lado da origem de replicação, e os intensificadores de adenovírus.

[0124] Os promotores iniciais e finais do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem viral de SV40 de replicação. Fiers *Et al.*, Nature, 273:113 (1978), Mulligan and Berg, Science, 209:1422-1427 (1980), Pavlakis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7398-7402 (1981). O promotor inicial imediato do citomegalovirus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição de Hind III E. Greenway *Et al.*, Gene, 18:355-360 (1982). Um sistema para expressar o DNA em hospedeiros mamíferos usando o papiloma vírus bovino como um vetor é revelado na Patente U.S. Nº 4.601.978. Ver também Gray *Et al.*, Nature, 295:503-508 (1982) expressando cDNA codificando imune interferon em células de macaco, Reyes *Et al.*, Nature, 297:598-601 (1982) na expressão de β -interferon humano, cDNA em células de camundongo sob o controle de um promotor de timidina quinase de vírus simples de herpes, Canaani (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5166-5170, na expressão do gene $\beta 1$ de interferon humano em células cultivadas de coelho e camundongo, e Gorman (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781, na expressão de sequência CAT de bactérias em células de rim de macaco, fibroblastos de embrião de galinha, células de ovário de hamster chinês, células HeLa, e células

de camundongo NIH-3T3 usando a repetição de terminal longo do vírus sarcoma de Rous como um promotor.

[0125] Outros métodos, vetores e células hospedeiras adequadas para adaptação à síntese do polipeptídeo de interesse em cultura de células de vertebrado recombinante são descritos em Gething *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979); Levinson *et al.*; EP 117.060; e EP 117.058. Em uma modalidade, um plasmídeo usado para praticar a presente invenção para expressão de cultura de células de mamífero de uma composição da presente invenção, incluindo qualquer ácido nucleico ou polipeptídeo, é pRK5 (Pub. EP no. 307.247) ou pSVI6B (Pub. PCT no. WO 91/08291, publicada em 13 de Junho de 1991).

VETORES DE EXPRESSÃO E VEÍCULOS DE CLONAGEM

[0126] A invenção proporciona cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem compreendendo os ácidos nucleicos da invenção (compreendendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da invenção) e/ou um ácido nucleico osmo-responsivo da invenção, incluindo ácidos nucleicos osmo-regulatórios da invenção. Partículas virais, baculovírus, fago, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, foscídeos, cromossomos artificiais bacterianos, DNA viral (por exemplo, varíola, adenovírus, vírus *fowl pox*, pseudo-raiva e derivados de SV40), cromossomos artificiais baseados em P1, plasmídeos de levedo, cromossomos artificiais de levedo e quaisquer outros vetores específicos para hospedeiros específicos de interesse (tais como células de mamífero), podem ser usados para a prática da invenção. Em um aspecto, os cassetes de expressão, vírus recombinante, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem usados para a prática da presente invenção podem incluir sequências de DNA cromossômicas, não cromossômicas e sintéticas. Grandes números de vetores

adequados são conhecidos por aqueles versados no campo e estão comercialmente disponíveis.

[0127] Vetores exemplificativos incluem vetores eucariotas, tais como pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Contudo, qualquer outro plasmídeo ou vetor pode ser usado, na medida em que eles sejam passíveis de replicação e viáveis na célula hospedeira. Vetores com baixo número de cópias ou alto número de cópias podem ser empregados com a presente invenção.

[0128] Os cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem usados para praticar a invenção podem compreender um promotor, um sítio de ligação ribossômica para início de tradução e um terminador de transcrição; e podem também incluir sequências apropriadas para amplificação de expressão. Vetores de expressão de mamífero podem compreender uma origem de replicação, quaisquer sítios de ligação ribossômica necessários, um sítio de poliadenilação, sítios aceitadores e doadores de *splicing*, sequências de término de transcrição e sequências 5' de flanqueamento não traduzidas. Em alguns aspectos, sequências de DNA derivadas dos sítios de poliadenilação e *splicing* de SV40 podem ser usadas para proporcionar os elementos genéticos não transcritos requeridos.

[0129] Em um aspecto, o vetor de expressão pode ter dois sistemas de replicação que permitem que o mesmo seja mantido em dois organismos, por exemplo, em células de mamífero ou inseto para expressão e em um hospedeiro procariota para clonagem e amplificação. Além disso, para integração de vetores de expressão, o vetor de expressão pode conter pelo menos uma sequência homóloga ao genoma da célula hospedeira. Ele pode conter duas sequências homólogas as quais flanqueiam a construção de expressão. O vetor de integração pode ser dirigido a um locus específicos na

célula hospedeira mediante seleção da sequência homóloga hospedeira para inclusão no vetor.

[0130] Construções para integração de vetores são bem conhecidas na técnica. Promotores eucariotas exemplificativos incluem precoce imediato de CMV, quinase de timidina de HSV, SV40 precoce e tardio, LTRs de retrovírus e metalotioneína-I de camundongo. Seleção do vetor e promotor apropriados está bem dentro do nível aqueles versados no campo, o vetor de expressão também contém um sítio de ligação ribossômica para início de tradução e um terminador de transcrição. O vetor também pode incluir sequências apropriadas para amplificação de expressão. Regiões promotoras podem ser selecionadas de qualquer gene desejado usando vetores de transferase de cloranfenicol (CAT) ou outros vetores com marcadores selecionáveis. Além disso, os vetores de expressão contêm, de preferência, um ou mais genes marcadores selecionáveis para proporcionar um traço fenotípico para seleção de células hospedeiras transformadas, tal como resistência à redutase de dihidrofolato ou neomicina para cultura de células eucariotas ou resistência à tetraciclina ou ampicilina em *E. coli*.

[0131] Vetores de expressão de mamífero também podem compreender uma origem de replicação, quaisquer sítios de ligação ribossômica necessários, um sítio de poliadenilação, sítios doadores e aceptadores de *splicing*, sequências de término de transcrição e sequências 5' de flanqueamento não transcritas. Em alguns aspectos, sequências de DNA derivadas de sítios de poliadenilação e *splicing* de SV40 podem ser usadas para proporcionar os elementos genéticos não transcritos requeridos.

[0132] Em aspectos alternativos, os ácidos nucleicos da invenção, por exemplo, aqueles compreendendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) e/ou ácidos nucleicos osmo-responsivos da invenção, são epissomais ou são estavelmente integrados no genoma de uma

célula, por exemplo, uma célula a ser cultivada.

[0133] Para integração estável de uma construção de um ácido nucleico da presente invenção, qualquer veículo ou carreador adequado pode ser usado, por exemplo, um vetor e/ou sistema de engolfamento lentiviral conforme descrito, por exemplo, nas USPNs 7.311.907; 7.262.049, que descrevem um vetor lentiviral pseudo-tipificado; USPNs 7.250.299; 7.226.780; 7.220.578; 7.211.247; 7.160.721, que descrevem métodos para intensificação de crescimento celular e aumento da densidade de culturas de célula contendo células hospedeiras infectadas com lentivírus; USPNs 7.078.031; 7.070.993; 7.056.699; 6.955.919; para mencionar uns poucos vetores e sistemas de engolfamento que podem ser usados para praticar a presente invenção.

[0134] Para transferência epissomal de uma construção de ácido nucleico da presente invenção, qualquer veículo ou carreador adequado pode ser usado, por exemplo, um vetor epissomal nuclear estável, conforme descrito na USPN 7.294.505; um sistema de vetor lentiviral para replicação epissomal de um gene desejado, conforme descrito na USPN 6.808.923; um vetor de expressão epissomal para expressão gênica tecido-específica, conforme descrito na USPN 6.797.494; vetores de papilomavírus humano para transdução epissomal, conforme descrito na USPN 6.605.281; um vetor epissomal, conforme descrito na USPN 6.479.279 ou 6.410.314; para mencionar uns poucos vetores e sistemas de engolfamento que podem ser usados para praticar a presente invenção.

[0135] Outros cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais ou veículos e sistemas de clonagem que podem ser usados para praticar a presente invenção incluem, por exemplo, vetores adenovirais replicação-competentes, conforme descrito na USPN 7.371.570; sistemas de trans-engolfamento baseados em adenovírus (Ad), conforme descrito na USPN 7.348.178; um

adenovírus, conforme descrito nas USPN 7.323.177; 7.319.033; 7.318.919; ou 7.306.793; para mencionar uns poucos vetores e sistemas de engolfamento que podem ser usados para praticar a presente invenção.

GENES MARCADORES

[0136] Em um aspecto, os cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem usados para praticar a invenção contêm um ou mais genes marcadores selecionáveis para permitir seleção de células hospedeiras, por exemplo, células de mamífero, contendo um ácido nucleico da presente invenção.

[0137] Marcadores selecionáveis exemplificativos incluem genes que codificam redutase de dihidrofolato ou genes que conferem resistência à neomicina para cultura de células eucariotas, genes que conferem resistência à tetraciclina ou ampicilina. Cassetes de expressão, vetores, vírus recombinantes, plasmídeos, fagos, fagemídeos, cromossomos artificiais e veículos de clonagem usados para praticar a invenção também incluem um gene marcador para permitir seleção de células que tenham sido transformadas, por exemplo, genes os quais tornam as bactérias resistentes a fármacos, tais como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, neomicina e tetraciclina. Marcadores selecionáveis podem também incluir genes biossintéticos, tais como aqueles nas vias biossintéticas de histidina, triptofano e leucina.

[0138] Em um aspecto, de forma a melhorar a capacidade de identificar células transfectadas, um ou mais ácidos nucleicos marcadores selecionáveis ou passíveis de triagem são usados como ou além do gene passível de expressão de interesse. "Genes marcadores" ou "ácidos nucleicos marcadores" são ácidos nucleicos que conferem um fenótipo distinto a células expressando o gene/ácido nucleico marcador, assim permitindo que as células transfectadas sejam distinguidas de células que não têm o marcador.

[0139] "Genes marcadores" ou "ácidos nucleicos marcadores" podem codificar um marcador selecionável ou passível de triagem, dependendo se o marcador confere um traço o qual pode ser "selecionado" por qualquer meio químico, isto é, através do uso de um agente seletivo (por exemplo, um antibiótico ou semelhante) ou se é simplesmente um traço que se pode identificar através de observação ou testagem, isto é, por meio de "triagem". Por exemplo, ta proteína fluorescente verde ou qualquer outra proteína fluorescente, proteínas bioluminescentes do tipo luciferase e semelhantes. Muitos exemplos de genes marcadores adequados são conhecidos na técnica e podem ser empregados na prática da presente invenção.

[0140] "Genes marcadores" ou "ácido nucleicos marcadores" também podem codificar um "marcador passível de secreção" cuja secreção pode ser detectada como um meio de identificar ou selecionar células transfectadas. Exemplos incluem um marcador o qual codifica um antígeno passível de secreção que pode ser identificado por meio de interação com anticorpo ou mesmo enzimas passíveis de secreção as quais podem ser detectadas por sua atividade catalítica. Proteínas passíveis de secreção caem em uma série de classes, incluindo pequenas proteínas passíveis de difusão detectáveis, por exemplo, através de ELISA; pequenas enzimas reativas detectáveis em solução extracelular (por exemplo, fosfatase alcalina secretada, luciferase secretada, a α -amilase secretada derivada de *Bacillus stearothermophilus* (SAMY), derivados de xilanase A derivada de *Bacillus subtilis*) e proteínas ligadas à membrana ou transitoriamente à membrana. Qualquer marcador selecionável pode ser usado para praticar a presente invenção e marcadores selecionáveis adequados para transfecções celulares são conhecidos na técnica. Tais marcadores podem incluir, mas não estão limitados a: deaminase de adenosina, fosfotransferase de aminoglicosídeo (em combinação com neomicina), gene de resistência à bleomicina (em combinação

com fleomicina ou bleomicina ou zeocina), deaminase de citosina (em combinação com N-(fosfononacetil)-L-aspartato, inosina e citosina), redutase de dihidrofolato (DHFR) (em combinação com metotrexato), dehidrogenase de histidinol (em combinação com histidinol), higromicina-B-fosfotransferase (em combinação com higromicina), quinase de timidina e fosforibosil transferase de xantina-guanina. Quando de uso de um marcador de deaminase de adenosina, células que incorporam o gene podem ser selecionadas por meio de crescimento na presença de baixas concentrações do inibidor de ADA, 2'-deoxicoformicina, com concentrações citotóxicas de adenosina ou seu análogo 9-β-D-xilofuranosil adenina.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS E CÉLULAS TRANSFORMADAS

[0141] A invenção também proporciona células transformadas ou transfectadas compreendendo uma construção de ácido nucleico da invenção, por exemplo, um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da invenção ou um ácido nucleico osmo-responsivo ou osmo-regulatório da invenção. A célula hospedeira pode ser qualquer uma das células hospedeiras familiares para aqueles versados no campo, incluindo células procariotas, células eucariotas, tais como células bacterianas, células fúngicas, células de levedura, células de mamífero, células de inseto ou células de planta. Células bacterianas exemplificativas incluem qualquer espécie dentro dos gêneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, incluindo, e.g., *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Células fúngicas exemplificativas incluem qualquer espécie *Aspergillus*. Células de levedo exemplificativas incluem qualquer espécie *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Schwanniomyces*, incluindo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*. Células de inseto exemplificativas incluem qualquer espécie *Spodoptera* ou *Drosophila*, incluindo

Drosophila S2 e *Spodoptera Sf9*. Células animais exemplificativas incluem CHO, COS ou melanoma de Bowes ou qualquer linhagem de célula de camundongo ou humana. A seleção de um hospedeiro apropriado está dentro da capacidade daqueles versados no campo. Técnicas para transformação de uma ampla variedade de espécies de plantas superiores são bem conhecidas e descritas na literatura técnica e científica. Vide, por exemplo, Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22: 421-477; USPN 5.750.870.

[0142] Um cassete de expressão, vetor, vírus recombinante, plasmídeo, fago, fagemídeo, cromossomo artificial ou veículo de clonagem da presente invenção pode ser introduzido nas células hospedeiras usando qualquer uma de uma variedade de técnicas, incluindo transformação, transdução, infecção viral, pistolas gênicas ou transferência de gene Ti-mediada. Métodos particulares incluem transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-Dextrana, lipofecção ou eletroporação (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

[0143] Em um aspecto, as construções da invenção são introduzidas nas células para triagem, assim, os ácidos nucleicos entram nas células de uma maneira adequada para subsequente expressão do ácido nucleico. O método de introdução é grandemente orientado pelo tipo da célula alvo. Métodos exemplificativos incluem precipitação com CaPO_4 , fusão de lipossoma, lipofecção (por exemplo, LIPOFECTIN™), eletroporação, infecção viral, etc. As construções da invenção podem se integrar estavelmente no genoma da célula hospedeira (por exemplo, com introdução retroviral) ou podem existir transitória ou estavelmente no citoplasma; por exemplo, através do uso de plasmídeos tradicionais, utilizando sequências regulatórias padrões, marcadores de seleção, etc.

[0144] Onde apropriado, as células hospedeiras manipuladas da presente invenção podem ser cultivadas em meios nutrientes convencionais

modificados conforme apropriado para ativação de promotores, seleção de transformantes ou amplificação dos genes da invenção. Após transformação de uma cepa hospedeira adequada e crescimento da cepa hospedeira até uma densidade celular apropriada, o promotor selecionado pode ser induzido através de meios apropriados (por exemplo, desvio de temperatura ou indução química) e as células podem ser cultivadas durante um período adicional antes de permitir que as mesmas produzam o polipeptídeo de recombinante desejado.

[0145] Células hospedeiras contendo as construções da invenção podem ser cultivadas em meios nutrientes convencionais, conforme apropriado para ativação de promotores, seleção de transformantes ou amplificação de genes. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, podem ser aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para aqueles versados no campo.

[0146] Métodos de transfecção são conhecidos por aqueles versados no campo, por exemplo, CaPO_4 e eletroporação. Dependendo da célula hospedeira usada, transformação é realizada usando técnicas padrões apropriadas a tais células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, conforme descrito em Sambrook *et al.*, 1989, *supra* ou eletroporação é, em geral, usado para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. Para células de mamífero sem tais paredes celulares, o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978) pode ser empregado. Aspectos gerais de transformações de um sistema hospedeiro de célula de mamífero foram descritos na Pat. U.S. No. 4.399.216. Transformações em levedo são, tipicamente, realizadas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Contudo, outros métodos para introdução de DNA em células, tal como através de microinjeção nuclear, eletroporação, fusão de protoplasto bacteriano com

células intactas ou policátions, por exemplo, polibreno ou poliomitina, também podem ser usados. Para várias técnicas de transformação de células de mamífero, vide Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) e Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO REGULATÓRIO

[0147] Em uma modalidade, a invenção proporciona ácidos nucleicos osmo-responsivos e osmo-regulatórios compreendendo pelo menos um ácido nucleico regulatório, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico inibitória, de estabilização ou sobre-regulação. Em uma modalidade, uma sequência que objetiva uma mensagem gênica, por exemplo, um gene lactogênico ou mensagem de gene lactogênico, é usada. Em uma modalidade, essa sequência é inibitória, por exemplo, compreende um RNA curto de interferência (siRNA), um microRNA (miRNA), um RNA *antisense* e/ou um RNA com atividade de ribozima. Assim, em modalidades alternativas, a invenção proporciona o uso de ácidos nucleicos regulatórios (inibitórios, de estabilização ou sobre-regulação), incluindo ácidos nucleicos que podem "objetivar" um gene, mensagem (mRNA) ou proteína para aumentar, intensificar, diminuir ou eliminar a expressão e/ou atividade do gene, mensagem (mRNA) ou proteína.

[0148] Em uma modalidade, esses ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios) são oligonucleotídeos, por exemplo, contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais, ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente, ácidos nucleicos sintéticos e/ou ácidos nucleicos recombinantes. A invenção abrange o uso de estruturas semelhantes a ácido nucleico com partes principais sintéticas; vide, por exemplo, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 153- 156. A invenção proporciona o uso de ácidos nucleicos regulatórios (inibitórios, de estabilização ou sobre-regulação), deoxiribonucleotídeo (DNA) ou ribonucleotídeo (RNA), quer

na forma fita simples ou dupla. A invenção proporciona o uso de ácido nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais. A invenção proporciona o uso de oligonucleotídeos regulatórios (por exemplo, inibitórios) mistos compreendendo uma porção de RNA trazendo substituintes 2'-O-alquila conjugada a uma porção de DNA via uma ligação de fosfodiéster; vide, por exemplo, USPN 5,013,830. A invenção proporciona o uso de estruturas semelhantes a ácido nucleico com partes principais sintéticas. Análogos com parte principal de DNA proporcionados pela invenção incluem fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidita, alquil fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino carbamato e ácidos nucleicos peptídicos (PNAs); vide *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press na Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 600, Eds. Baserga e Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36: 1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). A invenção proporciona uso de PNAs contendo partes principais não-iônicos, tais como unidades N-(2-aminoetil) glicina. Ligações de fosforotioato são descritas, por exemplo, pelas USPNs 6.031.092; 6.001.982; 5.684.148; vide também, WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197. Outras partes principais sintéticas usadas nos ácidos nucleicos da presente invenção incluem ligações de metilfosfonato ou ligações alternadas de metilfosfonato e fosfodiéster (vide, por exemplo, USPN 5,962,674; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698) e ligações de benzilfosfonato (vide, por exemplo, USPN 5,532,226; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 153-156). A invenção proporciona o uso de ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios), incluindo genes, polinucleotídeos, DNA, RNA, cDNA, mRNA, oligonucleotídeo primers, sondas e produtos de amplificação.

[0149] Ácido nucleicos da invenção podem ser introduzidos em

células eucariotas (por exemplo, mamífero) para fins de expressão de transcritos de RNA que funciona para afetar os padrões de expressão gênica ainda não traduzidos em proteína. Ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios) exemplificativos usados para a prática da presente invenção incluem RNAs curtos de interferência (siRNAs) e microRNAs (miRNAs), RNA *antisense* e RNA com atividade de ribozima: esses podem funcionar para reduzir ou eliminar a expressão de genes em células nativas (endógenos) ou introduzidos (heterólogos), por exemplo, genes de mamífero.

[0150] Genes e ácidos nucleicos usados para a prática da presente invenção podem ser construídos ou isolados os quais, quando transcritos, produzem RNA regulatório (por exemplo, *antisense* ou *sense*) ou RNA fita dupla que é complementar a todo ou parte(s) de (um) RNA(s) mensageiro(s) alvo. O RNA regulatório (por exemplo, *antisense* ou *sense*) ou fita dupla ou siRNA ou miRNA reduz a produção do produto polipeptídico do RNA mensageiro. O produto polipeptídico pode ser qualquer proteína codificada pelo genoma de célula de mamífero.

[0151] Genes e ácidos nucleicos usados para a prática da presente invenção também podem ser construídos ou isolados os quais, quando transcritos, produzem enzimas de RNA ou ribozimas, as quais podem atuar como endoribonucleases e catalisar a clivagem de moléculas de RNA com sequências selecionadas.

[0152] A clivagem do RNA mensageiro selecionado pode resultar na produção reduzida de seus produtos polipeptídicos codificados. Esses ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios) podem ser usados para preparar novas linhagens de células de mamífero; essas linhagens de células de mamífero podem expressar níveis reduzidos de polipeptídeos incluindo, mas não limitado a, polipeptídeos citados aqui, que podem ser afetados por RNA *antisense* ou de interferência.

[0153] Comprimentos e concentrações ótimas de ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios ou sobre-regulatórios) usados em qualquer modalidade particular, por exemplo, em um biorreator, um implante, em uma célula culture, expressos como uma proteína recombinante e semelhantes, podem ser determinados usando métodos e sistemas de triagem de rotina. Estratégias para o design de comprimentos e concentrações ótimas são bem descritos na literatura científica e de patente e aqueles versados no campo podem produzir ácidos nucleicos regulatórios (por exemplo, inibitórios ou sobre-regulatórios), por exemplo, oligonucleotídeos, usando os novos reagentes da invenção utilizando métodos e sistema de triagem de rotina.

OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTISENSE*

[0154] A invenção proporciona oligonucleotídeos *antisense* compreendendo pelo menos uma sequência que objetiva uma mensagem gênica, por exemplo, uma sequência que objetiva um gene lactogênico ou mensagem de gene lactogênico. Estratégias para design de oligonucleotídeos *antisense* são bem descritos na literatura científica e de patente e aqueles versados no campo podem produzir oligonucleotídeos que codificam uma proteína (por exemplo, que codificam proteína lactogênica) usando os novos reagentes da invenção. Por exemplo, protocolos de "gene walking" /mapeamento de RNA para triagem de oligonucleotídeos *antisense* eficazes são bem conhecidos no campo; vide, por exemplo, Ho (2000) Methods Enzymol. 314: 168-183, que descreve um ensaio de mapeamento de RNA, o qual é baseado em técnicas moleculares padrões para proporcionar um método fácil e confiável para seleção de sequências *antisense* potentes. Vide também Smith (2000) Eur. J. Pharm. Sci. 11: 191-198.

[0155] Em uma modalidade, ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente são usados como oligonucleotídeos de ácido nucleico regulatórios (por exemplo, inibitórios ou sobre-regulatórios). Esses oligonucleotídeos

antisense podem ser de qualquer comprimento; por exemplo, em aspectos alternativos, os oligonucleotídeos *antisense* têm entre cerca de 5 a 100, cerca de 10 a 80, cerca de 15 a 60, cerca de 18 a 40. O comprimento original pode ser determinado por meio de triagem de rotina. Os oligonucleotídeos *antisense* podem estar presentes em qualquer concentração. A concentração ótima pode ser determinada por meio de triagem de rotina. Uma ampla variedade de análogos de ácido nucleico e nucleotídeos sintéticos que não ocorrem naturalmente são conhecidos, os quais podem se dirigir a esse problema potencial. Por exemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) contendo partes principais não-iônicas, tais como unidades de N-(2-aminoetil) glicina, podem ser usados. Oligonucleotídeos *antisense* tendo ligações de fosforioato também podem ser usados, conforme descrito nos documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) Toxicol Appl Pharmacol 144: 189-197; Antisense Therapeutics, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Oligonucleotídeos *antisense* tendo análogos de uma parte principal de DNA sintético proporcionados pela presente invenção também incluem ácidos nucleicos de fosforo-ditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquil fosfotiréster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato e morfolino carbamato, conforme descrito acima.

[0156] A metodologia de química combinatorial pode ser usada para criar vastos números de oligonucleotídeos que podem sofrer triagem rapidamente por oligonucleotídeos específicos que têm afinidades e especificidades de ligação apropriadas com relação a qualquer alvo, tal como as sequências de xilanase, mananase e/ou glucanase *sense* e *antisense* da invenção (vide, por exemplo, Gold (1995) J. de Biol. Chem. 270: 13581-13584).

RIBOZIMAS REGULATÓRIAS

[0157] A invenção proporciona ribozimas capazes de regular um transcrito (uma mensagem), por exemplo, que pode se ligar a uma mensagem

que codifica proteína lactogênica. Em uma modalidade, essas ribozimas podem regular (por exemplo, inibir) a atividade da proteína, por exemplo, atividade de uma proteína lactogênica, por exemplo, do mRNA alvo. Estratégias para o design de ribozimas e seleção da sequência *antisense* específica para a proteína lactogênica alvo são bem descritas na literatura científica e de patente e aqueles versados no campo podem produzir tais ribozimas usando os novos reagentes da invenção. Ribozimas atuam por meio de ligação a um RNA alvo através da porção de ligação do RNA alvo de uma ribozima a qual é mantida em proximidade com uma porção enzimática do RNA que cliva o RNA alvo. Assim, a ribozima reconhece e se liga a um RNA alvo através de emparelhamento de base complementar e, uma vez ligada ao sítio correto, atua enzimaticamente para clivar e inativar o RNA alvo. Clivagem de um RNA alvo de tal maneira destruirá sua capacidade de sintetizar diretamente uma proteína codificada se a clivagem ocorrer na sequência de codificação. Após uma ribozima ter se ligado e clivado seu RNA alvo, ela pode ser liberada do RNA para se ligar a outros alvos repetidamente.

[0158] Em algumas circunstâncias, a natureza enzimática de uma ribozima pode ser vantajosa com relação a outras tecnologias, tal como a tecnologia *antisense* (onde uma molécula de ácido nucleico simplesmente se liga a um ácido nucleico alvo para bloquear sua transcrição, tradução ou associação à outra molécula), uma vez que a concentração eficaz de ribozima necessária para obter um tratamento terapêutico pode ser menor do que aquela de um oligonucleotídeo *antisense*. Essa vantagem potencial reflete a capacidade da ribozima de atuar enzimaticamente. Assim, uma única molécula de ribozima é capaz de clivar muitas moléculas do RNA alvo. Além disso, uma ribozima é, tipicamente, um inibidor altamente específico, com a especificidade da inibição dependendo não apenas do mecanismo de emparelhamento de base de ligação, mas também do mecanismo pelo qual a molécula inibe a expressão do RNA ao

qual ela se liga, isto é, a inibição é causada por clivagem do RNA alvo e, assim, a especificidade é definida como a proporção da taxa de clivagem do RNA alvo com relação à taxa de clivagem do RNA não-alvo. Esse mecanismo de clivagem é dependente de muitos fatores adicionais, além daqueles envolvidos em emparelhamento de base. Assim, a especificidade de ação de uma ribozima pode ser maior do que aquela do oligonucleotídeo *antisense* que se liga ao mesmo sítio de RNA.

[0159] Uma ribozima usada para praticar a invenção pode ser uma molécula de RNA de ribozima enzimática, a qual pode ser formada em um motivo "hammerhead", um motivo de *hairpin*, como um motivo do vírus delta de hepatite, um motivo de íntron do grupo I e/ou um RNA semelhante à RNaseP em associação com uma sequência guia de RNA. Exemplos de motivos "hammerhead" são descritos, por exemplo, por Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8: 183; motivos de *hairpin* por Hampel (1989) *Biochemistry* 28: 4929 e Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18: 299; o motivo do vírus delta de hepatite por Perrotta (1992) *Biochemistry* 31: 16; o motivo de RNaseP por Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35: 849; e o íntron do grupo I por Cech, Pat. U.S. No. 4.987.071. A citação desses motivos específicos não se destina a ser limitativa.

INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi)

[0160] Em um aspecto, a invenção proporciona moléculas regulatórias de RNA (por exemplo, inibitórias, de estabilização ou sobre-regulação), por exemplo, uma molécula de "RNAi", para objetivação de sequências de codificação de proteína, tais como sequências de codificação de proteína lactogênica. A molécula de RNAi pode compreender uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA), por exemplo, moléculas de siRNA, miRNA e/ou RNA curto de *hairpin* (shRNA). A molécula de RNAi, por exemplo, siRNA (pequeno RNA inibitório) pode inibir a expressão de um gene de codificação de proteína

(por exemplo, um gene que codifica proteína lactogênica) e/ou miRNA (microRNA) para inibir a tradução de uma mensagem de proteína (por exemplo, uma mensagem de proteína lactogênica). Em um aspecto, a molécula de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, tem concentração 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou mais nucleotídeos duplos de comprimento.

[0161] Embora a invenção não esteja limitada a qualquer mecanismo de ação particular, o RNAi pode entrar em uma célula e causar a degradação de um RNA fita simples (ssRNA) de sequências idênticas ou similares, incluindo mRNAs endógenos. Quando uma célula é exposta ao RNA fita dupla (dsRNA), mRNA do gene homólogo é seletivamente degradado por meio de um processado denominado interferência de RNA (RNAi). Um possível mecanismo por trás do RNAi é a ruptura de um RNA fita dupla (dsRNA) que corresponde a uma sequência gênica em pedaços curtos denominados RNA curto de interferência, o que dispara a degradação de mRNA que corresponde a essa sequência. Em um aspecto, os RNAi's da invenção são usados em produtos terapêuticos para silenciamento gênico, vide, por exemplo, Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7: 1040-1046. Em um aspecto, a invenção proporciona métodos para degradar seletivamente RNA usando as moléculas de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, da invenção. O processo pode ser praticado *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Em um aspecto, as moléculas de RNAi da invenção podem ser usadas para gerar uma mutação de perda de função em uma célula, um órgão ou um animal.

[0162] Métodos para a produção e uso de ácidos nucleicos regulatórios, por exemplo, moléculas de RNAi, siRNA e/ou miRNA, para regulação de expressão de RNA, por exemplo, para degradação seletiva de RNA, são bem conhecidos na técnica; vide, por exemplo, USPNs 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

ANIMAIS NÃO-HUMANOS TRANSGÊNICOS

[0163] A invenção proporciona animais não-humanos transgênicos compreendendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da invenção, por exemplo, para estudar a osmo-regulação no animal não-humano. Animais não-humanos transgênicos podem ser produzidos e gerados usando qualquer método conhecido na técnica; vide, por exemplo, USPNs 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que descrevem a produção e uso de células e óvulos transformados e camundongos, coelhos, ratos, porcos, galinhas, cabras, peixe e vacas transgênicas. Vide também, por exemplo, Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157, que descreve a produção de proteínas recombinantes no leite de animais lácteos transgênicos; Baguisi (1999) Nat. Biotechnol. 17: 456-461, demonstrando a produção de cabras transgênicas.

CULTURA DE CÉLULAS, IMPLANTES E BIORREATORES

[0164] Em modalidades alternativas, as composições e métodos da presente invenção podem ser usados para sustentar a saúde e viabilidade celular em qualquer implante, órgão artificial ou sistema de cultura, por exemplo, em biorreatores, implantes, órgãos artificiais ou simples lâminas de cultura de células, garrafas, discos, tubos ou frascos. Composições e métodos são usados para sustentar a saúde e viabilidade de células em condições de cultura, por exemplo, quando essas células são criadas para produzir um produto, por exemplo, uma proteína recombinante ou produto de polissacarídeo ou um produto viral (por exemplo, uma partícula de vírion) no caso de uma "linhagem de células produtoras" (vide, por exemplo, USPNs 5.837.484; 6.566.118) ou uma molécula orgânica, tal como um policetídeo, porque as células são mais saudáveis e mais viáveis em virtude da incorporação de uma composição da presente invenção (por exemplo, um cassete de expressão, vetor, vírus

recombinante, plasmídeo, fago, fagemídeo, cromossomo artificial ou veículo de clonagem da presente invenção ou qualquer ácido nucleico quimérico compreendendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção), mais desse produto desejado é produzido.

[0165] Composições e métodos, conforme proporcionado aqui, também podem ser usados para reforçar a produção de moléculas, por exemplo, proteínas recombinantes, pelas células em um sistema de cultura, por exemplo, um biorreator, um implante e semelhantes. Em um aspecto, composições e métodos conforme proporciona do aqui são usadas para manter ou aumentar a produção de proteína apropriadamente enovelada ou preferencialmente enovelada (por exemplo, um enovelamento do tipo silvestre) e/ou glicosilada sob condições de menos do que as condições osmóticas ótimas (menos do que as condições osmóticas ótimas para uma célula ou sistema de cultura particular), por exemplo, sob condições de hiperosmolalidade e/ou hipo-osmolalidade, tais como aquelas observadas em condições de cultura de células densa ou em estágio posterior. Assim, em uma modalidade, as composições e métodos conforme proporcionado aqui são usadas para manter ou aumentar a qualidade de produto (por exemplo, proteínas recombinantes) produzido em uma célula, por exemplo, um sistema de cultura de célula, particularmente condições de estresse osmótico, tal como observado em condições de cultura de células densa ou em estágio posterior.

[0166] Composições e métodos conforme proporcionado aqui podem ser praticados com qualquer sistema de cultura conhecido na técnica; vide, por exemplo, USPNs 5.705.364; 5.721.121; 5.976.833; 6.180.401; 6.410.270; 6.716.602; 7.294.484; 7.294.481; e Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. 20030096414; 20050272124 (que descreve culturas de célula alimentadas em batelada); 20060160180; 20070254358; 20070231901 (que descreve um sistema de cultura de células microfluídico); 20070184529 (que

descreve a manipulação de um ambiente de cultura de células para glicosilação); 20070161106.

[0167] Por exemplo, em uma modalidade, uma "cultura de célula alimentada em batelada" é usada, por exemplo, uma cultura em batelada onde as células e meio de cultura são fornecidos a um vaso de cultura inicialmente e nutrientes de cultura adicionais são alimentados, continuamente ou em incrementos distintos, à cultura, com ou sem coleta periódica de células e/ou produto antes de término da cultura. Sistemas de cultura alimentados em batelada usados para praticar a presente invenção podem ser "culturas em batelada semi-contínuas", por exemplo, onde culturas inteiras, incluindo células e meios, são periodicamente removidos e substituídos por meio fresco. "Cultura em batelada" simples, por exemplo, onde todos os componentes para a cultura de células, incluindo células e todos os nutrientes de cultura, são fornecidos ao vaso de cultura no início do processo de cultura, também pode ser usada para praticar a presente invenção. Cultura de perfusão também pode ser usada para praticar a presente invenção, por exemplo, onde um sobrenadante não é removido do vaso de cultura durante um processo de crescimento de cultura; as células podem ser retidas na cultura, por exemplo, por meio de filtração, encapsulação, ancoragem a microveículos, etc. e o meio de cultura é contínua ou intermitentemente introduzido e removido do vaso de cultura.

[0168] As células da presente invenção (incluindo qualquer célula compreendendo um cassete de expressão, vetor, vírus recombinante, plasmídeo, fago, fagemídeo, cromossomo artificial ou veículo de clonagem da presente invenção ou qualquer ácido nucleico quimérico compreendendo um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção) pode ser usado em qualquer sistema de cultura de célula, incluindo qualquer biorreator, lâmina de cultura de célula, tubos ou frasco. A invenção também proporciona sistemas de biorreator, sistemas de cultura de célula,

lâminas, tubos e frascos compreendendo as células da presente invenção.

[0169] Por exemplo, na prática da presente invenção, uma fase de crescimento de célula pode ser seguida por uma fase de produção de polipeptídeo, a qual é distinta da mesma. Em uma modalidade, uma fase de produção é realizada em um vaso de cultura diferente da fase de crescimento celular.

[0170] Alternativamente, o mesmo vaso pode ser empregado para cada etapa. Por exemplo, o meio de cultura da fase de crescimento pode ser fornecido com um meio de alta osmolalidade e baixo teor de glicose para produção. Alternativamente, troca de meio usando dispositivos de separação de fluido disponíveis na técnica (por exemplo, filtração de fluxo turbulento, telas giratórias ou microveículos de leito fluidizado) podem ser usados para permitir que o mesmo vaso seja usado.

[0171] Em uma modalidade, a fase de produção envolve inoculação de células animais cultivadas na fase de crescimento em uma densidade de cultura de células de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^6$ células/mL ou pelo menos cerca de $3,0 \times 10^6$ células/mL ou entre cerca de 1 e 10×10^6 células/mL. Em uma modalidade, células animais são cultivadas em uma osmolalidade inicial de cerca de 400 a 600 mOsm ou entre cerca de 400 a 500 mOsm, em um vaso de cultura, por exemplo, tal como aquele exemplificado para a fase de crescimento.

[0172] Em uma modalidade, para obter um meio de cultura tendo a osmolalidade especificada, um meio de cultura PS-04™, DIESEL™ ou SUPER CELL™ ou meio similar pode ser usado e a osmolalidade do meio de cultura pode ser aumentada via a adição da concentração basal de glicose e sal (tal como NaCl, por exemplo). Esse tipo de meio de cultura contém um excesso de aminoácidos de forma a proporcionar nutrientes adicionais para a célula e obter uma alta osmolalidade inicial. Contudo, conforme será evidente por aqueles

versados no campo, a(s) concentração(ões) dos outros constituintes no meio de cultura pode(m) ser ajustada(s) de forma a atingir a osmolalidade desejada.

[0173] Em uma modalidade, a osmolalidade é mantida substancialmente na faixa desejável por toda a cultura. Controle do fornecimento de glicose a um meio de cultura de células ajuda a impedir aumentos excessivos na osmolalidade substancialmente acima do ótimo desejável.

[0174] Em uma modalidade, a fase de produção é realizada na presença de uma concentração de glicose controlada por toda a cultura para estar dentro de uma faixa entre cerca de 0,01 e 1 g/L, de preferência 0,02-0,5 g/L e, mais preferivelmente, 0,05-0,2 g/L. De forma a monitorar e controlar a concentração de glicose do meio de cultura na faixa especificada, FIA ou outros sistemas de controle on-line automatizados são úteis.

[0175] Em uma modalidade, a concentração de glutamina também é controlada por toda a cultura para estar em uma faixa de 0,2 a 2 mM, mais preferivelmente 0,5 a 1 mM. Controle da concentração de glutamina pode ser obtido usando um sistema FIA similar àquele discutido acima, por exemplo.

[0176] Em uma modalidade, condições de cultura, tais como temperatura, pH, dO₂ e semelhantes, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para produção de proteína e serão evidentes para aqueles versados no campo. Por exemplo, o pH pode ser ajustado para uma faixa entre 6,5 e 7,5 e a temperatura para produção pode estar entre 30°C e 38°C.

[0177] Em uma modalidade, o ciclo de produção pode ser reduzido do tempo normal de cerca de 15 dias ou mais para proteínas recombinantes para cerca de 9 dias ou menos. Em determinadas modalidades (por exemplo, onde o polipeptídeo de interesse é DNase), a fase de produção é terminada antes que a titulação máxima de polipeptídeo seja obtida. Isso é vantajoso, uma vez que a composição de DNase

resultante tem um percentual reduzido de deamidação comparado com a DNase produzido em operações mais longas. Após a fase de produção de polipeptídeo, o polipeptídeo de interesse pode ser recuperado do meio de cultura usando técnicas as quais são bem estabelecidas no campo.

BIORREADORES, IMPLANTES E ÓRGÃOS ARTIFICIAIS

[0178] A invenção também proporciona implantes e órgãos artificiais, sistemas de biorreator, sistemas de cultura de célula, lâminas, discos, tubos, garrafas e frascos compreendendo células da presente invenção. Qualquer implante, órgão artificial, sistemas de biorreator, sistema de cultura de célula, lâmina de cultura de célula, disco (por exemplo, disco de Petri), tubo de cultura de célula e/ou frasco de cultura de célula pode ser usado para praticar a presente invenção.

[0179] Por exemplo, um biorreator da invenção ou um biorreator usado para praticar os métodos da presente invenção pode ser um dispositivo de biorreator passível de implante conforme descrito, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 20080112995; ou um dispositivo de biorreator conforme descrito, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. 20080057571; 20080044890; 20080044850; 20080038816; 20080032396; 20080032389; 20080032380; 20080014629; 20080014215; e/ou 20080003669 e/ou nas Pats. U.S. Nos. (USPNs) 7.378.023; 7.371.567, que descrevem biorreatores para bio-órgãos artificiais; 7.351.584; que descreve biorreatores para hepatócitos de mamífero; 7.348.175, que descreve um microprocessador controlado e um biorreator instrumentado; 7.300.584, que descreve um dispositivo para tratamento biológico de uma suspensão em um biorreator; 7.290.669, que descreve um biorreator de fluxo por extravasamento; 7.264.962, que descreve um reator enzimático com três estágios; 7.229.808, que descreve um biorreator usando material biológico imobilizado viável; 7.198.941, que descreve um aparelho de biorreator com vaso poroso; 7.198.940, que

descreve um aparelho de biorreator e sistema de cultura de célula para cultura e processamento automatizados de células vivas; 7.156.985, que descreve um sistema de biorreator tendo controle de temperatura aprimorado; para descrever apenas uns poucos biorreatores exemplificativos e sistemas de cultura de célula que podem ser usados para praticar a presente invenção.

[0180] Em modalidades alternativas, a invenção proporciona implantes, por exemplo, implantes médicos (por exemplo, células que secretam insulina ou uma citocina ou hormônio) ou stents, implantes ortopédicos, oculares ou dentais compreendendo uma célula da invenção. Por exemplo, implantes e órgãos artificiais (por exemplo, implante ou pele, fígado, pâncreas ou dentes artificiais), sistemas de biorreator, sistemas de cultura de célula, lâminas, discos, tubos e frascos podem compreender células tronco, células pluripotentes, células não diferenciadas, células do plexo coróide, células de Schwann, células retiniais, células nervosas, células ósseas, células hepáticas, células hepáticas parenquimais, células endoteliais, adipócitos, células fibroblásticas, células de Kupffer, células renais, células de vaso sanguíneo, células da pele, células periodontais, odontoblastos, dentinoblastos, cimentoblastos, enameloblastos, tecido ectomesenquimal odontogênico, osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos e outras células e tecidos envolvidos em odontogênese ou formação óssea e/ou células tronco e outras células de órgãos humanos ou animais ou as células são embriônicas ou células tronco de adulto ou uma combinação das mesmas.

[0181] Qualquer biorreator, implante, stent, órgão artificial ou dispositivo similar compreendendo uma célula da invenção pode ser usado para produzir ou usar as composições ou methods da presente invenção; por exemplo, implantes conforme descrito nas USPNs 7.388.042; 7.381.418; 7.379.765; 7.361.332; 7.351.423; 6.886.568; 5.965.125; 5.270.192; e Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. 20040127987; 20080119909 (que

descreve implantes auriculares); 20080118549 (que descreve implantes ocular); 20080020015 (que descreve um curativo para ferimentos bioativo); 20070254005 (que descreve bio-próteses de válvula cardíaca, enxertos vasculares, implantes de menisco); 20070059335; 20060128015 (que descreve implantes hepáticos).

INTENSIFICADORES TRANSCRICIONAIS OSMO-RESPONSIVOS E SUAS PROTEÍNAS DE

LIGAÇÃO

[0182] A invenção proporciona pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) compreendendo pelo menos uma sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva ou NFATc-responsiva operacionalmente ligada a uma sequência regulatória transcricional, por exemplo, operacionalmente ligada a um promotor, tal como um promotor mínimo, um promotor constitutivo ou promotor induzível e semelhantes. Sequências intensificadoras transcricionais TonEBP-responsivas e NFATc responsivas e as proteínas TonEBP e NFATc proteínas que se ligam às mesmas são bem conhecidas na técnica.

[0183] Por exemplo, uma sequência intensificadora transcricional TonEBP-responsiva pode compreender a sequência: 5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1); e sequências intensificadoras transcricionais TonEBP-responsivas são descritas, por exemplo, em Daoudal (1997) J. Biol. Chem. 272(5): 2615-2619; Ferraris (1999) Am. J. Physiol. 276(3 Pt 1) e outros descritos abaixo. Sítios de ligação à TonEBP ativos exemplificativos que podem ser usados para praticar a presente invenção incluem aqueles encontrados na **Tabela 1**:

TABELA 1

Origem	Sequência	Referência	SEQ ID NO:
BGT1 canina	5' TGGAAAAGTCC 3'	10	11
Aldose redutase humana A	5' TGGAAAAATAT 3'	5	12
Aldose redutase humana B	5' TGGAAAAATTT 3'	5	13

Origem	Sequência	Referência	SEQ ID NO:
Aldose redutase humana C	5' TGGAAAATCAC 3'	5	14
Aldose redutase de coelho	5' CGGAAAATCAC 3'	3	15
Aldose redutase de camundongo e rato	5' TGGAAAATCAC 3'	1	16
Sítios de ligação a TonEBP humana	5' TGGAAAATTAC 3'	8	17
Sítios de ligação a TonEBP humana modificados, 6	5' TGGAAATATTAC 3'	8	18
Sítios de ligação a TonEBP humana modificados, 7	5' TGGAAATTTAC 3'	8	19
Sítios de ligação a TonEBP de coelho modificados, 1	5' AGGAAAATCAC 3'	2	20
Sítios de ligação a TonEBP de coelho modificados, 2	5' CGGAAAAAACC 3'	2	21
Sítios de ligação a TonEBP de coelho modificados, 3	5' CGGAAAATACC 3'	2	22
Sítios de ligação a TonEBP de coelho modificados, 4	5' CGGAAAATCCC 3'	2	23
Sódio/mio-inositol humano, TonEA	5' TGGAAAACCTAC 3'	9	24
Sódio/mio-inositol humano, TonEB1	5' ATAGAATTCCA 3' (<i>antisense</i> : 5' TGGAATTCTAT 3')	9	25 (<i>antisense</i> 26)
Sódio/mio-inositol humano, TonEB2/3	5' TGGAAAATTCCA 3'	9	27
Sódio/mio-inositol humano, TonEC1	5' TGGAAAATTAC 3'	9	28
Sódio/mio-inositol humano, TonEC2	5' TGGAAAGTTAC 3'	9	29
Sódio/mio-inositol humano, TonEp	5' TGGAAAGTTCC 3'	9	30
HSP70 de camundongo, TonEA	5' TGGAAAGTTTT 3'	11	31
HSP70 de camundongo, TonEB	5' TGGAAAATTTT 3'	11	32
HSP70 de camundongo, TonEC	5' TGGAAATCTCC 3'	11	33
HSP70 de camundongo, TonED	5' TGGAAAAACAC 3'	11	34
Gene transportador-A de uréia de camundongo	5' GGAGTTTTCCA 3' (<i>antisense</i> : 5' TGGAAAACCTCC 3')	4	35 (<i>antisense</i> 36)

1. Daoudal S, Tournaire C, Halere A, Veyssi re G, Jean C. Isolation of the mouse aldose reductase promoter and identification of a tonicity-responsive element. J. Biol Chem. 31 de Janeiro de 1997; 272(5): 2615-9.

2. Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, García-Pérez A. Functional consensus for mammalian osmotic response elements. Am J Physiol. Mar o de 1999; 276(3 Pt 1).

3. Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB, García-Pérez A. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem.* 2 de Agosto de 1996; 271(31): 18318-21.

4. Fenton RA, Cottingham CA, Stewart GS, Howorth A, Hewitt JA, Smith CP. Structure and characterization of the mouse UT-A gene (Slc14a2). *Am J Physiol. Renal Physiol.* Abril de 2002; 282(4): F630.

5. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SS. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem.* 27 de Junho de 1997; 272(26): 16431-7.

6. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos e Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 7214-7219.

7. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A: Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 2001, 15: 47-58.

8. Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Cis- e trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol.* Abril de 1998; 274(4 Pt 2): F753-61.

9. Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS, Kwon HM. Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J. Biol Chem.* 1998 Aug 7; 273(32): 20615-21.

10. Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L: Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 2002, 9: 90-94.

11. Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. Mol Cell Biol. Agosto de 2002; 22(16): 5753-60.

REFORÇO DO FENÓTIPO OSMO-PROTETOR

[0184] Em um aspecto, as composições e/ou métodos da invenção também expressam proteínas que se ligam aos intensificadores transcrpcionais osmo-responsivos, por exemplo, composições (construções) da invenção compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma proteína que se liga a um intensificador transcrricional osmo-responsivo usado em uma construção da presente invenção. Essa modalidade alternativa é particularmente útil em aspectos da invenção onde as construções e/ou métodos da invenção são usados como sistemas de expressão ácido nucleico e/ou polipeptídeo induzíveis; onde as construções da invenção em si podem fornecer (fabricar), induzível ou constitutivamente (por exemplo, osmo-responsivamente), proteínas novas ou adicionais que se ligam aos intensificadores transcrpcionais osmo-responsivos para "reforçar" a ativação de transcrição das sequências intensificadoras transcrpcionais osmo-responsivas presentes em uma construção da presente invenção.

[0185] Em outra modalidade, as proteínas novas ou adicionais que se ligam aos intensificadores transcrpcionais osmo-responsivos para "reforçar" a ativação de transcrição das sequências intensificadoras transcrpcionais osmo-responsivas estão presentes sobre outras construções que não um elemento regulatório transcrricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção.

[0186] Por exemplo, um método exemplificativo da invenção compreende uso de uma construção compreendendo TRE da presente invenção e outra construção de expressão (por exemplo, um vetor de expressão) para geração de novas ou sequências de ligação a intensificador transcrricional osmo-responsivas adicionais.

[0187] Por exemplo, uma construção da presente invenção pode codificar uma proteína de ligação a intensificador tonicidade-responsivo ou “proteína de ligação à TonE” ou “TonEBP” tendo a sequência (SEQ ID NO: 37):

1	MPSDFISLLS	ADLDLESPKS	LYSRESVYDL	LPKELQLPPS
	RETSVASMSQ TSGGEAGSPP			
61	PAVVAADASS	APSSSSMGGGA	CSSFTTSSSP	TIYSTSVTDS
	KAMQVESCSS AVGVSNRGVS			
121	EKQLTSNTVQ	QHPSTPKRHT	VLYISPPPED	LLDNSRMSCQ
	DEGCGLESEQ SCSMW MEDSP			
181	SNFSNMSTSS	YNDNTEVPRK	SRKRNPQKRP	GVKRRDCEES
	NMDIFDADSA KAPHYVLSQL			
241	TTDNKGNSKA	GNGTLENQKG	TGVKKSPMLC	GQYPVKSEGK
	ELKIVVQPET QHRARYLTEG			
301	SRGSVKDRTQ	QGFTVKLEG	HNEPVVLQVF	VGNDSGRVKP
	HGFYQACRVT GRNTTPCKEV			
361	DIEGTTVIEV	GLDPSNNMTL	AVDCVGILKL	RNADVEARIG
	IAGSKKKSTR ARLVFRVNIM			
421	RKDGSTLTQ	TPSSPILCTQ	PAGVPEILKK	SLHSCSVKGE
	EEVFLIGKNF LKGTKVIFQE			
481	NVSDENSWKS	EAEIDMELFH	QNHLIVKVPP	YHDQHITLPV
	SVGIYVVTNA GRSHDVQPFT			
541	YTPDPAAAGA	LNVNVKKEIS	SPARPCSFEE	AMKAMKTTGC
	NLDKVNIIPN ALMTPLIPSS			
601	MIKSEDVTPM	EVTAEKRSST	IFKTTKSVGS	TQQTLENISN
	IAGNGSFSSP SSSHLPSENE			
661	KQQQIQPKAY	NPETLTTIQT	QDISQPGTFP	AVSASSQLPN
	SDALLQQATQ FQTRETQSRE			
721	ILQSDGTVVN	LSQLTEASQQ	QQQSPLQEQA	QTLQQQISSN

IFPSPNSVSQ LQNTIQQQLQA

781 GSFTGSTASG SSGSVDLVQQ VLEAQQQLSS VLFSAPDGNE
NVQEQLSADI FQQVSQIQSG

841 VSPGMFSSTE PTVHTRPDNL LPGRAESVHP QSENTLSNQQ
QQQQQQQQVM ESSAAMVMEM

901 QQSICQAAAQ IQSELPSTA SANGNLQQSP VYQQTSHMMS
ALSTNEDMQM QCELFSSPPA

961 VSGNETSTTT TQQVATPGTT MFQTSSSGDG EETGTQAKQI
QNSVFQTMVQ MQHSGDNQPQ

1021 VNLFSSTKSM MSVQNSGTQQ QGNGLFQQGN EMMSLQSGNF
LQQSSHSQAQ LFHPQNPIAD

1081 AQNLSQETQG SLFHSPNPV HSQTSTTSSE QMQPPMFHSQ
STIAVLQGSS VPQDQQSTNI

1141 FLSQSPMNNL QTNTVAQEAF FAAPNSISPL QSTSNSEQQA
AFQQQAPIQH IQTPMLSQEQ

1201 AQPPQQGLFQ PQVALGSLPP NPMPQSQQGT MFQSQHSIVA
MQSNSPSQEQ QQQQQQQQQQ

1261 QQQQQQSILF SNQNTMATMA SPKQPPPNMI FNPQNPNMAN
QEQQNQSIFH QQSNMAPMNQ

1321 EQQPMQFQSQ STVSSLQNPG PTQSESSQTP LFHSSPQIQL
VQGSPSSQEQ QVTLFLSPAS

1381 MSALQTSINQ QDMQQSPLY S PQNNMPGIQG ATSSPQPQAT
LFHNTAGGTM NQLQNSPGSS

1441 QQTSGMFLFG IQNNCSQLLT SGPATLPDQL MAISQPGQPQ
NEGQPPVTTL LSQQMPENSP

1501 LASSINTNQN IEKIDLLVSL QNQGNNLTGS F

[0188] A sequência de ativação transcricional tonicidade-responsiva NFATc também pode ser usada nas construções da invenção; a via

de sinalização NFATc é descrita, por exemplo, em Li (2007) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292(5): C1606-16. A sequência responsiva à proteína de ligação a intensificador tonicidade-responsiva descrita, por exemplo, por Miyakawa (1999) "Tonicity-responsive enhancer binding protein, arel-like protein que stimulates transcrição in response to hypertonicity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5): 2538-2542 (vide também, por exemplo, Lopez-Rodriguez (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(13): 7214-7219), também pode ser usada para praticar a presente invenção. Essa proteína regula a expressão gênica induzida por estresse osmótico em células de mamífero. Diferente dos elementos monoméricos dessa família de proteína, essa proteína existe como um homodímero e forma dímeros estáveis com elementos de DNA. Múltiplas variantes de transcrito que codificam diferentes isoformas foram reveladas para esse gene. Uma isoforma que pode ser usada para praticar a presente invenção é (SEQ ID NO: 40):

```

1    MPSPDFISLLS    ADLDLESPKS    LYSRDSLKLH    PSQNFHFRAGL
LEESVYDLLP KELQLPPSRE
61    TSVASMSQTS    GGEAGSPPPA    VVAADASSAP    SSSSMGGACS
SFTTSSSPTI YSTSVTDSKA
121   MQVESCSSAV    GVSNRGVSEK    QLTSNTVQQH    PSTPKRHTVL
YISPPPEDLL DNSRMSCQDE
181   GCGLESEQSC    SMWMEDSPSN    FSNMSTSSYN    DNTEVPRKSR
KRNPQKQRPV KRRDCEESNM
241   DIFDADSAKA    PHYVLSQLTT    DNKGNSKAGN    GTLENQKGTG
VKKSPMLCGQ YPVKSEGKEL
301   KIVVQPETQH    RARYLTEGSR    GSVKDRTQQG    FPTVKLEGHN
EPVVLQVFVG NDSGRVKPHG
361   FYQACRVTGR    NTPCKEVDI    EGTTVIEVGL    DPSNNMTLAV
DCVGILKLRN ADVEARIGIA
421   GSKKKSTRAR    LVFRVNIMRK    DGSTLTLQTP    SSPILCTQPA

```

GVPEILKKSL HSCSVKGEEE

481 VFLIGKNFLK GTKVIFQENV SDENSWKSEA EIDMELFHQN
HLIVKVPPYH DQHITLPVSV

541 GIYVVTNAGR SHDVQPFTYT PDPAAGALNV NVKKEISSPA
RPCSFEEAMK AMKTTGCNLD

601 KVNIIPNALM TPLIPSSMIK SEDVTPMEVT AEKRSSTIFK
TTKSVGSTQQ TLENISNIAG

661 NGSFSSPSSS HLPSENEKQQ QIQPKAYNPE TLTTIQTQDI
SQPGTFPAVS ASSQLPNSDA

721 LLQQATQFQT RETQSREILQ SDGTVVNLSQ LTEASQQQQQ
SPLQEQAQLT QQQISSNIFP

781 SPNSVSQQLQN TIQQLQAGSF TGSTASGSSG SVDLVQQVLE
AQQQLSSVLF SAPDGNENVQ

841 EQLSADIFQQ VSQIQSGVSP GMFSSTEPTV HTRPDNLLPG
RAESVHPQSE NTLSNQQQQQ

901 QQQQQVMESS AAMVMEMQQS ICQAAAIQS ELFPSTASAN
GNLQQSPVYQ QTSHMMSALS

961 TNEDMQMQCE LFSSPPAVSG NETSTTTTQQ VATPGTTMFQ
TSSSGDGEET GTQAKQIQNS

1021 VFQTMVQMQH SGDNQPQVNL FSSTKSMMSV QNSGTQQQGN
GLFQQGNEMM SLQSGNFLQQ

1081 SSHSQAQLFH PQNPIADAQN LSQETQGSLF HSPNPIVHSQ
TSTTSSEQMQ PPMFHSQSTI

1141 AVLQGSSVPQ DQQSTNIFLS QSPMNNLQTN TVAQEAFFAA
PNSISPLQST SNSEQQAQFQ

1201 QQAPISHIQT PMLSQEQAQF PQQGLFQPQV ALGSLPPNPM
PQSQQGTMFQ SQHSIVAMQS

1261 NSPSQEQQQQ QQQQQQQQQQ QQQSILFSNQ NTMATMASPK

QPPPNMIFNP NQNPMANQEQ

1321 QNQSIFHQQS NMAPMNQEQQ PMQFQSQSTV SSLQNPGPTQ
SESSQTPLFH SSPQIQLVQG

1381 SPSSQEQQVT LFLSPASMSA LQTSINQQDM QQSPLYSPQN
NMPGIQGATS SPQPQATLFH

1441 NTAGGTMNQL QNSPGSSQQT SGMFLFGIQN NCSQLLTSGP
ATLPDQLMAI SQPGQPQNEG

1501 QPPVTTLLSQ QMPENSPLAS SINTNQNI EK IDLLVSLQNQ GNNLTGSF

[0189] Vide, por exemplo, Nagase (1998) *DNA Res.* 5(6): 355-364; Lopez-Rodriguez (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(13): 7214-7219; Miyakawa (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5): 2538-2542.

[0190] Conforme descrito acima, a invenção proporciona construções de ácido nucleico que, quando inseridas e expressas em uma célula (incluindo células em um biorreator, cultura de célula, implantes e semelhantes), conferem um fenótipo osmo-protetor a essa célula. Em modalidades alternativas, a invenção proporciona construções osmo-protetoras com capacidade intensificada, por exemplo, que também codificam um polipeptídeo de NFATc, um polipeptídeo de AP-1, um polipeptídeo de TonEBP, um polipeptídeo de calcineurina ou uma combinação dos mesmos. Uma capacidade osmo-protetora aumentada é obtida quando uma construção da invenção também expressa um polipeptídeo de NFATc porque, por exemplo, polipeptídeos de NFATc se ligam a intensificadores responsivos à tonicidade, resultando em mais (maior, mais alta) expressão de proteínas osmo-protetoras na célula. Uma capacidade osmo-protetora aumentada é obtida quando uma construção da invenção também expressa um polipeptídeo de AP-1 porque, por exemplo, polipeptídeos de AP-1 podem ser um cofator necessário para ligação do polipeptídeo de NFATc a intensificadores responsivos à tonicidade. Uma capacidade osmo-protetora aumentada é obtida quando uma construção da invenção também expresse um

polipeptídeo de TonEBP porque, por exemplo, proteínas TonEBP se ligam às sequências intensificadoras transcricionais TonEBP-responsivas da presente invenção. Os ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de NFATc, AP-1, TonEBP e/ou calcineurina podem também ser regulados por um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção ou por outro intensificador ou promotor.

[0191] Em uma modalidade alternativa, ao invés de serem expressos sobre a mesma construção que uma molécula de ácido nucleico osmo-responsiva ORE-TRE da invenção, os polipeptídeos de NFATc, AP-1, TonEBP e/ou calcineurina são expressos sobre construções distintas, por exemplo, vetores distintos, os quais podem ser episomais, construções de expressão transitória ou construções de expressão genomicamente integrados.

KITS E BIBLIOTECAS

[0192] A invenção proporciona kits compreendendo composições e métodos da invenção, incluindo células da invenção, sequências alvo, agentes de transfecção, agentes de transdução, instruções (com relação aos métodos da invenção) ou qualquer combinação dos mesmos. Como tal, kits, células, vetores e semelhantes são proporcionados aqui.

[0193] A invenção será ainda descrita com referência aos exemplos a seguir; contudo, deve ser entendido que a invenção não está limitada a tais exemplos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 - DESIGN DE ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANSCRICIONAIS HÍBRIDOS

OSMO-SENSÍVEIS

[0194] A invenção proporciona elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (ORTREs).

[0195] Esse exemplo descreve o uso de um sítio de ligação à TonE para criar um elemento regulatório transcricional híbrido sintético da presente

invenção e suas características de expressão quando de aumento das osmolalidades. Esses resultados demonstram que os elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos da presente invenção podem ser transativados de uma maneira osmo-dependente.

MÉTODOS

CONSTRUÇÃO DO PROMOTOR OSMO-RESPONSIVO POR1

[0196] O promotor osmo-responsivo POR1 foi clonado por meio de amplificação por PCR do promotor de CMV humano com oligos OLM155 5'-TTGACTAGTT**GGAAAATCACCAGA**ATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTC **CTGACTC**ATTGCTAGCTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTAC GGTGGGAG-3' (SEQ ID NO: 8) e a sequência de anelamento OLM165 5'-GGTGGTTTAATCGATAGAACC-3' (SEQ ID NO: 10) onde os sítios de ligação à TonE e AP1 estão em negrito, esses sítios de ligação, bem como a sequência entre os mesmos, são tidos como o elemento de resposta osmótica (OR), a sequência de anelamento está em itálico; um sítio de clonagem SpeI e um NheI são introduzidos, respectivamente, 5' e 3' do elemento de resposta osmótica (OR) e os sítios de clonagem estão sublinhados. O produto de PCR foi clonado no Topo, assim, resultando no pLM216. O promotor híbrido com seu íntron 3' diretamente foi excisado do pLM216 com (SpeI/Clal) e clonado no plasmídeo de expressão STIgMA-FC Stalkless (SpeI Clal), assim, resultando no pOsmo1 (POR1-Íntron-STIgMA-Fc-pA; POR1, OR-Pfragmento CMV).

CULTURA DE CÉLULA, TRANSFECCÃO

[0197] Células de ovário de Hamster chinês CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) foram crescidas em suspensão em um meio com baixo teor de proteína isento de soro (insulina recombinante humana). Protocolos de transfecção otimizados com LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram usados para a transfecção transitória em alta eficiência das células. Células transitoriamente transfectadas foram coletadas seis (6) horas pós-transfecção e

cultivadas em lâminas com seis (6) cavidades em meio contendo soro com aumento de osmolalidade. A osmolalidade do meio foi ajustada, em cada cavidade, adicionando um volume fixo de solução salina tamponada com fosfato com aumento da concentração de sal. Células transitoriamente transfectadas foram rotineiramente analisadas após 48 horas com relação à expressão de um gene de fusão Fc através de ELISA.

RESULTADOS

[0198] De forma a analisar o potencial do elemento osmo-responsivo para o design de um sistema de regulação de gene de mamífero para a produção biofarmacêutica e engenharia genética responsiva a estresse, nós fundimos o elemento osmo-responsivo do promotor de aldose redutase de camundongo (sequências -1053 a -1007), o qual contém um sítio TonE site e um AP-1 (Proteína-1 de Ativação) (vide, por exemplo, Daoudal *et al* 1997, supra) 5' da porção do promotor imediato precoce de citomegalovírus humano, assim, construindo o promotor osmo-responsivo POR1.

[0199] Nós construímos um plasmídeo no qual o promotor POR1 exemplificativo aciona a expressão de uma proteína de fusão Fc pOsmo1 (POR1-Íntron-STIgMA-Fc-pA; POR1 ou Pfragmento CMV). Após transfecção de plasmídeos de expressão de fusão Fc com um promotor constitutivo- (o promotor de citomegalovírus humano) ou POR1-acionada em células CHOK1 DUX-B11 (dhfr-), as células transfectadas foram cultivadas e crescidas durante 48 horas (h) em meio com aumento de osmolalidades. Os sobrenadantes das células foram, então, ensaiados quanto à expressão da fusão Fc, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 2, onde as osmolalidades são expressas como mOsm e a concentração de proteína do promotor constitutivo e do elemento regulatório transcricional POR1 da invenção em mg/L.

[0200] Os níveis de expressão do plasmídeo de expressão acionada por promotor constitutivo permaneceram estáveis de 300 a 400 mOsm e, então, diminuíram à medida que a osmolalidade aumentou adicionalmente. Isso provavelmente reflete comportamentos celulares bem descritos em alta osmolalidade: diminuição das taxas de crescimento celular e diminuição da viabilidade celular com aumento de osmolalidade.

[0201] Consequentemente, expressão constitutiva do gene repórter responde pelos efeitos de altas osmolalidades sobre a expressão de proteína recombinante.

[0202] O promotor de citomegalovírus humano e o promotor 1 osmo-responsivo acionam níveis de expressão de proteína recombinante equivalentes a 300 mOsm. À medida que a osmolalidade foi aumentada para 400 mOsm, os níveis de expressão POR1-acionada aumentaram e, então, diminuíram com aumento de osmolalidade. Contudo, os níveis de expressão POR1-acionada diminuíram em uma taxa muito mais lenta do que sua contraparte acionada por promotor constitutivo.

CONCLUSÃO

[0203] Comparação dos níveis de expressão de fusão Fc POR1 exemplificativo-acionada e constitutiva-acionada indica que mesmo embora a fisiologia das células seja afetada em altas osmolalidades e, assim, a produção global de proteína diminuía, o POR1 exemplificativo da invenção aciona maiores níveis de expressão de proteína do que o promotor de CMV no meio hiperosmótico. Esses resultados demonstram que os elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos da presente invenção podem ser trans-ativados de uma maneira osmo-dependente quando transfectados em células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-). Assim, esses resultados demonstram que os elementos regulatórios transcricionais da invenção, conforme exemplificado por essa expressão de transgene POR1-acionada, podem ser

usados como um sensor de osmolalidade em tempo real.

EXEMPLO 2 - DESIGN DE UMA SÉRIE DE ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANSCRICIONAIS

OSMO-RESPONSIVOS

[0204] Esse exemplo descreve o design e testagem de uma série de elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos da presente invenção. Nós testamos o impacto do aumento do número de elementos osmo-responsivos em uma construção da presente invenção sobre uma janela de expressão de proteína recombinante sobre o aumento de osmolalidades. A Figura 3 ilustra esquematicamente como três elementos regulatórios transcrpcionais osmo-responsivos sintéticos exemplificativos da presente invenção foram construídos.

MÉTODOS:

CONSTRUÇÃO DOS PROMOTORES OSMO-RESPONSIVOS

[0205] POR1 foi excisado do pOsmo1 (SpeI/ClaI) e clonado no pOsmo1 (NheI/ClaI), assim, resultando em um promotor híbrido osmo-responsivo contendo 2 elementos osmóticos responsivos: pLM217 (POR2-Íntron). Da mesma forma, POR3 foi construído pela excisão de POR2-Íntron do pLM217 (SpeI/ClaI) e inserção no pOsmo1 (NheI/ClaI), assim, resultando no pOsmo2 (POR3-Íntron-STIgMA-Fc-pA; POR3, OR-OR-OR-Pfragmento CMV). POR2-Íntron foi excisado do pLM217 (SpeI/ClaI) e clonado no pLM217 (NheI/ClaI), assim, resultando no pLM218: POR4-Íntron (POR4, OR-OR-OR-OR-Pfragmento CMV). POR4-Íntron foi excisado do pLM218 (SpeI/ClaI) e ligado no pOsmo2 (NheI/ClaI), assim, resultando no pOsmo3 (POR7-Íntron-STIgMA-Fc-pA; POR7, OR-OR-OR-OR-OR-OR-OR-Pfragmento CMV).

CULTURA DE CÉLULA, TRANSFECCÃO

[0206] Células de ovário de Hamster chinês CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) foram crescidas em suspensão em um meio com baixo teor de proteína isento de soro (insulina humana recombinante). Protocolos de transfecção

otimizados com LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram usados para transfecção transitória em alta eficiência das células. Células transitoriamente transfectadas foram coletadas 6 horas pós-transfecção e cultivadas em lâminas com 6 cavidades contendo meio com aumento de osmolalidade. A osmolalidade do meio foi ajustada em cada cavidade mediante a adição de um volume fixo de solução salina tamponada com fosfato com aumento da concentração de sal. Células transitoriamente transfectadas foram rotineiramente analisadas após 48 horas quanto à expressão do gene de fusão Fc através de ELISA.

RESULTADOS

[0207] De forma a avaliar o impacto de um aumento do número de elementos osmo-responsivos 5' do fragmento promotor de citomegalovírus humano, nós construímos outros dois promotores osmo-responsivos trazendo 3 ou 7 elementos osmo-responsivos clonados lado a lado: POR3 e POR7, conforme ilustrado na Figura 3. Células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) foram transfectadas com o plasmídeo de expressão de fusão Fc acionado pelo promotor constitutivo de citomegalovírus humano ou o promotor osmo-responsivo 3, POR3 ou o promotor osmo-responsivo 7, POR7. Seis (6) horas pós-transfecção, as células foram coletadas e cultivadas em meio com aumento de osmolalidade. Expressão constitutiva do gene repórter não sofreu um impacto significativo pela osmolalidade entre 300 mOsm e 400 mOsm, o nível de expressão de fusão Fc, então, diminuiu à medida que a osmolalidade aumentou, conforme ilustrado na Figura 4, a qual ilustra esquematicamente a eficácia osmo-protetora *in vivo* dos elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (OR-TREs) exemplificativos da presente invenção ilustrados na Figura 3; vide também os dados normalizados na Figura 5.

[0208] Os níveis de expressão de fusão Fc POR3-acionada

eram metade dos níveis de expressão constitutiva de suas contrapartes em meio isotônico, conforme ilustrado na Figura 4. À medida que a osmolalidade do meio aumentava de 300 mOsm para 500mOsm, expressão acionada por POR3 aumentou para um pico de 1,5 vezes os níveis de expressão isotônica e, então, diminuiu com a osmolalidade de 500 mOsm até 700 mOsm.

[0209] Os níveis de expressão de fusão Fc POR7-acionada eram quinze vezes menor do que suas contrapartes de expressão constitutiva em meio isotônico, conforme ilustrado na Figura 4. À medida que a osmolalidade aumentou de 300 mOsm para 550 mOsm, os níveis de expressão de fusão Fc POR7-acionada aumentaram para um máximo de quatro vezes os níveis de expressão isotônica e, então, diminuíram com a osmolalidade. Os dados são normalizados na Figura 5.

CONCLUSÃO

[0210] Quanto mais elementos osmo-responsivos (maior número de) são codificados (inseridos) dentro de elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (OR-TREs) (também denominados “promotores osmo-responsivos híbridos”) da presente invenção, menor o nível de expressão de transgene em meio isotônico - mas maior seu fator de indução (a proporção de seus níveis máximos de expressão para os níveis de expressão isotônica). Assim, nós construímos uma série de promotores osmo-responsivos que proporcionam uma variedade de janelas de expressão de transgene e fatores de indução; e a invenção proporciona uma variedade de elementos regulatórios transcricionais osmo-responsivos (OR-TREs) tendo um ou uma pluralidade de elementos osmo-responsivos manipulados na construção; por exemplo, tendo uma ou uma pluralidade de sequências intensificadoras de proteína de ligação a intensificador de tonicidade (TonEBP)-responsivas (motivos de TonEBP-ligação) e as modalidades alternativas, também opcionalmente tendo um ou uma

pluralidade de sítios de ligação à proteína AP-1 (motivos de ligação à AP-1).

NÍVEIS DE EXPRESSÃO NORMALIZADA

ANÁLISE DE DADOS

[0211] A diminuição relativa nos níveis de expressão constitutiva de expressão isotônica para hipertônica é indicativa da diminuição osmo-relacionada na produção de proteína em virtude de crescimento e viabilidade celular inibidas. Assim, nós normalizamos os níveis de expressão POR3- e POR7-acionada com seus níveis de expressão constitutiva; vide Figura 4.

CONCLUSÃO

[0212] Esse exemplo apresenta dados demonstrando como o aumento do número de elementos osmo-responsivos codificados nas construções da presente invenção (o elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) da presente invenção ou “promotor osmo-responsivo”) diminui os níveis de expressão isotônica de uma maneira dependente do número de elementos osmo-responsivos. Esse exemplo também apresenta dados que demonstram que o nível real de transativação desses promotores pelas construções exemplificativas da presente invenção aumenta com a osmolalidade de uma maneira linear, de 350 mOsm para 700 mOsm.

EXEMPLO 3 - MODULAÇÃO GÊNICA TRANSCRICIONAL E PÓS-

TRANSCRICIONAL OSMO-SENSÍVEL

[0213] Esse exemplo descreve construções exemplificativas da invenção tendo uma modulação gênica transcricional e pós-transcricional osmo-sensível combinada; por exemplo, as construções exemplificativas da invenção são capazes de sobre-regular positivamente os níveis de expressão transcricional e pós-transcricional de mensagem e polipeptídeo, respectivamente, sob condições de estresse osmótico (por exemplo, alta concentração de sal).

[0214] Modalidades alternativas combinam osmo-regulação com

controles dos níveis transcricionais e/ou pós-transcricionais (por exemplo, traducional): (1) (em um nível transcricional) em um promotor osmo-responsivo de mamífero endógeno e/ou um promotor osmo-responsivo eucariota sintético da presente invenção; e (2) (em um nível pós-transcricional) mediante incorporação de uma ou mais sequências ou motivos transcricionais ou traducionais. Esses controles podem ser incorporados (manipulados) em uma construção da invenção, de modo que qualquer mensagem (transcrito) gerada a partir dessa construção tem uma região 5' e/ou 3' não traduzida osmo-sensível; e em uma modalidade, controla níveis transcricionais e/ou pós-transcricionais (por exemplo, traducionais) adicionais.

[0215] Por exemplo, a presença de sequências ou motivos de controle de nível transcricional e/ou pós-transcricional (por exemplo, traducional) ou motivos gera um mRNA (uma mensagem) que é mais estável e/ou mais duradoura, por exemplo, mais estável e/ou mais duradoura em condições de hiperosmolalidade (por exemplo, um ambiente hiperosmótico); assim, resultando em expressão aumentada de proteína recombinante em condições de hiperosmolalidade, por exemplo, em altas osmolalidades. Essa modalidade reforça o fator de regulação entre expressão basal em meio isotônico e indução gênica máxima em condições de hiperosmolalidade, por exemplo, em meio hiperosmótico.

[0216] **Exemplo 4:** O rendimento da produção de proteína recombinante acionada por um promotor constitutivo diminui constantemente à medida que a osmolalidade aumenta. Nós imaginamos que a introdução de elemento(s) osmo-responsivo(s) em um promotor constitutivo poderia transativar adicionalmente o promotor constitutivo e contra-equilibrar os efeitos negativos de hipertonidade sobre a produção de proteína recombinante. De forma a testar essa hipótese, nós introduzimos um, três ou sete elementos osmo-responsivos entre o intensificador do promotor de CMV humano e P_{fragmento CMV}.

MÉTODOS:

CONSTRUÇÃO DOS PROMOTORES OSMO-RESPONSIVOS

[0217] O intensificador do promotor de CMV humano foi amplificado por PCR com oligos OLM401: 5'-**CAAGCTT****GACTAGT**CAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT-3' (SEQ ID NO: 38) e OLM400: 5'-**AGCTAGC**ACACCGTACACGCCTACCG-3' (SEQ ID NO: 39) (sítios de restrição em negrito, sequência de anelamento em itálico). O produto de PCR foi digerido com HindIII e NheI, P_{OR1}-Íntron foi excisado de um plasmídeo intermediário (SpeI/EcoRI), ambos os fragmentos de DNA foram clonados em outro plasmídeo intermediário (HindIII/EcoRI), assim, resultando em: PconstOR1-Íntron: E_{hCMV}OR1P_{fragmento CMV-Íntron}. A mesma estratégia foi usada para construir o PconstOR3-Íntron: E_{hCMV}OR3P_{fragmento CMV-Íntron} e PconstOR7-Íntron: E_{hCMV}OR7P_{fragmento CMV-Íntron}.

[0218] PconstOR1 foi excisado do plasmídeo intermediário (SpeI/ClaI) e clonado no pOsmol (SpeI/ClaI), assim, resultando em: pconstOsmo1 (PconstOR1-Íntron-STIgMA-Fc-pA; PconstOR1: E_{hCMV}-P_{OR1}). A mesma estratégia foi usada para construir o pconstOsmo3 (PconstOR3-Íntron-STIgMA-Fc-pA; PconstOR3: E_{hCMV}-P_{OR3}) e pconstOsmo7 (PconstOR7-Íntron-STIgMA-Fc-pA; PconstOR7: E_{hCMV}-P_{OR7}) foram construídos.

CULTURA DE CÉLULA, TRANSFECCÃO

[0219] Células de ovário de Hamster chinês CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) foram crescidas em suspensão em um meio com baixo teor de proteína isento de soro (insulina recombinante humana). Protocolos otimizados de transfecção com lipofectamina foram usados para transfecção transitória altamente eficiente das células. Células transitoriamente transfectadas foram coletadas 6 horas pós-transfecção e cultivadas em lâminas com 6 cavidades em meio contendo soro em osmolalidade aumentada. A osmolalidade do meio foi ajustada em cada cavidade mediante a adição de um volume fixo de solução

salina tamponada com fosfato com aumento da concentração de sal. Células transitoriamente transfectadas foram rotineiramente analisadas com um ensaio de expressão de gene de fusão Fc realizado através de ELISA.

RESULTADOS

[0220] De forma a avaliar o impacto da introdução de um aumento do número de elementos osmo-responsivos 3' do intensificador do promotor de citomegalovírus humano e 5' do fragmento de promotor de citomegalovírus humano, nós construímos três promotores trazendo 1, 3 ou 7 elementos osmo-responsivos clonados lado a lado: PconstOR1, PconstOR3, PconstOR7. Células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) foram transfectadas com um plasmídeo de expressão de fusão Fc acionado pelo promotor constitutivo de citomegalovírus humano ou um desses promotores manipulados. 6 horas pós-transfecção, as células foram coletadas e cultivadas em meio para aumento de osmolalidade.

[0221] Expressão constitutiva do gene repórter diminuiu constantemente à medida que a osmolalidade aumentava (**Figura 6**).

[0222] Para nossa surpresa, introdução de um elemento osmo-responsivo entre o intensificador e o fragmento do promotor de CMV levou a uma duplicação de expressão de proteína recombinante em meio isotônico. Entre 300 mOsm/Kg e 450mOsm/Kg, os níveis de expressão da proteína recombinante de interesse acionados por PconstOR1 foram mantidos nesse alto nível e, então, diminuídos com a osmolalidade de 500 mOsm/Kg até 700 mOsm/Kg.

[0223] A introdução de três elementos osmo-responsivos dentro do promotor de CMV humano constitutivo levou a um ligeiro aumento na expressão de proteína recombinante comparado com o promotor de CMV do tipo silvestre a 300 mOsm/Kg. Em contraste, a introdução de sete elementos osmo-responsivos levou a uma ligeira diminuição de expressão de proteína recombinante em meio isotônico. Os níveis de expressão de fusão Fc acionada pelo promotor de CMV modificado para conter três ou sete elementos osmo-responsivos aumentaram de 300 mOsm/Kg para

400 mOsm/Kg e, então, diminuíram constantemente até 700 mOsm/Kg.

CONCLUSÃO

[0224] Introdução de um elemento osmo-responsivo dentro do promotor de CMV humano leva a uma duplicação nos níveis de proteína recombinante a 300 mOsm/Kg. Esse foi um resultado inesperado.

[0225] A presença de elementos osmo-responsivos permite contra-equilibrar os efeitos de osmolalidade aumentada sobre a expressão de proteína recombinante e, quando três ou sete elementos osmo-responsivos são introduzidos, níveis de expressão recombinante são sobre-regulados, com aumento de osmolalidade para atingir um máximo a 400 mOsm/Kg e, então, diminuem continuamente.

[0226] Uma série de modalidades da invenção foram descritas. Todavia, será entendido que diversas modificações podem ser feitas sem se desviar do espírito e escopo da invenção. Consequentemente, outras modalidades estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. VETOR, caracterizado por compreender uma molécula de ácido nucleico que compreende: pelo menos um elemento regulatório transcricional osmo-responsivo (OR-TRE) compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 operacionalmente ligada a um regulador transcricional heterólogo, e uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína heteróloga operacionalmente ligada ao regulador transcricional, em que o regulador transcricional heterólogo compreende os nucleotídeos 65 a 106 da SEQ ID NO: 8.

2. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo referido regulador transcricional compreender um promotor, um intensificador ou uma combinação dos mesmos.

3. VETOR, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo referido regulador transcricional compreender um promotor imediato precoce de citomegalovírus humano.

4. VETOR, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo referido pelo menos um OR-TRE estar posicionado 5' do referido promotor.

5. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender três do referido OR-TRE.

6. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender sete do referido OR-TRE.

7. VETOR, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo referido regulador transcricional compreender ainda um intensificador precoce imediato de citomegalovírus humano.

8. VETOR, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo referido pelo menos um OR-TRE estar posicionado 3' do referido intensificador.

9. VETOR, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo referido regulador transcricional compreender ainda um íntron de

citomegalovírus humano posicionado 5' da referida molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína heteróloga.

10. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela referida proteína heteróloga ser uma proteína ou peptídeo osmo-protetor.

11. VETOR, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela referida proteína ou peptídeo osmo-protetor ser uma prolina ou uma glicina-betaína, um transportador de taurina, um transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, um cotransportador de sódio-*mio*-inositol, uma proteína de choque térmico, uma aquaporina ou uma aldose redutase, ou uma esterase que objetiva neuropatia (NTE).

12. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela referida proteína heteróloga ser um polipeptídeo TonEBP.

13. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela referida proteína heteróloga ser selecionada a partir do grupo que consiste em uma proteína anti-apoptótica; uma proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula; uma proteína chaperona envolvida na facilitação de dobramento de proteína; uma proteína envolvida em secreção extracelular de proteínas; uma enzima glicolítica; uma proteína de regulação do ciclo celular; uma enzima de glicosilação ou qualquer combinação dos mesmos.

14. VETOR, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela proteína anti-apoptótica ser Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 ou Bcl-w.

15. VETOR, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela proteína que confere resistência ao estresse oxidativo a uma célula ser uma superóxido dismutase, uma catalase, uma glutational peroxidase, uma peroxiredoxina, uma sulfiredoxina, tioredoxina, tioredoxina redutase, tioredoxina peroxidase, tioltransferase, glutaredoxina ou uma glutational redutase.

16. VETOR, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado

pela proteína chaperona envolvida na facilitação de dobramento de proteína ser uma proteína de ligação de imunoglobulina (BiP), calnexina, calreticulina, ERp57 ou uma proteína dissulfeto isomerase (PDI).

17. VETOR, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela enzima glicolítica ser uma piruvato carboxilase ou uma piruvato quinase.

18. VETOR, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela proteína de regulação de ciclo celular ser uma ciclina ou uma quinase ciclina-dependente, ou um inibidor de uma ciclina ou de uma quinase ciclina-dependente.

19. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo referido vetor ser um plasmídeo.

20. VETOR, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela referida molécula de ácido nucléico compreender ainda pelo menos um OR-TRE adicional compreendendo a sequência de ácido nucléico de SEQ ID NO: 7 operacionalmente ligada a um regulador transcricional adicional, e uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína heteróloga adicional operacionalmente ligada ao regulador transcricional adicional, em que o regulador transcricional heterólogo compreende os nucleotídeos 65 a 106 da SEQ ID NO: 8.

Fig. 1a

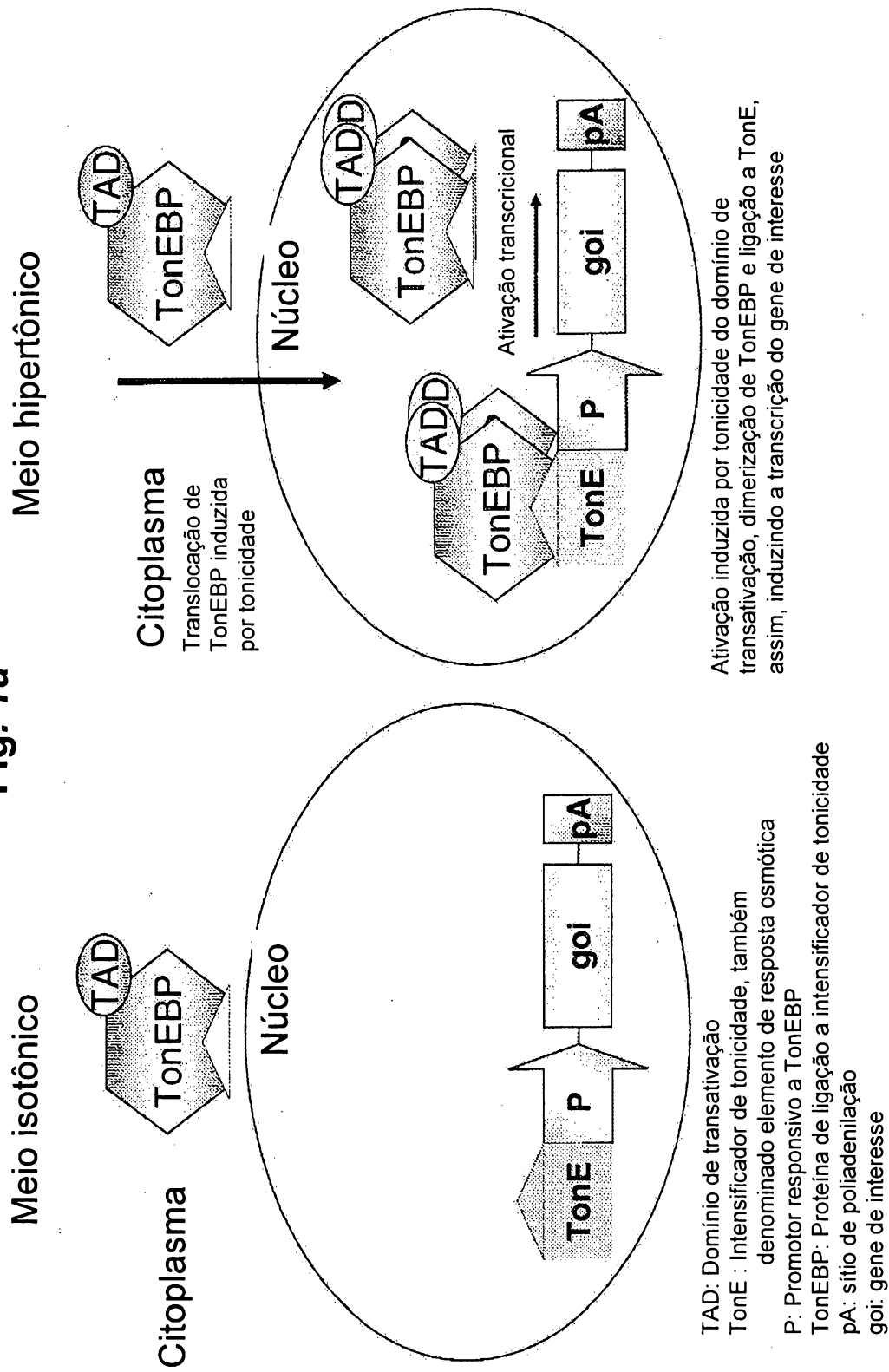


Fig. 1b

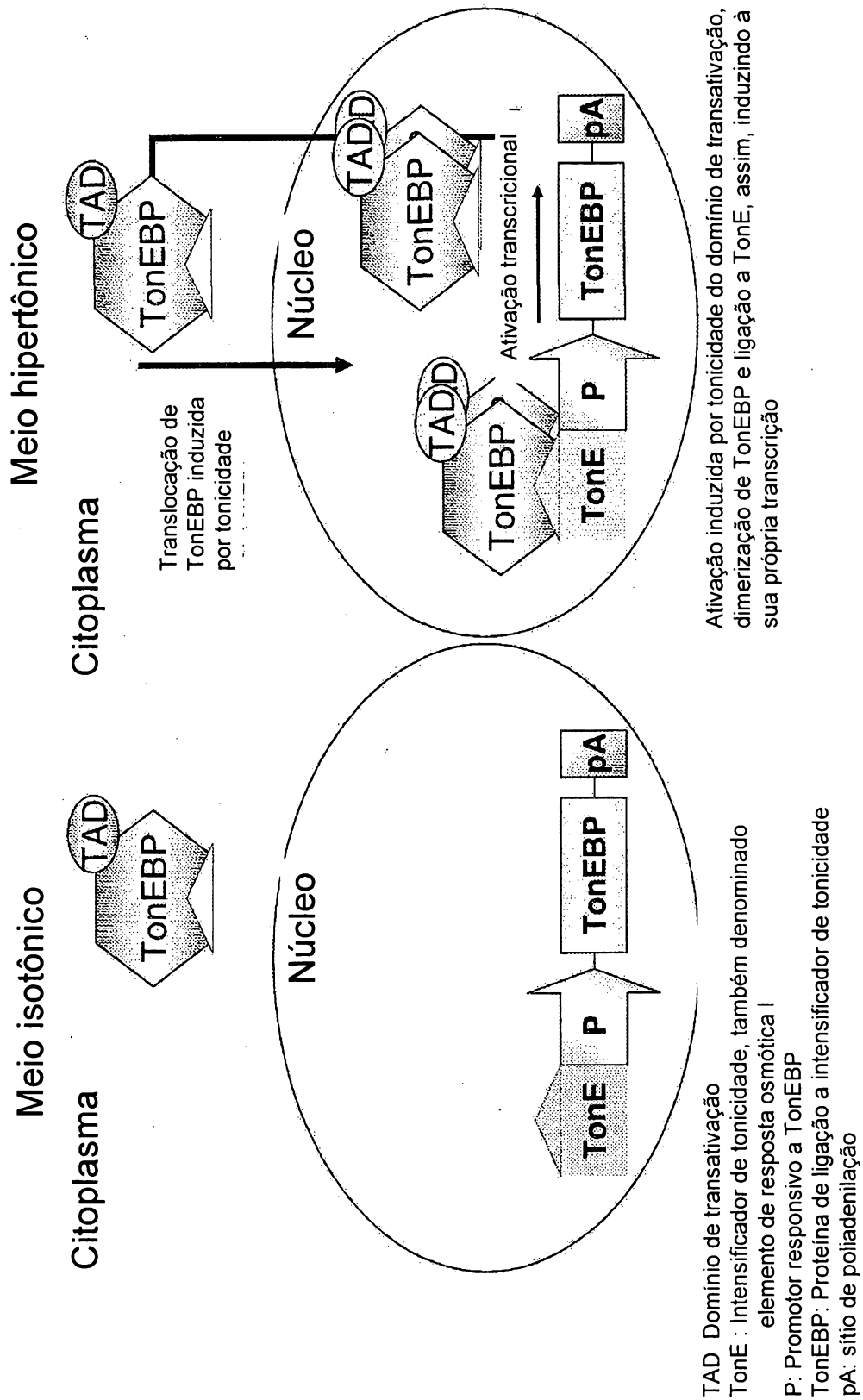


Fig. 2

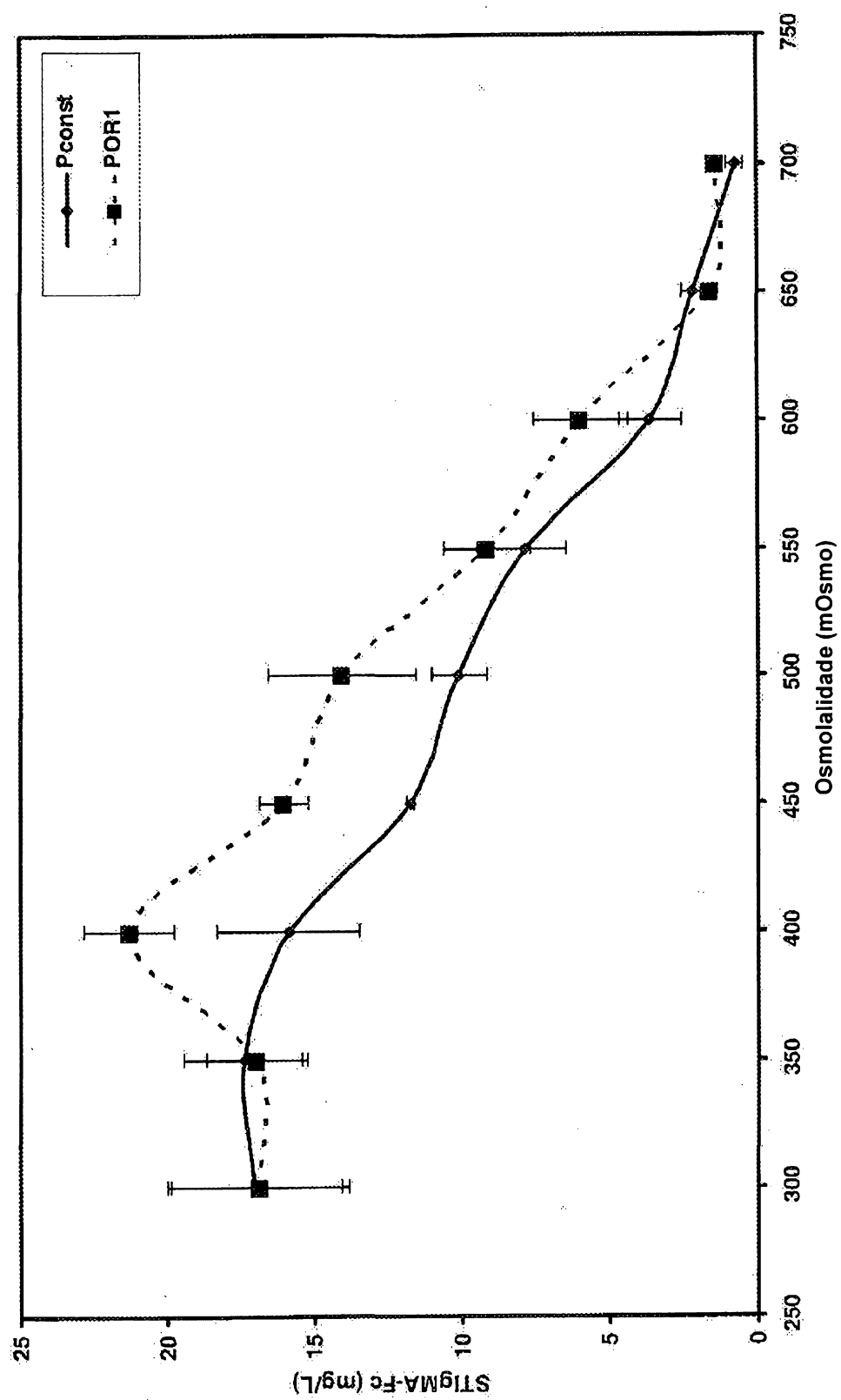


Fig. 3

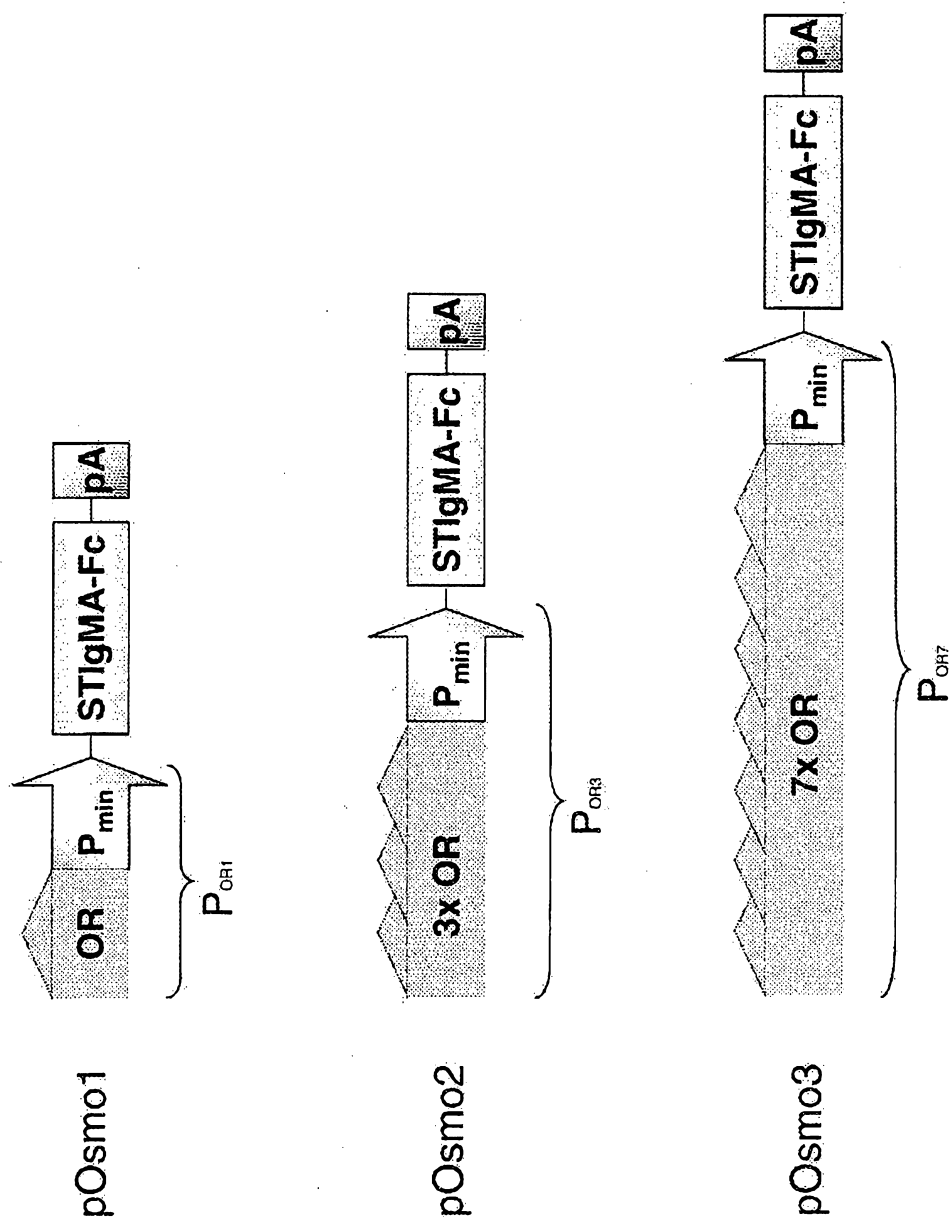


Fig. 4

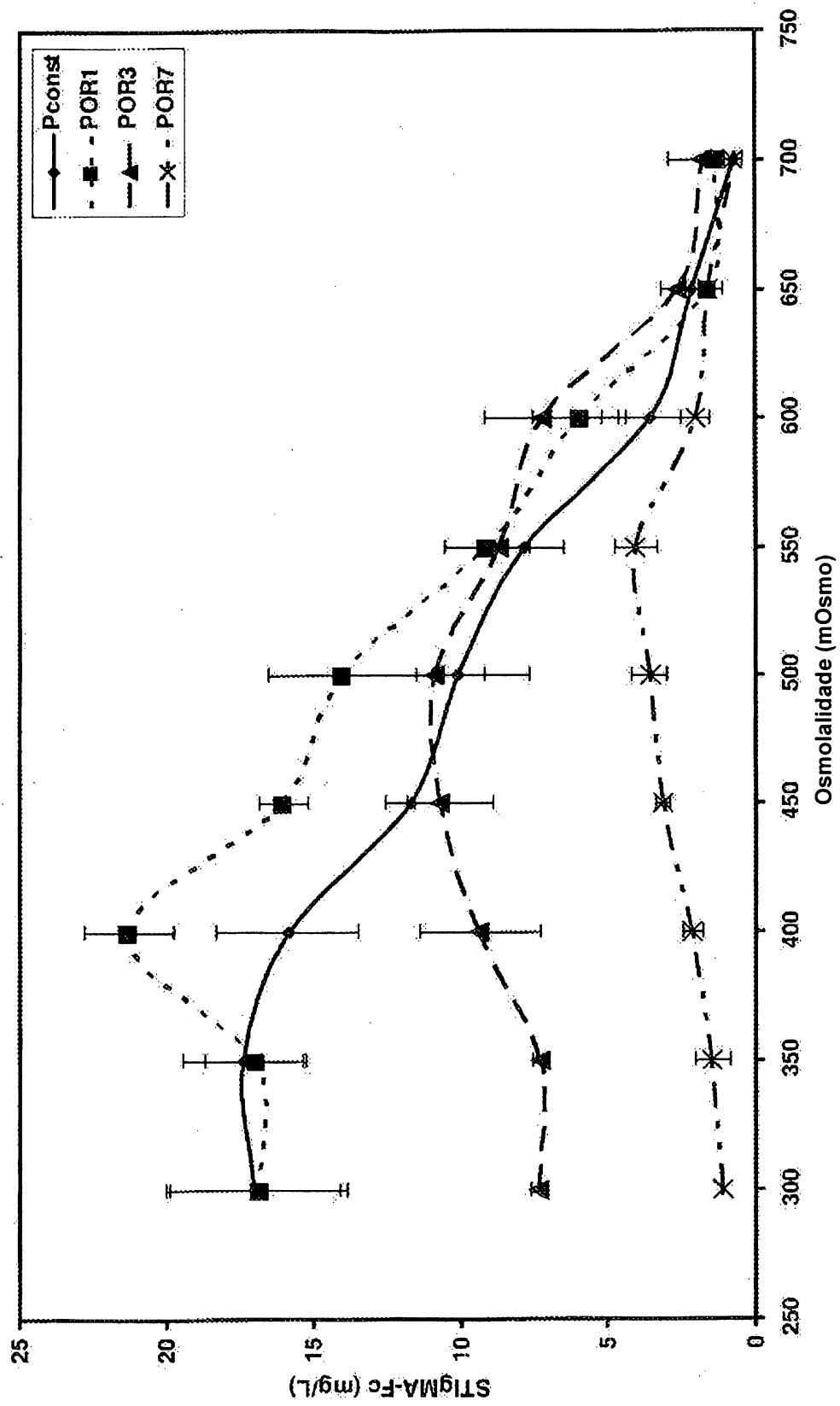


Fig. 5

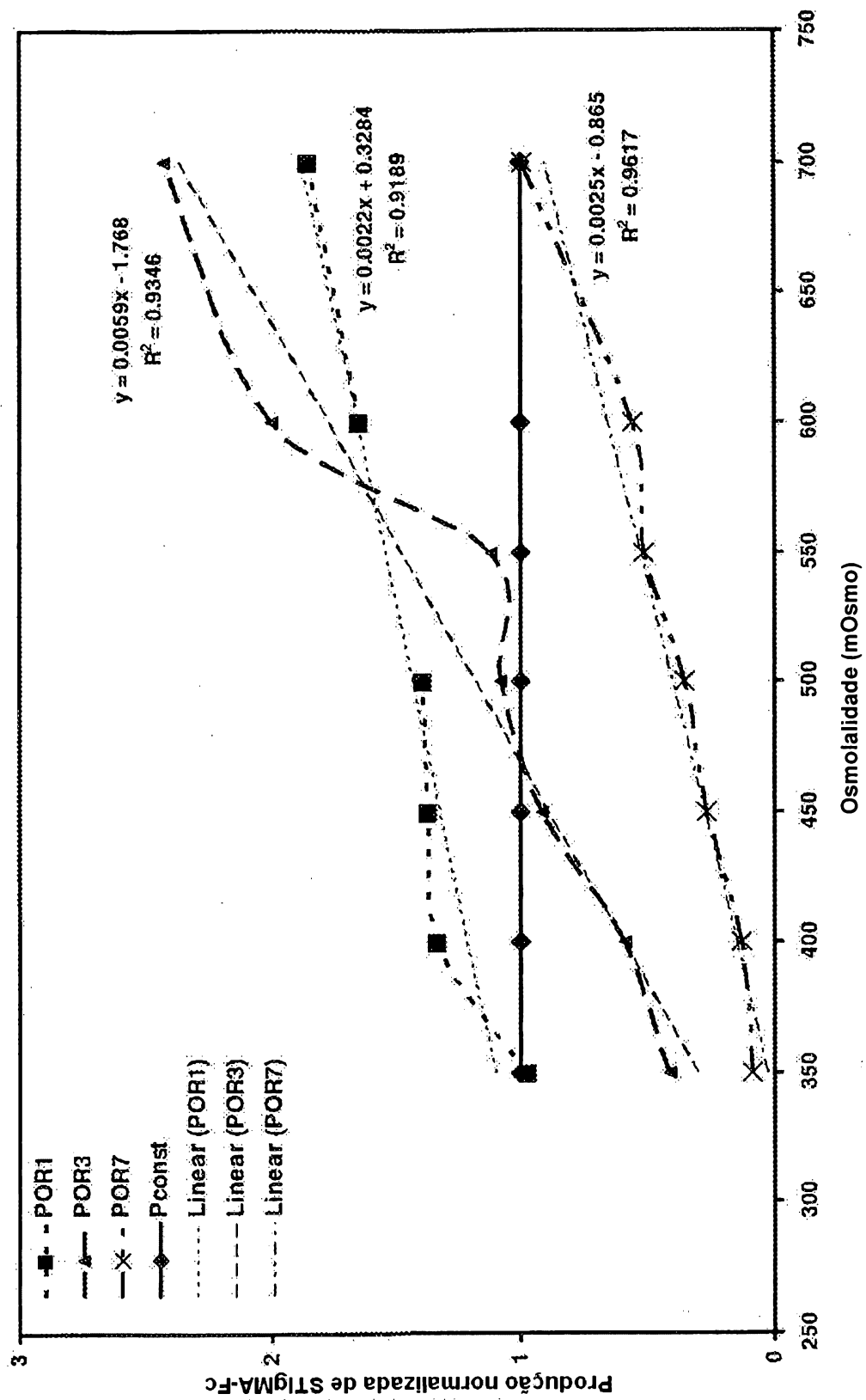


Fig. 6

