

## Production of Recombinant Therapeutic Proteins in Genetically Engineered Animals: the Dawn of a New Era

Produção de proteínas terapêuticas recombinantes  
em animais geneticamente modificados: o surgimento de uma nova era

Leonardo Tondello Martins<sup>1</sup>, Kaio Cesar Simiano Tavares<sup>1</sup>, Louhanna Pinheiro Rodrigues Teixeira<sup>1</sup>,  
Francisco Eder de Moura Lopes<sup>1</sup>, Saul Gaudencio Neto<sup>1</sup>, Carlos Enrique Méndez Calderón<sup>1</sup>,  
Luis Henrique de Aguiar<sup>1</sup>, Igor de Sá Carneiro<sup>1</sup>, Cícera Regina Lazzarotto<sup>1</sup>,  
Marcelo Bertolini<sup>1,2</sup> & Luciana Relly Bertolini<sup>1,3</sup>

### ABSTRACT

**Background:** The production of transgenic animals has been envisioned as a viable strategy to improve food quality, animal yield, and for the production of bioproducts that can be used for the benefit of the human and animal population. Transgenic animals have been used to improve production traits, to add value to animal products, to minimize the impact on the environment, to promote disease resistance, and most notably, to produce recombinant proteins in natural fluids, such as milk, that can be collected, purified and used as biomedical products (*biopharming*). This review aims to discuss past and recent technological advances in animal transgenesis, and the perspective for *biopharming* in Brazil.

**Review:** Since the production of recombinant human insulin from *Escherichia coli* in the 1970s, continuous development of new platforms has allowed a significant expansion in the biopharmaceutical market. The animal platform has been shown to be highly competitive by adding value as low cost implementation, production and scale up, as well as high productivity of synthesized proteins. The expression of recombinant proteins in milk represents the most developed system for production of biopharmaceutical drugs in animals, with two approved biopharmaceuticals for human use: Atryn<sup>®</sup>, a recombinant antithrombin produced in the milk of goats, approved in 2006 by European Medicines Agency (EMA) and in 2009 by US Food and Drug Administration (FDA), and more recently, Ruconest<sup>®</sup>, a recombinant human C1 esterase inhibitor protein (C1INH) produced in the milk of rabbits, first approved by EMA in 2012, followed by the FDA approval in 2014. Transgenic animals have been produced by many strategies that have gradually evolved over the decades, including the use of embryo microinjection, viral vectors and transposable elements, sperm-mediated gene transfer, and cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT). Transgenesis in livestock animals still faces some challenges, mainly due to random transgene integration and lack of control over transgene copy number. Recent developments by the use of specific DNA editing nucleases (zinc-finger, TALE, CRISPR/Cas9 nucleases) has improved efficiency and control over the integration of exogenous DNA into the host genome. In addition, the use of adenoviral vectors for transient transgene expression have been a valuable strategy, providing rapid and cost-effective evaluation of gene constructs and characterization of recombinant target proteins in the mammary gland prior to transgenesis. Such approaches, when combined, allow precise genomic modifications for a more effective use of the animal platform for recombinant protein production.

**Conclusion:** Several technological advancements attained in the field of molecular biology in the past half a century have provided a realm of clever strategies and elegant tools for a more efficient use in genetic engineering for the production of complex recombinant proteins, for which, the animal platform stands out. The mammary gland expression system for the production of functional proteins in the milk of animals has been proven as a viable technological alternative to aid in the resolution of problems of the modern world. Despite some skepticism, the transgenic animal platform has already been translated in the development of new drugs, procedures and even therapies to the benefit of animals and humans. By critically evaluating the current scientific, technological, legal and regulatory scenarios in Brazil, a favorable moment is present for the consolidation of national intellectual and technological know-how in *biopharming*, minimizing the current large national dependence on foreign products.

**Keywords:** transgenesis, pronuclear microinjection, animal cloning, mammary gland, genome editing nucleases, biopharmaceuticals, *biopharming*.

**Descritores:** transgênese, microinjeção pró-nuclear, clonagem animal, glândula mamária, nucleases de edição de genoma, biofármacos.

Received: 4 August 2015

Accepted: 27 November 2015

Published: 30 December 2015

<sup>1</sup>Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará, Brazil. <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre. CORRESPONDENCE: L.R. Bertolini [luciana.bertolini@pucrs.br - Tel.: +55 (51) 3353-4514]. Laboratório de Biotecnologia Animal, Prédio 12, Sala 114C. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga n. 6681, Bairro Partenon. CEP 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

## I. INTRODUÇÃO

### II. PLATAFORMAS PARA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS

1. Modelo procarionte
2. Leveduras
3. Células de insetos/baculovirus
4. Plantas transgênicas
5. Células mamíferas em cultivo
6. Plataforma animal

### III. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA PLATAFORMA ANIMAL

### IV. PRINCIPAIS TECNOLOGIAS PARA A GERAÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

1. Microinjeção pró-nuclear em zigotos
2. Clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS)

### V. TECNOLOGIAS-SUPORTE EMERGENTES PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA PLATAFORMA ANIMAL

1. Nucleases para edição do genoma e o potencial na transgênese por gene targeting
  - 1.1. Zinc-finger Nucleases (ZFN)
  - 1.2. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)
  - 1.3. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9 nuclease (CRISPR/Cas9)
2. Vetores adenovirais para análise de viabilidade de modelos para produção de biofármacos na glândula mamária

### VI. PERSPECTIVAS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS NO BRASIL E NO MUNDO

### VII. CONCLUSÕES

#### I. INTRODUÇÃO

A engenharia genética aplicada à produção de organismos geneticamente modificados (OGMs) representa uma das grandes conquistas da ciência moderna no último meio século que tem possibilitado ao homem ultrapassar as fronteiras do que foi convencionalmente explorado na natureza, sobretudo no campo da biomedicina. Neste contexto, a produção de animais geneticamente modificados, vislumbrada inicialmente como uma alternativa tecnológica para melhorar a qualidade dos alimentos e a produção animal, tem sido direcionada como uma plataforma de crescente importância para a produção de bioprodutos e biofármacos que possam ser utilizados para o benefício da população humana e animal. Porém, antes de iniciar-se uma discussão sobre o uso da engenharia genética para fins de modificações genômicas em organismos vivos, cabe diferenciarmos um OGM de um organismo transgênico. Enquanto um OGM é todo e qualquer organismo cujo material genético tenha sido alterado por meio de técnicas de engenharia genética, um organismo transgênico, um termo cunhado por Gordon & Ruddle em 1981 [68],

é um organismo que possui uma incorporação estável de DNA exógeno em seu genoma com transmissão germinativa de forma Mendeliana. Portanto, todo o organismo transgênico é um OGM, mas nem todo o OGM é um transgênico, o que traz conotações importantes na atualidade, pelo desenvolvimento de tecnologias de manipulação genômica, como as nucleases de edição de DNA, que podem gerar um OGM transgênico ou não-transgênico, como discutido abaixo.

Em meio a tantos avanços nas áreas de biologia molecular e biologia do desenvolvimento desde o século XX, a busca pela manipulação genética em organismos vivos tem base concreta com o surgimento da tecnologia de DNA recombinante na década de 70, pela descoberta das enzimas de restrição do tipo II [175], que permitiu a manipulação do DNA de forma previsível e repetível, advindas do sucesso de uma simples introdução de uma sequência de DNA em plasmídeo [97]. Logo, e logicamente, a proposta de aplicação de tal tecnologia em organismos complexos passou a nutrir o interesse de diversos grupos de pesquisadores em países desenvolvidos, como por exemplo, a microinjeção de DNA de SV40 na blastocela de embriões murinos [98], que resultou em animais geneticamente modificados, porém sem transmissão germinativa do transgene. Com o refinamento de procedimentos já estabelecidos em embriologia, como a microinjeção de pró-núcleos em zigotos ainda na década de 60 [123], iniciaram-se esforços para geração de organismos transgênicos a partir da manipulação de embriões, que culminaram nos trabalhos pioneiros de geração de camundongos transgênicos por Frank Ruddle e colaboradores no início da década de 80 [68,69], seguidos por Franklin Constantini & Elizabeth Lacy [38] e Ralph Brinster e colaboradores [22]. Tais sucessos levaram o grupo de Ralph Brinster ao desenvolvimento dos primeiros mamíferos domésticos transgênicos com alteração de função com relevância biológica (hormônio do crescimento), inicialmente em camundongos [146], e posteriormente em leporinos, ovinos e suínos [75].

A despeito do grande potencial inicial em aspectos zootécnicos e de produção instigado pelos primeiros modelos transgênicos em animais, os maiores avanços e investimentos de tempo e esforços da transgênese animal, considerando o refinamento técnico-científico e a aceitabilidade social e mercadológica, tem ocorrido no campo biomédico. Especificamente,

a manipulação genética tem proporcionado a rápida criação e exploração de organismos transgênicos, incluindo animais, potencialmente utilizados tanto na produção de proteínas recombinantes para uso em humanos, como ferramentas para qualificar pesquisas em doenças humanas, incluindo a descoberta, o aprimoramento e a análise da eficácia dos mais variados regimes terapêuticos [62,128,184,194].

Entre os vários sistemas de expressão potencialmente exploráveis para a produção de biofármacos, a plataforma animal baseada no uso de animais biorreatores tem demonstrado ser altamente competitiva por agregar valores decisivos, como o baixo custo de implantação estrutural, produção e escalonamento, a alta produtividade e o elevado valor biológico das proteínas sintetizadas [49,89,209]. Além disso, a proximidade filogenética existente entre os humanos e as diferentes espécies de mamíferos permite que os biorreatores animais sintetizem proteínas recombinantes estruturalmente muito semelhantes às formas originais [54,154]. Neste contexto, a produção de biofármacos pela plataforma animal com a expressão de proteínas recombinantes complexas pelo leite é considerada uma excelente opção [54,55,209]. A plataforma animal tem sido amplamente testada, e vem sendo cada vez mais consolidada como um sistema extremamente robusto para a produção de biofármacos [33,35,54,209]. Porém, a produção de animais transgênicos tem se mantido desafiadora ao longo do tempo [133,140,141,199,210,213]. A baixa eficiência da transgênese em grandes animais associada à demanda aumentada por modelos modificados criou mais do que um estímulo, mas uma necessidade de aprimoramento das metodologias clássicas, assim como do desenvolvimento de novas tecnologias para a produção mais eficiente de animais transgênicos.

Animais transgênicos têm sido historicamente produzidos por meio de várias estratégias que gradualmente evoluíram ao longo das últimas décadas, incluindo o uso da microinjeção pró-nuclear de embriões (MI), de vetores virais e transposons, da transferência de genes mediada pelo espermatozóide, e da tranfecção de embriões ou células para a produção de animais fundadores transgênicos pela clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Dentre as tecnologias acima, a clonagem por TNCS e a MI pronuclear têm sido as biotecnologias mais confiáveis e robustas para a geração de animais transgênicos úteis [4,114,140,214]. Em contraste com a MI que representa o método pioneiro e mais

tradicional, a credibilidade da TNCS deve-se à forma mais controlada através da qual o transgene é integrado no genoma receptor [113]. Em adição, é também possível escolher o sexo e avaliar *molecularmente* as células selecionadas através da caracterização do número de cópias e inserções do transgene [112,124], e da localização cromossômica das inserções [105] previamente à sua utilização como doadoras de núcleo para TNCS. Associado a isto, tecnologias-suporte emergentes têm expandido a potencialidade e versatilidade de modelos para a produção de proteínas recombinantes funcionais. A transgenia em animais de produção geralmente esbarra em muitos desafios, principalmente devido à aleatoriedade e à falta de controle sobre o número de cópias e do sítio de integração do transgene no genoma, e a incerteza sobre o nível de expressão do transgene e a funcionalidade da proteína recombinante. O advento recente das endonucleases de edição gênica, já neste século, como as *Zinc Finger*, TALENs e CRISPR/Cas9, tem revolucionado o campo da engenharia genética ao propiciarem alta eficiência na manipulação do DNA em diversas espécies. Da mesma forma, a utilização de vetores adenovirais permite a comprovação ou não da viabilidade de uma plataforma de produção de proteínas recombinantes, como por exemplo, pela expressão transiente de proteínas farmacêuticas no leite de animais biorreatores não transgênicos, que podem ser intensivamente analisadas antes da produção definitiva de um organismo transgênico, o que pode melhor direcionar esforços para modelos funcionais, reduzindo custos e otimizando o tempo. Combinadas, estas tecnologias e estratégias criaram novas perspectivas relativas ao incremento da eficiência geral de geração de modelos animais biorreatores com vistas à produção de biofármacos.

Coligar todas as ferramentas disponíveis para a geração de animais transgênicos voltados à produção de proteínas terapêuticas é altamente estratégico diante do cenário atual. Além da demanda mundial crescente, há um ambiente altamente favorável no país no âmbito da produção de medicamentos biológicos, visto o Brasil ser peculiarmente pobre nos processos internos de produção, sendo ainda dependente da importação de biofármacos [153]. O objetivo da presente revisão é descrever algumas das estratégias de implementação e aplicação da plataforma animal para a produção de biofármacos, o impacto de tecnologias emergentes na engenharia genética, e perspectivas sobre a produção de biofármacos a partir da plataforma animal no Brasil e no mundo.

## II. PLATAFORMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS

A primeira proteína purificada para uso terapêutico foi a insulina em 1922 a partir de pâncreas de bovinos e suínos, tendo sido administrada com sucesso no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 1 em um paciente de 14 anos no Hospital de Toronto, no Canadá [6]. Alguns avanços notáveis que aconteceram a partir da segunda metade do século XX, como o surgimento da engenharia genética, foram essenciais para transformar a utilização de proteínas terapêuticas em um setor fundamental dentro da indústria farmacêutica. Dentre tais avanços, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante na década de 1970 deu base à manipulação e a produção aprimorada de proteínas recombinantes para fins terapêuticos [27]. A primeira etapa para a produção de proteínas recombinantes refere-se à clonagem da sequência de DNA correspondente; posteriormente, a proteína deve ser sintetizada em um sistema onde não é naturalmente produzida.

Os principais fatores normalmente associados à escolha do sistema de produção mais adequado levam em consideração a complexidade estrutural, a funcionalidade, o tempo de produção e o rendimento da proteína a ser obtida [52,89]. O emprego da engenharia genética permitiu que proteínas humanas fossem produzidas em diversos sistemas biológicos, utilizando as mais variadas formas de organismos vivos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, plantas, células em cultivo e mesmo em animais. A primeira proteína humana recombinante que foi utilizada para farmacoterapia foi justamente a insulina humana (Humulin®), produzida em *Escherichia coli*, e aprovada pelo FDA em 1982. Outras proteínas humanas recombinantes rapidamente foram desenvolvidas nos anos seguintes, como, por exemplo, o hormônio do crescimento, o interferon- $\alpha$ , o ativador do plasminogênio tecidual e a eritropoietina [26,117]. Um dos grandes avanços alcançados através da tecnologia do DNA recombinante foi justamente a produção em larga escala de proteínas de interesse para atender a demanda crescente da indústria farmacêutica [180].

### 1. Modelo procarionte

A produção de proteínas recombinantes em bactérias geneticamente modificadas representa o modelo pioneiro, que logo passou a apresentar limitações importantes relacionadas à incapacidade proca-

riante em sintetizar moléculas estruturalmente mais complexas [99]. Em muitos casos, bactérias não são capazes de empacotar adequadamente e organizar as subunidades proteicas para formar moléculas grandes e biologicamente ativas. Adicionalmente, bactérias não realizam modificações pós-traducionais, como glicosilações, carboxilações, fosforilações e sulfatações [89]. Conseqüentemente, outros sistemas passaram a ser desenvolvidos para suprir a necessidade de proteínas farmacêuticas estruturalmente complexas, onde podem ser destacados os sistemas compostos por leveduras, células de insetos/baculovirus, plantas, células animais e modelos animais em mamíferos.

### 2. Leveduras

Por serem organismos eucarióticos, espécies de leveduras representaram uma grande promessa na busca pela produção de grandes quantidades de proteína recombinante com estrutura mais complexa. Entretanto, e de maneira geral, este sistema se mostrou ineficiente no empacotamento e clivagem necessários para a bioatividade de moléculas complexas, e, em adição, em muitos casos algumas leveduras não glicosilam adequadamente as proteínas recombinantes, desencadeando repostas imunes por adicionar resíduos de açúcares que não são encontrados em proteínas humanas [89,147].

### 3. Células de insetos/baculovirus

O sistema baseado no uso de baculovirus como vetor de expressão em células de insetos tem sido utilizado extensivamente quando o objetivo se resume à produção de proteínas em quantidades limitadas [1,91]. Entretanto, esta ferramenta ainda apresenta limitações importantes, destacando-se o fato de que as células infectadas morrem após a infecção, necessitando que tanto as células como os vírus sejam substituídos várias vezes até a obtenção de maiores quantidades de uma proteína específica. Em adição, células de insetos não adicionam todos os açúcares presentes em proteínas humanas [3,139].

### 4. Plantas transgênicas

O uso de plantas oferece uma possibilidade interessante, simples e econômica para a produção de proteínas recombinantes, especialmente em virtude da grande quantidade de proteína que pode ser produzida bem como armazenada nas folhas e sementes, sob baixo custo, sendo que neste caso, a produção e

o escalonamento são praticamente ilimitados [82]. Já existe a produção em larga escala de proteínas principalmente direcionadas à pesquisa [71,84,85], porém a síntese de proteínas por meio de células vegetais para uso farmacêutico representa algo mais ambicioso e desafiador. A célula vegetal é capaz de empacotar e adicionar subunidades à estrutura primária tão eficientemente como células animais, porém a adição de resíduos de carboidratos ocorre diferentemente. Neste caso, o padrão distinto de N-glicosilação efetuado pela célula vegetal que adiciona açúcares como xilose e  $\alpha$ -(1,3)-fucose pode atuar elevando a imunogenicidade e acelerando, possivelmente, o *clearance* de proteínas terapêuticas utilizadas para uso humano [7]. Em adição, a utilização de plantas para este fim suscita uma limitação ética criada pelo fato de serem geralmente cultivadas em campo aberto, gerando o risco de disseminação descontrolada de uma determinada proteína [110]. Para evitar este risco é possível empregar as seguintes estratégias: (a) utilizar plantas estéreis; (b) utilizar plantas não consumidas na alimentação humana, como tabaco ou alfafa [2]; e (c) cultivar as plantas em estufas. Estas alternativas são tecnicamente possíveis, mas tendem a elevar o custo de produção, reduzindo a atratividade da plataforma vegetal de forma geral. Buscado contornar o obstáculo atrelado à biossegurança, uma boa possibilidade reside na produção de proteínas através de células vegetais em cultivo [66,82].

##### 5. Células mamíferas em cultivo

Seguramente, o sistema mais utilizado para a produção de biofármacos se baseia no uso de células de mamíferos, sendo que dentre os 58 diferentes biofármacos produzidos entre 2006 e 2014, 32 foram sintetizados por meio desta plataforma [197]. Neste caso, destaca-se o uso de células CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*), utilizadas há décadas com sucesso [73]. Uma das grandes vantagens deste sistema é que as proteínas secretadas no meio de cultivo sofrem modificações pós-traducionais muito semelhantes, na maioria das vezes, às suas formas originais [64,96]. Mesmo com a imensa disponibilidade de diferentes linhagens de células animais, cerca de 70% de todas as proteínas recombinantes terapêuticas presentemente aprovadas são produzidas por células CHO, somando um valor anual de vendas no mundo de aproximadamente US\$ 30 bilhões [100]. A popularidade deste tipo celular pode ser atribuída a três razões principais

[107]: (1) como tal plataforma tem se demonstrado como um “hospedeiro” seguro, o uso de células CHO favorece a aprovação de drogas por agências reguladoras; (2) a baixa produtividade específica inerente à maioria das células de mamíferos vem sendo superada em células CHO através da amplificação gênica, para a qual existem sistemas já bem estabelecidos; e (3) células CHO são altamente eficazes na execução de modificações pós-traducionais produzindo, na maioria das vezes, proteínas recombinantes com glicofornas compatíveis e bioativas no organismo humano. Apesar de todo o potencial encontrado no sistema de células CHO, a plataforma celular de forma geral apresenta limitações vinculadas ao alto custo de produção e ao escalonamento [50]. De acordo com Soler e Houdebine [178], um fermentador de 100 mil L do tipo utilizado em plataformas de células CHO custa ao redor de US\$ 400 milhões, e cerca de 5 anos são necessários para sua construção e operacionalização. Neste caso, um erro na estimativa pela demanda de uma nova droga, um prognóstico equivocado sobre a aprovação legal nos testes pré-clínicos e clínicos, além da aceitação e comercialização do biofármaco em questão, pode ser incrivelmente dispendioso. Aliás, como pode ser concluído analisando as informações revisadas por Kelley [106], nisto reside o grande risco do mercado em questão, no investimento em drogas que jamais serão comercializadas, daí a importância da busca por sistemas de produção cada vez mais econômicos e seguros.

##### 6. Plataforma animal

Animais transgênicos oferecem possibilidades particularmente atrativas para o preparo de proteínas recombinantes com propriedades farmacêuticas. As principais vantagens residem na tríade que associa o baixo custo de produção com a alta produtividade e qualidade das proteínas sintetizadas [50,198]. Mais especificamente, o custo de produção de uma plataforma animal pode ser estimado em até um décimo do montante gasto na construção de uma plataforma de células biorreatoras [49], sendo possível produzir animais duplo ou triplo-transgênicos, que detenham dois, três ou mais transgenes, produzindo, possivelmente, vários biofármacos e agregando grande valor a um único animal [102]. Aliado aos benefícios econômicos está a especial capacidade para a produção de proteínas extremamente complexas [52], visto que a atividade biológica de muitas proteínas depende de um

processamento pós-traducional adequado incluindo modificações como a remoção do peptídeo sinal, a formação de pontes de bissulfito, o processamento proteolítico e a adição de subunidades onde se destacam as glicosilações, sulfatações, carboxilações e amidações [89]. Estes mecanismos são dependentes de enzimas celulares específicas localizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, que estão diferentemente distribuídas em tipos celulares distintos [23]. Tais atributos são estrategicamente importantes, visto as glicosilações representarem o evento pós-traducional mais importante na produção de proteínas terapêuticas, afetando marcadamente a função geral por modular a atividade, o *clearance* e a imunogenicidade proteica [183].

As construções gênicas utilizadas para a produção de animais transgênicos fornecem todas as informações necessárias para que as células produzam a proteína recombinante com a mesma estrutura primária da proteína original, sem interferir no padrão de glicosilação da proteína. Mais especificamente, a sequência de peptídeos pode determinar o sítio de glicosilações, mas os tipos específicos de glicosiltransferases presentes nas células secretoras é que irão determinar quais oligossacarídeos e em que proporção serão adicionados à molécula [17,160]. Em geral, as espécies mamíferas são filogeneticamente bastante próximas dos humanos e acabam executando um perfil de glicosilação adequado, quando na produção de biofármacos [54]. Prova disto são as proteínas recombinantes complexas biologicamente ativas e imunologicamente seguras já produzidas no leite de animais transgênicos [55,128,148,209,212]. Em geral, o tipo de glicosilação encontrada no leite de animais transgênicos tem se apresentado similar às suas formas nativas [54,154], podendo haver alterações [35,44] não necessariamente atreladas à perda funcional. O exemplo que melhor ilustra este quadro é o caso da antitrombina-III recombinante (Atryn<sup>®</sup>)<sup>1</sup> que, em contraste com a antitrombina-III isolada do plasma humano, apresenta fucose, que é rara em estruturas oligomanosídicas encontradas em mamíferos, e é menos sializada nos resíduos de NANA (ácido N-acetilneuramínico) e NGNA (ácido N-glicolilneuramínico) [55]. Este medicamento foi aprovado pelo EMA e FDA, já que sua atividade biológica e imunogenicidade não são comprometidas quando utilizado como biofármaco.

### III. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA PLATAFORMA ANIMAL

Os animais transgênicos oferecem possibilidades particularmente atrativas para o preparo de proteínas recombinantes com propriedades farmacêuticas. Por esse motivo, muitos laboratórios de pesquisa e empresas farmacêuticas têm realizado esforços para produzir uma variedade de proteínas terapêuticas nesta plataforma, utilizando leporinos, suínos, ovinos, caprinos e bovinos [198]. Essa crescente demanda tem incentivado também a busca por sistemas de expressão que apresentem vantagens como a maior produtividade, menor tempo de produção e menor custo. No entanto, a seleção do sistema de expressão mais adequado para produzir uma proteína recombinante depende essencialmente das características e da aplicação pretendida dessa proteína [137,198].

Apesar do sangue, urina, plasma seminal, ovo de galinha, bicho da seda e larvas de drosófila serem vias alternativas para a produção de proteínas recombinantes [121,131,137,165,198,215], o leite representa a via de expressão mais robusta para a produção de biofármacos a partir de animais transgênicos [87,88]. O sangue recolhe as secreções de muitos tecidos, o que pode parecer vantajoso pela possibilidade de expressão em vários locais do organismo. No entanto, a coleta invasiva e o risco de proteínas bioativas reagirem com o sistema do animal tornam essa via a menos adequada para produção de biofármacos [198]. O ovo de galinhas transgênicas pode ser um modelo satisfatório para produção de proteínas recombinantes, visto a boa produtividade deste sistema, a relativa simplicidade referente aos requisitos gerais para criação, além da alta concentração proteica na clara do ovo e da capacidade de promover N-glicosilações [80,81,137]. Em adição, algumas proteínas podem ser eficientemente produzidas a partir da urina, sendo que, inclusive, foi demonstrado haver um processo de síntese proteica mais adequado no urotélio do que na glândula mamária para certas proteínas exógenas [31]. Apesar disso e da maior rapidez na produção através da urina em comparação com o período de lactação, a produção de biofármacos na urina não é tão explorada devido às baixas taxas de secreção proteica pelo epitélio da bexiga urinária [198].

A produção de proteínas recombinantes no leite constitui a melhor opção disponível [33,36,86,166,196], o que pode ser visualizado na comparação com os demais sistemas, em termos de atributos e limitações,

sumarizado na Tabela 1. Primeiramente, o leite é facilmente coletado em grandes quantidades, com este sistema tendo gerado níveis de expressão que oscilam no patamar de gramas de proteína recombinante por litro de leite, o que é excelente [54,55,209]. Aliado a

isto, as tecnologias associadas à purificação de proteínas sintetizadas no leite evoluíram tremendamente, facilitando o desenvolvimento integral dos diversos trabalhos direcionados à produção de biofármacos no leite de animais transgênicos [67,203].

**Tabela 1.** Características intrínsecas aos diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes pela plataforma transgênica animal.

Característica	Leite	Sangue	Clara do ovo	Plasma seminal	Urina	Bicho da seda	Larva de drosófila
Nível de produção	++++	++	+++	+	+	++	+
Custo de investimento	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
Custo de produção	++++	++++	++++	++	+	++++	++++
Flexibilidade	+++++	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservação da linhagem	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Escalonamento	++++	++++	++++	++	+	++++	+++
Efeitos no organismo	+++	++	+++	+++	+++	++++	++++
Modificações pós-traducionais	++++	+++++	+++	+++	+++	++	++
Glicosilações	++++	++++	+++	+++	+++	++	++
Estabilidade da proteína	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
Purificação	+++	++	+++	++	++	+++	++
Contaminação por patógenos	+++	++	+++	+++	++	++++	++++
Produtos no mercado	++++	+	++	+	+	++	+

Adaptado a partir de Houdebine [89] e Wang *et al.* [198]

O sistema de expressão de proteínas recombinantes no leite se baseia na fusão de uma sequência regulatória específica para a expressão na glândula mamária (promotor) com o gene codificante da proteína humana (ou humanizada) de interesse [54]. Vários promotores que direcionam a expressão para o leite têm sido utilizados na produção de modelos transgênicos, como o WAP murino [5,51], a  $\beta$ -caseína caprina [111,148], a  $\beta$ -caseína bovina [92,118] e a  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina [128].

A escolha da espécie animal para uso como modelo depende grandemente da expectativa pela demanda da proteína em questão. Normalmente há um conflito entre produção de leite e tempo necessário para a obtenção de lactações fisiológicas, onde a escolha de uma característica anula a outra [198].

Camundongos transgênicos têm sido comumente utilizados para testar construções gênicas antes ou concomitante à geração dos animais fundadores pertencentes a espécies maiores [54]. Este modelo permite a avaliação e otimização das construções de DNA de forma rápida e com baixo custo, o que pode ser crucial para o êxito da tecnologia. Obviamente, a

pequena produção de leite em camundongos restringe a expressão de proteínas a pequenas quantidades, dificilmente escalonáveis industrialmente, mas que são geralmente suficientes para a geração de dados preliminares valiosos referentes à funcionalidade da proteína de interesse.

Cabras transgênicas produzindo na ordem de 600 a 800 L de leite por lactação natural têm demonstrado uma grande aptidão para a síntese de proteínas terapêuticas [54]. Nesta espécie, o tempo desde a transferência do transgene até a obtenção de uma lactação fisiológica pode ser de 16 a 18 meses [154]. Em adição, a precocidade aliada à prolificidade característica da espécie caprina possibilitam a rápida expansão de um rebanho transgênico a partir de poucos animais fundadores. O primeiro biofármaco de origem animal aprovado para uso terapêutico em humanos (Atryn<sup>®</sup>)<sup>1</sup> é produzido no leite caprino.

Entre os animais mais utilizados, a produção de coelhos transgênicos através da microinjeção pronuclear é relativamente eficiente e barata [198]. Quando comparados com ruminantes, coelhos

apresentam um intervalo bem mais curto entre gestações, permitindo a exploração de até oito lactações por ano. Entretanto, cerca de apenas 1,5 litros são obtidos por lactação, o que limita este sistema à produção de proteínas com uma escala comercial de poucos quilogramas/ano [132,179]. Fêmeas suínas lactantes podem produzir entre 100 a 200 litros por lactação, e, interessantemente, são capazes de executar modificações pós-traducionais complexas, como a  $\gamma$ -carboxilação, mais eficientemente do que células de mamíferos em cultivo ou no leite de camundongo [126].

Vacas leiteiras frequentemente produzem 8000 kg ou mais de leite por ano, sendo possível obter anualmente dezenas de quilogramas de proteína recombinante a partir de uma única vaca transgênica lactante [47,53]. Porém, são necessários cerca de três anos desde a transferência gênica até a obtenção do leite derivado de uma lactação fisiológica [154]. Neste caso, a alta demanda por uma determinada proteína pode compensar o atraso temporal em virtude da grande capacidade de escalonamento produtivo alcançado nesta espécie. Em síntese, quanto mais alta for a necessidade de mercado por uma determinada proteína, maior deve ser a capacidade de produção leiteira do animal, o que, conseqüentemente, envolve maiores intervalos entre gerações e maiores custos associados de produção.

#### IV. PRINCIPAIS TECNOLOGIAS PARA A GERAÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Diferentemente de camundongos, em que a transfecção de células-tronco embrionárias para posterior produção de quimeras é empregada com sucesso na geração de animais geneticamente modificados [57], a obtenção de animais de produção transgênicos baseia-se principalmente em três técnicas-base: a microinjeção pró-nuclear de zigotos (MI), a clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS), e em menor escala, a transgênese mediada por espermatozoides. Essas técnicas podem ser empregadas de forma isolada como ferramentas para a integração da construção gênica no genoma receptor ou utilizadas em combinação com outros sistemas, potencialmente propulsores de sua eficiência, valendo destacar o uso associado com vetores lentivirais [10], transposons [95] e nucleases para edição de genoma [39]. A transgênese mediada por espermatozoides, apesar de ter surgido como um método bastante promissor e de baixo custo [115], ainda esbarra na alta variabilidade de resultados

entre diferentes laboratórios, baixa eficiência em espécies de alta produção leiteira e falta de estudos que demonstrem efetivamente os mecanismos de integração do DNA exógeno no hospedeiro [164]. Por estes motivos, esta revisão irá abordar apenas as características relacionadas às técnicas de microinjeção de pró-núcleo e a clonagem por TNCS, duas principais técnicas que se perpetuaram na vanguarda dos métodos de eleição para a produção de animais transgênicos. Também será abordado o uso promissor das nucleases para edição de genoma direcionado ao aumento da eficiência na obtenção de *knockins* e *knockouts*, e os avanços obtidos na metodologia de expressão transiente de proteínas utilizando vetores adenovirais, uma estratégia que permite a rápida obtenção e análise de viabilidade de produção de biofármacos no leite de modelos animais não-transgênicos antes de se definir o estabelecimento de animais fundadores transgênicos.

##### 1. Microinjeção pró-nuclear (MI) de zigotos

A técnica pioneiramente utilizada para a produção de animais transgênicos consistiu da microinjeção de fragmentos de DNA linearizados diretamente no pró-núcleo de embriões murinos no estágio de 1-célula. Desenvolvido por Lin (1966) [123] para avaliar a sobrevivência de zigotos murinos após a microinjeção pró-nuclear com proteínas, este método foi utilizado com sucesso em 1980 em camundongos [69] e se perpetuou como a preferência para as espécies mais prolíficas como camundongos, ratos, coelhos e suínos. Os primeiros animais de produção (suínos, leporinos e ovinos) [75] foram gerados cinco anos após a obtenção dos primeiros camundongos geneticamente modificados e, seis anos mais tarde, bovinos [20] e caprinos [51] transgênicos também foram gerados por MI.

Apesar do sucesso e ampla utilização, a baixa eficiência da microinjeção pró-nuclear limita sua aplicação, já que em geral, apenas uma pequena parcela (<1%) dos animais nascidos produzidos são transgênicos [58,158,174]. Em adição, nos casos em que a co-integração de múltiplos transgenes é necessária, como por exemplo para a expressão de anticorpos recombinantes [154], a frequência de fundadores “úteis” é ainda menor. Aliado a isto, a MI resulta em uma alta frequência de mosaicismos genômicos, situação na qual o transgene não se encontra integrado em todas as células do organismo [158,167,199].

A integração do transgene no genoma animal de forma aleatória está relacionada com uma manifes-



tação fenotípica imprevisível no modelo transgênico. Por consequência, no caso da produção de proteínas recombinantes na glândula mamária, os níveis de expressão tornam-se imprevisíveis [157]. Embora a MI venha sendo utilizada há mais de três décadas para a geração dos mais variados modelos transgênicos, o perfil variável e dificilmente rastreável de expressão do transgene [30,188,142] levou à busca de alternativas de maior eficiência e menor custo de produção de modelos transgênicos. A clonagem por TNCS surgiu na década de 1990 como uma alternativa de grande impacto para a transgênese animal [4,32,42,114,170]. Não obstante, com o advento das nucleases de edição de genoma, a microinjeção pró-nuclear concomitante de construções gênicas e nucleases para a integração sítio-dirigida fez ressurgir a MI como estratégia de alto interesse para a produção de animais geneticamente modificados, para modelos de múltiplos propósitos (*knockin*, *knockouts*, adição, substituição ou reparo de genes endógenos, etc.), teoricamente em níveis nunca antes alcançados.

## 2. Clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS)

Logo após o sucesso da clonagem por TNCS alcançado com o nascimento da ovelha Dolly em 1996 [201], a mesma técnica foi empregada com êxito um ano depois pelo mesmo grupo utilizando fibroblastos transfectados com DNA exógeno para a produção de ovinos transgênicos (Polly e Molly) carregando o gene do fator IX humano [170]. Já neste trabalho pioneiro foi demonstrado o grande potencial da clonagem como ferramenta para a geração de modelos transgênicos onde foi estimado ser possível utilizar 2,5 vezes menos animais em um programa de engenharia genética para gerar o mesmo número de animais transgênicos em relação à técnica de MI.

Uma das peculiaridades que agrega força à clonagem como ferramenta para a transgênese é o fato de que as construções de DNA podem ser introduzidas em células em cultivo permitindo a seleção com marcadores de clones celulares que realmente integraram a sequência de interesse em seu genoma [105,140,143]. Convenientemente, é também possível avaliar *molecularmente* as colônias celulares previamente à sua utilização como doadoras de núcleo para TNCS. Isto é obtido por meio da caracterização do número de cópias e inserções do transgene por PCR quantitativo, ou qPCR [112] e *Southern blot* [124], respectivamente;

da localização cromossômica das inserções através de técnicas de hibridização, como a hibridização fluorescente *in situ*, ou FISH [105]; e mesmo pela expressão *in vitro* através de cultivos de células da glândula mamária [214]. As células transgênicas podem ainda ser congeladas em grande número, o que permite sua utilização posterior em maior escala, após a obtenção de resultados dos procedimentos piloto de transferência nuclear somados com os dados preliminares sobre nascimentos, nível de expressão e bioatividade da proteína de interesse produzida no leite. Em adição, o sexo do animal pode ser direcionado para a produção de fêmeas, o que geralmente é preferível por acelerar a produção de leite e os testes preliminares a partir dos animais fundadores.

A produção de embriões clonados com células transgênicas previamente caracterizadas permite, por exemplo, eliminar vários problemas associados à MI. Em contraste com a geração de animais transgênicos pela MI que, em geral, resulta em 0,5 a 3,0%, e em menos de 10% de neonatos transgênicos em relação ao número de embriões microinjetados, e ao número total de neonatos, respectivamente, a clonagem por TNCS com o uso de células doadoras transgênicas garante que 100% da progênie seja transgênica, além de eliminar o mosaicismo [24]. Em adição, a possibilidade de pré-selecionar as linhagens celulares transgênicas é particularmente decisiva na produção de anticorpos monoclonais recombinantes, porque, neste caso, frequentemente vários transgenes precisam ser expressos na mesma célula secretora do epitélio mamário em concentrações equivalentes [93]. Neste caso, a co-integração de transgenes no mesmo *locus* cromossômico, para evitar a segregação dos genes durante a propagação do rebanho, é desejável e pode ser melhor explorada com o uso da clonagem por TNCS.

Dentre as biotecnologias disponíveis para a produção de animais transgênicos, pode-se inferir que a clonagem por TNCS ainda apresenta vários atributos favoráveis: (a) a transferência nuclear com células somáticas transgênicas transfectadas permite um sistema mais controlado para a introdução dos transgenes no genoma receptor, em especial pela utilização de nucleases de edição de DNA; (b) o mosaicismo em animais fundadores pode ser completamente extinguido; (c) o número de animais doadores de oócitos e receptores de embrião pode ser reduzido, baixando o custo de pro-

dução; e (d) com a seleção e caracterização das células transgênicas, todos os animais clonados nascidos serão transgênicos. Não obstante, o sucesso na clonagem exige o exímio domínio técnico e científico de várias disciplinas e áreas de conhecimento, com a clonagem por TNCS ainda sendo ineficiente, com menos de 5% dos embriões clones produzidos resultando em animais nascidos vivos [16]. A identificação de fatores associados a esta baixa eficiência é essencial para a otimização dos procedimentos para a obtenção de clones transgênicos também de forma mais eficiente e menos dispendiosa em espécies de produção [29,60,63,150].

#### V. TECNOLOGIAS-SUPORTE EMERGENTES PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA PLATAFORMA ANIMAL

##### *1. Nucleases para edição de genoma e o potencial na transgênese por gene targeting*

Para a geração de um organismo transgênico, é necessária a existência de quebra de dupla-fita do DNA (DSB, *double strand break*) no DNA genômico receptor para que ocorra a incorporação do transgene (DNA exógeno) no genoma de um determinado hospedeiro [155]. As causas mais comuns de DSBs geralmente são radiações ionizantes e químicos tóxicos ao genoma, mas também podem ser resultado de processos fisiológicos da célula, como a replicação do DNA em células, ou a recombinação V(D)J em linfócitos [18,135]. Após o DSB, a célula realiza o reparo do DNA, que pode ocorrer por uma das duas vias principais de reparo do DNA, denominadas de via de recombinação homóloga (RH) e via de recombinação não homóloga (NHEJ, *non-homologous end joining*). Na RH, as extremidades lesadas são alinhadas e ligadas utilizando sequências homólogas de DNA como molde, com reparo de alta fidelidade [173]. Já na via NHEJ, as extremidades rompidas são religadas aleatoriamente sem base em nenhuma homologia, o que pode induzir mutações e alterações de sequência, sendo um reparo de baixa fidelidade [138]. Quando o transgene é inserido na célula, este será integrado no genoma por uma destas duas vias. O uso da via baseada em homologia de DNA para a inserção sítio-dirigida de um transgene é chamado de *gene targeting* [45], um processo altamente desejável em engenharia genética. Porém, em células de mamíferos, a via NHEJ é de 1.000 a 10.000 vezes mais ativa do que a via de recombinação homóloga [177], e por este motivo, quando uma célula é transfectada

ou um zigoto é microinjetado com uma construção de DNA, a inserção que predominará será aleatória, pela via NHEJ, ou seja, a integração ocorrerá em qualquer local do genoma onde ocorrer uma DSB. Por ser de ocorrência menos frequente, estratégias para direcionar a inserção de transgenes pela via homóloga têm sido desenvolvidas ao longo do tempo. A superexpressão de proteínas chave da via RH, como a Rad51 e/ou Rad52, que se ligam às extremidades livres de fita simples de DNA [12] tem sido um dos métodos mais utilizados, apresentando aumento de 37 vezes na taxa de *gene targeting* em células HeLa [45]. Entretanto, Kim *et al.* [108] relataram que um excesso de Rad51 e Rad52 em células humanas e de camundongos podem causar um desbalanço da via homóloga de reparo de DNA, diminuindo as taxas de *gene targeting* (GT). Outra alternativa seria manipular a via NHEJ, diminuindo transientemente a expressão de proteínas essenciais à esta rota [13,14,187]. Nesse contexto, as proteínas do complexo Ku (Ku70, Ku80, Xrcc4) desempenham papel essencial na ligação das extremidades livres de DNA após o DSB, iniciando a via de recombinação não-homóloga [130]. O uso da tecnologia de RNA de interferência (RNAi) como uma ferramenta flexível para a manipulação da NHEJ, visando a atenuação de proteínas específicas, tem se mostrado uma opção viável de diminuição de integração aleatória e aumento de inserção sítio dirigida (GT) em células em cultivo. Em células tumorais humanas, a depleção transiente de Ku70 e Xrcc4 levou a uma diminuição de 70% na taxa de integração aleatória de DNA e um aumento de 33 vezes na frequência de recombinação homóloga no *locus HPRT* [15], o que demonstra o potencial da utilização de distintas ferramentas moleculares em forma conjunta como estratégia para a modificação genética de forma mais eficiente e previsível em animais.

A utilização das nucleases para edição de DNA tem promovido uma revolução do campo da engenharia genética, por causarem DSBs sítio-dirigidas que podem ser direcionados virtualmente a qualquer lugar do genoma. Diversos relatos do emprego de *Zinc-finger Nucleases* (ZFN), *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Cas9* (CRISPR/Cas9) para promover alterações direcionadas no genoma de diferentes espécies domésticas foram descritos nos últimos anos [120,156,185,200,211], incluindo a associação de nucleases para edição de DNA

com recombinação homóloga, empregada com sucesso em diferentes espécies, como camundongos [104], suínos [120], ratos [163] e humanos [151]. A utilização destas nucleases favorece uma maior facilidade e flexibilidade na manipulação do DNA, podendo promover um aumento na eficiência do número de transgênicos produzidos pela técnica de microinjeção pró-nuclear, por exemplo [134]. Neste contexto, recentemente, Crispo *et al.* [39] utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 para promover a mutação no gene da miostatina em ovinos e obtiveram elevadas taxas de neonatos vivos (41,5%), com 49,5% sendo mutantes e 22,7% sendo *knockouts* bialélicos [39]. Também Proudfoot *et al.* [156] produziram bovinos e ovinos com seu genoma editado neste mesmo gene utilizando TALENs, corroborando a eficiência destas nucleases para edição de genoma para animais de produção.

As principais vantagens e desvantagens no emprego de cada uma destas nucleases para a produção de animais transgênicos serão discutidas nos próximos tópicos, com ênfase na tecnologia de CRISPR/Cas9, que vem se destacando atualmente por sua maior simplicidade de produção, menor custo, alta eficiência e grande flexibilidade.

### 1.1. Zinc-finger Nucleases (ZFN)

A primeira sequência *Zinc-Finger* (ZF) foi descoberta em 1985, em oócitos de *Xenopus* sp. [136]. Cada ZF liga-se a três bases de DNA, e em torno de três a seis ZFs são ligadas uma à outra para que reconheçam uma sequência de DNA que seja específica, de 9-18 pb [145] (Figura 1). As ZFNs são proteínas ZFs fusionadas à endonucleases como a *FokI*, que promove uma clivagem não específica sempre que é dimerizada. Portanto, para realizar a clivagem da fita dupla de DNA, duas ZFNs são necessárias, cada uma anelando-se em uma das fitas do DNA, separadas por um espaçador de 5 a 7 pb, para que ocorra a dimerização da *FokI* [176].

As aplicações das ZFNs para a transgênese passaram a ser as mais diversas possíveis. Utilizando-se das quebras de dupla-fita do DNA e das vias de recombinação homóloga e não-homóloga, manipulações no genoma de diversas espécies, incluindo células humanas em cultivo [9], foram realizadas, valendo-se desde a microinjeção de embriões com um mRNA codificando a ZFN desejada, até a transfecção de células com DNA codificando para a nuclease direcionada ao gene a ser editado [116]. Apesar das vantagens que vieram com o advento das ZFNs para

a edição de genoma, algumas limitações tornaram-se claras com o tempo. Dentre estas, destacam-se (i) a dificuldade para laboratórios não-especializados em montar uma ZFN, o que pode chegar a meses de trabalho [161]; e (ii) a limitação no número de alvos no genoma, que é de 1 a cada 200 bases, o que pode dificultar a realização de modificações mais precisas, principalmente manipulações na fase de leitura de alguns genes [72].

### 1.2. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)

As TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) são produzidas naturalmente pelas bactérias gram-negativas *Xanthomonas* sp., ligando-se ao seu DNA e funcionando como um fator de transcrição para diversos genes [181]. Em sua estrutura, as TALEs contêm várias unidades com 33 a 35 aminoácidos, sendo que o 12º e o 13º são variáveis; dependendo da combinação destes aminoácidos, a repetição liga-se a um nucleotídeo diferente, sendo cada repetição chamada de RVD (*repeat variable diresidue*) [19]. Da mesma maneira que as ZFNs, as TALEs podem ser utilizadas para a geração de quebras de dupla-fita de DNA quando fusionadas à endonuclease *FokI*, gerando TALENs [28]. A representação da arquitetura das TALENs também pode ser visualizada na Figura 1.

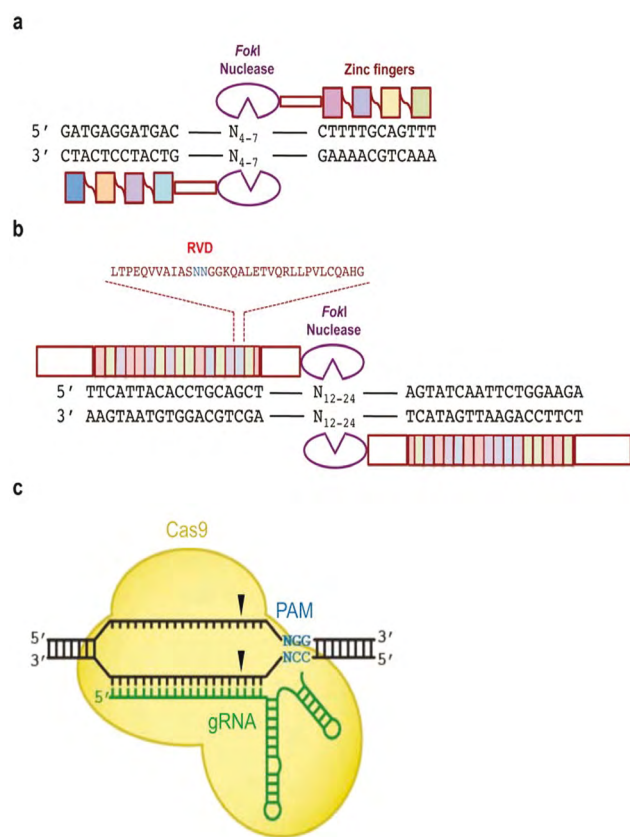
A maior simplicidade de construção de TALENs em relação às ZFNs, além de sua alta especificidade, tornaram essa tecnologia muito prática e flexível, o que levou, por exemplo, à construção de uma biblioteca de TALENs direcionadas a 18.470 genes humanos [109]. As TALENs também foram empregadas com sucesso na edição do genoma de diferentes espécies animais de interesse econômico, como bovinos [25], suínos [25], ovinos [156] e caprinos [41]. Uma limitação das TALENs é a necessidade de uma timidina no genoma sempre no começo da nuclease [28]. Adicionalmente, quando comparadas às CRISPR/Cas9, tanto as TALENs quanto as ZFNs apresentam desvantagens em relação ao desenho e validação [48], como detalhado no próximo tópico.

### 1.3. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9 nuclease (CRISPR/Cas9)

O sistema CRISPR/Cas9 foi descrito em *E. coli* inicialmente como séries de pequenas repetições

palindrômicas inter-espaçadas por sequências curtas [94], e posteriormente associada ao sistema imune adaptativo bacteriano [8]. Funciona através da interação entre o CRISPR RNA (crRNA) e o *trans-activating* crRNA (tracrRNA). Este duplex de RNAs pode ser substituído pelo RNA guia (gRNA), que direciona a nucleasa Cas9 para locais específicos no genoma, através de pareamento de bases Watson-Crick (Figura 1) [103].

Devido a sua grande flexibilidade (pode ser projetada virtualmente para qualquer lugar no genoma que possua os nucleotídeos NGG-chamado de PAM- *Protospacer Adjacent Motif*) e a facilidade de manipulação no laboratório (exige apenas um passo de clonagem molecular), o sistema CRISPR/Cas9 tem se destacado frente às ZFNs e às TALENs [90].



**Figura 1.** Representação gráfica das nucleases para edição de genoma. (a) *Zinc-finger nucleases* (ZFN), compostas de *zinc finger motifs* que reconhecem sequências específicas de nucleotídeos. As ZFs são fusionadas à nuclease *FokI*, que, quando dimerizada, promove a quebra de dupla fita do DNA. (b) *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs), compostas por unidades chamadas RVD (*repeat variable diresidue*) que reconhecem nucleotídeos específicos, de acordo com os aminoácidos presentes nas posições 12 e 13. Também são fusionadas à nuclease *FokI* para promover a clivagem do DNA-alvo. (c) *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated protein 9 nuclease* (CRISPR/Cas9), são guiadas pelo RNA guia (gRNA) para um alvo específico no genoma, sempre precedido pelo *protospacer adjacent motif* (PAM). A quebra de dupla fita é gerada pela nuclease Cas9. Adaptado de Pattanayak et al. [149].

Em 2013, o sistema de CRISPR/Cas9 do tipo II de *Streptococcus pyogenes* foi aplicado pela primeira vez para a edição de genoma em células de mamíferos [37,129]. Desde então, diversas aplicações desta tecnologia, como geração de modelos para doenças, *knockin* e *knockout* de genes, tratamento de infecções virais, ativação e repressão da expressão seletiva de genes, seleção de alvos para drogas, dentre outras [48] foram empregadas com sucesso por diferentes grupos em todo o mundo, demonstrando a rápida disseminação desta tecnologia embasada principalmente na simplicidade no processo de construção e altos índices de edição gênica. Pouco tempo após seu uso em células de mamíferos [37], a tecnologia CRISPR/Cas9 espalhou-se por laboratórios e empresas do mundo inteiro. Uma simples busca pelos termos “CRISPR CAS9” no Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) retornou com cerca de 1.000 publicações de 2013 até hoje, em uma média de um artigo a cada 1,1 dias. A tecnologia também está revolucionando os campos biomédico e de animais de produção, permitindo a introdução de diversas alterações desejadas no genoma em apenas um intervalo de geração.

Em camundongos, o uso de CRISPR/Cas9 gerando múltiplos *knockins* e *knockouts* [198,205] validou a aplicação desta tecnologia para espécies de produção. Li et al. [119] gerou *knockouts* duplos em camundongos e ratos em uma única microinjeção. Deleções de até 10 Kb foram obtidas usando apenas dois gRNAs diretamente em embriões murinos [61]. Comparando-se com o tradicional método do uso de células-tronco embrionárias para a obtenção de quimeras, o uso de CRISPR/Cas9 reduziu o tempo de obtenção de um camundongo transgênico de 10 para apenas 2 meses, possibilitando a introdução de múltiplos alelos mutados em uma única rodada de experimentos [171].

Em animais de produção, o primeiro relato de sucesso no uso de CRISPR/Cas9 foi em 2013, com a modificação de alelos em suínos e bovinos [185]. Em 2014, Hai et al. [74] relataram a geração de suínos com mutações bialélicas no gene responsável pela doença de von Willebrand, um importante modelo biomédico que não é adequadamente reproduzido em murinos. Também em 2014, Heo et al. [83] realizaram pioneiramente com sucesso *gene targeting* em embriões e iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) bovinos, destacando a eficiência de 100% na edição de genoma em embriões. Em ovinos, aliando-se CRISPR/Cas9 e clonagem, foram obtidos cordeiros nascidos vivos com

uma mutação no gene da miostatina, que promove o crescimento de “musculatura dupla”, uma importante característica econômica na pecuária [76]. Em suínos, de maneira impressionante e demonstrando a alta flexibilidade do sistema CRISPR/Cas9, 62 *loci* foram editados ao mesmo tempo em células PK15 [207]. Os principais modelos de animais de produção com genes editados por CRISPR/Cas9 publicados até 2015 estão listados na Tabela 2.

Presentemente, vislumbra-se um enorme potencial de desenvolvimento em engenharia genética

pela combinação de tecnologias consolidadas, como a microinjeção pró-nuclear em associação a nucleases de edição de DNA em zigotos, ou ainda pela associação adicional destes componentes à manipulação de vias de reparo de DNA por RNAi em células para uso na clonagem por TNCS. Tais processos prometem revolucionar a área de engenharia genética, pelo aumento de eficiência e precisão das modificações genéticas em quaisquer organismos vivos, permitindo também a geração de forma rápida, de baixo custo e eficiente de múltiplas modificações no genoma em um único processo.

**Tabela 2.** Espécies de animais de produção modificados geneticamente pelo uso de nucleases de edição do genoma por meio da tecnologia CRISPR/Cas9, com genes-alvo e vias de reparo de DNA utilizados em cada sistema.

Espécie	Gene-alvo	Via de reparo de DNA	Referência
Suína	<i>vWF</i>	NHEJ	[66]
	<i>CD163, CD1D</i>	NHEJ	[184]
	<i>SLA-1,2,3</i>	NHEJ	[150]
	<i>GGTA1, CMAH, iGb3S</i>	NHEJ	[110]
	<i>SOX10</i>	RH	[199]
	<i>MITF</i>	NHEJ	[180]
Caprina	<i>MSTN, BLG, NUP, PrP</i>	NHEJ	[129]
	<i>MSTN, FGF5</i>	NHEJ	[179]
Ovina	<i>MSTN</i>	NHEJ	[68]
	<i>MSTN</i>	NHEJ	[34]

Adaptado de Bosch *et al.* [21]

## 2. Vetores adenovirais para análise de viabilidade de modelos para produção de biofármacos na glândula mamária

Historicamente, pelos custos e esforços envolvidos na produção de animais de produção fundadores transgênicos, normalmente utilizava-se previamente o camundongo para a avaliação da viabilidade de modelos de expressão de proteínas recombinantes, o que incluía desde a análise do potencial de expressão de construções gênicas e a funcionalidade da proteína, até estudos de efeitos do transgene e de sua expressão no bem estar animal. Tal estratégia, considerada segura e conservadora, mesmo que de relativo sucesso, traduzia-se em um maior tempo até a geração de modelo animal de relevância, quando funcional. Além disto, e como ocorre para muitas outras áreas de estudo, nem sempre o modelo murino reflete o nível de expressão e produção, tampouco de modificações pós-traducionais que sejam compatíveis à biofuncionalidade de proteínas

recombinantes em outras espécies de maior interesse para a geração de fundadores. A utilização de vetores adenovirais surgiu como uma estratégia importante para análise de viabilidade de modelos para produção de biofármacos na glândula mamária da própria espécie de interesse, em intervalo de tempo e custos significativamente menores do que a geração de modelo transgênico murino. Em sendo potencialmente funcional na expressão transiente, parte-se então para a produção de um animal transgênico, com expressão constitutiva no tecido-alvo, como por exemplo, na glândula mamária.

O uso da glândula mamária como alvo para vetores adenovirais foi descrito há 20 anos, inicialmente utilizando o gene da  $\beta$ -galactosidase com o propósito de avaliar a transferência de genes em camundongos [206] e ratos [101]. Em 2002, esta técnica foi utilizada com sucesso para induzir a expressão de lisostafina, uma proteína com efeito no combate à mastite causada por *Staphylococcus aureus*, na glândula mamária de

cabras fora do período de lactação [59]. Finalmente, em 2004, o sistema adenoviral foi utilizado pioneiramente com o objetivo de produzir proteínas recombinantes em larga escala, através da expressão transiente de hormônio do crescimento humano (hGH) no leite de camundongos e cabras não transgênicos [169].

A plataforma de produção transiente de proteínas recombinantes utiliza adenovírus do tipo 5 deletado das regiões E1 e E3, que o torna defectivo em sua replicação, com capacidade de abrigar um transgene de até 7,5 Kb [11]. Altos títulos de adenovírus são produzidos em células em cultivo que expressam o gene viral E1, podendo chegar a  $10^{11}$ - $10^{12}$  partículas/mL [208]. A entrada na célula hospedeira (transdução) se dá pelo *coxsackievirus and adenovirus receptor* (CAR), localizado na membrana celular como parte das junções oclusivas intercelulares [34]. O DNA viral permanece de forma episomal na célula infectada, que pode estar ou não em divisão [193]. Promotores específicos ou constitutivos de alta expressão podem ser utilizados para direcionar a expressão do transgene desejado em altos níveis no tecido-alvo [65,172].

Utilizada com sucesso inicialmente apenas em cabras não-lactantes [169], a plataforma de injeção intramamária obteve melhores resultados com o uso de agentes que causam uma disrupção temporária das junções oclusivas entre as células epiteliais da glândula mamária, como o ácido etilenoglicol tetracético (EGTA) [79,189,191,202,204] ou ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetra-acético (BAPTA) [125]. Essa disrupção leva a uma maior exposição dos receptores adenovirais (CAR), promovendo a entrada de um maior número de cópias virais por célula, e um maior número total de células transduzidas. Desde a produção de hormônio do crescimento humano (hGH) em 2004 [169], níveis que variam de mg/L a g/L de sete proteínas recombinantes foram obtidos em diferentes espécies animais transduzidas com adenovírus na glândula mamária, incluindo a eritropoietina humana [125,190,191], a lactoferrina humana [77,78], a glucocerebrosidase humana [186], o fator de crescimento neural beta humano [211,212], o hGH [79], a antitrombina humana [204,205] e antígeno E2 para febre suína clássica [168,189].

O processo de síntese viral envolve técnicas básicas de clonagem molecular e cultivo celular, e em 4 a 5 semanas é possível a obtenção de altos títulos de um vetor adenoviral recombinante para o gene de in-

teresse [127]. Recentemente, Sanchez e colaboradores [168] simplificaram o processamento de uma vacina recombinante utilizando a subunidade E2 para CSFV expressa no leite de cabras inoculadas com adenovírus em sua glândula mamária, demonstrando que o antígeno injetado diretamente com as proteínas do soro é tão efetivo quanto o purificado através de cromatografia.

A inoculação de adenovírus gera uma elevada resposta imune no hospedeiro, que acaba levando à eliminação das células transduzidas [206], limitando a produção de proteínas a um período que dura em média 7 a 10 dias. A readministração viral após 30 dias da inoculação inicial falhou em produzir proteínas recombinantes no leite caprino, provavelmente devido à memória do sistema imunológico ao vírus [191]. Uma alternativa promissora descrita recentemente foi o uso de vírus adeno-associados recombinantes (rAAV) para a produção de proteínas na glândula mamária [195]. Por gerarem uma baixa resposta imune no hospedeiro [182], a injeção deste vírus na glândula mamária foi capaz de produzir a proteína recombinante por 8 semanas em camundongos e 19 semanas em coelhas [195]. Outra característica que merece destaque foi a possibilidade de reinoculação com sucesso do vírus no mesmo animal, abrindo portas para a utilização comercial desta tecnologia.

Esses resultados demonstram a grande aplicabilidade deste sistema como uma ferramenta útil para a pré-avaliação da expressão de proteínas recombinantes no leite, devido ao curto tempo entre a produção do vírus e a expressão da proteína de interesse diretamente na glândula mamária, constituindo-se em uma opção viável e econômica na avaliação de construções gênicas antes do investimento para a produção de um animal transgênico.

## VI. PERSPECTIVAS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS NO BRASIL E NO MUNDO

Na esfera nacional é importante destacar que a ciência e a indústria brasileira permanecem sendo amplamente dependentes da importação de medicamentos químicos alopáticos assim como de biofármacos [153]. Já há algum tempo o governo Brasileiro tem estrategicamente aumentado o financiamento no país direcionado à aquisição de pacotes tecnológicos e/ou biofármacos industrializados de outros países, buscando também fomentar o desenvolvimento da produção interna em conexão com a pesquisa científica [162]. Aliado a isto, o país foi legislativamente

disciplinado, mediante a criação da Lei nº 8.974/95 (Lei de Biossegurança), e politicamente organizado após a criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) que deve, entre outras funções, acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico das atividades voltadas para a engenharia genética, estabelecer normas e regulamentos relativos às atividades e projetos relacionados a organismos geneticamente modificados, e propor ao Presidente da República a Política Nacional de Biossegurança [122]. Desta forma, tem sido criado um ambiente promissor instaurado nacionalmente que precisa ser usufruído para que se rompa a inércia estática que assola a ciência e tecnologia nacional no âmbito da produção de biofármacos.

Os números financeiros do mercado global de vendas de biofármacos, incluindo vacinas, proteínas terapêuticas e anticorpos monoclonais, apontam para um quadro bastante próspero no setor. Apenas em 2013, esse mercado movimentou US\$ 200,6 bilhões, com previsões de US\$ 234 bilhões para 2014 e de US\$ 387,6 bilhões em 2019, crescendo com uma taxa aproximada de 12% ao ano. Essa taxa de crescimento estável vem acontecendo ao longo da última década. Além disso, dentre os dez medicamentos mais vendidos no mundo, sete são biofármacos, os quais movimentaram juntos um mercado global de mais de US\$ 58 bilhões em vendas [56,159]. Complementando, os custos para o desenvolvimento de um novo biofármaco são semelhantes aos gastos para a elaboração de uma nova molécula pelo método convencional. Levando-se em consideração todas as etapas de produção, o custo médio para o desenvolvimento de um biofármaco é de US\$ 1,24 bilhões, ao passo que um medicamento convencional custa hoje cerca de US\$ 1,32 bilhões para chegar ao mercado [46].

Atualmente existem dois biofármacos produzidos em animais transgênicos e aprovados para comercialização nos Estados Unidos e Europa: o ATryn<sup>®1</sup> e o Ruconest<sup>®2</sup>. O ATryn<sup>®1</sup>, que é uma antitrombina humana recombinante produzida no leite de cabras transgênicas, obteve liberação para comercialização pelo EMA em 2007 e junto ao FDA em 2009, sendo o primeiro biofármaco comercializado no mundo para uso biomédico produzido em animais geneticamente modificados [62]. Este produto é indicado para a prevenção de eventos

tromboembólicos nos períodos perioperatório e periparto em pacientes com deficiência hereditária de antitrombina [70]. Adicionalmente, o ATryn<sup>®1</sup> está em fase 3 de testes clínicos para o tratamento de pré-eclampsia, patologia que tem uma incidência mundial de 2-10% de todas as gestações [144], e que tem um mercado norte-americano ao redor de US\$ 1 bilhão. O Ruconest<sup>®2</sup> é um inibidor de esterase C1 produzido no leite de coelhas transgênicas [43]. Esta proteína recombinante purificada recebeu autorização para comercialização na Europa em 2010 e obteve a licença para o mercado americano em 2014. Antes de sua aprovação nos EUA, a companhia Pharming registrou vendas de aproximadamente US\$ 1,2 milhões no mercado Europeu nos primeiros 3 meses de 2014. Com a autorização do FDA, o Ruconest<sup>®2</sup> entrou no mercado americano [40], que é de US\$ 400 milhões. Este cenário, com estas duas aprovações na Comunidade Europeia e nos EUA, tem impulsionado o interesse por parte dos setores público e privado para o desenvolvimento de formas mais eficientes, seguras e econômicas de geração de fundadores transgênicos para atender a crescente demanda mundial por proteínas de uso biomédico [152]. A recente aprovação do salmão AquaAdvantage<sup>®</sup> pelo FDA para ingresso na cadeia alimentar humana [192] também promete impulsionar o desenvolvimento e aprovação de novos produtos de animais transgênicos, como carne, leite ou ovos com um valor agregado pelas modificações genéticas, ou mesmo de modelos de resistência a doenças ou com benefício ao ambiente, entre outras inúmeras possibilidades.

Como pode ser constatado, o custo de produção de animais transgênicos, especialmente de modelos para expressão de proteínas farmacêuticas, frente à eminente oportunidade de aprovação legal e exploração econômica, pode ser definitivamente compensado. Neste contexto, o potencial mercadológico de certos produtos pode operar como um elemento fomentador de seu desenvolvimento [153,162]. Em adição, especialmente no caso de produtos ou tecnologias inovadoras, um grande potencial de mercado associado a um real valor agregado estará normalmente atrelado à maior facilidade para captação de recursos, não apenas a partir das agências financiadoras de pesquisas, mas também através de investimentos empresariais privados e incentivos governamentais.

## VII. CONCLUSÕES

A inovação na tecnologia de produção de biofármacos é uma necessidade em resposta a um mercado em crescimento constante, onde diferentes plataformas de produção estão ganhando espaço, dentre elas a produção de biofármacos utilizando a plataforma animal. Esta plataforma apresenta-se potencialmente sustentável, qualitativa e economicamente viável e competitiva, caracterizando-se como um caminho altamente promissor e ainda pouco explorado para a produção de terapêuticos. Metodologias tradicionais como a clonagem por TNCS e a MI pró-nuclear já podem ser executadas em associação com outras tecnologias que abordam o uso de endonucleases e vetores adenovirais para a formação de sistemas mais completos direcionados à produção de animais transgênicos e proteínas recombinantes. Tais evoluções tecnológicas, somadas a avanços no ponto de vista regulatório nos últimos anos sinalizam uma tendência de grande investimento no setor, com base no crescimento de mercado, principalmente com vistas à produção de proteínas terapêuticas a partir de animais geneticamente modificados. Tal cenário gera novas perspectivas para a produção de outros biofármacos de grande demanda nacional e mundial. Por exemplo, entre os dez medicamentos mais vendidos no mundo, sete são proteínas recombinantes, e quatro dos cinco biofármacos de maior mercado mundial são anticorpos monoclonais [56,159], os quais podem ser produzidos no leite de animais transgênicos na escala de g/L [154], sendo facilmente escalonados para atender a crescente demanda mundial, ainda significativamente reprimida.

O Brasil ainda se encontra em plenas condições de conquistar um espaço significativo no cenário mundial de produção de biofármacos, visto a demanda ser crescente no mundo, com barreiras para a produção e aprovação de proteínas recombinantes no mundo desenvolvido sendo cada vez mais difíceis de serem transpostas. No Brasil, encontra-se estabelecida uma legislação vigente e moderna, que contempla diretrizes para atividades com OGMs em todo tipo de organismo, com órgãos atuantes de regulamentação (p.ex., CTNBio, CIBios) e fiscalização (MAPA, ANVISA, etc.). Em adição, há grupos estruturados e com sucesso em atividades com OGM no país, com sistemas de produção animal que podem sustentar a produção de proteínas mais complexas a partir de animais transgênicos. Finalmente, o apoio governamental para pesquisas

nesta área nos últimos 10 a 15 anos favoreceu a atual conjuntura de crescimento e potencial brasileiro na área. Porém, ainda se faz necessária uma melhor estruturação desta cadeia produtiva, com suporte a uma estrutura que permita a realização de testes pré-clínicos e clínicos, suporte ao escalonamento da produção com o apoio de plataformas de produção, apoio a sistemas prontos para irem à planta de produção, e fundamentalmente, continuidade no suporte financeiro para iniciar novos modelos, e continuar o que já foi iniciado e está encaminhado.

Com vistas a todo o desenvolvimento tecnológico já estabelecido, e com as tremendas perspectivas biotecnológicas da atualidade, em adição ao cenário atual no Brasil, torna-se claro que ainda temos todas as condições de sermos competitivos neste setor, se continuarmos atuando de forma objetiva e determinada. Obviamente, não podemos continuar dependentes por muito tempo da importação de biofármacos, que são absurdamente dispendiosos ao nosso país. Não obstante, talvez o maior prejuízo nem seja o custo financeiro pela importação, mas a permissibilidade de um falso desenvolvimento autóctone em alguns segmentos do setor, promovida por ações públicas e/ou privadas, com a importação, por exemplo, de pacotes bilionários de “plantas” completas de produção de alguns biofármacos, gerado por acordos que nos mantêm em dependência tecnológica e intelectual. Enquanto tais pacotes são estabelecidos lentamente no país, continuar-se-á a rotular alguns produtos importados como que aqui produzidos, em uma pretensa independência intelectual e falso pioneirismo tecnológico. Isto nos diminui, pois acreditamos termos todas as condições intelectuais e tecnológicas, recursos humanos, biológicos, materiais e financeiros, e aspectos legais regulatórios para o desenvolvimento do setor no país, em especial, pela exploração da plataforma procarionte para proteínas recombinantes simples, e a plataforma animal, mais econômica e eficiente, para a produção de proteínas terapêuticas recombinantes complexas.

Será necessário aos detentores e geradores do conhecimento continuar explorando os campos referentes às demandas e às exigências do mercado e dos órgãos reguladores, para que estas promissoras vitórias no campo científico sejam traduzidas, de fato, em produtos melhores e mais acessíveis ao mercado, gerados intelectual e tecnologicamente no país, para benefício da população brasileira.



MANUFACTURERS

<sup>1</sup>rEVO Biologics Inc./LFB USA. Framingham, MA, USA.

<sup>2</sup>Pharming Group NV. Leiden, The Netherlands.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content of the paper.

REFERENCES

- 1 **Abdulrahman W., Radu L., Garzoni F., Kolesnikova O., Gupta K., Osz-Papai J., Berger I. & Poterszman A. 2015.** The production of multiprotein complexes in insect cells using the baculovirus expression system. *Methods in Molecular Biology*. 1261: 91-114.
- 2 **Abranches R., Marcel S., Arcalis E., Altmann F., Fevereiro P. & Stoger E. 2005.** Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*. 120(1): 121-134.
- 3 **Ailor E., Takahashi N., Tsukamoto Y., Masuda K., Rahman B.A., Jarvis D.L., Lee Y.C. & Betenbaugh M.J. 2000.** N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplysia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology*. 10(8): 837-847.
- 4 **Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempes M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overström E.W. & Echelard Y. 1999.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*. 17(5): 456-461.
- 5 **Baldassarre H., Wang B., Keefer C.L., Lazaris A. & Karatzas C.N. 2004.** State of the art in the production of transgenic goats. *Reproduction, Fertility and Development*. 16(4): 465-470.
- 6 **Banting F.G., Campbell W.R. & Fletcher A.A. 1923.** Further Clinical Experience with Insulin (pancreatic extracts) in the Treatment of Diabetes Mellitus. *British Medical Journal*. 1(3236): 8-12.
- 7 **Bardor M., Faveeuw C., Fitchette A.C., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L. & Lerouge P. 2003.** Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*. 13(6): 427-34.
- 8 **Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A. & Horvath P. 2007.** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315(5819): 1709-1712.
- 9 **Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B. & Barbas C.F. 3rd. 1998.** Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(25): 14628-14633.
- 10 **Bender B., Hoffmann O.I., Negre D., Kvell K., Bósz Z. & Hiripi L. 2013.** Low titer lentiviral transgenesis in rodents with simian immunodeficiency virus vector. *BioTechniques*. 55(3): 137-140.
- 11 **Benihoud K., Yeh P. & Perricaudet M. 1999.** Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(5): 440-447.
- 12 **Benson F.E., Baumann P. & West S.C. 1998.** Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature*. 391(6665): 401-404.
- 13 **Bertolini L.R. & Bertolini M. 2010.** Interference (RNAi) in Animal Biotechnology. In: Heldman D.R, Bridges A., Hover D. & Wheeler M.B. (Eds). *Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food*. New York: Taylor & Francis Group, pp.1-4.
- 14 **Bertolini L.R., Bertolini M., Anderson G.B., Maga E.A., Madden K.R. & Murray J.D. 2007.** Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 reduces Ku complex and DNA integration in human cancer cells. *Journal of Biotechnology*. 128(2): 246-257.
- 15 **Bertolini L.R., Bertolini M., Maga E.A., Madden K.R. & Murray J.D. 2009.** Increased gene targeting in Ku70 and Xrcc4 transiently deficient human somatic cells. *Molecular Microbiology and Biotechnology*. 41(2): 106-114.
- 16 **Bertolini L.R., Feltrin C., Gaudencio-Neto S., Martins L.T., Tavares K.C.S., Rodrigues V.H.V., Aguiar L.H., Calderon C.E.M., Almeida J.L. & Bertolini M. 2012.** Animal cloning: survival of the fittest. *Ciência Animal*. 22(1): 82-105.
- 17 **Betenbaugh M.J., Tomiya N., Narang S., Hsu J.T. & Lee Y.C. 2004.** Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Current Opinion in Structural Biology*. 14(5): 601-606.
- 18 **Bierne H., Ehrlich S.D. & Michel B. 1997.** Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *The EMBO Journal*. 16(11): 3332-3340.

- 19 Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A. & Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326(5959): 1509-1512.
- 20 Bondioli K.R., Biery K.A., Hill K.G., Jones K.B. & De Mayo F.J. 1991. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Biotechnology*. 16: 265-273.
- 21 Bosch P., Forcato D.O., Alustiza F.E., Alessio A.P., Fili A.E., Olmos Nicotra M.F., Liaudat A.C., Rodríguez N., Talluri T.R. & Kues W.A. 2015. Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(10): 1907-1929.
- 22 Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M., Senear A.W., Warren R. & Palmiter R.D. 1981. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 27(1): 223-231.
- 23 Brooks S.A. 2004. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Molecular Biotechnology*. 28(3): 241-255.
- 24 Campbell K.H. 2002. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *Journal of Anatomy*. 200(3): 267-275.
- 25 Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G., Stverakova D., Proudfoot C., Christian M., Voytas D.F., Long C.R., Whitelaw C.B. & Fahrenkrug S.C. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(43): 17382-17387.
- 26 Carter P.J. 2011. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*. 317(9): 1261-1269.
- 27 Carton J.M. & Sthrol W.R. 2013. Protein therapeutics (introduction to biopharmaceuticals). In: Ganellin R., Roberts S.M. & Jefferies R. (Eds). *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*. Waltham: Elsevier, pp.127-159.
- 28 Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J. & Voytas D.F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*. 39(17): 7879.
- 29 Chavatte-Palmer P., Lee R., Bertolini M., Jammes H., Schmidt M. & Callesen H. 2013. Pregnancy and neonatal care of SCNT animals. In: *Principles of Cloning*. 2nd edn. London: Academic Press, pp.107-125.
- 30 Chen C.M., Wang C.H., Wu S.C., Lin C.C., Lin S.H. & Cheng W.T. 2002. Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine  $\alpha$ -lactalbumin regulation sequences. *Transgenic Research*. 11(3): 257-268.
- 31 Chrenek P., Makarevich A.V., Pivko J. & Bulla J. 2010. Transgenic farm animal production and application. *Slovak Journal of Animal Science*. 43(2): 45-49.
- 32 Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce De León F.A. & Robl J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280(5367): 1256-1258.
- 33 Clark A.J. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 3(3): 337-350.
- 34 Cohen C.J., Shieh J.T., Pickles R.J., Okegawa T., Hsieh J.T. & Bergelson J.M. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(26): 15191-15196.
- 35 Cole E.S., Higgins E., Bernasconi R., Garone L. & Edmunds T. 1994. Glycosylation patterns of human proteins expressed in transgenic goat milk. *Journal of Cell Biochemistry*. 56(18D): 265.
- 36 Colman A. 1996. Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 63(4): 639S-645S.
- 37 Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A. & Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121): 819-823.
- 38 Constantini F. & Lacy E. 1981. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature*. 294: 92-94.
- 39 Crispo M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., Dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Crénéguy A., Bruselle L., Anegón I. & Menchaca A. 2015. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*. 10(8): 136690-136707.
- 40 Cruz M.P. 2015. Conestat alfa (Ruconest) first recombinant C1 esterase inhibitor for the treatment of acute attacks in patients with hereditary angioedema. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(2): 109-111.

- 41 Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L. & Zhu H. 2015. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Scientific Reports*. 5: 10482-10493.
- 42 Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A. & Ayares D.L. 2002. Targeted disruption of the  $\alpha 1,3$ galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*. 20(3): 251-255.
- 43 Davis B. & Bernstein J.A. 2011. Conestat alfa for the treatment of angioedema attacks. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 7: 265-273.
- 44 Denman J., Hayes M., O'Day C., Edmunds T., Bartlett C., Hirani S., Ebert K.M., Gordon K. & McPherson J.M. 1991. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 9(9): 839-843.
- 45 Di Primio C., Galli A., Cervelli T., Zoppe` M. & Rainaldi G. 2005. Potentiation of gene targeting in human cells by expression of *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *Nucleic Acids Research*. 33(14): 4639-4648.
- 46 DiMasi J.A. & Grabowski H.G. 2007. Economics of new oncology drug development. *Journal of Clinical Oncology*. 25(2): 209-216.
- 47 Dobson H., Smith R., Royal M., Knight Ch. & Sheldon I. 2007. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 42(Suppl 2): 17-23.
- 48 Doudna J.A. & Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346(6213): 1077-1087.
- 49 Dove A. 2002. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature Biotechnology*. 20(8): 777-779.
- 50 Dyck M.K., Lacroix X., Pothier F. & Sirard M.A. 2003. Making recombinant proteins in animals - different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*. 21(9): 394-409.
- 51 Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M.A., Schindler J.E., Monastersky G.M., Vitale J.A. & Gordon K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 9(9): 835-838.
- 52 Echelard Y., Gavin W., Lawton A., Ziomek C & Meade H. 2009. Transgenic technology: a validated approach for large-scale manufacturing. *BioProcessing*. 29: 50-54.
- 53 Echelard Y., Williams J.L., Destrempe M.M., Koster J.A., Overton S.A., Pollock D.P., Rapiejko K.T., Behboodi E., Masiello N.C., Gavin W.G., Pommer J., Van Patten S.M., Faber D.C., Cibelli J.B. & Meade H.M. 2009. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle. *Transgenic Research*. 18(3): 361-376.
- 54 Echelard Y., Ziomek C.A. & Meade H.M. 2006. Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals. *BioPharm International*. 19(8): 36-42.
- 55 Edmunds T., Van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M. & Cole E.S. 1998. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*. 91(12): 4561-4571.
- 56 Evaluatepharma. 2014. Budget Busters: The shift to high-priced innovator drugs in the USA. Disponível em: <<http://info.evaluategroup.com/rs/evaluatepharmaltd/images/SV2014.pdf>>. [Accessed online April 2015].
- 57 Evans M.J. & Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819): 154-156.
- 58 Eyestone W.H. 1999. Production and breeding of transgenic cattle using *in vitro* embryo production technology. *The-riogenology*. 51(2): 509-517.
- 59 Fan W., Plaut K., Bramley A.J., Barlow J.W. & Kerr D.E. 2002. Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 85(7): 1709-1716.
- 60 Feltrin C., Cooper C.A., Mohamad-Fauzi N., Rodrigues V.H.V. Aguiar L.H., Gaudencio-Neto S., Martins L.T., Calderón C.E.M., Morais A.S., Carneiro I.S., Almeida T.M., Silva I.N.G. Rodrigues J.L., Maga E.A., Murray J.D., Libório A.B., Bertolini L.R. & Bertolini M. 2014. Systemic Immunosuppression by Methylprednisolone and Pregnancy Rates in Goats Undergoing the Transfer of Cloned Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 49(4): 648-656.
- 61 Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K. & Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using

- gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Research*. 41(20): 187-195.
- 62 Gavin W. 2014. ATryn®: 1st GE (genetically engineered) animal success story for production of a human recombinant pharmaceutical. *BMC Proceedings*. 8(Suppl 4): O4.
- 63 Gerger R.P.C., Zago F.C., Ribeiro E.S., Gaudencio-Neto E.S., Martins L.T., Aguiar L.H., Rodrigues V.H.V., Furlan F.H., Ortigari Jr.I., Sainz R.D., Ferrell C.L., Miglino M.A., Ambrósio C.E., Rodrigues J.L., Rossetto R., Forell F., Bertolini L.R. & Bertolini M. 2016. Developmental pattern of bovine handmade cloned concepti in late pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*. [in press].
- 64 Ghaderi D., Zhang M., Hurtado-Ziola N. & Varki A. 2012. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 28: 147-175.
- 65 Ghersa P., Gobert R.P., Sattonnet-Roche P., Richards C.A., Merlo Pich E. & Hooft van Huijsduijnen R. 1998. Highly controlled gene expression using combinations of a tissue-specific promoter, recombinant adenovirus and a tetracycline-regulatable transcription factor. *Gene Therapy*. 5(9): 1213-1220.
- 66 Giritch A., Marillonnet S., Engler C., Vaneldik G., Botterman J. & Klimyuk V. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants co-infected with non-competing viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(40): 14701-14706.
- 67 Gironès M., Bolhuis-Versteeg L.A., Lammertink R.G. & Wessling M. 2006. Flux stabilization of silicon nitride microsieves by backpulsing and surface modification with PEG moieties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 299(2): 831-840.
- 68 Gordon J.W. & Ruddle F.H. 1981. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei. *Science*. 214(4526): 1244-1246.
- 69 Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. & Ruddle F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of National Academic Sciences*. 77(12): 7380-7384.
- 70 GTC Biotherapeutics. 2009. US Package Insert. Antithrombin (Recombinant) ATryn for Injection, 16 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM134045.pdf>> [Accessed online April 2015].
- 71 Gu J.F., Qiu M. & Yang J.C. 2013. Enhanced tolerance to drought in transgenic rice plants overexpressing C4 photosynthesis enzymes. *The Crop Journal*. 1(2): 105-114.
- 72 Gupta R.M. & Musunuru K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *Journal of Clinical Investigation*. 124(10): 4154-4161.
- 73 Hacker D.L., De Jesus M. & Wurm F.M. 2009. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnology Advances*. 27(6): 1023-1027.
- 74 Hai T., Teng F., Guo R., Li W. & Zhou Q. 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*. 24(3): 372-375.
- 75 Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D. & Brinster R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 315(6021): 680-683.
- 76 Han H., Ma Y., Wang T., Lian L., Tian X., Hu R., Den S., Li K., Wang F., Li N., Liu G., Zhao Y. & Lian Z. 2014. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*. 1(1): 2-5.
- 77 Han Z.S., Li Q.W., Zhang Z.Y., Xiao B., Gao D.W., Wu S.Y., Li J., Zhao H.W., Jiang Z.L. & Hu J.H. 2007. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expression and Purification*. 53(1): 225-231.
- 78 Han Z.S., Li Q.W., Zhang Z.Y., Yu Y.S., Xiao B., Wu S.Y., Jiang Z.L., Zhao H.W., Zhao R. & Li J. 2008. Adenoviral vector mediates high expression levels of human lactoferrin in the milk of rabbits. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(1): 153-159.
- 79 Han Z., Wu S., Li Q., Li J., Gao D., Li K., Liu Z.W. & Zhao H. 2009. Efficient human growth hormone gene expression in the milk of non-transgenic goats. *Folia Biologica (Praha)*. 55(1): 17-22.
- 80 Harvey A.J. & Ivarie R. 2003. Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poultry Science*. 82(6): 927-930
- 81 Harvey A.J., Speksnijder G., Baugh L.R., Morris J.A. & Ivarie R. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnology*. 20(4): 396-399.

- 82 Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M. & Fischer R. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*. 22(11): 1415-1422.
- 83 Heo Y.T., Quan X., Xu Y.N., Baek S., Choi H., Kim N.H. & Kim J. 2015. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells and Development*. 24(3): 393-402.
- 84 Herbers K. & Sonnewald U. 1999. Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(2): 163-168.
- 85 Hood E.E. 2002. From green plants to industrial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 30(3): 279-283.
- 86 Houdebine L.M. 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *Journal of Biotechnology*. 34(3): 269-287.
- 87 Houdebine L.M. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research*. 9(4-5): 305-320.
- 88 Houdebine L.M. 2002. Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(6): 625-629.
- 89 Houdebine L.M. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 32(2): 107-121.
- 90 Hsu P.D., Lander E.S. & Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 157(6): 1262-1278.
- 91 Hu N.J., Rada H., Rahman N., Nettleship J.E., Bird L., Iwata S., Drew D., Cameron A.D. & Owens R.J. 2015. GFP-Based Expression Screening of Membrane Proteins in Insect Cells Using the Baculovirus System. *Methods in Molecular Biology*. 1261: 197-209.
- 92 Huang S., Zhang K., Huang Y., Chen M., Li H., Lu D., Lu J., Chen Y., Qiu X., Xue J. & Zeng Y. 1998. Secretion of biological active human IX protein in the milk of transgenic goats. *Chinese Science Bulletin*. 43(15): 1317-1319.
- 93 Ishii Y., Tsukahara M. & Wakamatsu K. 2015. A rapid method for simultaneous evaluation of free light chain content and aggregate content in culture media of Chinese hamster ovary cells expressing monoclonal antibodies for cell line screening. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. [in press].
- 94 Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. & Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 169(12): 5429-5433.
- 95 Ivics Z., Mátés L., Yau T.Y., Landa V., Zidek V., Bashir S., Hoffmann O.I., Hiripi L., Garrels W., Kues W.A., Bösze Z., Geurts A., Pravenec M., Rüllicke T. & Izsvák Z. 2014. Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nature Protocols*. 9(4): 773-793.
- 96 Jacobs P.P. & Callewaert N. 2009. N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Current Molecular Medicine*. 9(7): 774-800.
- 97 Jackson D.A., Symons R.H. & Berg P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69(10): 2904-2909.
- 98 Jaenisch R. & Mintz B. 1974. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA (blastocyst microinjection *in vitro*/development/DNA re-association kinetics of simian virus 40). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 71(4): 1250-1254.
- 99 Jänne J., Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Alhonen L., Sinervirta R. & Halmekytö M. 1994. Transgenic bioreactors. *The International Journal of Bbiochemistry*. 26(7): 859-870.
- 100 Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S. & Yap M.G. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*. 103(10): 40-47.
- 101 Jeng M.H., Kao C., Sivaraman L., Krnacik S., Chung L.W., Medina D., Conneely O.M. & O'Malley B.W. 1998. Reconstitution of estrogen-dependent transcriptional activation of an adenoviral target gene in select regions of the rat mammary gland. *Endocrinology*. 139(6): 2916-2925.
- 102 Jeong Y.H., Park C.H., Jang G.H., Jeong Y.I., Hwang I.S., Jeong Y.W., Kim Y.K., Shin T., Kim N.H., Hyun S.H., Jeung E.B. & Hwang W.S. 2013. Production of multiple transgenic Yucatan miniature pigs expressing human complement regulatory factors, human CD55, CD59, and H-transferase genes. *PLoS One*. 8(5): e63241.

- 103 Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A. & Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816-821.
- 104 Kasperek P., Krausova M., Haneckova R., Kriz V., Zbodakova O., Korinek V. & Sedlacek R. 2014. Efficient gene targeting of the *Rosa26 locus* in mouse zygotes using TALE nucleases. *FEBS Lett*. 588(21): 3982-3988.
- 105 Keefer C.L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A.A., Zhou J.F., Leduc M., Downey B.R., Lazaris A. & Karatzas C.N. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biology of Reproduction*. 64(3): 849-856.
- 106 Kelley B. 2009. Industrialization of mAb production technology. The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*. 1(5): 443-452.
- 107 Kim J.Y., Kim Y.G. & Lee G.M. 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3): 917-930.
- 108 Kim P.M., Allen C., Wagener B.M., Shen Z., Nickoloff J.A. 2001. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 29(21): 4352-4360.
- 109 Kim Y., Kweon J., Kim A., Chon J.K., Yoo J.Y., Kim H.J., Kim S., Lee C., Jeong E., Chung E., Kim D., Lee M.S., Go E.M., Song H.J., Kim H., Cho N., Bang D., Kim S. & Kim J.S. 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*. 31(3): 251-258.
- 110 Kirk D.D., McIntosh K., Walmsley A.M. & Peterson R.K. 2005. Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Research*. 14(4): 449-462.
- 111 Ko J.H., Lee C.S., Kim K.H., Pang M.G., Koo J.S., Fang N., Koo D.B., Oh K.B., Youn W.S., Zheng G.D., Park J.S., Kim S.J., Han Y.M., Choi I.Y., Lim J., Shin S.T., Jin S.W., Lee K.K. & Yoo O.J. 2000. Production of biologically active human granulocyte colony-stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research*. 9(3): 215-222.
- 112 Kong Q., Wu M., Huan Y., Zhang L., Liu H., Bou G., Luo Y., Mu Y. & Liu Z. 2009. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS One*. 4(8): e6679.
- 113 Kues W.A. & Niemann H. 2011. Advances in farm animal transgenesis. *Preventive Veterinary Medicine*. 102(2): 146-156.
- 114 Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J. & Randall S. 2002. Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 295(5557): 1089-1092.
- 115 Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G. & Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*. 57(5): 717-723.
- 116 Le Provost F., Lilloco S., Passet B., Young R., Whitelaw B. & Vilotte J.L. 2010. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends in Biotechnology*. 28(3): 134-141.
- 117 Leader B., Baca Q.J. & Goland D.E. 2008. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7(1): 21-39.
- 118 Lee W.K., Han Y.M., Shin S.T., Lee D.H., Yoo O.J. & Lee K.K. 1997. *In vitro* development of DNA-injected embryos co-cultured with goat oviduct epithelial cells in Korean native goats (*Capra hircus aegagrus*). *Theriogenology*. 47(5): 1115-1123.
- 119 Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zhao Y. & Liu M. 2013. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 31(8): 681-683.
- 120 Li P., Estrada J.L., Burlak C., Montgomery J., Butler J.R., Santos R.M., Wang Z.Y., Paris L.L., Blankenship R.L., Downey S.M., Tector M. & Tector A.J. 2015. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*. 22(1): 20-31.
- 121 Lilloco S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J. & Haslam C. 2007. Oviduct specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(6): 1771-1776.
- 122 Lima D.M. 2006. A tecnologia da transgênese e seu respaldo jurídico. *Revista de Direito Público*. 1: 37-44.
- 123 Lin T.P. 1966. Microinjection of mouse eggs. *Science*. 151(3708): 333-337.
- 124 Lin J., Zhang Q., Zhu L.Q., Yu Q.H. & Yang Q. 2014. The copy number and integration site analysis of IGF-1 transgenic goat. *International Journal of Molecular Medicine*. 34(3): 900-910.
- 125 Liu Z.B., Han Z.S., Li Q.W., Yang H., Lu W.Z. & Li W.Y. 2010. Enhanced expression of adenovirus encoding rhEPO assisted by BAPTA. *Animal Biotechnology*. 21(3): 164-169.

- 126 Lubon H. & Paleyanda R.K. 1997. Vitamin K-dependent protein production in transgenic animals. *Thrombosis and Haemostasis*. 78(1): 532-536.
- 127 Luo J., Deng Z.L., Luo X., Tang N., Song W.X., Chen J., Sharff K.A., Luu H.H., Haydon R.C., Kinzler K.W., Vogelstein B. & He T.C. 2007. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*. 2(5): 1236-1247.
- 128 Maga E.A., Cullor JS., Smith W., Anderson G.B. & Murray J.D. 2006. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3(4): 384-392.
- 129 Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E. & Church G.M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339(6121): 823-826.
- 130 Mari P.O., Florea B.I., Persengiev S.P., Verkaik N.S., Brüggewirth H.T., Modesti M., Giglia-Mari G., Bezstarosti K., Demmers J.A., Luider T.M., Houtsmuller A.B. & van Gent D.C. 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(49): 18597-18602.
- 131 Markaki M., Drabek D., Livadaras I. & Craig R.K. 2007. Stable expression of human Growth Hormone over 50 generations in transgenic insect larvae. *Transgenic Research*. 16(1): 99-107.
- 132 Mckee C., Gibson A., Dalrymple M., Emslie L., Garner I. & Cottingham I. 1998. Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nature Biotechnology*. 16(7): 647-651.
- 133 Meng L., Wan Y., Sun Y., Zhang Y., Wang Z., Song Y. & Wang F. 2013. Generation of five human lactoferrin transgenic cloned goats using fibroblast cells and their methylation status of putative differential methylation regions of IGF2R and H19 imprinted genes. *PloS One*. 8(10): e77798.
- 134 Ménoret S., Tesson L., Rémy S., Usal C., Thépenier V., Thinard R., Ouisse L.H., De Cian A., Giovannangel C., Concordet J.P. & Anegon I. 2015. Gene targeting in rats using transcription activator-like effector nucleases. *Methods* (San Diego, U.S.A.). 69(1): 102-107.
- 135 Michel B., Ehrlich S.D. & Uzest M. 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO Journal*. 16(2): 430-438.
- 136 Miller J., McLachlan A.D. & Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*. 4(6): 1609-1614.
- 137 Mizutani A., Tsunashima H., Nishijima K., Sasamoto T., Yamada Y., Kojima Y., Motono M., Kojima J., Inayoshi Y., Miyake K., Park E.Y. & Iijima S. 2012. Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Research*. 21(1): 63-75.
- 138 Mladenov E. & Iliakis G. 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research*. 7(11): 61-72.
- 139 Nettleship J.E. 2012. Structural biology of glycoproteins, glycosylation. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/glycosylation/structural-biology-of-glycoproteins>>. [Accessed online November 2014].
- 140 Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A. & Chen C. 2014. Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. *PloS One*. 9(9): 106718-106724.
- 141 Niemann H. & Kues W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reproduction Science*. 79(3-4): 291-317.
- 142 Niemann H. & Kues W.A. 2007. Transgenic farm animals: an update. *Reproduction Fertility and Development*. 19(6): 762-770.
- 143 Oh H.J., Park J.E., Park E.J., Kim M.J., Kim G.A., Rhee S.H., Lim S.H., Kang S.K. & Lee B.C. 2014. Analysis of cell growth and gene expression of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as nuclear donor cell. *Development, Growth & Differentiation*. 56(9): 595-604.
- 144 Osungbade K.O. & Ige O.K. 2011. Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *Journal of Pregnancy*. 2011: 481095-481096.
- 145 Pabo C.O., Peisach E. & Grant R.A. 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 313-340.
- 146 Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C. & Evans R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*. 300(5893): 611-615.

- 147 Park S., Xu Y., Stowell X.F., Gai F., Saven J.G. & Boder E.T. 2006. Limitations of yeast surface display in engineering proteins of high thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection*. 19(5): 211-217.
- 148 Parker M.H., Birck-Wilson E., Allard G., Masiello N., Day M., Murphy K.P., Paragas V., Silver S. & Moody M.D. 2004. Purification and characterization of a recombinant version of human alpha-fetoprotein expressed in the milk of transgenic goats. *Protein Expression and Purification*. 38(2): 177-183.
- 149 Pattanayak V., Guilinger J. P. & Liu, D. R. 2014. Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. *Methods in Enzymology*. 546: 47-78.
- 150 Pereira A.F., Feltrin C., Almeida K.C., Carneiro I.S., Avelar S.R.G., Alcântara Neto A.S., Sousa F.C., Melo C.H.S., Moura R.R., Teixeira D.I.A., Freitas V.J.F., Bertolini L.R. & Bertolini M. 2013. Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research*. 109(2-3): 163-172.
- 151 Perez-Pinera P., Ousterout D.G., Brown M.T. & Gersbach C.A. 2012. Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Research*. 40(8): 3741-3752.
- 152 Pharming. 2015. Pharming group: a potential genzyme in the making. Disponível em: <<http://www.pharming.com/archives/2187>>. [Accessed online May 2015].
- 153 Pimentel V., Gomes R., André L., Maciel M. & Pieroni J.P. 2013. O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. *BNDES Setorial*. 38: 173-212.
- 154 Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y. & Meade H.M. 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 231(1-2): 147-157.
- 155 Prentiss M., Prévost C. & Danilowicz C. 2015. Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 50(6): 453-476.
- 156 Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B. & Fahrenkrug S.C. 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*. 24(1): 147-153.
- 157 Pursel V.G. & Rexroad C.E. 1993. Status of research with transgenic farm animals. *Journal of Animal Science*. 71(Suppl 3): 10-19.
- 158 Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., Bolt D.J., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L. & Hammer R.E. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science*. 244 (4910): 1281-1288.
- 159 Quartz. 2015. The best selling prescription drugs in the world last year. Disponível em: <<http://qz.com/349929/best-selling-drugs-in-the-world/>>. [Accessed online April 2015].
- 160 Raju T.S. 2003. Glycosylation variations with expression systems and their impact on biological activity of therapeutic immunoglobulins. *BioProcess International*. 1: 44-54.
- 161 Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F. & Joung J.K. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods*. 5(5): 374-375.
- 162 Reis C., Pieroni J.P. & Souza J.O.B. 2010. Biotecnologia para saúde no Brasil. *BNDES Setorial*. 32: 193-230.
- 163 Remy S., Tesson L., Menoret S., Usal C., De Cian A., Thepenier V., Thinard R., Baron D., Charpentier M., Renaud J.B., Buelow R., Cost G.J., Giovannangeli C., Fraichard A., Concordet J.P. & Anegon I. 2014. Efficient gene targeting by homology-directed repair in rat zygotes using TALE nucleases. *Genome Research*. 24(8): 1371-1383.
- 164 Robl J.M., Wang Z., Kasinathan P. & Kuroiwa Y. 2007. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*. 67(1): 127-133.
- 165 Royer C., Jalabert A., Da Rocha M., Grenier A.M., Mauchamp B. & Couble P. 2005. Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Research*. 14(4): 463-472.
- 166 Rudolph N.S. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*. 17(9): 367-374.
- 167 Rusconi S. 1990. Transgenic regulation in laboratory animals. *Experientia*. 47(9): 866-877.
- 168 Sanchez O., Barrera M., Farnós O., Parra N.C., Salgado E.R., Saavedra P.A., Meza C.D., Rivas C.I., Cortez-San Martín M. & Toledo J.R. 2014. Effectiveness of the E2-classical swine fever virus recombinant vaccine produced and formulated within whey from genetically transformed goats. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21(12): 1628-1634.
- 169 Sanchez O., Toledo J.R., Rodríguez M.P. & Castro F.O. 2004. Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *Journal of Biotechnology*. 114(1-2): 89-97.



- 170 Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. & Campbell K.H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 278(5346): 2130-2133.
- 171 Seruggia D. & Montoliu L. 2014. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Research*. 23(5): 707-716.
- 172 Shapiro G.S., Van Peurse C., Ornelles D.A., Schaack J. & DeGregori J. 2006. Recombinant adenoviral vectors can induce expression of p73 via the E4-orf6/7 protein. *Journal of Virology*. 80(11): 5349-5360.
- 173 Shrivastav M., De Haro L.P. & Nickoloff J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*. 18(1): 134-147.
- 174 Simons J.P., Wilmut I., Clark A.J., Archibald A.L., Bishop J.O. & Lathe R. 1988. Gene transfer into sheep. *Biotechnology*. 6: 179-183.
- 175 Smith H.O. & Wilcox K.W. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*, purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*. 51(2): 379-391.
- 176 Smith J., Bibikova M., Whitby F. G., Reddy A.R., Chandrasegaran S. & Carroll D. 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Research*. 28(17): 3361-3369.
- 177 Smith K. 2001. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reproduction, Nutrition, Development*. 41(6): 465-485.
- 178 Soler E. & Houdebine L.M. 2007. Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*. 13: 65-94.
- 179 Stromqvist M., Houdebine L.M., Andersson J.O., Edlund A., Johansson T., Viglietta C., Puissant C. & Hansson L. 1997. Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of trans-genic rabbits. *Transgenic Research*. 6(4): 271-278.
- 180 Stryjewska A., Kiepusa K., Librowski T. & Lochyński S. 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports: PR*. 65(5): 1075-1085.
- 181 Sugio A., Yang B., Zhu T. & White F.F. 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA $\gamma$ 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(25): 10720-10725.
- 182 Sun J.Y., Anand-Jawa V., Chatterjee S. & Wong K.K. 2003. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Therapy*. 10(11): 964-976.
- 183 Swiech K., de Freitas M.C., Covas D.T. & Picanço-Castro V. 2015. Recombinant glycoprotein production in human cell lines. *Methods in Molecular Biology*. 1258: 223-240.
- 184 Tai L.M., Youmans K.L., Jungbauer L., Yu C. & LaDu M.J. 2011. Introducing Human APOE into A Transgenic Mouse Models. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011: 810981-810989.
- 185 Tan W., Carlson D. F., Lancto C.A., Garbe J.R., Webster D.A., Hackett P.B. & Fahrenkrug S.C. 2013. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(41): 16526-16531.
- 186 Tavares K.C.S., Dias A.C., Lazzarotto C.R., Gaudencio-Neto S., de Sá Carneiro I., Ongaratto F.L., Pinto A.F., de Aguiar L.H., Calderón C.E., Toledo J.R., Castro F.O., Santos D.S., Chies J.M., Bertolini M. & Bertolini L.R. 2015. Transient Expression of Functional Glucocerebrosidase for Treatment of Gaucher's Disease in the Goat Mammary Gland. *Molecular Biotechnology*. November: 1-9.
- 187 Tavares K.C.S., Pinho R.M., Carneiro I.S., Aguiar L.H., Calderon C.E.M., Martins L.T., Ambrósio C.E., Bertolini M., Maga E.A., Murray J.D. & Bertolini L.R. 2012. Efficient RNAi-induced protein knockdown in somatic cells using diced or chemically produced Small Interfering RNAs (siRNA). *Acta Scientiae Veterinaria*. 40(3): 1048-1058.
- 188 Thomson A.J., Marques M.M. & McWhir J. 2003. Gene targeting in livestock. *Reproduction Supplements*. 61: 495-508.
- 189 Toledo J.R., Sánchez O., Montesino R., Farnos O., Rodríguez M.P., Alfonso P., Oramas N., Rodríguez E., Santana E., Vega E., Ganges L., Frias M.T., Cremata J. & Barrera M. 2008. Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *Journal of Biotechnology*. 133(3): 370-376.
- 190 Toledo J.R., Sánchez O., Seguí M.R., García F.Y., Rodríguez M.P. & Cremata J.A. 2005. Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1726(1): 48-56.

- 191 Toledo J.R., Sánchez O., Seguí R.M., García G., Montañez M., Zamora P.A., Rodríguez M.P. & Cremata J.A. 2006. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *Journal of Biotechnology*. 123(2): 225-235.
- 192 U.S. Food and Drug Administration. 2015. AquAdvantage Salmon Approval Letter and Appendix. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/GeneticEngineering/GeneticallyEngineered-Animals/ucm466214.htm>>. [Accessed online May 2015]
- 193 Verma I.M. & Somia N. 1997. Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature*. 389(6648): 239-242.
- 194 Voigt A., Katterle Y., Kahle M., Kluge R., Schürmann A., Joost H.G. & Klaus S. 2015. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling prevents diabetes but not obesity in NZO mice, a model for polygenic diabetes. *Genes & Nutrition*. 10(6): 57-67.
- 195 Wagner S., Thresher R., Bland R. & Laible G. 2015. Adeno-associated-virus-mediated transduction of the mammary gland enables sustained production of recombinant proteins in milk. *Scientific Reports*. 5: 15115-15123.
- 196 Wall R.J. 1999. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. *Livestock Production Science*. 59(2): 243-255.
- 197 Walsh G. 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*. 32: 992-1000.
- 198 Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J. & Liu E. 2013. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *BioMed Research International*. 2013: 2314-6133.
- 199 Whitelaw C.B., Springbett A.J., Webster J. & Clark J. 1993. The majority of G0 transgenic mice are derived from mosaic embryos. *Transgenic Research*. 2(1): 29-32.
- 200 Whyte J.J., Zhao J., Wells K.D., Samuel M.S., Whitworth K.M., Walters E.M., Laughlin M.H. & Prather R.S. 2011. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Molecular Reproduction and Development*. 78(1): 2.
- 201 Wilmut I., Bai Y. & Taylor J. 2015. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philosophical Transactions B*. 370: 9-17.
- 202 Xiao B., Li Q.W., Feng B., Han Z.S., Gao W., Li J., Li K., Zhao R., Jiang Z.L., Hu J.H. & Zhi X.B. 2008. High-level expression of recombinant human nerve growth factor beta in milk of nontransgenic rabbits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 105(4): 327-334.
- 203 Xu J., Yang L., Luo Z. & Wang Y. 2010. Synthesis of poly(N,N-dimethylacrylamide)-block-poly(ethylene oxide)-block-poly(N,N-dimethylacrylamide) and its application for separation of proteins by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 31(10): 1713-1720.
- 204 Yang H., Li Q.W., Han Z.S., Hu J.H., Li W.Y. & Liu Z.B. 2009. Recombinant human antithrombin expressed in the milk of non-transgenic goats exhibits high efficiency on rat DIC model. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 28(4): 449-457.
- 205 Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L. & Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154(6): 1370-1379.
- 206 Yang J., Tsukamoto T., Popnikolov N., Guzman R.C., Chen X., Yang J.H. & Nandi S. 1995. Adenoviral-mediated gene transfer into primary human and mouse mammary epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters*. 98(1): 9-17.
- 207 Yang Y., Güell M., Niu D., George H., Lesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R.A., Fishman J.A. & Church G. 2015. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 350(6264): 1101-1104.
- 208 Yeh P. & Perricaudet M. 1997. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB Journal*. 11(8): 615-623.
- 209 Yu H., Chen J., Liu S., Zhang A., Xu X., Wang X., Lu P. & Cheng G. 2013. Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats. *Journal of Biotechnology*. 168(4): 676-683.
- 210 Yu J.C., Liu S., Chen J., Xu X., Sha H., Zhang, Wu G., Xu F. & Cheng G. 2006. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats Guohua. *Journal of General Virology*. 87(4): 1019-1027.
- 211 Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y. & Li N. 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*. 21(11): 1638-1640.
- 212 Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A., Chen J. & Cheng G. 2008. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expression and Purification*. 57(2): 127-35.

- 213 Zhang Y.L., Wan Y.J., Wang Z.Y., Xu D., Pang X.S., Meng L., Wang L.H., Zhong B.S. & Wang F. 2010.** Production of dairy goat embryos, by nuclear transfer, transgenic for human acid beta-glucosidase. *Theriogenology*. 73(5): 681-690.
- 214 Zhao M.T., Lin H., Liu F.J., Quan F.S., Wang G.H., Liu J., Hua S. & Zhang Y. 2009.** Efficiency of human lactoferrin transgenic donor cell preparation for SCNT. *Theriogenology*. 71(2): 376-384.
- 215 Zhu L., Vande-Lavoie M.C., Albanese J., Beenhouwer D.O., Cardarelli P.M. & Cuison S. 2005.** Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology*. 23(9): 1159-1169.

