UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP/USP

MARCELA CRISTINA CORRÊA DE FREITAS

**Clonagem e expressão do fator VII de coagulação sanguínea
em linhagens celulares humanas.**

Ribeirão Preto

2015

MARCELA CRISTINA CORRÊA DE FREITAS

**Clonagem e expressão do fator VII de coagulação sanguínea
em linhagens celulares humanas.**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas – Modalidade Biomédica.

Área de Concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Freitas, Marcela Cristina Corrêa de

Clonagem e expressão do fator VII de coagulação sanguínea em linhagens celulares humanas/ Marcela Cristina Corrêa de Freitas; orientador Dimas Tadeu Covas. - Ribeirão Preto, 2015.
99 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2015.

1. Fator VII. 2. Proteínas recombinantes. 3. Linhagens celulares humanas.

Nome: FREITAS, Marcela Cristina Corrêa de
Título: Clonagem e expressão do fator VII de coagulação sanguínea em linhagens celulares humanas.

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas –
Modalidade Biomédica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais, José Augusto e Vânia, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o amor e suporte necessários. E as minhas irmãs, Josi e Laís, que mesmo distantes fisicamente se fazem presentes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pela oportunidade, orientação e confiança depositadas em mim, os quais contribuíram para meu crescimento científico e pessoal;
- À Dra. Virgínia Picanço e Castro pela ajuda, atenção, ensinamentos, paciência e principalmente pela amizade e por ser um exemplo para mim;
- Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pela oportunidade e apoio financeiro;
- À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização do curso de doutorado;
- À Fapesp – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;
- Aos coordenadores dos laboratórios de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto: Maristela Delgado Orelana, Patrícia Vianna Bonini Palma, Simone Kashima, Virgínia Picanço e Castro, Kamilla Swiech Antonietto, e Wilson Araújo da Silva Junior;
- A Aline e a Amanda que foram meus braços direito e esquerdo durante todos os experimentos, análises e discussões científicas;
- A Carolina Thomé e a Clarice do Centro de Química de Proteínas pelos ensinamentos e paciência;
- A Sandra Navarro pela atenção e ajuda com as figuras;
- A Dalvinha, a Renata e a Carminha pela atenção e por serem sempre tão prestativas e solícitas;
- Ao Emerson e a Adriana, secretários do Departamento de Clínica Médica – FMRP/USP;

- À banca examinadora, Profa. Dra. Elisabeth Augusto, Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo, Dra. Virgínia Picanço e Castro e Prof. Dr. Vitor Marcel Faça, por terem aceitado o convite e pelas críticas e sugestões feitas ao trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Aos meus pais José Augusto e Vânia por todo amor, carinho, compreensão, ensinamentos, suporte e por sempre acreditarem em mim e me apoiarem;
- As minhas queridas irmãs Josi e Laís pelo amor, carinho, cumplicidade e horas de risadas e brincadeiras sempre que estamos juntas;
- Aos meus avós Alceu e Carmen e Jurandir e Angelina pelo carinho e apoio;
- Ao tio André, tio Jú, Jocele e Érika pelo apoio, carinho e incentivo que sempre me deram;
- Ao meu namorado Thiago Alvarenga que apesar de ser um dos últimos a fazer parte desta etapa se tornou uma das pessoas mais importantes da minha vida;
- As minhas amigas de Rio Preto, Paula e Luiza e as minhas amigas da faculdade Francieli, Anna Isabel, Mariane, Patrícia, e Fernanda pelos anos de amizade, conselhos, cumplicidade, apoio e carinho;
- As minhas queridas amigas Daiani, Gabi e Nathália pelos anos de convivência, carinho e amizade;
- As minhas queridas “irmãzinhas” da Biotecnologia Aline, Luiza, Lilian e Naiara pela convivência diária, amizade, apoio, conselhos, ouvidos comilanças e por fazerem meus dias mais leves e felizes;
- Aos amigos Rafael, Robson, Ângelo, Mario, Amanda e Giu pela convivência, amizade, viagens e paciência na cultura;
- A amiga Danielle Magalhães pela amizade, conselhos e parceria;
- Aos amigos do laboratório de Transferência Gênica Lucas, Ricardo, Daianne, Thaís, Raquel e aos que já se foram Andrielle, Marta, Danilo e Sr Luis pela convivência, troca de experiências e amizade;
- Aos amigos Mauricio, Ferzinha, Aline Romagnoli, Evandra, Péricles, Alexander, Slav, Suelen, Daiane, Virginia Mara, Mariana, Katia, Tathi, Rochelle, Juliana Ueda, Carol, Samia, Thaísa;

- A todos os amigos e funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, afinal em 9 anos de Hemocentro muitas pessoas fizeram parte dessa caminhada;
- E o meu muito obrigada a Deus e aos amigos espirituais pela oportunidade, proteção e paciência durante toda a minha caminhada.

“Sempre recebi os elogios como incentivos dos amigos para que eu venha a ser o que eu tenho consciência de que ainda não sou...”

(Chico Xavier)

RESUMO

FREITAS, M. C. C. **Clonagem e expressão do fator VII de coagulação sanguínea em linhagem celulares humanas.** 2015. 92 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2015.

O Fator VII recombinante (FVIIr) tem sido a principal escolha terapêutica dos pacientes hemofílicos que desenvolvem inibidores contra os fatores VIII e IX utilizados como tratamento. Atualmente, o produto utilizado é produzido em células de camundongo (BHK-21), o qual oferece desvantagens considerando a complexidade das modificações pós-traducionais desta proteína e a inserção de glicosilações de origem murina altamente imunogênicas aos seres humanos. Dessa maneira a produção de proteínas para uso terapêutico em linhagens celulares humanas surge como uma alternativa promissora. Dentro desse contexto, o objetivo principal deste trabalho foi clonar e expressar o FVII de coagulação sanguínea em 3 linhagens celulares humanas (HepG2, Sk-Hep, HKB-11), compará-las com a linhagem murina BKH-21, e selecionar a melhor produtora da proteína recombinante. As células foram modificadas com o vetor lentiviral p1054-CIGWS, contendo os genes do FVII e do marcador GFP. Após a modificação das células foi observada uma eficiência de transdução de 80% nas células BHK-21-FVIIr, 73% nas células HepG2-FVIIr, 32% nas células HKB-11-FVIIr e 95% Sk-Hep-FVIIr. Análises da expressão gênica por PCR em Tempo Real mostraram que as três linhagens humanas modificadas apresentaram expressão do RNAm relativo ao FVIIr, sendo que a linhagem celular HepG2 foi a que teve maior expressão de FVIIr, seguida da Sk-Hep-1 e HKB-11. Quando submetidas ao tratamento com vitamina K por um período de 10 dias em cultura, a expressão do gene FVIIr foi semelhante para as três linhagens (HepG2: 164563 URE, HKB-11: 119122 URE e Sk-Hep: 124919 URE). O FVII é uma proteína que para sua ativação, possui como principal modificação pós traducional a γ -carboxilação vitamina K dependente, que ocorre por meio do ciclo da vitamina K com a participação de 3 enzimas, γ -carboxilase, VKORC1 e calumenina (inibidor). A expressão gênica dessas enzimas foi avaliada antes e após o tratamento com a vitamina K. Foi possível observar que houve um aumento nos níveis de RNAm nas células humanas tratadas com vitamina K, sugerindo que esta é capaz de ativar as enzimas do ciclo da γ -carboxilação. A cinética de crescimento celular em garrafas estáticas mostrou que as células murinas BHK-21 modificadas possuem uma velocidade específica de crescimento 25% mais elevada que das células humanas. Contudo a cinética de produção das linhagens recombinantes mostrou que as células humanas produzem

cerca de 3 vezes mais FVIIr do as células BHK-21. Devida a baixa produção de FVIIr na linhagem celular murina, e ao fato de que a linhagem humana HepG2 apresenta um perfil de crescimento extremamente lento, as linhagens recombinantes Sk-Hep-1-FVIIr e HKB-11-FVIIr foram selecionadas para ensaios de cultivo em suspensão utilizando microcarregadores em frascos *spinners*. Ao longo de 10 dias de cultivo as células HKB-11-FVIIr mostraram uma produção acumulada de 152 µg de FVIIr, o que corresponde a 304 UI. As células Sk-Hep-1-FVIIr produziram cerca de 202,6 µg de FVIIr, o que corresponde a 405,2 UI. Em suma, nossos dados comprovam que as linhagens celulares humanas são eficazes para a produção de fator VII recombinante, uma vez que, utilizando nosso modelo de produção, estas mostraram-se melhores do que a de células murinas (BHK-21) utilizadas pela indústria. Assim, estas linhagens celulares humanas podem ser usadas como uma nova plataforma para a produção de FVII, bem como para outras proteínas recombinantes, de maneira mais segura e com menor risco de desenvolvimento de anticorpos inibidores.

Palavras chave: Fator VII, proteína recombinante, linhagens celulares humanas.

ABSTRACT

FREITAS, M. C. C. **Cloning and expression of coagulation factor VII in human cell lines.** 2015. 92 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2015.

Recombinant factor VII (FVIIr) has been the main therapeutic choice for hemophilic patients who develop inhibitors antibodies to conventional treatments (FVIII and FIX). Currently, the commercial product is produced in murine cells (BHK-21) which gives disadvantages considering the complexity of post-translational modifications of these proteins. The insertion of murine residues can be highly immunogenic in humans. Thus the production of proteins for therapeutic use in human cell lines appears as a promising alternative. In this context, the aim of this study was to clone and express the blood coagulation FVII in 3 human cell lines (HepG2, Sk-Hep-1, HKB-11) and select the best cell line for production of recombinant protein. The cells were modified with the lentiviral vector p1054-CIGWS containing the FVII gene and GFP gene marker. After cells modification we observed efficiency of transduction, in which 80% of BHK-21-FVIIr cells showed GFP expression, 73% of HepG2-FVIIr cells, 32% of HKB-11-FVIIr cells and 95% SK-Hep-FVIIr. Gene expression analysis by real-time PCR showed that the three modified human cell lines exhibited RNA expression relative to FVIIr. When cells were treated with 5 ug/mL vitamin K in culture, the gene expression of FVIIr was similar in the three cell lines (HepG2: 164 563 URE, HKB-11: 119122 and SK-Hep URE: 124919 URE). For FVII activation, the main post translational modification is γ -carboxylation vitamin-K-dependent which involves three enzymes, γ -carboxylase, VKORC1 and calumenina (inhibitor). Gene expression of these enzymes was evaluated before and after treatment with vitamin K. It was observed that there was an increase in mRNA levels in human cells treated with vitamin K, suggesting that the treatment is capable of activating the enzymes of the vitamin K cycle. Cell growth kinetics showed that modified murine cells BHK-21 have a higher specific growth rate, around 25% more than human cells. However the kinetics of production of recombinant cell lines showed that human cells expressing rFVII 3-fold more rFVII than BHK-21 cells. Due the low rFVII production of murine cells, and the extremely slow growth profile of human cell line HepG2, the recombinant cell lines Sk-Hep-1-rFVII and HKB-11-rFVII have been selected for cultivation tests in suspension using microcarriers in spinners flasks. Over 10 days of cultivation the HKB-11 cells showed a cumulative production of rFVII 152 ug, corresponding to 304 IU and SK-Hep-1 cells showed a rFVII production of 202.6 ug, corresponding to 405.2 IU. In summary, our data demonstrate that human cell lines are effective for producing recombinant factor VII. Using our production model, human cells were better than murine cells (BHK-21) used by the industry. Thus, these human cell lines can be used as a new platform for the FVII production, as well as for other recombinant proteins, with less risk of developing inhibitor antibodies.

Keywords: factor VII, recombinant protein, human cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fator VII ativado.....	5
Figura 2 -	Sistema de γ -carboxilação dependente de vitamina K.....	6
Figura 3 -	Fluxograma mostrando as etapas de desenvolvimento do projeto.....	14
Figura 4 -	Morfologia das linhagens celulares humanas.....	34
Figura 5 -	Expressão relativa dos genes CALU, VKORC1, γ -carboxilase e FatorVII nas linhagens celulares humanas.....	35
Figura 6 -	Amplificação do gene do FVII a partir de uma biblioteca de cDNA da linhagem celular HepG2.....	38
Figura 7 -	Análise de sequenciamento.....	39
Figura 8 -	Amplificação do gene do FVII-ATCC a partir do vetor pUC19-F7.....	40
Figura 9 -	Digestão do vetor pGEM-FVII com as enzimas de restrição Sall e EcoRV.....	41
Figura 10 -	Digestão do DNA referente ao vetor 1054-FVIIr com a enzima de restrição Scal.....	42
Figura 11 -	Digestão do DNA referente aos vetores pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI.....	43
Figura 12 -	Células Hek293T após 48h de transfecção com Lipofectamina® e com PEI.....	44
Figura 13 -	Expressão de GFP nas células Hek293T após 48h de infecção para cálculo do título viral.....	45
Figura 14 -	Expressão de GFP nas linhagens celulares recombinantes BHK-21, HepG2, HKB-11 e Sk-Hep.....	46
Figura 15 -	Linhagens celulares recombinantes modificadas com o vetor p1054-FVIIr.....	47
Figura 16 -	Expressão relativa do gene Fator VII recombinante nas linhagens celulares humanas.....	48
Figura 17 -	Padrão de bandas das proteínas presentes no sobrenadante celular.....	50
Figura 18 -	Western Blot.....	51
Figura 19 -	Expressão de GFP e quantificação do FVIIr na linhagem celular recombinante HKB-11 antes e após o <i>sorting</i>	53
Figura 20 -	Expressão relativa do RNAm relativo gene Fator VII recombinante nas linhagens celulares humanas HepG2, HKB-11 e Sk-Hep.....	55
Figura 21 -	Expressão relativa do RNAm referente ao gene da enzima γ -carboxilase (A), VKORC1 (B) e da proteína inibitória Calumenina (C) nas linhagens celulares humanas HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11, antes e após a transdução, antes e após o tratamento com vitamina K.....	56
Figura 22 -	Cinética de crescimento da linhagem celular SK-Hep-1-FVIIr.....	59

Figura 23 -	Cinética de crescimento da linhagem celular HKB-11-FVIIr.....	60
Figura 24 -	Cinética de crescimento da linhagem celular BHK-21-FVIIr.....	61
Figura 25 -	Padrão de Crescimento celular da linhagem HepG2 ao longo de 16 dias de cultivo em garrafas estáticas.....	63
Figura 26 -	Cinética de produção das linhagens celulares produtoras de fator VII recombinante.....	64
Figura 27 -	Cinética de produção das linhagens celulares produtoras de fator VII recombinante, mensurada pelo método de tempo de tromboplastina (TP).....	66
Figura 28 -	Cultivo da linhagem celular Sk-Hep-FVIIr em microcarregadores em frascos <i>spinner</i>	68
Figura 29 -	Morfologia das células Sk-Hep-1-FVIIr aderidas em microcarregadores no sétimo dia de experimento.....	69
Figura 30 -	Cinética de produção da linhagem celular Sk-Hep-1 produtora de fator VII recombinante cultivadas em frascos <i>spinner</i> por 10 dias.....	70
Figura 31 -	Cinética de produção de FVIIr biologicamente ativo na linhagem celular Sk-Hep-1-FVIIr cultivadas em frascos <i>spinner</i> por 10 dias.....	70
Figura 32 -	Cultivo da linhagem celular HKB-11-FVIIr em microcarregadores em frascos <i>spinner</i>	72
Figura 33 -	Morfologia das células HKB-11-FVIIr aderidas em microcarregadores no sétimo dia de experimento.....	73
Figura 34 -	Cinética de produção da linhagem celular HKB-11 produtora de fator VII recombinante cultivadas durante 10 dias em frascos <i>spinner</i>	74
Figura 35 -	Cinética de produção de FVIIr biologicamente ativo na linhagem celular HKB-11-FVIIr cultivadas em frascos <i>spinner</i> por 10 dias.....	74
Figura 36 -	Comparação da cinética de crescimento celular das células Sk-HEP-1 e HKB-11 produtoras de FVIIr.....	75
Figura 37 -	Comparação da cinética de produção de FVIIr nas células Sk-HEP-1 e HKB-11 produtoras de FVIIr pelo teste de ELISA.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela I -	Aprovação prevista de novos FVIIra.....	9
Tabela II -	Razão entre a expressão dos genes CALU, VKORC1 e γ -carboxilase.....	36
Tabela III -	Quantificação do FVIIr pelo ensaio de ELISA e TP.....	49
Tabela VI -	Decaimento na porcentagem de células GFP positivas após 12 meses de cultivo.....	52
Tabela V -	Comparação entre o presente estudo e alguns trabalhos da literatura.....	82
Tabela VI -	Comparação entre as linhagens celulares recombinantes produtoras de FVIIr.....	84

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Coagulopatias.....	1
1.2	Mecanismos de ação do FVII na hemostasia normal e o papel das doses farmacológicas.....	3
1.3	O gene do Fator VII.....	4
1.4	Fator VII e a γ -carboxilação dependente de vitamina K.....	5
1.5	FVII recombinante: produto comercial utilizado no tratamento dos pacientes	7
2	OBJETIVO.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	Fluxograma.....	14
3.2	Vetores	15
3.3	Linhagens celulares.....	15
3.4	Caracterização das linhagens celulares humanas.....	15
3.5	Clone isolado a partir de uma biblioteca de cDNA humano	16
3.6	Amplificação do DNA por PCR.....	16
3.7	Purificação do fragmento amplificado	17
3.8	Ligação do gene isolado no vetor pGEM®-T Easy - Subclonagem.....	17
3.9	Preparação de bactérias competentes.....	17
3.10	Transformação bacteriana	18
3.11	Extração de DNA plasmidial.....	18
3.12	Análise da extração do DNA plasmidial	19
3.13	Sequenciamento do DNA referente ao gene do FVII.....	19
3.14	Amplificação do gene FVII-ATCC por PCR e ligação no vetor pGEM®-T Easy - Subclonagem	20

3.15	Clonagem do gene FVII-ATCC no vetor p1054-CIGWS e checagem por enzimas de restrição	20
3.16	Produção dos vetores p1054-FVIIr, pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG.....	21
3.17	Transfecção da linhagem celular Hek293T para produção de partículas virais	22
3.18	Produção de lentivirus	22
3.19	Titulação viral por citometria de fluxo.....	23
3.20	Transdução dos vetores lentivirais nas linhagens celulares alvo	24
3.21	Análise da eficiência de transdução e expressão do gene GFP por citometria de fluxo	24
3.22	Seleção das células GFP positivas por citometria de fluxo (<i>Sorting</i> Celular)	25
3.23	Expressão gênica do FVII recombinante e das enzimas de γ -carboxilação por PCR em tempo real	25
3.24	Quantificação do FVIIr pelo ensaio de ELISA	26
3.25	Quantificação do FVIIr ativo pelo ensaio de TP (Tempo de Protrombina)	27
3.26	Western Blot para FVII	28
3.27	Avaliação do crescimento celular das linhagens celulares	29
3.28	Cinética de produção do FVIIr nas linhagens celulares humanas modificadas cultivadas em placas estáticas	30
3.29	Crescimento em suspensão utilizando microcarregadores em frascos <i>Spinner</i>	31
4	RESULTADOS.....	34
4.1	Caracterização das linhagens celulares	34
4.2	Clonagem do gene do FVII a partir da biblioteca de cDNA de HepG2.....	36
4.3	Clonagem do gene do FVII-ATCC no vetor de sequenciamento.....	39
4.4	Clonagem do cNDA do FVII em um vetor lentiviral.....	41
4.5	Modificação da linhagem celular Hek293T para a produção de lentivirus p1054-FVIIr	42

4.6	Linhagens celulares modificadas para produção de FVIIr	45
4.7	Caracterização do FVII recombinante produzido pelas linhagens celulares	48
4.7.1	Expressão do FVIIr nas linhagens celulares modificadas.....	48
4.7.2	Quantificação do FVIIr nas linhagens celulares modificadas	49
4.7.3	Western Blot	50
4.7.4	Geração da população celular HKB-11/FVIIr homogênea	52
4.8	Caracterização das linhagens celulares produtoras de FVIIr	54
4.8.1	Linhagens celulares humanas modificadas expressam RNAm do FVIIr e das enzimas de γ -carboxilação	54
4.8.2	Cinética de crescimento das linhagens celulares produtoras de FVIIr	58
4.8.3	Cinética de Produção do FVIIr nas linhagens celulares recombinantes.....	64
4.9	Produção de FVIIr nas linhagens celulares Sk-Hep e HKB-11 cultivadas em suspensão em frascos <i>Spinner</i>	66
4.10	Comparação da produção de FVIIr nas linhagens celulares Sk-Hep e HKB-11 cultivadas em suspensão em frascos <i>Spinner</i>	75
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Coagulopatias

A hemofilia A é uma doença sanguínea ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência ou anormalidade do fator VIII (FVIII), um cofator necessário para a geração da fibrina. Esta deficiência de proteína de coagulação é a mais comum dentre as coagulopatias, com uma incidência de aproximadamente 1 em cada 5.000 homens e atualmente afeta aproximadamente 400.000 pessoas no mundo (ALEDORT, 2007; MANNUCCI, 2008). A hemofilia B é uma doença hereditária que também se encontra associada ao cromossomo X e consiste na deficiência do fator IX da coagulação sanguínea (CHOO et al., 1982; BITHELL, 1998; PEYVANDI et al., 2001), com uma incidência de 1 em cada 30.000 homens (HARRISON et al., 1998). Clinicamente, tanto a hemofilia A quanto a B apresentam muitas similaridades, isto é, o paciente apresenta frequentes episódios de sangramento, na maioria das vezes em regiões cutâneas, músculo-esquelético e em tecidos moles. O sangramento pode ocorrer também em outros espaços críticos como, por exemplo, no espaço intracranial ou retroperitoneal (ROBERTS e LILES, 1997).

A terapia convencional para os pacientes com hemofilias consiste na infusão intravenosa do fator VIII ou FIX derivado do plasma ou da proteína recombinante. Contudo, um dos maiores problemas desta terapia é a formação de anticorpos inibitórios contra o FVIII e FIX, que é atualmente, a complicação mais significativa relacionada com o tratamento no atendimento clínico de pacientes hemofílicos. Aproximadamente 5% dos pacientes com hemofilia B e 20 a 30% dos pacientes com hemofilia A grave, submetidos à terapia de reposição de FIX e FVIII, respectivamente, desenvolvem anticorpos que inibem a atividade do fator infundido (CAO et al., 2009). Os tratamentos disponíveis para esses pacientes incluem o uso de agentes hemostáticos e a indução à tolerância imunológica utilizando infusões de altas doses de FVIII ou FIX. Essas abordagens são caras, devido ao alto custo dos fatores, e nem

sempre bem sucedidas (QADURA et al., 2009). Por esse motivo, muitos esforços têm sido realizados na tentativa de encontrar um tratamento hemostaticamente efetivo, independente da presença de fator VIII e IX.

Ao longo dos anos, muitos estudos identificaram o fator VII ativado (FVIIa) como um candidato atrativo para a hemostasia, independente do uso de FVIII/FIX, em modelos animais com hemofilia (LUSHER et al., 1983; HEDNER e KISIEL, 1983; LUSHER, 1991). Além disso, o FVIIa purificado do plasma, mostrou induzir a hemostasia em alguns pacientes portadores de hemofilia grave (HEDNER e KISIEL, 1983; HEDNER et al., 1989). Em conjunto, esses dados sugerem que doses farmacológicas do FVIIa ligado ao fator tecidual (FT) exposto no local do ferimento, ativam o FX e promovem a formação de trombina no local da injúria (HEDNER e KISIEL, 1983; HEDNER, 2006), fazendo com que este fator de coagulação apresente-se como uma alternativa para os pacientes hemofílicos portadores de anticorpos inibidores.

Em 25 de março de 1999 a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso do primeiro fator VII recombinante, o NovoSeven®. Distribuído pela NovoNordisk, o fator VII recombinante ativado (FVIIra) é indicado no tratamento de episódios de sangramentos em pacientes portadores da hemofilia A e B que desenvolvem anticorpos contra os fatores VIII e IX respectivamente (ABSHIRE, 2008). Além disso, o FVIIra é recomendado para o tratamento de sangramentos espontâneos e/ou cirúrgicos críticos que ameaçam a vida dos pacientes (Hay, 1997), bem como em portadores de outras doenças tais como: deficiência de FVII (INGERSLEV e KRISTENSEN, 1998), trombastenia de Glanzmann (GEORGE et al., 1990), doença de von Willebrand, desordem na função das plaquetas, coagulopatias de disfunção hepáticas, hemorragia intracerebral aguda, hemorragia pulmonar, eventos tromboembólicos, entre outros (HOFFMAN, 2014).

1.2 Mecanismos de ação do FVII na hemostasia normal e o papel das doses farmacológicas

De acordo com o conceito atual, a hemostasia ocorre em dois tipos principais de superfície: nas células que expressam o fator tecidual (FT) e nas plaquetas ativadas pela trombina (MONROE et al., 2002). O FT permite o início da cascata de coagulação do sangue e funciona como o receptor de alta afinidade para o FVIIa presente na circulação. O FVIIa é o ligante natural do fator tecidual e o complexo formado é bastante forte e estável (HOFFMAN e MONROE, 2001).

Uma vez formado o complexo entre o FT e o FVIIa, ocorre a formação de uma quantidade limitada de trombina. Esse número limitado de moléculas de trombina formado na fase inicial da hemostasia, ativa os cofatores FVIII, FV, FXI e as plaquetas. Uma vez ativadas, as plaquetas saem da circulação e vão se localizar no local da injúria. A ativação dos fatores VIII e IX na superfície das plaquetas ativadas promovem a ativação do fator X em FXa, que por sua vez se liga ao FVa gerando uma grande quantidade de trombina. O passo final do processo é a formação de um coágulo firme de fibrina, o qual é resistente a proteólise prematura e é capaz não só de iniciar, mas também, de manter a homeostase, enquanto o processo de cicatrização é estabelecido (HEDNER e BRUN, 2007).

Na ausência de FVIII ou FIX apenas uma pequena quantidade de trombina é gerada pelo complexo FT-FVIIa e a geração de trombina total, que se inicia na superfície das plaquetas, não ocorre. Essa última fase depende da formação do complexo FVIII-FIX na superfície das plaquetas ativadas. Como resultado, os coágulos de fibrina formados em pacientes hemofílicos são frágeis e facilmente dissolvidos pela proteólise prematura (COLLET et al., 2000; HOFFMAN e MONROE, 2001). A partir de estudos da hemofilia em modelos celulares, foi possível demonstrar que concentrações farmacológicas do fator VIIa recombinante (FVIIr) ligam-se inespecificamente nas plaquetas ativadas e geram trombina na superfície destas,

mesmo na ausência de FVIII/FIX (HEDNER e BRUN, 2007). Isso ocorre pois o FVIIra ativa o FX na superfície das plaquetas ativadas independente da presença de FVIII ou FIX (MONROE et al., 1997).

Dessa forma, a adição de doses farmacológicas de FVIIra, resulta no rápido aumento na taxa de geração de trombina na superfície das plaquetas ativadas. Como resultado da elevação da ativação das plaquetas no local da injúria, foi observado aumento da adesão plaquetária, assim como, outros mecanismos necessários para manter a homeostase (LISMAN et al., 2005; HEDNER, 2006).

1.3 O gene do Fator VII

O gene do fator VII tem seu locus situado na região 34 do braço longo do cromossomo 13 (13q34). Estruturalmente e funcionalmente está relacionado ao grupo das serino proteases dependentes de vitamina K, que incluem ainda os fatores IX, X, protrombina (FII) e a proteína C (DAVIE, et al., 1991). Seu tamanho é de aproximadamente 12,8 Kb e é composto de nove exons e oito íntrons. A sequência nucleotídica dos exons é completamente conhecida. Os exons 1a e 1b e parte do exon 2 codificam um peptídeo sinal, responsável pela secreção da proteína, que é removido durante o processamento. O restante do exon 2 e os exons 3 a 8 codificam a proteína FVII de 406 aminoácidos presente na circulação sanguínea (HAGEN et al, 1986; O'HARA et al., 1987).

O FVII é sintetizado no fígado e circula no sangue em uma concentração de 0,5 µg/mL na forma de uma cadeia única, com um peso molecular de 50 kDa. Na porção amino-terminal é constituído por um domínio rico em resíduos de ácido glutâmico que serão γ -carboxilados para formação do ácido γ -carboxiglutâmico (Gla), tornando as proteínas biologicamente ativas. Este domínio proteico é conhecido como domínio GLA (ácido γ -carboxiglutâmico). Em seguida ao domínio GLA o FVII tem dois domínios

semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e um domínio serino-protease na porção carboxi-terminal (FURIE & FURIE, 1988).

A conversão do fator VII na enzima ativa (FVIIa) ocorre pela clivagem da ligação peptídica Arg152-Ile153, na qual não ocorre a liberação de nenhum peptídeo (BJOERN, et al., 1991). Como consequência, o fator VIIa é composto por duas cadeias polipeptídica unidas por ponte dissulfeto. A cadeia leve compreende o domínio GLA, a hélice aromática e os dois domínios EGF. Esta cadeia é composta por 152 aminoácidos e possui peso molecular de 20 kDa. A cadeia pesada possui o sítio catalítico da molécula e compreende 254 aminoácidos com aproximadamente 30 kDa de peso molecular (Figura 01) (MURSHUDOV, et al., 1997).

Figura 01: Fator VII ativado. Proteína composta por uma cadeia leve (N-terminal) que compreende as regiões GLA (domínio GLA) e EGF (domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico), mostrada na cor azul. A cadeia pesada (C-terminal), possui o domínio catalítico, e é mostrada na cor vermelha. As cadeias são unidas por uma ponte dissulfeto entre os resíduos Arg152 e Ile153.

1.4 Fator VII e a γ -carboxilação dependente de vitamina K

Um dos principais problemas com a produção de fatores de coagulação recombinantes dependentes de vitamina K para o uso terapêutico tem sido a recuperação funcional deficiente dessas proteínas do meio de cultura celular (WASLEY et al., 1993; KAUFMAN et al., 1986). Estudos têm demonstrado que esses resultados são devidos principalmente: 1) a incompleta γ -carboxilação das proteínas secretadas (PIPE et al., 2004; KAUFMAN et al., 1986) e 2) remoção ineficiente do propeptídeo pela protease furin no complexo de Golgi (WASLEY et al., 1993).

O sistema de γ -carboxilação vitamina K-dependente é um sistema composto de várias proteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático (WALLIN e HUTSON, 2004). Este sistema é composto de: 1) uma enzima γ -carboxilase vitamina K-dependente, que utiliza como cofator a forma reduzida de hidroquinona da vitamina K (vit. K_1H_2) e 2) a enzima vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR), que produz o cofator (vit. K_1H_2). A enzima VKOR é conhecida por sua sensibilidade à varfarina, um anticoagulante amplamente utilizado na prevenção de trombose. Concomitante com γ -carboxilação, a hidroquinona é convertida no metabolito vitamina K 2,3 epóxido que é reduzido de volta ao cofator vit. K_1H_2 pela ação da VKOR, no chamado ciclo da vitamina K (Figura 02) (WALLIN et al., 2002; WALLIN e HUTSON, 2004).

Figura 02: Sistema de γ -carboxilação dependente de vitamina K. Nas proteínas dependentes de vitamina K, a γ -carboxilase converte os resíduos de ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico (Gla), por meio da adição de CO_2 nos resíduos de ácido glutâmico (GLU) das proteínas recém sintetizadas. Para essa modificação pós-traducional a γ -carboxilase requer a vitamina K na forma hidroquinona (vit. K_1H_2) como cofator. Concomitante com a γ -carboxilação, a vitamina K_1H_2 é convertida em vitamina K_1 2,3 epóxido (vit. $K_1>O$). O epóxido é reduzido em vitamina K_1H_2 pela enzima vitamina K_1 2,3 epóxido redutase (VKOR). Esta interconversão cíclica de metabólitos da vitamina K constitui o ciclo da vitamina K (modificado de WALLIN e HUTSON, 2004).

Em 2004, Wajih e colaboradores identificaram a proteína calumenina como um dos fatores capazes de regular o sistema de γ -carboxilação. Os autores propuseram

um modelo no qual a calumenina se ligaria na γ -carboxilase como uma chaperona inibitória e também afetaria a proteína VKOR. Esta conclusão é baseada em dados que incluem: 1) a inibição da atividade da γ -carboxilase com transfecção de uma construção contendo o cDNA da calumenina, 2) o silenciamento do gene calumenina por um Smart siRNA e 3) uma abordagem proteômica que demonstra a existência de interações proteína-proteína entre γ -carboxilase e a calumenina (WAJIH et al., 2004).

Em 2008, um trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, mostrou um aumento na produção de FVII recombinante em células Hek-293 de 9% para 68%, quando estas eram co-transfectadas com o gene da proteína VKORC1 e com o shRNA para suprimir a calumenina (WAJIH et al., 2008). Em conjunto, estes trabalhos mostram a importância da γ -carboxilação para a produção de FVII em culturas celulares.

1.5 FVII recombinante: produto comercial utilizado no tratamento dos pacientes

O FVIIr tem sido o alvo terapêutico, principalmente nos pacientes portadores de hemofilias que desenvolvem inibidores aos tratamentos utilizados, seja devido a administração de hemoderivados ou do respectivo recombinante. Em 2012, no Brasil, entre os pacientes testados ($n = 6.835$; 74,93%), 7,48% e 1,72% dos hemofílicos A e B, respectivamente, apresentavam inibidores. Este dado se baseia na presença de pelo menos uma dosagem de inibidor positiva, mensurada por teste de triagem. Entretanto, uma vez que aproximadamente 25% dos pacientes não foram testados e/ou não dispõem de informações cadastradas no sistema de saúde, a frequência de inibidores pode ser superior aos resultados informados (MINISTÉRIO DA SAÚDE – Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil – 2011- 2012).

A administração do FVIIr é considerada o tratamento de primeira escolha para pacientes hemofílicos com inibidor, uma vez que as evidências indicam sua eficácia e

por apresentar menos efeitos adversos que as estratégias terapêuticas atuais (ABSHIRE, 2008). Por isso, o FVIIr faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde desde 1999.

Em função do seu elevado custo o Ministério da Saúde tem adquirido o FVIIr apenas para os pacientes que apresentam inibidores de alta titulação, não responsivos ao uso de derivados do plasma ou para aqueles pacientes que apresentam reação alérgica grave (com risco de vida). Já na Europa, as indicações para uso do FVIIr compreendem alguns distúrbios plaquetários, sangramentos espontâneos ou cirúrgicos de difícil controle, além do seu uso em doentes com a deficiência congênita do FVII (DURAN, 2005).

O primeiro produto comercial baseado na proteína de coagulação VII recombinante é o chamado NovoSeven®, fabricado pela empresa NovoNordisk. O cDNA do FVII foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA preparado a partir de amostras de fígado humano e de células HepG2 (HAGEN, et al., 1986; O'HARA, et al., 1987) e clonado em um vetor de expressão. Este produto recombinante é produzido em células BHK (*Baby Hamster Kidney*) modificadas com vetor plasmidial que secretam o FVII. É considerado um medicamento de alto custo, assim como os outros fatores de coagulação recombinantes (FVIIIr e rFIX).

A partir do desenvolvimento e aprovação do NovoSeven, inúmeras indústrias farmacêuticas voltaram esforços para a produção de fator VII recombinante, evidenciando a necessidade de novos produtos no mercado. Dentro deste contexto, em 2012, a Stragen-Pharma lançou o fator VII recombinante russo, denominado Coagil®-VII. Além disso, outras empresas estão em fases de testes clínicos e com aprovação de seus produtos prevista para os próximos anos, como mostra a tabela I.

Tabela I. Aprovação prevista de novos FVIIra.

Nome do Produto	Indústria Farmacêutica	Aprovação Prevista (FDA/EMA)
BAX-817	Baxter	2016
LR769	rEVO Biologics/ LFB Company	≥2017
CB-813d/PF-05280602	Catalyst Biosciences/Pfizer	≥2017
CSL689	Behring	2017

Fonte: Relatório La Merie, 2013.

Assim como o NovoSeven, todas as proteínas recombinantes citadas acima, são produzidas em linhagens celulares murinas, sendo elas BHK ou CHO. Apesar de serem produzidas a partir de processos livres de componente animal, essas proteínas não estão isentas de epítomos murinos, potencialmente imunogênicos, provenientes da células produtoras.

Proteínas humanas produzidas em linhagens celulares murinas podem levar a reações de imunogenicidade, pois estas células apresentam um perfil de glicosilação um pouco diferente do das células humanas. Células murinas, como BHK e CHO não possuem algumas enzimas humanas de glicosilação tais como: α 2-6, sialtransferase, α 1-3/4 fucosiltransferase e N-acetilglucosamina transferase. Além disso, estas linhagens produzem dois epítomos altamente imunogênicos para humanos: o Gal α 1-3Gal e o Neu5Gc (PADLER-KARAVANI E VACARI 2011; SWIECH 2012). Todos os seres humanos expressam espontaneamente anticorpos contra estes dois glicanos, o que pode reduzir o tempo de ação dos biofármacos.

Trabalhos recentes demonstraram que ácido siálico não-humano é encontrado em quantidades muito variáveis em glicoproteínas bioterapêuticas aprovadas para o tratamento de várias doenças. Entre os biofármacos listados podemos destacar: Helixate®, Kogenate®, NovoSeven® produzidos em BHK e Herceptin®, Humira®, Refato® produzidos em células CHO.

Portanto o Neu5Gc é um exemplo de xeno-antígeno que deve ser evitado para melhorar a qualidade do produto (GHJADERI et al., 2012, PLADER-KARAVANI E VAKARI 2011). Recentemente a *Octapharma*® lançou no mercado o primeiro FVIII recombinante produzido em células humanas (Hek293) aprovado pelo EMEA (*European Medicines Agency*) (WALSH,2014).

Deste modo, a busca por novas plataformas de produção de proteínas recombinantes vem ganhando destaque. Células humanas são excelentes candidatas devido a sua capacidade de produção de proteínas com perfil de glicosilação correto (sem a presença de resíduos imunogênicos) e a sua capacidade de gama-carboxilação, modificações pós-traducionais essenciais para o FVII.

A necessidade de um fator VII de coagulação mais seguro, com um custo reduzido e também a necessidade de desenvolvimento de novos bioprocessos empregando linhagens celulares humanas, juntamente com estratégias que permitam a produção de altos níveis do produto justificaram a realização deste projeto que visa o desenvolvimento de um bioprocesso otimizado para a produção de fator de VII. Trabalhos neste sentido podem trazer como benefícios para a sociedade brasileira a possibilidade de obtenção de medicamentos mais eficientes. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como proposta a clonagem e expressão do FVII em linhagens celulares humanas para a produção de um FVIIr mais eficiente e sem epítomos imunogênicos e por fim obter um produto recombinante mais seguro.

Este trabalho foi desenvolvido na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP) que faz parte do CTC (Centro de Terapia Celular) um dos centros apoiados pela FAPESP/CEPID (Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão) e possui uma vasta experiência na produção de fatores recombinantes em células de mamífero.

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi modificar linhagens celulares humanas com vetor lentiviral contendo o cDNA do FVII de coagulação sanguínea e selecionar a melhor célula produtora do FVII recombinante, para no futuro desenvolver um bioprocesso que possibilite a produção de FVII em larga escala utilizando células humanas.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma

Figura 03: Fluxograma mostrando as etapas de desenvolvimento do projeto.

3.2 Vetores

- p1054-CIGWS (cedido por Katja Lützenkirche, George Speyer Haus, Frankfurt, Alemanha)
- pCMVΔR 8.91 (cedido por Romain Zufferey, Universidade de Turin, Itália)
- pMD2.VSVG (cedido por Luigi Naldini, Universidade de Turin, Itália)
- pUC19-F7 (adquirido do ATCC sob o número de catálogo 59791)

3.3 Linhagens celulares

Sk-Hep-1 - linhagem celular derivada de adenocarcinoma de fígado humano (adquirido do ATCC® sob número de catálogo HTB-52™);

HepG2 - linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano (adquirido do ATCC® sob número de catálogo HB-8065™);

HKB11 - linhagem celular híbrida de células embrionárias de rim humano, Hek293 e da linhagem celular de células B, 2B8 (adquirido do ATCC® sob número de catálogo CRL-12568);

BHK-21 - linhagem celular de rim embrionário de hamster (*Baby Hamster Kidney*) que será utilizada como controle (adquirido do ATCC® sob número de catálogo CCL-10™);

Hek293T – linhagem celular derivada de células embrionárias de rim humano, modificadas para a produção de lentivírus (adquirido do ATCC® sob número de catálogo CRL-3216™)

3.4 Caracterização das linhagens celulares humanas

As linhagens celulares anteriormente citadas (com exceção da BHK-21 e Hek293T) foram caracterizadas quanto ao nível de expressão de RNAm pelo método de PCR em tempo real. Os genes analisados foram: γ -carboxilase, vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR) e calumenina. Além disso, foi realizada a análise da expressão basal de fator VII de cada uma das linhagens celulares. A análise

quantitativa da expressão foi realizada pela metodologia TaqMan (Applied Biosystems), cujos *primers* e sondas foram adquiridos pelo sistema AssayOnDemand. Para a normalização das amostras foi utilizada a média geométrica dos Cts dos genes endógenos, GAPDH e β -actina, obtidos pelo sistema PDAR (Applied Biosystems) cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise pela metodologia de $10000/2^{\Delta C}$, fórmula esta que não necessita de gene calibrador para a análise (ALBESIANO et al, 2003).

3.5 Clone isolado a partir de uma biblioteca de cDNA humano

O experimento teve início a partir da extração de RNA total de 3×10^6 células da linhagem de hepatocarcinoma HepG2, por meio do Kit RNeasy Minikit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, procedeu-se a transcrição reversa em cDNA utilizando a transcriptase reversa High Fidelity (Life Technology) de acordo com instruções do fabricante.

Para a construção dos oligonucleotídeos sintéticos, primers, foi utilizado como referência a sequência de nucleotídeos depositados no GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information) sob o número de acesso NM_000131.3 com a denominação de *Homo sapiens* coagulation factor VII.

3.6 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação das sequências nucleotídicas correspondente ao fator VII foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando as seguintes sequências de oligonucleotídeos (*primers*): *sense* 5'-GTCGACATGGTCTCCCAGGCCCTC -3' e *antisense* 5' - GATATCCTAGGGAAATGGGGCTCGC -3', no termociclador GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems. Para uma reação com volume final de 25 μ L foram utilizados: 20 ng de cDNA, 0,2 mM dos dNTPs; 2,0 μ L de primer 5' (5pmoles/ μ L); 2,0

μL de primer 3' (5pmoles/ μL); 1U da enzima Taq DNA polimerase (Platinum High Fidelity – Invitrogen) e 2,5 μL do seu tampão (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2 e 0,01 % de gelatina (m/v). O programa de amplificação foi inicialmente composto por desnaturação inicial a 94°C durante dois minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos. Finalmente, seguiu-se uma extensão final de 72°C durante 10 minutos.

3.7 Purificação do fragmento amplificado

O produto da reação de amplificação, correspondendo ao gene do Fator VII foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de 1,4Kb foi recortada do gel e purificada utilizando o kit de purificação de produto de PCR em gel de agarose - *Illustra GFX PCR DNA and Band Purification Kit* (GE) – seguindo as recomendações do fabricante. Este procedimento permite a eliminação dos contaminantes antes de prosseguir com a subclonagem no vetor desejado.

3.8 Ligação do gene isolado no vetor pGEM®-T Easy - Subclonagem

Foi realizada a reação de ligação incubando 5 μL do tampão da enzima (2X *Rapid ligation buffer* - Promega), 1 μL do vetor linearizado (*pGEM-T Easy vector* - Promega), 3 μL do produto de PCR relativo ao cDNA do fator VII e 1U/ μL da T4 DNA ligase (Promega). A reação foi incubada *overnight* a 4°C.

3.9 Preparação de bactérias competentes

Uma alíquota da bactéria *E. coli* DH10 β foi colocada em meio de cultura LB (10g de Triptona, 10g de NaCl, 5g de extrato de levedura, diluir em H_2O , pH7.0) e incubada sob agitação a 37°C, *overnight*. A seguir essa cultura foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C sob agitação por 2 horas (assim a cultura atingirá a fase de

crescimento logarítmica) até atingir a D.O. de 0,5 – 0,6. Parte dessa suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspendida em tampão Tris-HCl Cálcio (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; CaCl₂ 70 mM). Essas bactérias competentes foram estocadas utilizando glicerol 70% e armazenadas em freezer -80°C.

3.10 Transformação bacteriana

Foram adicionados 4µL da reação de ligação do vetor em microtubo contendo bactérias competentes. Por meio de choque térmico a 42°C por 50s, seguido de 2 minutos em banho de gelo procedeu-se a transformação. Em seguida, essa mistura foi estricada em placas contendo meio de cultura LB-ágar com o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) com a finalidade de selecionar as colônias contendo plasmídeos recombinantes. As placas foram incubadas a 37°C, *overnight*.

3.11 Extração de DNA plasmidial

Uma colônia de bactéria, selecionada a partir da placa anteriormente estricada, foi inoculada em minicultura contendo 5mL de LB líquido com antibiótico ampicilina (100 mg/mL) e incubada em shaker a 37°C, por 16h. Para isolar o DNA plasmidial foi utilizado o Kit de Miniprep (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação e a pureza da amostra do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria utilizando os comprimentos de onda de 260 a 280 nm. A qualidade do DNA foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.12 Análise da extração do DNA plasmidial

O DNA, relativo ao gene do FVII, foi analisado com o uso das endonucleases de restrição específicas (Sal I e EcoR V). O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.13 Sequenciamento do DNA referente ao gene do FVII

A banda de aproximadamente 1300pb referente ao cDNA do gene do fator VII foi sequenciada utilizando os primers: *sense* 5' - GTCGACATGGTCTCCCAGGCCCTC -3' e *antisense* 5' - GATATCCTAGGGAAATGGGGCTCGC -3'. O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI^{TM}3130 Prism (PE Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento foi utilizado 2µL do reagente Big Dye Terminator (v3.1) (PE Applied Biosystems), 100 ng de DNA plasmidial e 2,5 pmoles de primer. Essa reação foi submetida a uma termociclagem de 95°C por 10 s, 51°C por 5 s e 60°C por 4 min, perfazendo 25 ciclos.

A seguir a reação foi precipitada com o protocolo ABI/Isopropanol (MERCK). Na forma de eletroferograma as sequências de DNA geradas foram diretamente enviadas, para um computador PowerMac (Macintosh), conectado ao aparelho sequenciador. Estes eletroferogramas foram interpretados pelo software Sequencing Analysis 3.3 e convertidos em seqüências de DNA, as quais foram analisadas empregando os programas ChromasPro e SeqMan. Após a análise das seqüências, estas foram analisadas na ferramenta de bioinformática Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a verificação da homologia com a seqüência do fator VII.

3.14 Amplificação do gene FVII-ATCC por PCR e ligação no vetor pGEM®-T Easy - Subclonagem

O vetor pUC19-F7 foi adquirido da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC cat num 58791). Este vetor possui a sequência do gene do fator VII, variante 02 e foi utilizado para o isolamento do gene fator VII a partir de uma reação de PCR, utilizando a reação de amplificação descrita na seção 3.5. Após a amplificação foi realizada a reação de ligação incubando 5µL do tampão da enzima (*2X Rapid ligation buffer* - Promega), 1µL do vetor linearizado (*pGEM-T Easy vector* - Promega), 3µL do produto de PCR digerido relativo ao cDNA do fator VII e 1U/µL da T4 DNA ligase (Promega). A reação foi incubada *overnight* a 4°C.

Após a subclonagem no vetor *pGEM-T Easy*, procedeu-se com o sequenciamento do DNA para verificação da homologia da sequência, como descrito anteriormente.

3.15 Clonagem do gene FVII-ATCC no vetor p1054-CIGWS e checagem por enzimas de restrição

Após o sequenciamento e confirmação do gene do FVII, o fragmento relativo a sequência do gene foi retirado do vetor pGEM-TEasy por meio de uma reação de digestão com as enzimas de restrição Sall e EcoRV. Uma vez isolado e purificado, o fragmento foi clonado no vetor lentiviral p1054-CIGWS.

Foi realizada a reação de ligação incubando 50 ng/µL do vetor lentiviral p1054-CIGWS linearizado, 150 ng/µL do produto de PCR digerido relativo ao cDNA do fator VII, 1U da T4 DNA ligase (Invitrogen) e 4µL do tampão específico da enzima (250mM Tris-HCl, pH 7.6, 500mM MgCl₂, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% polietilenoglicol 8000), para um volume de reação final de 20µL. A reação foi incubada por 16 horas a 16°C no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Com o intuito de checar se a ligação ocorreu de maneira correta, foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *ScaI*, responsável por cortar o DNA do vetor p1054-FVII nas posições 1478 e 8456, podendo ser visualizada no gel de agarose 1% como bandas do tamanho de 6,9 kb e 4,4 Kb.

3.16 Produção dos vetores p1054-FVIIr, pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG

Após a clonagem do gene do FVII no vetor p1054-FVII, foi realizada a amplificação dos seguintes plasmídeos: p1054-FVIIr, pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG. Inicialmente foi realizada, para cada um dos plasmídeos, a transformação de bactérias competentes utilizando a metodologia de choque térmico a 42°C por 50s, seguido de 2 minutos em banho para cada um dos respectivos vetores.

Em seguida, essa mistura foi estricada em placas contendo meio de cultura LB-ágar com o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) com a finalidade de selecionar as colônias contendo plasmídeos recombinantes. As placas foram incubadas a 37°C, *overnight*. Uma colônia de bactéria, da placa transformada, foi inoculada em minicultura contendo 5mL de LB líquido/antibiótico e incubada a 37°C com agitação de 200 rpm, por 16h. Após esse período, os 5 mL da minicultura de bactérias foi inoculada em 100 mL de LB líquido/antibiótico e incubada sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Para isolar o DNA plasmidial foi utilizado o QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e a pureza da amostra do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria utilizando os comprimentos de onda de 260 a 280 nm. A qualidade do DNA foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

Todos os vetores utilizados foram checados com enzimas de restrição para a confirmação da integridade. A sequência do vetor pMD2.VSVG foi checada com a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, (bandas esperadas 556 pb, 858

pb, 1671 pb e 2737), enquanto que a do vetor pCMV Δ R 8.91 pode ser observada após a digestão com a enzima *EcoRI* (banda esperada 12150pb)

3.17 Transfecção da linhagem celular Hek293T para produção de partículas virais

Com o objetivo de produzir partículas virais para posterior modificação das células alvo, foi utilizada a linhagem Hek293T que são capazes de empacotar os vírus após a tripla co-transfecção. Para a transfecção com o plasmídeo p1054-FVIIr foram utilizados dois protocolos, com o intuito de testar o mais eficiente para posterior produção de lentivirus. O primeiro consistiu no uso do lipídeo catiônico Lipofectamina®, seguindo as recomendações do fabricante. Foram plaqueadas 1×10^7 células em frascos T175 e utilizou-se a quantidade de 30 μ g de DNA total.

A segunda metodologia utilizada consistiu no uso do reagente de transfecção *Polyethylenimine* (PEI), um polímero catiônico que se liga ao DNA resultando na formação de um complexo DNA-PEI (polyplex), que pode eficientemente transfectar células de mamíferos. Essa metodologia foi descrita por Segura e colaboradores em 2010. Para a transfecção foram plaqueadas 1×10^7 células em frascos T175 e utilizado DNA na proporção 3:2:1 (p1054-FVIIr: pCMV Δ R8.91: pMD2VSVG). A razão de DNA:PEI utilizada foi de 1:2.

3.18 Produção de lentivirus

Células Hek293T são frequentemente utilizadas para a produção de partículas lentivirais. Para a produção viral é importante que a linhagem celular (Hek293T) expresse estavelmente o gene para o grande antígeno T do SV40. Neste método é necessário o uso de um vetor contendo o transgene e dois vetores auxiliares, que possuam a origem de replicação do SV40, para que após a transfecção os plasmídeos

dentro das células possam se replicar, o que aumenta a transcrição do transgene e a produção de proteínas virais e por fim mais partículas virais serão secretadas no meio de cultura.

Para a produção de partículas virais foi utilizado o reagente PEI. Os três plasmídeos foram transfectados na seguinte proporção: 20 µg vetor com o transgene (p1054-FVIlr), 13 µg pCMVΔR8.91 (contendo gag, pol, ver e tat do HIV-1), 7 µg pMD2 VSVG (codifica o envoltório do VSV-G).

Após a transfecção (15-20 horas) as células foram incubadas com meio fresco. Após 48 horas o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 450 x g, por 5 minutos a 4°C, filtrado (filtro 0,45 µm) para a retirada de restos celulares. Alíquotas de 1 mL foram congeladas a -80°C para a determinação do título viral e para o uso nos experimentos de transdução. Uma vez congelado a -80°C e descongelado (a 37°C), o poder de infecção das partículas virais é diminuído em cerca de 20-40%. Entretanto, para padronização do uso e para que os experimentos possam ser reproduzíveis, as partículas virais foram primeiramente congeladas.

3.19 Titulação viral por citometria de fluxo

Para a titulação do sobrenadante viral, inicialmente foi plaqueado 2×10^5 células Hek293T em cada poço, da placa de 6 poços. Após atingir a confluência de 80-90% as células foram infectadas com o sobrenadante contendo vírus p1054-FVIlr nas seguintes diluições: 1:1, 1:2 e 1:3, sendo a proporção de sobrenadante viral para meio de cultura fresco. As diluições foram feitas em duplicata e foi utilizado polybrene 5,5 µg/mL.

Após 16h de infecção, o meio das células foi trocado por meio fresco (DMEM 10% soro fetal bovino). As células foram então cultivadas por 48h e após este período foram tripsinizadas e levadas para a citometria de fluxo para a análise da expressão

do gene GFP contido no vetor p1054-FVIlr. De posse dos resultados obtidos pela citometria de fluxo foi possível calcular o título viral a partir da fórmula abaixo.

$$T = (F \times C/V) \times D$$

F = frequência de células GFP positivas (%obtida/100)

C = numero total de células no poço no momento da transdução

V = volume em mL do poço

D = diluição do vetor lentiviral

3.20 Transdução dos vetores lentivirais nas linhagens celulares alvo

Alíquotas do sobrenadante produzido pelas células Hek293T transfectadas, e anteriormente congeladas, foram descongeladas e colocadas sobre as culturas das linhagens celulares Sk-Hep, HepG2, HKB11 e BHK, na presença de polybrene 5,5 µg/mL. Para isso, 24h antes da transdução, as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células por poço, na placa de 6 poços. Foi adicionada uma concentração viral de 10 vírus/célula, baseado nos valores obtidos pela titulação viral. Após a adição do sobrenadante viral, as células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, e os ciclos de transdução foram repetidos por dois a três dias consecutivos, dependendo da linhagem celular.

3.21 Análise da eficiência de transdução e expressão do gene GFP por citometria de fluxo

Após a modificação das linhagens celulares com o vetor lentiviral, foi possível analisar a eficiência da transdução por meio da expressão do gene marcador GFP, utilizando a citometria de fluxo. Após 48h do último ciclo de transdução, as células foram tripsinizadas e 1×10^5 células foram ressuspensas em PBS 1X e enviadas para análise. Células não modificadas são utilizadas como calibradoras. A citometria de

fluxo permite observarmos, dentro de uma amostra, qual a porcentagem de células que expressam o gene GFP.

A análise por citometria de fluxo da expressão de GFP também foi utilizada para verificar e acompanhar a estabilidade das células produtoras de FVIIr, ao longo das passagens em cultura.

3.22 Seleção das células GFP positivas por citometria de fluxo (*Sorting Celular*)

Com a finalidade de selecionar populações celulares recombinantes mais homogêneas e aumentar a quantidade de células GFP positivas e consequentemente, produtoras de FVII recombinante, foi realizado uma seleção das células GFP positivas por citometria de fluxo utilizando o citômetro *BD FACSAria*.

Para tanto as linhagens celulares HKB-11/FVIIr e Sk-Hep/FVIIr foram cultivadas nos seus respectivos meios de cultura e, no dia do sorting, as células foram tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 1X e passadas em uma peneira com poros de 0,45µm de diâmetro, para evitar a formação de aglomerados celulares.

Após a calibração do citômetro de fluxo fez-se a seleção das células GFP positivas, de modo que somente tais células foram coletadas, enquanto que as células GFP negativa foram descartadas. As células selecionadas foram colocadas novamente em cultura para posteriores análises.

3.23 Expressão gênica do FVII recombinante e das enzimas de γ -carboxilação por PCR em tempo real

A análise da expressão do RNAm relativo ao fator VII na população celular, bem como das enzimas relacionadas a γ -carboxilação, foi realizada através de RT-

PCR em tempo real. Para tanto, inicialmente procedeu-se a extração de RNA total de 5×10^6 células, utilizando-se o Kit RNeasy (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, a pureza e concentração do RNA total foram avaliadas por análise de absorbância a 260 nm e 280 nm.

A análise da expressão do RNAm envolveu duas etapas: a) em um primeira etapa foi realizada a síntese do cDNA a partir de 2 µg de RNA total; b) em uma segunda etapa foi realizada a amplificação do cDNA pela reação em cadeia da DNA polimerase em tempo real (Real Time PCR).

O gene calibrador utilizado em nosso laboratório é uma média geométrica entre os genes endógenos GAPDH e β -actina, obtido pelo sistema PDAR (Applied Biosystems) cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilita a análise pela metodologia de $\Delta\Delta C_t$.

3.24 Quantificação do FVIIr pelo ensaio de ELISA

Para a quantificação total de fator VII (FVII e FVIIa) produzido pelas linhagens celulares, foi realizado o teste de ELISA para o fator VII, Factor VII Human ELISA Kit (Abcam 108829), de acordo com as instruções do fabricante.

O meio de cultura das células produtoras de FVIIr foi coletado após 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo, e centrifugados a 3000xg por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foram feitas alíquotas de 1mL das amostras e congeladas a -20°C. No dia do experimento, uma alíquota foi descongelada e 50 µL de cada amostra foi incubada em placa de 96 poços contendo o anticorpo para FVII. Em seguida foram realizadas incubações com anticorpo biotilado, conjugado estreptoavidina-peroxidase, e por fim um substrato cromogênico. Entre a adição de um reagente e outro foram realizadas lavagens com tampão específico. Todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante do kit. Após o tempo de reação, a absorbância das

amostras é lida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 450 nm. O resultado final é dado em ng/mL.

Este teste emprega a técnica de quantificação por ensaio imunoenzimático capaz de medir a quantidade de FVII. Esse processo ocorre de maneira que o FVII presente nas amostras e na curva padrão, seja ligado a uma estrutura em forma de sanduíche contendo um anticorpo monoclonal específico para o fator VII e um anticorpo policlonal biotinilado, o qual é reconhecido por um conjugado com a estreptoavidina biotinilada.

3.25 Quantificação do FVIIr ativo pelo ensaio de TP (Tempo de Protrombina)

Com o intuito de quantificar o FVIIr produzido na forma ativa, foi realizado o ensaio de TP no Laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto, utilizando o equipamento ACL 7000 (Instrumentation Laboratory).

O tempo de protrombina é um teste utilizado para avaliar a anteriormente chamada via extrínseca e a via comum, ou seja, os fatores VII, X, V, II e o fibrinogênio. Assim, o tempo de protrombina estará aumentado em casos de deficiência de fibrinogênio e de qualquer um dos fatores mencionados anteriormente.

O meio de cultura das células produtoras de FVIIr foi coletado após 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo, e centrifugados a 3000xg por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foram feitas alíquotas de 1mL das amostras e congeladas a -20°C. No dia do experimento, uma alíquota de cada amostra foi descongelada para a realização do teste. Este consiste na determinação do tempo de coagulação de um plasma deficiente, após a adição de tromboplastina (fator III) e de cálcio, à 37°C. A adição de um excesso de tromboplastina promove a ativação do FVII presente na amostra. Uma vez ativado, o FVIIa ativará o fator X, iniciando a via comum da coagulação.

O resultado é dado em porcentagem, o qual é convertido em UI (Unidades Internacionais) de acordo com a convenção de que 100% corresponde a 1UI.

3.26 Western Blot para FVII

Após a quantificação pelo ensaio de ELISA foi realizada a avaliação do FVIIr produzido pelas linhagens celulares por meio da técnica de Western Blot. Para isso, inicialmente as células foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura na ausência de soro fetal bovino, por um período de 48h.

Após coletar 40 mL de sobrenadante de cada tipo celular, estes foram concentrados utilizando membranas VivaSpin 20, 30kDa MWCO (GE Healthcare). Foi então utilizada uma segunda metodologia a fim de obtermos um sobrenadante mais concentrado, o SpeedVac, o qual é capaz concentrar amostras utilizando um processo de centrifugação à vácuo. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare), o qual determina a concentração de proteínas pela absorbância a 280 nm dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina.

Após a quantificação, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida com gradiente de 4-20% e expostas a uma voltagem de 100V por um período de 20 minutos, seguido de 150V por 2 horas e 30 minutos. Depois de correr o gel foi realizada a transferência do material para uma membrana de PVDF, procedimento esse no qual se aplica uma voltagem de 35V durante 1 hora. Uma vez feita a transferência, a membrana foi incubada em TBS-T 1X (20mM TRIS + 385mM NaCl + 0.05% Tween 20) com 5% de leite em pó desnatado, sob agitação, *overnight* (16h). Essa etapa é denominada bloqueio.

No dia seguinte, a membrana contendo as amostras foi retirada da solução de bloqueio, lavada com tampão TBS-T 1x e incubada com o anticorpo primário anti-FVII humano (Abcam) em uma diluição de 1/500 em TBS-T 1X com 5% de leite em pó desnatado. Após um período de 16 horas, a membrana foi novamente lavada com

tampão TBS-T 1x e em seguida incubada com anticorpo secundário *anti-habbit* (1/5000). Depois de 1h, a membrana foi exposta ao reagente ECL Prime (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante, e revelada em foto documentador.

3.27 Avaliação do crescimento celular das linhagens celulares

Para caracterizar o crescimento celular das linhagens transduzidas foi realizada uma cinética de crescimento por um período de 7 dias na qual foi avaliada a velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) como parâmetro de cultivo.

No dia zero, em cada placa de cultura de 100 mm foram plaqueadas 1×10^5 células totais em um volume final de 8 mL de meio de cultura específico para cada linhagem celular, suplementado com vitamina K (5 $\mu\text{g/mL}$) (Kanakion® MM – Roche). A cada 24 horas, duas dessas placas de cultura foram tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 1x e as células foram contadas pelo método de exclusão do azul de tripan para avaliar a viabilidade celular. O experimento foi realizado em duplicata.

Com os valores encontrados de crescimento celular, foi montado um gráfico de concentração celular ao longo do tempo, bem como um de viabilidade celular por tempo.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento celular máxima, foi utilizada a seguinte equação (MILLER & REDDY, 1998; HISS, 2001):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.1)$$

Onde: μ - velocidade específica de crescimento (h^{-1})

X – concentração de células (cél/mL)

t – tempo (h)

Na fase exponencial de crescimento da célula pode-se considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \text{cte} = \mu_{\text{máx}} \quad (4.2)$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X em um intervalo de tempo t , tem-se que,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (4.3)$$

Nesta expressão, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo. Uma vez determinado o valor de $\mu_{\text{máx}}$, é possível determinar o tempo de duplicação (t_d) na fase de crescimento exponencial através da equação abaixo:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (4.4)$$

3.28 Cinética de produção do FVIIr nas linhagens celulares humanas modificadas cultivadas em placas estáticas

Para caracterizar o perfil de produção de FVIIr das linhagens transduzidas foi realizada uma cinética de produção por um período de 4 dias na qual foi avaliada a quantidade de FVIIr acumulado a cada 24 horas.

No dia zero, em cada placa de cultura de 100 mm foram plaqueadas 1×10^5 células BHK-21, 4×10^5 células Sk-Hep-1, 6×10^5 células HKB-11 e $1,8 \times 10^6$ células HepG2 em um volume final de 8 mL de meio de cultura específico para cada linhagem celular, suplementado com vitamina K ($5\mu\text{g/mL}$) (Kanakion® MM – Roche). A cada 24 horas, duas dessas placas de cultura foram tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 1X e as células foram contadas pelo método de exclusão do azul de tripan para avaliar a viabilidade celular. O sobrenadante celular foi coletado e centrifugado a 000g por 10 minutos. As amostras foram aliqüotadas e congelado a -20°C para posterior

análises de ELISA e ensaio de atividade biológica. O experimento foi realizado em duplicata.

Para a análise da diferença estatística entre o crescimento celular das linhagens celulares transduzidas foi utilizado o Teste t, método paramétrico e não pareado. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.

3.29 Crescimento em suspensão utilizando microcarregadores em frascos *Spinner*

Inicialmente as células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² para expansão, e mantidas em incubadora a 37° C e 5% de CO². Após atingir a confluência de aproximadamente 80%, as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA 1X e inoculadas em frascos T de 75 cm². A morfologia celular durante a expansão foi observada com a utilização de um microscópio invertido.

Após atingir o número de células suficientes (5×10^6 células), inoculou-se em frasco *spinner* (100 mL, com volume de trabalho de 50 mL) já contendo meio de cultura e microcarregador. Utilizou-se a concentração de 3,0 g/L do microcarregador Cytodex 3. O preparo e esterilização dos microcarregadores foi realizado de acordo com as normas do fabricante. O experimento foi dividido em 2 fases: a fase para a adesão e a fase para a expansão celular. A duração da fase de adesão foi de 6 horas, com agitação intermitente: de 30 em 30 minutos por 2 minutos. Para a fase de expansão utilizou-se agitação constante de 40 rpm.

Para avaliar a adesão das células nos microcarregadores, foram retiradas amostras a cada uma hora para determinação da densidade celular em suspensão e a viabilidade.

Para acompanhar o crescimento celular durante a fase de expansão foram retiradas amostras a cada 24 horas para quantificação celular e para posteriores

análises de glicose e ácido láctico. As células livres em suspensão foram quantificadas utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan. Já para as células aderidas nos microcarregadores, a quantificação foi determinada através do método Cristal Violeta.

Amostras do sobrenadante celular foram coletadas, centrifugadas e congeladas a -20°C para posterior análises de ELISA e ensaio de atividade biológica.

O experimento teve duração de 10 dias, sendo que a cada 3 dias foram feitas fotomicrografias em microscopia de contraste de fases para análise das células aderidas aos microcarregadores e microscopia de fluorescência, para análises da expressão de GFP das células aderidas.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das linhagens celulares

As linhagens celulares humanas HepG2, Sk-Hep-1, HKB-11 e a linhagem celular murina BHK-21, foram cultivadas na intenção de produzir um banco de células *master* e um banco de células de trabalho. A produção de banco de células é de extrema importância pois permite que haja uma reprodutibilidade dos experimentos ao longo do desenvolvimento do projeto.

Com o intuito de conhecer melhor as linhagens celulares utilizadas no presente estudo, foi realizada uma caracterização morfológica das células, por meio de fotografias em microscópio óptico de contraste de fase (Figura 4).

Figura 04: Morfologia das linhagens celulares humanas. Foto em microscópio óptico de contraste de fases mostrando em (A) linhagem celular BHK-21, (B) linhagem celular HepG2, (C) linhagem celular HKB-11 e (D) linhagem celular Sk-Hep-1.

Como podemos observar na Figura 04, as células da linhagem murina BHK-21 (A) são grandes, de morfologia alongada e com características fibroblastóides. Em B, podemos observar a linhagem HepG2 que cresce em aglomerados de células aderidas à placa de cultura. Esse perfil de crescimento deve-se, provavelmente, ao fato dessas células derivarem de um hepatocarcinoma.

A linhagem celular híbrida HKB-11 é mostrada em (C), na qual pode-se observar que as células crescem aderidas e possuem uma morfologia mais alongada, porém, de menor tamanho, quando comparadas com a BHK-21. Já a linhagem Sk-Hep-1 (D), apresenta morfologia de células epiteliais, condizendo com sua origem de adenocarcinoma hepático.

Além da caracterização morfológica, as linhagens celulares humanas também foram caracterizadas quanto a expressão dos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação. Para isso foi realizada a quantificação por PCR em tempo real dos genes γ -carboxilase e vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKORC1), além do gene inibitório calumenina (CALU). Também foi possível a quantificação do RNAm referente ao gene do Fator VII endógeno, como mostra a Figura 05.

Figura 05: Expressão relativa dos genes CALU, VKORC1, γ -carboxilase e FatorVII nas linhagens celulares humanas.

Em relação aos genes envolvidos no processo de γ -carboxilação, a linhagem celular HepG2 é a que mais expressa γ -carboxilase e VKORC1. As células HepG2 expressaram 72 unidades relativas de expressão (URE) do gene γ -carboxilase e 104 URE do gene VKORC1. As células HKB-11 e SK-Hep expressam cerca de 12 URE e 19 URE do gene γ -carboxilase e 64 URE e 63 URE do gene VKORC1, respectivamente.

Como observado no gráfico, a linhagem HepG2 foi a que mais expressou o gene inibitório CALU, na ordem de 55 URE, seguidas pelas linhagens HKB-11 (41 URE) e SK-Hep (31 URE).

Com o objetivo de identificar a melhor linhagem celular humana para a produção do fator VII recombinante, foi realizada uma razão entre a expressão do gene inibitório CALU e a expressão dos genes envolvidos na γ -carboxilação (Tabela II).

Tabela II. Razão entre a expressão dos genes CALU, VKORC1 e γ -carboxilase.

Células	Razão (CALU/VKORC1)	Razão (CALU/ γ -Carbox)
HepG2	0,52	0,76
SK-Hep	0,48	2,50
HKB-11	0,64	2,10

Como mostrado na tabela II, a linhagem celular que apresentou menor razão entre a expressão do gene inibitório CALU e os genes γ -carboxilase e VKORC1 foi a HepG2, seguida da linhagem HKB-11 e Sk-Hep-1, estas com um perfil semelhante.

4.2 Clonagem do gene do FVII a partir da biblioteca de cDNA de HepG2

Após a caracterização das linhagens celulares foi realizada a amplificação do cDNA do FVII para a posterior clonagem em vetor de expressão. Para a clonagem do gene de interesse no vetor de sequenciamento pGEM-T Easy (subclonagem),

inicialmente o cDNA do fator VII foi isolado da linhagem celular hepática HepG2. Foi realizada a extração de RNAm total, produção de cDNA e posterior amplificação do gene do FVII por meio de uma reação de PCR utilizando os primers específicos (Material e Métodos, seção 3.5).

O fator VII é um gene que, pelo processo de *splicing* alternativo, apresenta 4 variantes do RNA. Duas dessas variantes apresentam atividade biológica (variantes 1 e 2) e a terceira é traduzida mas a proteína não é funcional. Além das 3 isoformas de RNA que são traduzidas, o FVII possui uma quarta variante que é um RNA não codificador.

A forma predominante no fígado normal é a variante 2 que devido ao processo de *splicing* alternativo não contém o éxon 1b e dessa forma codifica um peptídeo sinal menor e possui o tamanho de 1,3 Kb. A variante 1 contém o éxon 1b, um peptídeo sinal mais longo e apresenta o tamanho de 1,4 Kb. Contudo, o peptídeo maduro codificado por ambas as variantes são idênticos (HAGEN et al., 1986; O' HARA et al., 1987). A variante 3 possui ausência de 3 exons e seu tamanho é de 1150 pb esse RNA traduzido não dará origem a proteína funcional do fator VII. As isoformas possuem tamanho similar e podem afetar a amplificação da região desejada.

Após a eletroforese em gel de agarose 1% foi possível observar uma banda larga entre as bandas do marcador de peso molecular de 1,0 e 2,0 Kb, como mostra a Figura 06.

Figura 06: Amplificação do gene do FVII a partir de uma biblioteca de cDNA da linhagem celular HepG2. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação, por meio da reação de PCR, das variantes (1,4 Kb), (1,3 Kb) e (1,1 Kb) do fator VII. M – marcador 1 Kb, raia 1 – variantes do FVII, raia 2 – controle negativo da reação.

Possivelmente esta região amplificada possui as variantes 1, 2 e 3. A região mais próxima de 1,4 kb foi cortada do gel de agarose, purificada e clonada em vetor de sequenciamento (pGEM-T Easy) para checar qual variante estaria presente nas células HepG2.

Após o sequenciamento da isoforma clonada, foi realizada a checagem da sequência pela ferramenta de bioinformática, “*Blast*” do NCBI, que permite comparar o grau de similaridade entre a sequência obtida, através das reações de sequenciamento, com a sequência de nucleotídeos referente ao gene do FVII presente em um banco de dados. A análise do sequenciamento mostrou que a isoforma isolada era a variante 3, e não a variante 1 ou 2. A variante 3 possui ausência de 3 exons consecutivos na região 5’, sendo eles os éxons 1b (66 pb), 2 (161 pb) e 3 (25 pb), gerando um peptídeo maduro com 252 pb a menos que a variante 01 (Figura 07). Infelizmente esta variante não produz a proteína ativa.

Figura 07: Análise de sequenciamento. Análise de sequenciamento realizado utilizando o banco de dados público “Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), mostrando a ausência de 3 exons consecutivos na região 5', sendo eles os éxons 1b (66 pb), 2 (161 pb) e 3 (25 pb), gerando um peptídeo maduro com 252 pb a menos que a variante 01.

Para evitar atrasos no andamento do projeto, foi adquirido do ATCC a variante 2 do FVII.

4.3 Clonagem do gene do FVII-ATCC no vetor de sequenciamento

Para a clonagem do gene de interesse no vetor de subclonagem pGEM-T Easy, inicialmente o gene do fator VII foi isolado do vetor pUC19-F7 (ATCC) por meio de uma reação de PCR utilizando os primers específicos. Após a eletroforese em gel de agarose 1% foi possível observar a banda de aproximadamente 1,3 Kb (Variante 2), como mostra a Figura 08.

Figura 08: Amplificação do gene do FVII-ATCC a partir do vetor pUC19-F7. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação, por meio da reação de PCR, do gene do fator VII (raias 1 e 2). M – marcador 1 Kb.

Em seguida, a sequência do FVII foi clonada no vetor intermediário pGEM-T Easy. Com o intuito de checar se ocorreu a ligação do fator VII na orientação correta no vetor foi realizada uma digestão utilizando as enzimas de restrição EcoRV e Sall. Após a digestão de 6 colônias foi possível observar uma banda de aproximadamente 4,4 Kb, referente ao vetor juntamente com o inserto não digeridos, uma banda de aproximadamente 3,0 Kb referente ao vetor pGEM-T Easy e a banda de aproximadamente 1,3 Kb referente ao fator VII, como pode ser observado na Figura 09.

Figura 09: Digestão do vetor pGEM-FVII com as enzimas de restrição Sall e EcoRV. Gel de agarose 1% mostrando a digestão do vetor pGEM-FVII. Nas raías de 1 a 6 pode-se observar as bandas de aproximadamente 4,3 Kb referente ao vetor pGEM-T Easy juntamente com o DNA do FVII, a banda de aproximadamente 3,0 Kb referente ao vetor pGEM-T Easy após a digestão e a banda de aproximadamente 1,3 Kb referente ao FVII. M – marcador 1 Kb.

4.4 Clonagem do cDNA do FVII em um vetor lentiviral

Após o sequenciamento e confirmação da clonagem do gene referente ao fator VII de coagulação sanguínea humano, foi realizada a clonagem do mesmo no vetor lentiviral de expressão p1054- CIGWS.

A ligação do inserto (FVIIr) no vetor lentiviral possibilitou a obtenção do vetor recombinante denominado p1054-FVIIr. Após a transformação das bactérias, observou-se o crescimento de 15 colônias. O DNA plasmidial de 3 colônias foi extraído e analisado por meio de uma reação de digestão com a enzima de restrição Sca I, que corta o vetor 1054-FVIIr nas posições 1478 pb e 8456 pb, gerando assim os fragmentos de 4469 pb e 6978 pb, como observado na Figura 10. Se o vetor estivesse vazio, veríamos apenas uma banda de 1054 pb.

Figura 10: Digestão do DNA referente ao vetor 1054-FVIIr com a enzima de restrição Scal. Gel de agarose 1% mostrando a digestão do DNA referente a 3 colônias do vetor 1054-FVIIr (raias 1 a 3), o qual apresenta as bandas de 4469 pb e 6978 pb. M – marcador 1 Kb.

4.5 Modificação da linhagem celular Hek293T para a produção de lentivirus p1054-FVIIr

Após verificar a clonagem do gene FVII no vetor lentiviral p1054, o que culminou na geração do vetor p1054-FVIIr, este vetor foi utilizado para a produção de partículas virais. Para a produção de vetores lentivirais em células Hek293T, além do vetor contendo o transgene, dois outros vetores, pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG, responsáveis pela formação do capsídeo e envelope viral respectivamente, também são necessários para formação de partículas viáveis. Os vetores utilizados foram checados com enzimas de restrição para a confirmação da integridade (bandas esperadas 556 pb, 858 pb, 1671 pb e 2737 para vetor pMD2.VSVG, e 12150pb vetor pCMV Δ R 8.91), como mostra a Figura 11.

Figura 11: Digestão do DNA referente aos vetores pCMV Δ R 8.91 e pMD2.VSVG com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. Gel de agarose 1% mostrando a digestão do DNA referente a 2 colônias do vetor pMD2.VSVG (raias 1 e 2), o qual apresenta as bandas de 556 pb, 858 pb, 1671 pb e 2737 pb. Nas raias 3 e 4 podemos observar uma banda de 12150 pb referente ao vetor pCMV Δ R 8.91 linearizado após digestão com a enzima EcoRI. M – marcador 1 Kb.

Com os três vetores checados, procedeu-se a tripla co-transfecção da linhagem celular Hek293T para a produção de lentivírus. Para tanto duas metodologias foram utilizadas: a transfecção utilizando o reagente Lipofectamina® e a transfecção utilizando o reagente PEI (*Polyethylenimine*) (Material e Métodos, seção 3.16).

Uma vez que o vetor p1054 possui o gene da proteína verde fluorescente, GFP, foi possível verificar a eficiência de transfecção da linhagem celular por meio de microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo.

Como mostrado na Figura 12 (A, B e C), podemos observar a fotomicrografia das células Hek293T após 48h da transfecção com Lipofectamina®. A intensidade de células GFP positivas não se mostrou muito elevada, como pôde ser confirmada posteriormente por citometria de fluxo, na qual foi possível observar que apenas 11,12% das células estavam expressando GFP (Figura 12C).

48h após transfecção com Lipofectamina

48h após transfecção com PEI

Figura 12: Células Hek293T após 48h de transfecção com Lipofectamina® e com PEI. Foto em microscópio óptico de contraste de fases mostrando em (A e D) linhagem celular Hek293T transfectadas. Foto em microscópio óptico de fluorescência mostrando em (B e E) as células Hek293T após 48h da transfecção utilizando a Lipofectamina® (B) e o PEI (E). Em C e F pode-se observar a porcentagem de células GFP positivas mensuradas por citometria de fluxo.

Em paralelo à transfecção com Lipofectamina® foi realizada a modificação das células Hek293T com o reagente PEI. Essa metodologia mostrou-se mais eficiente para a produção de lentivírus, como pode-se observar nas fotomicrografias em microscópio de fluorescência (Figura 12 E) , bem como pela porcentagem de expressão da proteína GFP, da ordem de 32,17%, detectada por citometria de fluxo, após 48h da transfecção (Figura 12 F).

O lote de partículas virais utilizado para infectar as células de interesse foi produzido em células Hek293T. Para tanto foi utilizado o protocolo descrito previamente (Material e Métodos – Seção 3.18). Foram utilizadas 3 diluições diferentes do sobrenadante viral para infectar as células Hek293 e assim titular a quantidade de vírus produzida, com a intenção de saber exatamente quantos vírus seriam utilizados no próximo passo de transdução das linhagens celulares alvo.

Após 48h da infecção, as células foram tripsinizadas e, uma vez que o vetor p1054-FVIlr possui GFP, a porcentagem de infecção pode ser observada por

citometria de fluxo (Figura 13). Como mostrado na Figura 13 podemos observar as duplicatas A e B, C e D, referentes às diluições de 1:3, 1:2, respectivamente.

Figura 13: Expressão de GFP nas células Hek293T após 48h de infecção para cálculo do título viral. Diluições do sobrenadante viral – 1:3 (A e B), 1:2 (C e D), e 1:1 (F e G).

Com a finalidade de calcular o título viral foram utilizados os valores referentes à diluição 1:3. Utilizando a fórmula previamente descrita obteve-se um título viral de 2×10^6 vírus/mL, que possibilitou dar continuidade aos experimentos.

A diluição de 1:2 não foi utilizada para o cálculo do título viral, pois os valores da citometria de fluxo mostraram-se acima de 30%, o que poderia gerar uma margem de erro elevada, uma vez que células com alta porcentagem de GFP podem ter recebido mais de uma cópia do vírus por célula (WANG e MCMANUS, 2009). Já a diluição 1:1 causou morte celular, impossibilitando a análise por citometria de fluxo.

4.6 Linhagens celulares modificadas para produção de FVIlr

O sobrenadante viral produzido foi utilizado para a transdução de 4 linhagens celulares: BHK-21 (murina), HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11 (humanas). Uma MOI de 10

vírus/ célula foi utilizada para cada uma das linhagens. Com o intuito de verificar a eficiência de transdução observou-se a expressão do gene marcador GFP por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 14C, 80% das células BHK-21-rFVII apresentaram expressão de GFP. As células HepG2-rFVII mostraram uma expressão de 73% enquanto que as células HKB-11-rFVII apresentaram 32% de GFP. Já a linhagem celular Sk-Hep-rFVII foi a que mostrou a melhor eficiência de transdução sendo que aproximadamente 95% das células expressaram GFP após a modificação (Figura 14L).

Figura 14: Expressão de GFP nas linhagens celulares recombinantes BHK-21, HepG2, HKB-11 e Sk-Hep. Em A, D, G e J gráficos referentes a relação de tamanho (FSC) pela complexidade interna (SSC) das respectivas células. Em B, E, H e K células controle. Em C, F, I e L gráficos mostrando a expressão de GFP nas linhagens celulares modificadas com o vetor p1054-rFVII.

O sucesso da modificação das linhagens celulares foi observado em fotomicrografias em microscópio óptico de fluorescência (Figura 15).

Figura 15: Linhagens celulares recombinantes modificadas com o vetor p1054-FVIlr. Foto em microscópio óptico de contraste de fases mostrando em A, C, E e G as linhagens celulares BHK-21, HepG2, HKB-11 e Sk-Hep, respectivamente. Foto em microscópio óptico de fluorescência mostrando a expressão do gene GFP nas linhagens BHK-21 (B), HepG2 (D), HKB-11 (F) e Sk-Hep (H).

4.7 Caracterização do FVII recombinante produzido pelas linhagens celulares

4.7.1 Expressão do FVIIr nas linhagens celulares modificadas

Após confirmar a expressão do gene GFP pelas metodologias de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, a próxima etapa consistiu em analisar a expressão do RNAm referente ao gene do fator VII nas linhagens celulares modificadas (Figura 16).

Figura 16: Expressão relativa do gene Fator VII recombinante nas linhagens celulares humanas.

Como pode ser observado na Figura 16, as três linhagens celulares humanas apresentaram expressão do RNAm referente ao gene do fator VII da ordem de 8589 unidades relativas de expressão (URE) na HepG2-FVIIr, 1361 URE na linhagem HKB-11-FVIIr e 5357 URE nas células Sk-Hep-FVIIr.

Não foi possível a detecção do RNAm do FVII na linhagem BHK-21-FVIIr, uma vez que esta é de origem murina e não possuíamos a sonda necessária para detectar os genes endógenos de camundongo.

4.7.2 Quantificação do FVIIr nas linhagens celulares modificadas

Com o objetivo de verificar se as linhagens celulares eram capazes de secretar a proteína do FVIIr no meio de cultura, realizamos a quantificação de FVIIr total (ativo e não ativo) produzido pelas linhagens celulares modificadas pelo ensaio de ELISA. Para quantificar o FVIIr biologicamente ativo (FVIIra) produzido pelas linhagens celulares modificadas, realizou-se o teste coagulométrico de tempo de protrombina (TP). Os resultados de ambos os testes são mostrados na tabela III.

Tabela III. Quantificação do FVIIr pelo ensaio de ELISA e TP.

Amostras	ELISA (ng/mL)	Atividade Biológica (UI/ml)
HepG2 não transduzida	6,3	Nd
HepG2/FVIIr	1176,57 (DP 465,65)	1,02 (DP 0,19)
Sk-Hep não transduzida	0,0	Nd
Sk-Hep/FVIIr	702,36 (DP 59,42)	2,22 (DP 1,20)
HKB-11 não transduzida	0,0	Nd
HKB-11/FVIIr	585,44 (DP 128,08)	0,17 (DP 0,05)
BHK-21 não transduzida	0,0	Nd
BHK-21/FVIIr	222,60 (DP 112,71)	0,16 (DP 0,04)
Plasma Humano	500,0	1,0

* DP- Desvio Padrão; Nd – não detectado

Como é possível observar, as três linhagens celulares humanas HepG2-FVIIr, Sk-Hep-FVIIr e HKB-11-FVIIr apresentaram quantidades de FVIIr mais elevadas do

que as encontradas no plasma humano (ng/mL), da ordem de 2,35x, 1,4x, e 1,17x, respectivamente.

Em relação ao FVIIr produzido de forma ativa, a Sk-Hep/FVIIr é a célula com capacidade de produzir mais proteína biologicamente ativa, seguida das linhagens HepG2/FVIIr, HKB-11/FVIIr. Já a linhagem BHK-21-FVIIr produz apenas 0,44 UI/mL, quantidade inferior a encontrada no plasma. Estes resultados indicam que as linhagens humanas são promissoras para a produção da proteína recombinante.

4.7.3 Western Blot

Após quantificar a proteína recombinante por ELISA e verificar que as linhagens celulares estavam produzindo FVIIr biologicamente ativo, foi realizado um Western Blot com a finalidade de observar o tamanho da proteína produzida.

Inicialmente foi realizado um gel de poliacrilamida com gradiente de 4-20% para mostrar o padrão de bandas das proteínas encontradas no sobrenadante celular, como mostrado na figura 17.

Figura 17: Padrão de proteínas presentes no sobrenadante celular. Gel de poliacrilamida (4-20%) corado com Comassie Blue, mostrando o padrão de bandas das proteínas encontradas no sobrenadante das células: 1 – HepG2 não transduzida, 2 – HepG2/FVIIr, 3 – Sk-Hep-1 não transduzida, 4 – Sk-Hep-1 FVIIr, 5 – HHK-11 não transduzida, 6 – HKB-11/FVIIr, 7 – BHK-21 não transduzida, 8 – BHK-21/FVIIr, 9 – Novo Seven. M – Marcador Kaleidoscope

Após verificar o padrão de bandas no gel de poliacrilamida, foi realizado o *blotting*. Para isso o conteúdo do gel foi transferido para uma membrana de PVDF e marcado com anticorpo anti-FVII (Figura 18).

Figura 18: Western Blot. 1 – HepG2 não transduzida, 2 – HepG2/FVIIr, 3 – Sk-Hep-1 não transduzida, 4 – Sk-Hep-1 FVIIr, 5 – HHK-11 não transduzida, 6 – HKB-11/FVIIr, 7 – BHK-21 não transduzida, 8 – BHK-21/FVIIr, 9 – Novo Seven.

Como é possível observar na figura 18, as bandas de aproximadamente 55 kDa evidenciam a expressão da proteína recombinante nas linhagens celulares modificadas (raias 2, 4, 6 e 8), enquanto não há expressão do FVIIr nas células não transduzidas (raias 1, 3, 5, 7).

Pode-se observar também que as células que possuem maior expressão do RNAm relativo ao FVIIr, bem como maior quantificação no ELISA, são as células que apresentam bandas de maior intensidade no Western Blot (HepG2-FVIIr na raia 2 e Sk-Hep-1-FVIIr na raia 4). Da mesma maneira, as células com menor expressão de RNAm e menor quantificação no ELISA, apresentam bandas referentes ao FVIIr de intensidade mais fracas no Western Blot (HKB-11-FVIIr na raia 6 e BHK-21-FVIIr na raia 8).

Na raia 9 pode-se observar o Novo Seven que foi utilizado como controle positivo da reação. A banda de peso molecular maior refere-se ao FVII de cadeia única não ativado (50 KDa), e a banda de peso molecular menor (20 KDa) refere-se à cadeia leve do FVIIr ativado. A banda de 30 KDa, referente à cadeia pesada do FVIIr,

não aparece do *blotting* uma vez que foi utilizado um anticorpo monoclonal que não marca essa cadeia especificamente.

4.7.4 Geração da população celular HKB-11/FVIlr homogênea

Como mostrado anteriormente, a linhagem celular HKB-11 foi a que apresentou a menor eficiência de modificação, sendo que após a transdução apenas 32% das células estavam expressando o gene marcador GFP, enquanto que as linhagens Sk-Hep, HepG2 e BHK-21 expressavam 95%, 73% e 80%, respectivamente.

Após 12 meses de cultivo, utilizado para o estabelecimento das linhagens celulares, acompanhamos a porcentagem de células que expressavam GFP (Tabela VI).

Tabela IV. Decaimento na porcentagem de células expressando GFP após 12 meses de cultivo.

Linhagem celular	% de células GFP positivas pós transdução	% de células GFP positivas após 12 meses de cultivo
Sk-Hep-FVIlr	95%	80%
HKB-11-FVIlr	32%	16%
HepG2-FVIlr	73%	50%
BHK-21-FVIlr	80%	64%

Como é possível observar na tabela IV, as células HKB-11 foram as que apresentaram maior perda na expressão do gene marcador GFP, em torno de 50%. Com o intuito de gerar uma população mais homogênea e com níveis de expressão mais comparáveis as outras linhagens celulares mostradas nesse trabalho, foi realizado a seleção de células HKB-11 GFP positivas por *sorting* celular, e o enriquecimento das células é mostrado nas Figura 19.

Figura 19: Expressão de GFP e quantificação do FVIlr na linhagem celular recombinante HKB-11 antes e após o *sorting*. Em A gráfico mostrando tamanho (FSC) pela complexidade interna (SSC), seguido pelo gráfico da expressão de GFP nas linhagens celulares modificadas antes do *sorting*. A partir da gate realizada, podemos observar no ultimo gráfico um enriquecimento na quantidade de células expressando GFP após o *sorting* celular. Em B, quantificação do FVIlr por ELISA, antes e após o *sorting* celular.

Como observado, houve um aumento no percentual de células que expressam GFP da ordem de 3,9 vezes.

Além do aumento na porcentagem de células GFP positivas foi possível observar um aumento na quantidade de FVIlr produzido quando testamos o sobrenadante celular pelo teste de ELISA. Após um período de 96h de cultivo, as células que não passaram por *sorting* estavam produzindo 604 ng/mL de FVIlr, enquanto que as células pós-*sorting*, cultivadas sob as mesmas condições, produziram 1468 ng/mL, um aumento de aproximadamente 2,5 vezes.

A partir destes resultados utilizamos para os experimentos seguintes apenas as células HKB-11-FVIlr pós-*sorting*, que serão citadas apenas como HKB-11-FVIlr.

4.8 Caracterização das linhagens celulares produtoras de FVIIr

Até aqui foram apresentados resultados referentes a geração das linhagens celulares produtoras de FVII recombinante, bem como uma caracterização global da proteína a nível de expressão do RNAm, quantificação da proteína, atividade biológica e western blot.

Os resultados que se seguem são referentes à caracterização das linhagens celulares recombinantes com o intuito de selecionar a melhor célula produtora de FVIIr.

4.8.1 Linhagens celulares humanas modificadas expressam RNAm do FVIIr e das enzimas de γ -carboxilação

Inicialmente, foi realizada a análise da expressão do RNAm referente ao gene do fator VII e das enzimas γ -carboxilase, VKORC1 e Calumenina.

Para analisar o perfil de expressão foram utilizadas somente as linhagens celulares humanas HepG2, HKB-11 e Sk-Hep em quatro condições distintas: 1) sem transdução e sem tratamento com vitamina K, 2) transduzidas com vetor 1054-FVIIr e sem tratamento com vitamina K, 3) sem transdução e tratadas com 5 μ g/mL de vitamina K por no mínimo 10 dias e 4) transduzidas com vetor 1054-FVIIr e tratadas com 5 μ g/mL de vitamina K por no mínimo 10 dias.

Após análise dos dados podemos observar que as três linhagens humanas apresentaram expressão do RNAm relativo ao FVIIr, após a transdução com vetor lentiviral. Quando submetidas ao tratamento com vitamina K por um período de 10 passagens em cultura, as células mostraram um perfil de expressão semelhante (HepG2: 164563 URE, HKB-11: 119122 URE e Sk-Hep: 124919 URE), como mostrado na figura 20.

Figura 20: Expressão relativa do RNAm relativo gene Fator VII recombinante nas linhagens celulares humanas HepG2, HKB-11 e Sk-Hep.

É possível observar que a linhagem celular HepG2 não transduzida, por ser derivada de um hepatocarcinoma, expressa níveis de RNAm de FVII endógenos (como mostrado anteriormente) e que o simples tratamento com a vitamina K aumentou em 480 vezes a expressão do RNAm endógeno.

Em relação às linhagens celulares transduzidas houve um aumento na expressão de FVIIr após o tratamento com a vitamina K, sendo que na HepG2-FVIIr o aumento foi de aproximadamente 7 vezes, na Sk-Hep-1-FVIIr de 14 vezes e na HKB-11-FVIIr o aumento foi de aproximadamente 45 vezes, quando comparadas antes e após o tratamento.

Quando analisamos a expressão das enzimas relacionadas a γ -carboxilação, foi possível observar que houve uma diferença nos níveis de expressão das enzimas γ -carboxilase, VKORC1 e o inibidor Calumenina (Figura 21).

Figura 21: Expressão relativa do RNAm referente ao gene da enzima γ -carboxilase (A), VKORC1 (B) e da proteína inibitória Calumenina (C) nas linhagens celulares humanas HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11, antes e após a transdução, antes e após o tratamento com vitamina K.

Para facilitar a análise, todas as comparações foram realizadas em relação as linhagens celulares não transduzidas e sem tratamento com vitamina K, condição esta que será chamada de condição inicial.

Na figura 21 A, pode-se observar a expressão do RNAm do gene da γ -carboxilase. Quando comparamos a expressão desta enzima nas células na condição inicial em relação às células modificadas com o gene do FVIIIr houve um aumento de em média de 3 vezes mais γ -carboxilase sendo expressas em todas as linhagens. Contudo, foi o tratamento com a vitamina K que fez com que os níveis de expressão do RNAm da enzima γ -carboxilase aumentassem. Dessa maneira podemos observar que nas células HepG2 não transduzida e com vitamina K houve um aumento de 220 vezes, as células Sk-Hep- 1 tiveram um aumento de 416 vezes e a linhagem HKB-11 mostrou 585 vezes mais RNAm da enzima γ -carboxilase, do que as células na condição inicial.

Na figura 21 B, pode-se observar a expressão do RNAm do gene da enzima VKORC1. Quando comparamos a expressão desta enzima nas células na condição inicial em relação às células modificadas com o gene do FVIIIr houve um aumento de 19 vezes nas células HepG2, 6,5 vezes na HKB-11 e uma diminuição na expressão de VKORC1 nas células Sk-Hep-1, de 7,5 vezes. Contudo, mais uma vez, foi o tratamento com a vitamina K que fez com que os níveis de expressão do RNAm da enzima VKORC1 aumentassem. Dessa maneira podemos observar que nas células HepG2 não transduzida e tratadas com vitamina K houve um aumento de 97,8 vezes, as células Sk-Hep-1 tiveram um aumento de 86,2 vezes e a linhagem HKB-11 mostrou 43,5 vezes mais RNAm da enzima VKORC1, do que as células na condição inicial.

Na figura 21 C, pode-se observar a expressão do RNAm do gene da enzima inibitória do ciclo de γ -carboxilação, a calumenina. Quando comparamos a expressão desta enzima nas células na condição inicial em relação às células modificadas com o

gene do FVIIr houve um aumento de 24 vezes nas células HepG2, 8,6 vezes na HKB-11 e de 9,3 vezes nas células Sk-Hep-1. Também no caso no inibidor calumenina, foi o tratamento com a vitamina K que fez com que os níveis de expressão do RNAm da enzima aumentassem. Dessa maneira podemos observar que nas células HepG2 não transduzida e tratadas com vitamina K houve um aumento de 200 vezes, as células Sk-Hep-1 tiveram um aumento de 384,6 vezes e a linhagem HKB-11 mostrou 409 vezes mais RNAm da enzima calumenina, do que as células na condição inicial.

Após a análise desses resultados, pode-se observar que a adição de vitamina K ao meio de cultura das linhagens celulares apresentou maior influência no nível de RNAm das enzimas de γ -carboxilação, do que a modificação celular com o gene do FVIIr.

4.8.2 Cinética de crescimento das linhagens celulares produtoras de FVIIr

Com o objetivo de avaliar o perfil de crescimento das linhagens celulares produtoras de fator VII recombinante em culturas estáticas, foram realizados experimentos por um período de 7 dias, em duplicata.

Figura 22: Cinética de crescimento da linhagem celular SK-Hep-1-FVIIr. Em A, crescimento e viabilidade celular durante o cultivo das células Sk-Hep-1-FVIIr em meio DMEM com 10% SFB, em placas de 10 cm^2 . Em B, velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{x,\text{máx}} = 0,79 \text{ dia}^{-1}$) ($n=2$).

A Figura 22 nos permite observar que a célula Sk-Hep-1-FVIIr apresentou uma alta viabilidade, em torno de 95%, durante todo o período analisado. A máxima concentração celular ($X_{\text{máx}}$) foi de $0,48 \times 10^6$ cél/mL alcançada no sexto dia de experimento. A fase exponencial do crescimento ocorreu entre os dias 2 e 6 e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,79 \text{ dia}^{-1}$, como mostrado

na Figura 22. Pode-se observar que não há mais crescimento celular após 6 dias de cultivo.

Em seguida foram analisados os dados da célula HKB-11-FVIIr (Figura 23).

Figura 23: Cinética de crescimento da linhagem celular HKB-11-FVIIr. Em A, crescimento e viabilidade celular durante o cultivo das células HKB-11-1-FVIIr em meio DMEM-F12 com 10% SFB, em placas de 10 cm^2 . Em B, velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{x.máx}} = 0,81 \text{ dia}^{-1}$) ($n=2$).

A análise da Figura 23 mostra os dados relativos à linhagem celular HKB-11-FVIIr. Foi possível observar que estas células apresentaram uma viabilidade, em torno

de 90%, durante os quatro primeiros dias de experimentos, seguido de cerca de 80% nos três últimos dias. A máxima concentração celular foi de $0,82 \times 10^6$ cél/mL alcançada no sétimo dia de experimento. A fase exponencial do crescimento ocorreu entre os dias 1 e 4 e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,81 \text{ dia}^{-1}$.

Em seguida foram analisados os dados da célula BHK-21-FVIlr (Figura 24).

Figura 24: Cinética de crescimento da linhagem celular BHK-21-FVIlr. Em A, crescimento e viabilidade celular durante o cultivo das células BHK-21-1-FVIlr em meio EMEM com 10% SFB, em placas de 10 cm^2 . Em B, velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{x,máx}} = 0,98 \text{ dia}^{-1}$) ($n=2$).

A linhagem murina BHK-21 (Figura 24) apresentou uma viabilidade em torno de 92% no primeiro dia, a qual foi declinando ao longo do experimento, levando à morte das células no sexto dia. A máxima concentração celular foi de $0,67 \times 10^6$ cél/mL alcançada no quarto dia de experimento. A fase exponencial de crescimento ocorreu entre os dias 1 e 4 e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,98 \text{ dia}^{-1}$. Após esse período, as células entraram em processo de morte celular.

Em relação a linhagem celular HepG2, não foi possível realizar experimentos que pudessem gerar dados para a análise da cinética de crescimento celular, uma vez que essas células crescem de maneira extremamente lenta. Além disso, as células não atingiram a confluência necessária para que fossem repicadas, entre 80 a 90% de confluência. Dessa maneira, optamos por registrar o padrão de crescimento celular da célula HepG2 por meio de fotomicrografias em microscópio de contraste de fases e de fluorescência (Figura 25).

3° dia de cultivo

6° dia de cultivo

9° dia de cultivo

16° dia de cultivo

Figura 25: Padrão de Crescimento celular da linhagem HepG2 ao longo de 16 dias de cultivo em garrafas estáticas. Em A, C, E e G, fotomicrografia em contraste de fases. Em B, D, F e H fotomicrografia em microscopia de fluorescência, mostrando a expressão do gene GFP.

A quantidade de 1×10^6 células foram descongeladas no dia 0 e plaqueadas em frascos T75. Como mostrado na figura 25, no 3º dia de cultivo, as células haviam apenas aderido à placa de cultura. Após 16 dias de cultivo no mesmo frasco, as células da linhagem HepG2 atingiram uma confluência de apenas 50 a 60%. Esses dados fizeram com que descontinuássemos os experimentos utilizando essa linhagem celular.

4.8.3 Cinética de Produção do FVIIr nas linhagens celulares recombinantes

Além da curva de crescimento, também foram realizados ensaios em placa de 100 mm^2 (culturas estáticas) com as mesmas linhagens celulares com o objetivo de avaliar a produção do fator VII recombinante por um período de 96h. Com esse intuito, a concentração inicial de células foi maior do que a utilizada nos experimentos de cinética de crescimento (Material e Métodos, Seção 3.28).

A figura 26 mostra um gráfico da concentração de FVII (ng/mL) pelo tempo, das três linhagens celulares humanas e da linhagem murina BHK-21 produtoras de FVIIr.

Figura 26: Cinética de produção das linhagens celulares produtoras de fator VII recombinante. Quantificação realizada pelo teste de ELISA.

Ao analisarmos a quantidade de FVIIr após o período de experimento, foi possível observar que as células HepG2 foram as que apresentaram maior produção de proteína recombinante sendo que em 24h já havia uma produção de 1227 ng/mL, chegando a 1843 ng/mL, após 96h de cultivo. Como as células foram cultivadas em 8 mL de meio na placa estática, foi possível a produção de um total de 14,7 µg de FVIIr, o que corresponde a 29,5 UI produzidas pelas células HepG2-FVIIr.

As células Sk-Hep-1 apresentaram uma produção de 415 ng/mL em 24h, chegando a um total de 1432 ng/mL após 4 dias. A linhagem HKB-11 mostrou um perfil semelhante de produção quando comparada com a Sk-Hep, sendo que no primeiro dia havia uma quantidade de 435 ng/mL de FVIIr e ao final das 96h foi possível quantificar cerca de 1468 ng/mL. Como havia 8 mL de meio de cultivo na placa, foi possível a produção de um total de 11,7 µg de FVIIr, o que corresponde a 23,5 UI produzidas pelas células HKB-11-FVIIr e 11,4 µg de FVIIr, o que corresponde a 22,9 UI produzidas pelas células Sk-Hep-1-FVIIr.

Já a linhagem celular murina BHK-21 foi a que apresentou menor produção de FVIIr ao longo de todo experimento, sendo que em 24h havia 250 ng/mL e ao final das 96h apenas 449 ng/mL, totalizando em 8 mL uma produção de 3,6 µg de FVIIr, o que corresponde a 7,2 UI.

Além da quantificação por ELISA, foram realizados experimentos para avaliar se o FVIIr produzido pelas linhagens celulares estava biologicamente ativo. Para isso utilizou-se o ensaio de tempo de tromboplastina (TP), como mostra a figura 27.

Figura 27: Cinética de produção das linhagens celulares produtoras de fator VII recombinante, mensurada pelo método de tempo de tromboplastina (TP).

Como podemos observar na figura 27, a célula Sk-Hep-1-FVIIr foi a que atingiu maior produção de FVIIr biologicamente ativo (1,88 UI/mL) em 96h de cultivo, seguida pela célula HepG2-FVIIr (1,42 UI/mL). A linhagem celular HKB-11-FVIIr, apesar de produzir quantidades de proteína recombinante equiparadas a célula Sk-Hep-1, produz apenas 0,25 UI/mL de FVIIr ativo. Já a linhagem celular murina BHK-21-FVIIr produziu cerca de 0,11 UI/mL de FVIIr ativo em 96h de cultura.

4.9 Produção de FVIIr nas linhagens celulares Sk-Hep e HKB-11 cultivadas em suspensão em frascos *Spinner*

A análise dos resultados anteriores nos mostraram que as células HepG2 possuem um padrão de crescimento extremamente lento, o que nos impossibilitou seu uso na etapa subsequente do trabalho. Já a linhagem BHK-21, de origem murina, não é o foco do presente trabalho, sendo utilizada apenas como controle. Dessa maneira, as duas linhagens celulares humanas produtoras de FVIIr, que foram utilizadas para

os experimentos subsequentes de cultivo em suspensão são a Sk-Hep-1-FVIIr e a HKB-11-FVIIr.

Os experimentos foram realizados por um período de 10 dias afim de analisar o perfil de crescimento, bem como a produção de FVIIr nas linhagens celulares crescendo em suspensão utilizando microcarregadores em frascos *spinner*. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como uma média de ambos.

Ao analisar os dados foi possível observar que célula Sk-Hep-1-FVIIr atingiu a máxima concentração celular, no valor de $1,11 \times 10^6$ cél/mL, no décimo dia de experimento. A fase exponencial de crescimento ocorreu entre os dias 1 e 6 e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,35 \text{ dia}^{-1}$.

Ao longo dos 10 dias de cultivo foi possível observar um consumo gradual de glicose, como era de se esperar, porém, não houve esgotamento devido as trocas de 50% do meio de cultura a cada 24h. Em relação a produção de lactato, observou-se que esta atingiu a concentração máxima no quinto dia de cultivo, com o valor médio de 1,25 g/L (Figura 28C).

Figura 28: Cultivo da linhagem celular Sk-Hep-FVIIr em microcarregadores em frascos *spinner*. Crescimento celular (A), velocidade máxima específica de crescimento (B) e perfil da concentração de glicose e lactato durante o cultivo das células Sk-Hep-1-FVIIr em meio DMEM 10% SFB em frascos *spinner* (n=2).

Para ilustrar o cultivo em microcarregadores e a expressão do gene marcador GFP, foram feitas imagens com microscopia de contraste de fases e de fluorescência, como mostrado na Figura 29.

Figura 29: Morfologia das células Sk-Hep-1-FVIIr aderidas em microcarregadores no sétimo dia de experimento. Em A, fotomicrografia em contraste de fase, mostrando as células adaptadas aderidas aos microcarregadores. Em B, microscopia eletrônica de fluorescência mostrando a expressão de GFP nas células aderidas.

A fim de quantificar a produção de FVIIr pela célula Sk-Hep-1-FVIIr foi realizado um ensaio de ELISA. Como mostrado na figura 30, a produção teve seu pico máximo alcançado no oitavo dia de experimento, chegando a uma concentração média de 1615 ng/mL (DP 74,47) de FVIIr. Ao final de 10 dias, obtivemos uma produção média de 4052 ng/mL de proteína recombinante em um volume de 50 mL, totalizando uma produção de 202,6 µg de FVIIr, o que corresponde a aproximadamente 405 UI. A produtividade ($C_{máx}/t$) na célula Sk-Hep-1-FVIIr foi de 201,8 ng/mL/dia.

Figura 30: Cinética de produção da linhagem celular Sk-Hep-1 produtora de fator VII recombinante cultivadas em frascos *spinner* por 10 dias.

A cinética de produção da proteína recombinante também foi medida em termos da quantidade de FVIIr biologicamente ativo que as células estavam produzindo. Para as células Sk-Hep-1, a cinética de produção é mostrada na figura 31.

Figura 31: Cinética de produção de FVIIr biologicamente ativo na linhagem celular Sk-Hep-1-FVIIr cultivadas em frascos *spinner* por 10 dias.

A figura 31 mostra que houve um pico de produção de FVIIr biologicamente ativo no oitavo dia de cultivo, da ordem de 4UI/mL.

Quando analisamos as células HKB-11-FVIIr, estas atingiram a máxima concentração celular, no valor de $1,61 \times 10^6$ cél/mL, no nono dia de experimento. A fase exponencial de crescimento ocorreu entre os dias 1 e 7 e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,36 \text{ dia}^{-1}$.

Assim como nas células Sk-Hep-1, ao longo dos 10 dias de cultivo foi possível observar um consumo gradual de glicose, como era de se esperar, porém, não houve esgotamento devido as trocas de 50% do meio de cultura a cada 24h. Em relação a produção de lactato, observou-se que esta atingiu a concentração máxima no nono dia de cultivo, com o valor médio de 0,47 g/L (Figura 32C).

Figura 32: Cultivo da linhagem celular HKB-11-FVIIr em microcarregadores em frascos *spinner*. Crescimento celular (A), velocidade máxima específica de crescimento (B) e perfil da concentração de glicose e lactato durante o cultivo das células HKB-11-1-FVIIr em meio DMEM-F12 10% SFB em frascos *spinner* (n=2).

Novamente, com o objetivo de ilustrar o cultivo em microcarregadores e a expressão do gene marcador GFP foram feitas imagens com microscopia de contraste de fases e de fluorescência da célula HKB-11-FVIlr, como mostrado na Figura 33.

Figura 33: Morfologia das células HKB-11-FVIlr aderidas em microcarregadores no sétimo dia de experimento. Em A, fotomicrografia em contraste de fase, mostrando as células adaptadas aderidas aos microcarregadores. Em B, microscopia eletrônica de fluorescência mostrando a expressão de GFP nas células aderidas.

O ensaio de ELISA também foi realizado para a linhagem HKB-11. Como mostrado na figura 34, a produção teve seu pico máximo alcançado no oitavo dia de experimento, chegando a uma concentração média de 1020 ng/mL (DP 9,8) de FVIlr. Ao final de 10 dias, obtivemos uma concentração média de 3038 ng/mL de FVIlr em 50 mL de meio de cultivo, totalizando uma produção de 152 µg de FVIlr, o que corresponde a aproximadamente 304 UI. A produtividade ($C_{\text{máx}}/t$) na célula HKB-11-FVIlr foi de 127,5 ng/mL/dia.

Figura 34: Cinética de produção da linhagem celular HKB-11 produtora de fator VII recombinante cultivadas durante 10 dias em frascos *spinner*.

A cinética de produção da proteína recombinante também foi medida em termos da quantidade de FVIIr biologicamente ativo as células estavam produzindo. Para as células HKB-11-FVIIr, a cinética de produção é mostrada na figura 35.

Figura 35: Cinética de produção de FVIIr biologicamente ativo na linhagem celular HKB-11-FVIIr cultivadas em frascos *spinner* por 10 dias.

A figura 35 mostra que houve um pico de produção de FVIIr biologicamente ativo no sexto dia de cultivo, da ordem de 0,6 UI/mL.

4.10 Comparação da produção de FVIIr nas linhagens celulares Sk-Hep e HKB-11 cultivadas em suspensão em frascos Spinner

Por fim, com o objetivo de visualizar e para que fosse possível comparar ambas as linhagens celulares produtoras de FVIIr, foram plotados gráficos com os resultados de ambas as células. Inicialmente pode-se observar a cinética de crescimento da Sk-Hep-1-FVIIr e da HKB-11-FVIIr (Figura 36).

Figura 36: Comparação da cinética de crescimento celular das células Sk-HEP-1 e HKB-11 produtoras de FVIIr.

Como podemos observar no gráfico da figura 36, as linhagens celulares apresentaram fases exponenciais semelhantes (Sk-Hep-1-FVIIr: do dia 1 a 6, HKB-11-FVIIr: do dia 1 a 7). Além disso, a velocidade máxima de crescimento foi a mesma para as duas, cerca de $0,35 \text{ dia}^{-1}$. Contudo, a linhagem HKB-11-FVIIr atingiu uma

concentração celular maior que a Sk-Hep-1-FVIIr, sendo $1,61 \times 10^6$ cés/mL e $1,11 \times 10^6$ cés/mL, respectivamente.

Em relação a cinética de produção podemos observar a figura 37.

Figura 37: Comparação da cinética de produção de FVIIr nas células Sk-HEP-1 e HKB-11 produtoras de FVIIr pelo teste de ELISA.

A figura 37 mostra a produção em ng/mL de fator VII recombinante, na qual é possível observar que tanto as células Sk-Hep-1-FVIIr quanto a HKB-11-FVIIr atingiram o pico de produção no oitavo dia de cultivo, contudo a concentração de FVIIr atingida pela linhagem Sk-Hep-1 foi 1,6x maior do que na célula HKB-11, sendo de 1615 ng/mL e 1020 ng/mL, respectivamente. Além disso, a produção média total ao longo dos 10 dias de cultivo foi de aproximadamente 202,6 μ g de FVIIr na linhagem Sk-Hep-1-FVIIr e de 152 μ g na célula HKB-11-FVIIr.

Frente aos dados apresentados observou-se que a primeira avaliação para um futuro escalonamento utilizando as células produtoras crescendo em suspensão com microcarregadores em frascos *spinner* mostrou que ambas as linhagens celulares humanas, Sk-Hep-1 e HKB-11, estão aptas para a produção de FVIIr nesse sistema.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Ao longo do período de quatro anos, de 2010 a 2014, 54 produtos biológicos foram aprovados para uso clínico e dentre estes, 6 foram para o tratamento de hemofilias, ou seja, 11% dos novos biofármacos são fatores de coagulação (WALSH, 2014). Analisando este panorama é possível perceber que este mercado está em constante expansão e em busca de novos produtos.

Quando o produto em questão é um fator de coagulação observa-se que diferentes grupos de pesquisa tem estudado, ao longo dos anos, maneiras de melhorar a expressão (WAJIH et al., 2008), a secreção e aumentar a meia-vida desses fatores. Um exemplo de novas estratégias seria a fusão desses fatores com partes de outras proteínas estáveis, tais como a albumina e a porção Fc de anticorpos (SCHULTE, 2013; METZNER ET al., 2013). Na maioria desses trabalhos, bem como na indústria farmacêutica, as células utilizadas para a produção de proteínas recombinantes são derivadas de espécies murinas, tais como CHO e BHK.

Nosso grupo de trabalho vem desenvolvendo, há 15 anos, pesquisas relacionadas à produção de fator FVIII e FIX de coagulação utilizando células humanas (PICANÇO et al., 2007; PICANÇO-CASTRO et al., 2008; RUSSO-CARBOLANTE et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; SWIECH et al., 2011; da ROSA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; CORREA de FREITAS et al., 2014). Neste período excelentes resultados foram obtidos, o que resultou em 2 patentes para o FVIII (US2014/0051122 A1 e US20100172891 A1) e 1 para FIX (WO2011011841 A1). Dentro desse contexto, a plataforma de produção que vinha gerando bons resultados com os fatores VIII e IX foi utilizada para a produção de FVII recombinante.

O principal diferencial deste projeto é a produção do fator VII de coagulação sanguínea em linhagens celulares humanas, com o intuito de produzir uma proteína mais semelhante a existente no corpo humano e menos imunogênica do que as

produzidas em células murinas. Além disso, outro objetivo do estudo foi comparar a produção entre as linhagens celulares humanas escolhidas (HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11) e com a linhagem murina controle BHK-21, utilizando o nosso sistema lentiviral de modificação celular.

Atualmente a linhagem celular CHO é a célula de mamífero mais utilizada pela indústria biofarmacêutica, com 60-70% de todos os produtos recombinantes sendo produzidos nesse tipo celular (FLIEDL et al., 2015; WURM, 2004; JAYAPAL et al., 2007). Contudo, um pequeno número de produtos, principalmente enzimas de reposição com modificações pós-traducionais específicas, vem sendo produzidas em linhagens celulares humanas. Como exemplo podemos citar os medicamentos: Xigris (drotrecogina- α ; Eli Lilly), Elaprase (Rh-idursulfase; Shire Pharmaceuticals, Dublin) e Replagal (Rh-alfa galactosidase; Shire) (WALSH, 2014). Além disso, no fim do ano passado (2014), o primeiro fator VIII de coagulação sanguínea produzido em células humanas (Hek293) foi aprovado pelo EMEA, o Nuwiq® produzido pela Octapharma (VALENTINO et al., 2014).

A tendência em produzir proteínas complexas em linhagens celulares humanas deve-se ao fato de existirem diferenças no padrão das modificações pós-traducionais entre as espécies de mamíferos (SWIECH et al., 2012; FLIEDL et al., 2015). Um exemplo dessas diferenças é o fato de que em muitos mamíferos a galactose- α 1,3-galactose (α Gal) é adicionada na porção N-glicana terminal, fato que não ocorre em humanos. Quando tratadas com proteínas que possuem essa modificação, ocorre o aparecimento de reações imunogênicas (GALILI, 2004).

Outro exemplo importante é o ácido N-glicolilneuraminico (Neu5Gc). Seres humanos possuem a forma catalítica inativa da enzima hidroxilase ácida cistidina monofosfato-N-acetilneuraminico e dessa forma não converte a cistidina monofosfato-N-acetilneuraminica (CMP-Neu5Ac) em ácido N-cistidina monofosfato-N-acetilneuraminico (CMP-Neu5Gc). Como consequência, o Neu5Gc está presente somente em proteínas derivadas de células não humanas (GHADERI et al., 2010). A

absorção dietética de Neu5Gc ou de biofarmacêuticos contaminados podem levar a indução de anticorpos anti- Neu5Gc, inflamações crônicas e além disso suspeita-se que este aumente os riscos de câncer e ataques cardíacos (VARKI,2010). Enquanto que para linhagens celulares humanas o risco é relativamente baixo e, baseado somente no uso de suplementos derivados de animal nas culturas celulares, o risco de contaminação por Neu5Gc é alto em células como CHO, BHK e células de mieloma e hibridomas murinos (GHADERI et al., 2012).

O fator VII é uma proteína que necessita de modificações pós-traducionais para sua perfeita atividade. Dentre essas modificações encontram-se 4 glicosilações e 10 γ -carboxilações, o que torna essa última de extrema importância para o fator funcional (BANNER et al., 1996; BJOERN et al., 1991; SUTKEVICIUTE et al., 2009). Dessa forma, torna-se importante não só a escolha de uma célula humana para a produção do FVIIr, como também o estudo da maquinaria dessas células em relação a expressão dos genes relacionados ao processo de γ -carboxilação: γ -carboxilase, VKORC1 e o gene inibitório Calumenina.

Analisando as enzimas que fazem parte do sistema de γ -carboxilação (γ -carboxilase, VKORC1 e calumenina), foi possível observar que o tratamento com a vitamina K age de maneira mais eficiente, elevando os níveis de expressão de todas as enzimas, quando comparada com a própria modificação das células com o gene do FVIIr. Isso provavelmente ocorre pois as enzimas são diretamente afetadas pela vitamina K da seguinte maneira: 1) enzima γ -carboxilase é vitamina K-dependente e, utiliza como cofator a forma reduzida de hidroquinona da vitamina K (vit. K_1H_2), 2) a enzima vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR) é responsável pela produção do cofator (vit. K_1H_2) e 3) a enzima calumenina que funciona como uma chaperona inibitória regulando todo ciclo da vitamina K, podendo se ligar tanto à γ -carboxilase quanto à VKOR (WALLIN et al., 2002; WALLIN e HUTSON, 2004).

De acordo com os resultados da expressão gênica das células modificadas e não modificadas, a célula HepG2 mostrou-se a melhor linhagem hospedeira para a produção do FVII recombinante, uma vez que esta apresentou uma menor relação do gene inibitório em relação as outras enzimas do ciclo de γ -carboxilação. A princípio, esses dados se mostraram condizentes pois essas células são derivadas de hepatocarcinoma e já possuem uma expressão intrínseca de RNAm de FVII, contudo não há expressão de proteína (HAGEN et al., 1986; GREENBERG et al., 1995).

Para a modificação das linhagens celulares foi utilizado o vetor lentiviral de expressão p1054-CIGWS. Vetores virais tem como principal vantagem a inserção do transgene no DNA da célula hospedeira fazendo com que esta passe a expressar de forma estável o gene de interesse (ANDERSON e HOPE, 2005). O vetor utilizado também possui o elemento WPRE que aumenta a eficiência do transporte e processamento do RNAm (DONELLO et al 1998) o que provavelmente contribuiu para uma maior expressão de FVII nas linhagens celulares humanas. Além disso, outra vantagem do nosso vetor é a de usar o gene GFP como gene repórter e que permite a seleção de clones celulares melhores produtores e mais estáveis por meio de *sorting* celular, eliminando assim o uso de drogas como pressão seletiva.

Segundo Wurm, 2004 uma importante consideração a se fazer quando se trata de produção de proteínas em células de mamíferos é a estabilidade do clone celular por extensos períodos de tempo. O trabalho exigido até que se considere uma linhagem produtora estável requer meses de estudos (WURM, 2004). Além disso, o uso de drogas, como por exemplo MTX (metotrexato) em culturas de células CHO (dihidrofolato redutase), como pressão seletiva, mantém um fenótipo aparente de linhagem celular estável. Todavia estudos genéticos tem demonstrado que a presença de drogas promove uma heterogeneidade citogenética, característica esta indesejável, especialmente em relação ao processo de aprovação regulatório da linhagem celular (KIM e LEE, 1999).

A clonagem e expressão do FVII humano tem sido realizada desde 1986, quando Hagen e colaboradores caracterizaram a sequência do cDNA que codifica o fator VII humano (HAGEN et al., 1986). Desde então surgiram vários trabalhos com o objetivo de estudar a estrutura, função, bem como melhorar expressão e a produção do mesmo. A Tabela V abaixo mostra exemplos de trabalhos, utilizando diferentes tipo de metodologias para modificação celular, vetores, linhagens celulares e níveis de produção e faz uma comparação com os dados obtidos neste trabalho.

Tabela V. Comparação entre o presente estudo e alguns trabalhos da literatura.

Referência	Ano	Linhagem Celular	Modificação Celular	Vetor	Seleção	Origem do FVII	Produção
Kemball-Cook et al.	1994	CHO	Eletroporação	pNeolG 502	Neomicina	Humano	5000 ng/mL
Ruiz et al.	2000	293				Coelho	
Seetharam et al.	2003	293	Lipofectamina	pIRES-Neo2	Geneticina	Rato	1000 a 3000 ng/mL
Wajih et al.	2008	293	FuGENE	pBUDC E4.1	Zeocina	Humano	273 ng/mL
Halabian et al.	2009	CHO	FuGENE	pcDNA 3.1	Geneticina	Humano	505 ng/mL
Halabian et al.	2009	CHO	FuGENE	pDEST 26	Geneticina	Humano	500 ng/mL
Xiao et al.	2013	CHO	Lipofectamina	pcDNA 3.1	Geneticina	Humano	304 ng/mL
Freitas et al.	2015	HepG2 Sk-Hep-1 HKB-11 BHK-21	Transdução lentiviral	p1054	Gene GFP	Humano	1176 ng/mL 702 ng/mL 585 ng/mL 223 ng/mL

Como podemos observar na tabela V, existem trabalhos que utilizaram o FVII derivado de outros mamíferos, tais como coelhos e ratos (RUIZ et al., 2000; SEETHARAM et al., 2003). Esses trabalhos tiveram como principal objetivo o estudo de homologias entre o FVII humano e o de outras espécies. Um exemplo é o trabalho

de Seetharam e colaboradores em 2003, que mostraram que há apenas 68% de identidade entre os fator VII de rato e de humano, sendo que ocorre uma variedade de amino ácidos diferentes entre as espécies (SEETHARAM et al., 2003).

Trabalhos que tiveram como objetivo clonar e expressar o FVII humano utilizaram, em sua maioria, as células CHO para produção da proteína recombinante, e a linhagem celular humana 293 foi utilizada somente em alguns estudos (Tabela V). Além disso, os trabalhos publicados até o momento também possuem em comum o fato de utilizarem vetores não virais e a utilização de drogas como pressão seletiva para geração de uma linhagem celular mais estável (WAHJI et al., 2008; HALABIAN et al., 2009; XIAO et al., 2013). Em relação à produção, a maioria dos trabalhos mostrou uma expressão em torno de 270 a 500 ng/mL de FVIIr, com exceção do trabalho de Kembell-Cook (1994), que relata a produção de 5000 ng/mL (KEMBALL-COOK et al., 1994)

O nosso trabalho mostrou a produção de fator VII em três linhagens celulares humanas nunca antes utilizadas para a expressão dessa proteína recombinante (HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11). Essas linhagens mostraram-se promissoras, uma vez que expressaram mais proteína recombinante quando comprada com a célula murina controle, BHK-21, e quando comparadas com outros trabalhos da literatura (Tabela V).

Com o objetivo de selecionar a melhor célula produtora de FVIIr dentre as linhagens celulares utilizadas no presente estudo, foi realizada uma comparação levando em consideração diversos parâmetros, como mostrado na Tabela VI.

Tabela VI. Comparação entre as linhagens celulares recombinantes produtoras de FVIlr.

	HepG2	Sk-Hep-1	HKB-11	BHK-21
Razão das enzimas de γ -carboxilação	CALU/VKORC1	0,52	0,48	0,64
	CALU/ γ -Carbox	0,76	2,50	2,10
% GFP pós transdução	73%	95%	32%	80%
RNA _m do FVIlr (URE)	8589	5357	1361	
ELISA (ng/mL)	1176,57	702,36	585,44	222,60
Atividade Biológica (UI/mL)	1,02	2,22	0,17	0,16
Cinética de crescimento (cultura estática)	$X_{\text{máx}}$ (cél/mL)	$0,48 \times 10^6$	$0,82 \times 10^6$	$0,67 \times 10^6$
	$\mu_{\text{máx}}$	$0,79 \text{ d}^{-1}$	$0,81 \text{ d}^{-1}$	$0,98 \text{ d}^{-1}$
	$[C_{\text{máx}}]$ (ng/mL)	1843	1432	449
Cinética de produção (cultura estática)	$[C_{\text{máx}}]$ (UI/mL)	1,42	1,88	0,11
	Produtividade ($C_{\text{máx}}/t$) (ng/mL/dia)	460,75	358	112,25
Cinética de crescimento (cultura em suspensão)	$X_{\text{máx}}$ (cél/mL)	$1,11 \times 10^6$	$1,61 \times 10^6$	
	$\mu_{\text{máx}}$	$0,35 \text{ d}^{-1}$	$0,36 \text{ d}^{-1}$	
	$[C_{\text{máx}}]$ (ng/mL)	1615	1020	
Cinética de produção (cultura em suspensão)	$[C_{\text{máx}}]$ (UI/mL)	4	0,6	
	Produtividade ($C_{\text{máx}}/t$) (ng/mL/dia)	201,8	127,5	

Como podemos observar, a linhagem celular murina BHK-21, apresentou uma eficiência de modificação celular elevada, sendo que após a transdução cerca de 80% das células estavam GFP positivas. Além disso, é a célula que possui a velocidade máxima de crescimento mais elevada ($0,98 \text{ dia}^{-1}$), ou seja, 25% mais alta do que nas outras linhagens estudadas. Contudo, apesar de ser uma célula amplamente utilizada pela indústria, quando utilizamos o nosso protocolo de modificação celular, esta linhagem apresentou uma produção de FVIIr (ng/mL) mais baixa do que as linhagens humanas, sendo que a HepG2-FVIIr produziu 5,3 vezes mais FVIIr do que a BHK-21, seguida das células Sk-Hep-1 (3,6 vezes) e da HKB-11 (2,6 vezes). Por esse motivo, as células BHK-21 não foram selecionadas para experimentos de crescimento em suspensão, e nos deram indícios de que as células humanas eram extremamente promissoras.

Ao fazer um paralelo entre as linhagens celulares humanas, é possível observar que as células HepG2 são, a princípio, as mais promissoras para a produção do FVIIr. Essas células são capazes de expressar uma grande quantidade de RNAm relativo ao gene do FVII, enquanto possui a melhor relação entre a expressão dos genes relacionados a γ -carboxilação. Além disso, quando avaliada a cinética de produção em cultura estática, temos uma concentração máxima de proteína de cerca de $2 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Contudo, essas células possuem um padrão de crescimento extremamente lento, sendo que, após varias tentativas, não foi possível estabelecer uma cinética de crescimento, e nem obter o número de células necessário para experimentos de crescimento em suspensão.

Segundo Wurm (2004), a seleção de células candidatas à produção de proteínas recombinantes também deve levar em consideração o crescimento celular. Uma produtividade específica muito alta é comumente vista em linhagens celulares de crescimento lento. Contudo, é a combinação entre um crescimento acelerado e uma elevada produtividade específica que fazem com que uma linhagem celular seja

considerada uma boa candidata para o escalonamento e futura produção de proteínas recombinantes (WURM, 2004).

Dentro desse contexto, optamos em dar continuidade aos experimentos com as células produtoras de FVIIr Sk-Hep-1 e HKB-11 (pós *sorting*).

Como observado na tabela VI, as células Sk-Hep-1 e HKB-11 possuem um perfil de crescimento semelhante, com velocidade específica de crescimento bastante próximas ($0,79 \text{ dia}^{-1}$ X $0,81 \text{ dia}^{-1}$). Além disso, a produção em culturas estáticas também foi semelhante, sendo de 1432 ng/mL na Sk-Hep-1 e 1468 ng/mL na HKB-11. Em vista desses resultados, ambas linhagens foram submetidas a próxima etapa: crescimento em suspensão em frascos *spinner* utilizando microcarregadores.

No cultivo em suspensão as células mantiveram um perfil de crescimento semelhante entre elas, contudo ambas as células apresentaram uma diminuição na velocidade máxima de crescimento, uma queda em torno de 55% no valor do $\mu_{\text{máx}}$. Uma explicação para tal observação seria a de que o aumento no cisalhamento durante o cultivo sob agitação fez com que as células diminuíssem a velocidade de crescimento. Em segunda instância também podemos propor que numa tentativa de aumentar a expressão da proteína recombinante houve uma diminuição no crescimento celular.

A regulação do crescimento de células de mamíferos tem sido proposto como um dispositivo para melhorar os processos para a produção de proteínas de interesse farmacêutico (GESERICK et al., 2000). Quando as células estão no processo proliferativo, a maior parte da energia metabólica é utilizado para a divisão celular (SANCHEZ-BUSTAMANTE et al., 2006). Já as células que têm altos níveis de expressão de proteínas heterólogas gastam energia metabólica para a produção de proteína e, portanto, apresentam menores taxas de crescimento celular (BROWNE e RUBEAI, 2007).

Quanto ao perfil de produção na cultura em suspensão, a linhagem celular Sk-Hep-1-FVIIr apresentou uma produção cerca de 37% mais elevada do que a HKB-11.

Além disso, outro fato importante observado foi que as células HKB-11-FVIIr, apesar de possuírem uma produção de cerca de 1 µg/mL de FVIIr, apenas ¼ desse total estaria sendo secretado na forma ativa.

Desde os primeiros estudos de clonagem e sequenciamento do FVII humano (HAGEN et al., 1986), sabe-se que a ativação do FVII em FVIIa envolve a hidrólise de uma única ligação peptídica entre a arginina 152 e a isoleucina 153. Essa ativação é provavelmente realizada *in vivo* predominantemente pelo FXa ligado a membrana (BUTENAS e MANN, 1996).

No início do desenvolvimento do projeto de produção do FVII recombinante (Novo Seven®), uma série de proteases específicas foram avaliadas. Contudo, nenhuma das proteases testadas foi capaz de realizar a clivagem completa após a arginina 152, sem que clivagens adicionais fossem feitas em outras ligações peptídicas da molécula (JURLANDER et al., 2001). Todavia, durante a purificação da cadeia única de FVII por cromatografia de troca iônica, foi observado que parte do FVII era convertido espontaneamente na forma ativada de duas cadeias (BJOERN e THIM, 1986). Análises subsequentes mostraram que a forma de duas cadeias gerada era idêntica ao FVIIa derivado do plasma, ou seja, a hidrólise específica entre os resíduos 152 e 153 havia ocorrido. Quando este processo foi otimizado, o FVIIr foi convertido em FVIIra com um rendimento de quase 100% (BJOERN e THIM, 1986; JURLANDER et al., 2001).

A cadeia única de FVIIr não possui atividade proteolítica intrínseca, contudo pequenas quantidades de FVIIra podem ser geradas por proteases celulares ou mesmo proteases liberadas no meio de cultura, e este FVIIra pode iniciar o processo de autoativação quando os FVIIr e FVIIra são concentrados numa coluna de troca iônica (JURLANDER et al., 2001; KREBBER e VISWANATHAN, 2008).

Dessa forma, todo o FVIIr produzido pelas linhagens celulares Sk-Hep-1 e HKB-11 podem ser convertidos em FVIIra durante futuras etapas de purificação da mesma maneira que é feito durante a produção do FVIIr comercial (NovoSeven). Além

disso, no caso da célula HKB-11, mesmo a baixa quantidade de FVIIr produzido seria suficiente para iniciar o processo de autoativação, convertendo toda a proteína produzida na sua forma ativa, podendo esta ser utilizada em futuros usos clínicos.

Ambas as linhagens celulares são bem conhecidas por seu potencial em expressar fatores de coagulação. Exemplo disso são os trabalhos de da Rosa e colaboradores que em 2012 utilizaram a célula Sk-Hep-1 para produção de FVIIIr (da ROSA et al., 2012) e Bomfim em 2013 para produção de rFIX (BOMFIM, 2013). Em 2006, Mei e colaboradores utilizaram as células HKB-11 para expressão de FVIIIr e mostraram um aumento de até 30 vezes na produção da proteína recombinante, quando comparado com outras linhagens tais como Hek293 e BHK-21 (MEI et al., 2006).

Outra vantagem no uso dessas linhagens celulares é que tanto a Sk-Hep-1 quanto a HKB-11 são células que podem ser adaptadas a um crescimento em suspensão em meio livre de soro, como mostrado recentemente em um outro trabalho do nosso grupo de pesquisa (BIAGGIO et al., 2015). Essa característica é de extrema importância considerando que a expressão de proteínas recombinantes em linhagens celulares humanas juntamente com a utilização de meios de cultura ausentes de componentes animais diminuem os riscos de contaminação xenogênica, desenvolvimento de epítomos imunogênicos, aumentando assim a qualidade e a segurança da proteína produzida. Além disso, a cultura em suspensão diminui os custos da produção, fator extremamente importante para as indústrias biofarmacêuticas.

Em suma, este é o primeiro estudo que comparou a produção de FVIIr nas linhagens celulares humanas HepG2, Sk-Hep-1 e HKB-11, mostrando o perfil de cada uma delas em relação a expressão gênica, crescimento e produção. A utilização dessas linhagens celulares teve por objetivo eliminar os problemas imunogênicos associados à proteínas recombinantes produzidas em linhagens de células murinas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que produziu de maneira eficaz o fator VII de coagulação sanguínea em linhagens celulares humanas.

Em conjunto, os resultados nos permitem concluir que as células Sk-Hep-1 e HKB-11 podem ser bastante eficazes na produção de proteínas recombinantes, uma vez que, utilizando nosso modelo de produção, estas mostraram resultados melhores do que a de células murinas (BHK-21) utilizadas pela indústria. Assim, estas linhagens celulares humanas podem ser usadas como uma plataforma para a produção de FVII, bem como para outras proteínas recombinantes, de maneira mais seguras e com menor risco de desenvolvimento de anticorpos inibidores.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abshire T. 2008. Safety Update on Recombinant Factor VIIa in the Treatment of Congenital and Acquired Hemophilia. *Seminars Hematology*; 45: S3-S6.
- Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi. 2003. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *N. Blood*. Nov 1;102(9):3333-9. Epub 2003 Jul 10.
- Aledort LM. 2007. History of haemophilia. *Haemophilia*.13 Suppl 5:1-2.
- Anderson JL, Hope TJ. 2005. Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances. *Gene Ther*. 12(23):1667-78.
- Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Sep 1;22(9):1381-9. Platelets and thrombin generation. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR.
- Banner D.W., D'Arcy A., Chene C., et al., The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor, *Nature* 380 (1996) 41–46.
- Biaggio RT, Abreu-Neto MS, Covas DT, Swiech K. 2015. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015 Mar 31. [Epub ahead of print]
- Bithell TC. Coagulação Sanguínea. 1998. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Hematologia Clínica Wintrobe's Volume II*. 1o ed. brasileira. São Paulo: Editora Manole LTDA, 615 – 668.
- Bjoern S, Foster DC, Thim L., et al. 1991. Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylation at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. *J Biol Chem*; 266(17):11051-11057.
- Bjoern S, Thim L. 1986. Activation of coagulation factor VII to VIIa. *Res Discl*. 269:564-565.
- Butenas S, Mann KG. 1996. Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry*. 13;35(6):1904-10.
- Cao O, Loduca P, Herzog RW. 2009. Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors. *J Thromb Haemost*. 7(Suppl 1): 88–91.
- Cho, M. -S., Yee, H., and Chan, S. 2002. Establishment of a human somatic hybrid cell line for recombinant protein production. *J. Biomed. Sci*. 9, 631–638.
- Cho, M-S., Yee H, Brown CL, Mei B, Mirenda CA, Chan S. 2003. A versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins. *Bioengineering Progress* 19, 229–232.
- Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG. 1982. Molecular cloning of the gene for human anti- haemophilic factor IX. *Nature*. 299:178-80.

- Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW. 2000. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(5):1354-61.
- Correa de Freitas MC, Fontes AM, de Castilho Fernandes A, Picanço-Castro V, de Sousa Russo EM, Covas DT. 2014. Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 36(3):213-8.
- da Rosa NG1, Swiech K, Picanço-Castro V, Russo-Carbolante EM, Soares Neto MA, de Castilho-Fernandes A, Faça VM, Fontes AM, Covas DT. 2012. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. *Biotechnol Lett.* 34(8):1435-43.
- de Castilho Fernandes A, Fontes A, Gonsales N, Swiech K, Picanco-Castro V, Faca S, Covas D. 2011. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. *Biotechnol Appl Biochem.* 58(4):243-9.
- Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol.* Jun;72(6):5085-92.
- Duran MS. 2005. *Terapia Hemostática Farmacológica – Fator VII Ativado.* Cap. 41. Cavalcanti, I. L. (Org.). *Medicina perioperatória.* Rio de Janeiro. Ed: SBA, 343 pags..
- Dvie EW, Fujikawa K, Kisiel W. 1991. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry.* 30(43):10363–10370.
- Fliedl, L. et al. 2015. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon, *New Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.11.005>
- Furie B e Furie BC. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 53(4):505–518.
- Galili U. 2004. Immune response, accommodation, and tolerance to transplantation carbohydrate antigens. *Transplantation* 78:1093–8.
- George JN, Caen JP, Nurden AT. 1990. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood.* 75(7):1383-95
- Ghjaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N, Varki A. 2012. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Ver* 28:147–76.
- Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Soari GC, Woodburg RG, Hart CE, Insley M, Kisiel W, Kurachi K. 1986. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA;* 83(8): 2412-2416.
- Halabian R, Fathabad ME, Masroori N, Roushandeh AM, Saki S, Amirizadeh N, Najafabadi AJ, Gharehbaghian A, Roudkenar MH. 2009. Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology. *Blood Transfus.* 7(4):305-12.

- Halabian R, Roudkenar MH, Esmaeili NS, Masroori N, Roushandeh AM, Najafabadi AJ. 2009. Establishment of a cell line expressing recombinant factor VII and its subsequent conversion to active form FVIIa through hepsin by genetic engineering method. *Vox Sang*. 2009. 96(4):309-15.
- Harrison S, Adamson S, Bonam D, Brodeur S, Charlebois T, Clancy B, Costigan R, Drapeau D, Hamilton M, Hanley K, Kelley B, Knight A, Leonard M, McCarthy M, Oakes P, Sterl K, Switzer M, Walsh R, Foster W. 1998. The manufacturing process for recombinant factor IX. *Semin Hematol*. 35(2 Suppl 2):4-10.
- Hedner U, Bjoern S, Bernvil SS, Tengborn L, Stigendahl L. 1989. Clinical experience with human plasma-derived factor VIIa in patients with hemophilia A and high titer inhibitors. *Haemostasis*. 19(6):335-43.
- Hedner U, Brun NC. 2007. Recombinant factor VIIa (FVIIra): its potential role as a hemostatic agent. *Neuroradiology*. 49(10):789-93.
- Hedner U, Kisiel W. 1983. Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *J Clin Invest*. 71(6):1836-41
- Hedner U. 2006. Mechanism of action, development and clinical experience of recombinant FVIIa. *J Biotechnol* 124(4):747-57.
- Hiss, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (ed). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgar Blucher, v. 2, p. 93-122, 2001.
- Hoffman M, Monroe DM. 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 85(6):958-65.
- Ingerslev J, Kristensen HL. 1998. Clinical picture and treatment strategies in factor VII deficiency. *Haemophilia*. 4(4):689-96.
- Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W-S, Yap MGS. 2007. Recombinant protein therapeutics from cho cells – 20 years and counting. *Chem Eng Prog* 103.
- Jones D, et al. 2003. High level expression of recombinant IgG in the human cell line PER. C6. *Biotechnol Prog* 19: 163-168.
- Jurlander B, Thim L, Klausen NK, Persson E, Kjalke M, Rexen P, Jørgensen TB, Østergaard PB, Erhardtsen E, Bjørn SE. 2001. Recombinant activated factor VII (FVIIra): characterization, manufacturing, and clinical development. *Semin Thromb Hemost*. 27(4):373-84.
- Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker BC. 1986. Expression, purification and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 261:9622–8.
- Kemball-Cook G1, Garner I, Imanaka Y, Nishimura T, O'Brien DP, Tuddenham EG, McVey JH. 1994. High-level production of human blood coagulation factors VII and XI using a new mammalian expression vector. *Gene*. 25;139(2):275-9.
- Kim SJ e Lee GM. 1999. Cytogenetic analysis of chimeric antibody-producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol. Bioeng*. 64, 741–749

- Lisman T, Adelmeijer J, Cauwenberghs S, Van Pampus EC, Heemskerk JW, De Groot PG. 2005.. Recombinant factor VIIa enhances platelet adhesion and activation under flow conditions at normal and reduced platelet count. *J Thromb Haemost.* 3(4):742-51.
- Lusher JM, Blatt PM, Penner JA, Aledort LM, Levine PH, White GC, Warriar AI, Whitehurst DA. 1983. Autoplex versus proplex: a controlled, double-blind study of effectiveness in acute hemarthroses in hemophiliacs with inhibitors to factor VIII. *Blood.* 62(5):1135-8.
- Lusher JM. 1991. Thrombogenicity associated with factor IX complex concentrates. *Semin Hematol.* 28(3 Suppl 6):3-5.
- Luthman H, Magnusson G. 1983. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res.* 11(5):1295-308.
- Mannucci PM. 2008. Prophylaxis in congenital coagulation disorders: past, present and future. *Blood Transfus.* 6 Suppl 2:s1-3.
- Mei B, Chen Y, Chen J, Pan CQ, Murphy JE. 2006. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. *Mol Biotechnol.* 34(2):165-78.
- Metzner HJ, Pipe SW, Weimer T, Schulte S. 2013. Extending the pharmacokinetic half-life of coagulation factors by fusion to recombinant albumin. *Thromb Haemost.* 110(5):931-9.
- Miller WM.; Reddy A. 1998 Quantitative analysis of cell growth, metabolism, and product formation. In: DOYLE, A. & GRIFFITHS, J. B. (ed). *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology.* Guildford: John Wiley & Sons, p. 133-159.
- Ministério da Saúde – Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil. 2011 – 2012.
- Moore FA, Moore EE, Sauaia A 1997. Blood transfusion: an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg;* 132:620-624.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. 1997. Refinement of Macromolecular structures by Maximum likelihood method. *Acta Cryst;* A34: 791- 809.
- O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, Murray MJ. 1987. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;84(15):5158-62.
- Peyvandi F, Asselta R, Mannucci PM. 2001. Autosomal recessive deficiencies of coagulation factors. *Rev Clin Exp Hematol.* 5(4):369-88.
- Picanço V, Heinz S, Bott D, Behrmann M, Covas DT, Seifried E, Tonn T. 2007 Recombinant expression of coagulant factor VIII in hepatic and non hepatic cell lines stably transduced with 3rd generation lentiviral vectors comprising the minimal FVIII promoter. *Cytotherapy* 9:785-794.
- Picanco-Castro V, Biaggio RT, Cova DT, Swiech K. 2013. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. *Protein Pept Lett* 20:1373-81.

- Picanço-Castro V, Corrêa de Freitas MC, de Sousa Bomfim A, de Sousa Russo EM. 2013. Patents in the Therapeutic Recombinant Protein Production Using Mammalian Cells. *Recent Pat Biotechnol* 8:165-71.
- Picanço-Castro V, Russo-Carbolante EM, Fontes AM, Fernandes AC, Covas DT. 2008. An enhancer/promoter combination strengthens the expression of blood-coagulation factor VIII in non-viral expression vectors. *Genet Mol Res.* 7(2):314-25.
- Pipe SW, Saint-Remy J-M, Walsh CE. 2004. New high-technology products for treatment of hemophilia. *Haemophilia* 10: 55–63.
- Qadura M, Waters B, Burnett E, Chegeni R, Bradshaw S, Hough C, Othman M, Lillicrap D. 2009. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood.* 23;114(4):871-80.
- Roberts,HR, Liles DK. 1997. The molecular biology of hemophilia B. In: Forbes, C. D.; Aledort, L. M.; Madhok, R. *Hemophilia*. 1a Edition, Chapman; Hall Medical, 35-50.
- Rodrigues ES, Picanço-Castro V, Espanhol MR, de Andrade LA, Palma PV, Kashima S, Fontes AM, Covas DT. 2013. Quantitative correlation between transcriptional levels of ER chaperone, peroximal protein and FVIII productivity in human Hek-293 cell line. *Springerplus.* 18;2:328.
- Ruiz SM, Sridhara S, Blajchman MA, Clarke BJ. 2000. Expression and purification of recombinant rabbit factor VII. *Thromb Res.* 15;98(2):203-11.
- Russo-Carbolante EM, Picanço-Castro V, Alves DC, Fernandes AC, Almeida-Porada G, Tonn T, Covas DT. 2011. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-Hep and 293T cells. *Biotechnol Lett.* 33(1):23-31.
- Sanchez-Bustamante CD, Kelm JM, Mitta B, Fussenegger M (2006) Heterologous protein production capacity of mammalian cells cultivated as monolayers and microtissues. *Biotechnol Bioeng* 93:169-180. doi: 10.1002/bit.20679
- Sarma KD, Ray D, Antony A (2000) Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni²⁺ or Co²⁺ salts. *Cytotechnology* 32:93-95.
- Schulte S. 2013. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res.* 131 Suppl 2:S2-6
- Seetharam S, Murphy K, Atkins C, Feuerstein G. 2003. Cloning and expression of rat coagulation factor VII. *Thromb Res.* 15;109(4):225-31.
- Segura MM, Garnier A, Durocher Y, Ansorge S, Kamen A. (2010). New protocol for lentiviral vector mass production. *Methods Mol Biol.* 614:39-52.
- Sutkeviciute I, Mistiniene E, Sereikaite J, Bumelis VA. 2009. The influence of different glycosylation patterns on factor VII biological activity. *Biochimie* 91(9):1123-30. doi: 10.1016/j.biochi.2009.05.015. Epub 2009 Jun 11.
- Swiech K, Kamen A, Ansorge S, Durocher Y, Picanço-Castro V, Russo-Carbolante EM, Neto MS, Covas DT. 2011. Transient transfection of serum-free suspension

HEK 293 cell culture for efficient production of human FVIII. *BMC Biotechnol.* 24;11:114.

Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. 2012. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif.* 84(1):147-53.

Takahashi K1, Tereda S, Ueda H, Makishima F, Suzuki E. 1994. Growth rate suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity. *Cytotechnology.* 15(1-3):57-64.

Thim L., Bjoern S., Christense M., et al. 1988. Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells, *Biochem. J.* 27 7785–7793..

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP, FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. Elisa Maria De Souza Russo Carbolante, Kamilla Swiech, Dimas Tadeu Covas, Virginia Picanco E Castro. Large scale and stable production of human fviii in the human cell line sk-hep-1. US 20140051122 A1, 19 Jan. 2012, 20 Fev. 2014. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/US20140051122?dq=US2014/0051122+A1&hl=pt-BR&sa=X&ei=vv8wVdKFI9LHsQStj4HwBw&ved=0CB4Q6AEwAA>>. Acesso em: 17 Abr. 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP, FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas. Recombinant human blood coagulation factor VIII protein, composition, use of a recombinant factor VIII protein, use of a composition, method of obtaining a recombinant human blood coagulation factor VIII protein and use thereof. US 20100172891 A1, 18 Set. 2009, 8 Jul. 2010. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/US20100172891?dq=US20100172891+A1&hl=pt-BR&sa=X&ei=SAIxVY-LDaLbsASJ04DAAQ&ved=0CB8Q6AEwAA>>. Acesso em: 17 Abr. 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP, FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas. Human blood coagulation factor ix recombinant protein, composition, use of a factor ix recombinant protein, use of a composition, method of obtaining human blood coagulation factor ix recombinant protein and use of the factor ix recombinant protein. WO 2011011841 A1, 31 Jul. 2009, 03 Fev. 2011. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/WO2011011841A1?cl=en&dq=WO2011011841+A1&hl=pt-BR&sa=X&ei=QAMxVaGiBsOwsASbuoDYCg&ved=0CB8Q6AEwAA>>. Acesso em: 17 Abr. 2015.

Valentino LA, Negrier C, Kohla G, Tiede A, Liesner R, Hart D, Knaub S. 2014. The first recombinant FVIII produced in human cells-an update on its clinical development programme. *Haemophilia* 1:1-9.

Varki A. 2010. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proc Natl Acad Sci* 107(Suppl.):8939–46.

Wajih N, Owen J, Wallin R. 2008. Enhanced functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection. *Thromb Res.* 122(3):405-10.

- Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. 2004. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* 279(24):25276-83.
- Wallin R, Hutson SM. 2004. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med* 10: 299–302.
- Wallin R, Sane DC, Hutson SM. 2002. Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Thromb Res* 8:221–6.
- Walsh G. 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol.* 2014 Oct;32(10):992-1000. doi: 10.1038/nbt.304
- Wang, X., McManus, M. 2009. Lentivirus Production. *J. Vis. Exp.* (32), e1499, DOI : 10.3791/1499.
- Wasley LC, Rehemtulla A, Bristol JA, Kaufman RJ. 1993. PACE/ furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J Biol Chem* 268:8458–65.
- Xiao W, Li CQ, Xiao XP, Lin FZ. 2013. Expression and fast preparation of biologically active recombinant human coagulation factor VII in CHO-K1 cells. *Genet Mol Res.* 16;12(4):6813-24.