UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Geração de novas variantes de fator IX recombinante
humano com aumento da sua atividade biológica**

Aline de Sousa Bomfim

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

RESUMO

BOMFIM, A. S. Geração de novas variantes de fator IX recombinante humano com aumento da sua atividade biológica. 2018. 137f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O Fator IX (FIX) da coagulação sanguínea é uma proteína dependente de vitamina K de grande valor farmacêutico no tratamento da hemofilia B, o qual é baseado na administração de FIX derivado de plasma humano ou FIX recombinante. A terapia baseada nestas abordagens apresenta limitações como os altos custos e a baixa disponibilidade para a população de hemofílicos. O FIX é uma proteína complexa com grande variedade de modificações pós-traducionais e, por isso, apresenta baixa atividade específica e produtividade. A produção de um FIX recombinante com aumento na sua atividade coagulante pode contribuir para terapias de reposição e gênica mais eficazes nas quais quantidades menores das moléculas cataliticamente melhoradas serão necessárias para se obter os benefícios terapêuticos do FIX. Essa infusão diminuída poderá reduzir ou eliminar a geração de inibidores de FIX, minimizando os efeitos colaterais e reduzindo os custos do tratamento, sendo um dos desafios atuais no tratamento da hemofilia B. Nesse contexto, a engenharia genética tem se tornado uma ferramenta importante na modificação de proteínas de interesse farmacêutico visando a melhora das suas propriedades bioquímicas e biofísicas. Este trabalho teve como objetivo desenvolver novas variantes de FIX recombinante humano com aumento da sua atividade biológica. Para isso, fizemos um estudo detalhado da estrutura da proteína FIX e geramos três variantes FIX-YKALW, FIX-ALL e FIX-LLW, utilizando a técnica de mutagênese sítio dirigida. Essas variantes foram expressas em células humanas SK-Hep-1 tratadas com vitamina K e as proteínas foram caracterizadas *in vitro* e *in vivo*. A quantidade de FIX total secretada no sobrenadante celular foi similar entre as variantes FIX-YKALW e FIX-LLW (3,2 µg/mL), enquanto FIX-ALL apresentou a menor expressão (1,8 µg/mL), quantidades 2-3 vezes menores que de FIX controle (FIX-WT). Entretanto, a atividade biológica das variantes foi, em média, 6,2 vezes maior que FIX-WT, com atividade específica 11 vezes maior para FIX-YKALW e FIX-LLW e 24 vezes maior para FIX-ALL. FIX-YKALW apresentou a melhor geração de trombina *in vitro* dentre as variantes e destacou-se na avaliação da eficiência hemostática em camundongos hemofílicos B, na qual uma dose 5 vezes menor que a recomendada de FIX foi suficiente para promover uma resposta pró-coagulante. Neste trabalho foram desenvolvidas 3 novas variantes de FIX recombinante humano com maior atividade específica que o fator disponível no Sistema Único de Saúde. O FIX-ALL apresentou-se como a proteína mais potente *in vitro* descrita até o momento e FIX-YKALW como a mais promissora, dentre as mutantes desenvolvidas, na proteção hemostática *in vivo*. Estudos complementares são necessários para transpor a barreira da pesquisa para a utilização desses novos fatores de coagulação no tratamento da hemofilia B. Entretanto, esse trabalho apresenta novas proteínas com potencial de serem usadas na combinação com a terapia gênica bem como na terapia de reposição.

Palavras-chave: hemofilia B, FIX recombinante humano, variantes de FIX, atividade coagulante.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Coagulação e hemostasia

A cascata de coagulação leva à geração de trombina e, conseqüentemente, à conversão de fibrinogênio em polímeros de fibrina que, em conjunto com a agregação plaquetária, atua na manutenção da hemostasia (HORAIVA; PEPPAS, 2017). As etapas da coagulação podem ser divididas em (1) formação de fibrina, (2) fibrinólise, (3) função plaquetária e (4) anticoagulantes naturais (DELOUGHERY, 2015).

A cascata de coagulação engloba uma série de reações enzimáticas envolvendo proteínas e plaquetas ativadas responsáveis por amplificar o sinal gerado por um trauma inicial, resultando na formação do coágulo de fibrina. A via clássica da coagulação, proposta por Davie, Ratnoff e Macfarlane (1964) divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FX) (DAVIE; RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Essas vias foram descritas baseadas em testes laboratoriais *in vitro*, entretanto, não refletem as observações clínicas. Diante disso e de algumas observações chaves, surgiu a necessidade de uma revisão do modelo clássico da coagulação, visto que o mesmo não conseguia responder várias importantes indagações relacionadas à clínica de pacientes portadores de certos distúrbios hemostáticos (FRANCISCETTI, 2008; DELOUGHERY, 2015).

Dessa forma, foi desenvolvido um modelo para a hemostasia baseado em superfícies celulares que substitui o modelo clássico da cascata de coagulação. Esse modelo enfatiza a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e parece ser capaz de explicar muitas questões até então não entendidas, quando empregado apenas o modelo tradicional da cascata (FRANCISCETTI, 2008; DELOUGHERY, 2015).

Segundo o modelo celular da coagulação sanguínea, após um dano na parede vascular, durante a hemostasia primária, ocorre a exposição dos componentes subendoteliais, tais como o colágeno, células musculares lisas e fibroblastos, à corrente sanguínea, que promovem a adesão e ativação das plaquetas e a formação de tampões plaquetários (BAKER; BRASSARD, 2011).

A hemostasia secundária é dividida em três fases: iniciação, amplificação e propagação. A fase de iniciação, começa imediatamente após a lesão e envolve a exposição de um iniciador chave da coagulação, o fator tecidual (FT), o qual é uma proteína integral de membrana das células do subendotélio, que se liga ao fator VII (FVII) como um cofator, promovendo sua proteólise e ativação (FVIIa) (MCMICHAEL, 2012). O complexo FT/FVIIa cliva proteoliticamente traços de fator IX (FIX) e FX em FIX ativo (FIXa) e FX ativo (FXa), respectivamente. Essa ativação permite ao FX se associar ao seu cofator, fator V (FV) ativado pelo fator XII (FXII), formando o complexo protrombinase nas células apresentadoras de FT. Este complexo tem por função converter protrombina em trombina (FIIa) (VERSTEEG et al., 2013) (Figura 1).

Na fase de amplificação, a pequena quantidade de trombina acumulada ativa as plaquetas que irão se aderir ao sítio do dano vascular. Em paralelo, a trombina converte mais FV em FVa, amplificando a atividade protrombinase, e converte o fator VIII (FVIII) em FVIIIa que atua como cofator do FIXa na superfície das plaquetas ativadas e na presença de íons cálcio, aumentando a geração de FXa. Em adição, a trombina converte o fator XI (FXI) em FXIa (VERSTEEG et al., 2013).

A fase de propagação ocorre em superfícies contendo fosfolipídeos pró-coagulantes como nas plaquetas ativadas. O FXIa converte mais FIX em FIXa, que se associa ao FVIIIa. Esse complexo tenase formado (FIXa/FVIIIa) juntamente com os íons cálcio, catalisa a conversão de FX em FXa, o qual forma o complexo FXa/FVa que resulta na formação de uma grande quantidade de trombina que converte fibrinogênio em fibrina. Como etapa final, a trombina ativa o fator XIII que estabiliza o coágulo formado (VERSTEEG et al., 2013).

Figura 1 – Modelo celular da coagulação sanguínea. Após um dano na parede vascular, ocorre a exposição dos componentes subendoteliais à corrente sanguínea, que promovem a adesão e ativação das plaquetas e a formação de tampões plaquetários. O FT é exposto e se liga ao FVII, o qual é ativado a FVIIa. O complexo FT/FVIIa ativa, subsequentemente, traços de FX e protrombina. A pequena quantidade de trombina (FIIa) produzida, ativa o FXI que ativa o FIX na superfície das plaquetas. O FIXa ativa, então, FX adicional. Simultaneamente, os traços de trombina gerados ativarão os fatores VIII (cofator do FIX) e V (cofator do FX), os quais aumentam drasticamente a atividade catalítica dos fatores IX e X, respectivamente. Finalmente, a ativação de trombina leva à conversão de fibrinogênio em fibrina. Em paralelo, a liberação de polifosfato (poli P) pelas plaquetas ativadas pode estimular a ativação adicional de FXII, FV e FXI e inibir a lise do coágulo formado (modificado de VERSTEEG *et al.*, 2013).

O conhecimento sobre a coagulação sanguínea e a hemostasia são necessários para a compreensão das coagulopatias como a hemofilia B e seus tratamentos.

1.2 Hemofilia B

A hemofilia B, também conhecida como doença de *Christmas*, é uma doença hemorrágica recessiva ligada ao cromossomo X, caracterizada pela deficiência quantitativa ou qualitativa do FIX (BRUNETTI-PIERRI *et al.*, 2009), o que leva os pacientes a uma

incapacidade de produzir adequadamente um coágulo estável após um dano no tecido (DUNN, 2010). É transmitida quase que exclusivamente a indivíduos do sexo masculino por mães portadoras da mutação (cerca de 70% dos casos) (Figura 2B). Porém, em cerca de 30% dos casos, a doença origina-se a partir de uma mutação *de novo*, fenômeno que pode ocorrer na mãe ou no feto. Os casos decorrentes de mutações *de novo* são chamados de esporádicos, podendo tratar-se de pacientes isolados (um único caso presente), ou a ocorrência apenas entre irmãos, ou seja, ausente em gerações pregressas (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016; HORAVA; PEPPAS, 2017) (Figura 2E).

Filhas de homem com hemofilia serão portadoras obrigatórias (Figura 2C). Apesar de muito rara, a hemofilia pode ocorrer em mulher (Figura 2F), em decorrência da união de homem com hemofilia e mulher portadora. Mais comumente, mulheres portadoras podem apresentar baixos níveis de FIX, evento este relacionado à síndrome de Turner ou à inativação do cromossomo X que não carrega a mutação associada à hemofilia, processo conhecido como compensação de dose (BAUER, 2015).

Figura 2 – Hereditariedade da hemofilia B. A) Indivíduos normais. B) Herança transmitida pela mãe portadora de mutação no gene FIX acarreta em filho hemofílico e filha portadora. C) Herança transmitida pelo pai hemofílico acarreta em filhas portadoras obrigatórias de mutação no gene FIX. D) Filha portadora de mutação no gene FIX após ocorrência de mutação *de novo* ausente em gerações pregressas. E) Filho hemofílico após ocorrência de mutação *de novo* ausente em gerações pregressas. F) Mulher hemofílica em decorrência da união de homem com hemofilia e mulher portadora (modificado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A prevalência da doença é de 1 em cada 25.000 a 30.000 homens no mundo (CASAÑA et al., 2009). No Brasil, cerca de 16% dos hemofílicos apresentam a coagulopatia hereditária do tipo B, a maioria (47%) se encontra na faixa etária dos 19 aos 44 anos, seguido por indivíduos acima dos 45 anos (33%) (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016). A Tabela 1 apresenta a incidência de hemofilia B nos 10 países com maior número de casos relatados no ano de 2015.

Tabela 1 - Incidência de hemofilia B em países com maior número de casos relatados em 2015.

<i>Países</i>	<i>Hemofilia B</i>
Estados Unidos	4.421
Índia	2.127
Brasil	1.945
China	1.787
Reino Unido	1.450
França	1.267
Irã	1.071
Japão	1.064
Egito	1.062
Turquia	878

Fonte: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016

1.2.1 Manifestações clínicas

Essa enfermidade manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de sangramentos, hemartroses e sangramentos musculares que acontecem, muitas vezes, sem associação com traumas evidentes. A frequência e a gravidade do quadro hemorrágico estão, geralmente, relacionadas com as concentrações plasmáticas do fator deficiente. De modo geral, a hemofilia B é classificada em leve, moderada e grave, correspondendo a níveis plasmáticos do fator IX entre 5% e 30%, 1% e 5% e inferiores a 1%, respectivamente (KESSLER; MARIANI, 2006) (Tabela 2). A proporção de pacientes distribuídos entre os níveis de

gravidade da doença ainda não é bem estabelecida, entretanto, dados da comunidade científica sugerem que, aproximadamente, 60-70% dos pacientes desenvolvem as formas moderada ou grave (KATZ, 1996; NERICH et al., 2008; AZNAR et al., 2009). No Brasil, dados obtidos do sistema Hemovida Web Coagulopatias em 2010 e apresentados pela Coordenação de Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde mostram que 33,06% dos diagnósticos referem-se à forma moderada, seguida de 28,22% relativos à forma grave e 23,93% relacionados à forma leve. Há cerca de 14,79% dos pacientes cujos dados não trazem informações sobre a gravidade de seus sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Tabela 2 - Classificação fenotípica da hemofilia B e suas características clínicas.

<i>Classificação</i>	<i>Nível de FIX (IX:C)</i>	<i>Frequência</i>	<i>Fenótipo Clínico</i>	<i>Idade média ao diagnóstico</i>
Grave	<0,01 UI/mL (<1% da atividade normal)	60%	Hemorragias espontâneas músculo- esquelética e de tecidos moles	≤2 anos
Moderada	0,01 – 0,05 UI/mL (1 – 5% da atividade normal)	15%	Hemorragias nas articulações e em músculos após pequenas lesões ou intervenção cirúrgica	<5 anos
Leve	0,05 – 0,40 UI/mL (5 – 40% da atividade normal)	25%	Hemorragias somente em pós-operatórios e traumas	Tardiamente

Fonte: HORAVA; PEPPAS, 2017

Os pacientes com altas deficiências apresentam manifestações hemorrágicas de repetição (2 a 4 por mês) e hemartroses graves, as quais, quando não tratadas adequadamente, evoluem para artropatias crônicas e incapacitantes. Estes pacientes estão sujeitos a hemorragias agudas, que podem comprometer órgãos vitais. As manifestações hemorrágicas são intermitentes e alguns pacientes podem não apresentar sangramentos por semanas ou meses (KESLEER; MARIANI, 2006).

Hemorragia cerebral é uma complicação grave que pode resultar de um trauma leve ou ocorrer espontaneamente, particularmente em pacientes com o quadro grave da doença.

Sintomas associados incluem enxaquecas, vômitos, sonolência, mudanças de comportamento, visão dupla e convulsões (HORAVA; PEPPAS, 2017). Hemorragias cerebrais são a principal causa de morte hemorrágica (DELOUGHERY, 2015).

Na hemofilia moderada, os hematomas e hemartroses nem sempre estão associados a traumatismos evidentes. Embora essas manifestações não sejam tão intensas quanto na hemofilia grave, se não tratadas adequadamente podem evoluir com instabilidade articular, resultando em sangramentos importantes e frequentes, fazendo com que a doença se expresse de maneira mais intensa do que poderia indicar o nível plasmático do fator deficiente (KESSLER; MARIANI, 2006).

Nas formas leves de hemofilia, os sangramentos somente ocorrem após traumas ou cirurgias, porém pode haver hemartroses espontâneas, especialmente em articulações onde previamente ocorreram hemorragia pós-traumática não tratada corretamente. Muitas vezes, essa forma de hemofilia é diagnosticada somente na idade adulta (DARBY et al., 2007).

Cerca de um terço das portadoras da mutação são classificadas como assintomáticas, isto é, elas possuem 40 – 60% dos níveis de FIX plasmático e apresentam sangramento anormal. As portadoras sintomáticas apresentam um quadro leve de manifestação da doença, entretanto, possuem fluxo menstrual mais intenso e prolongado conhecido como menorragia, dismenorreia (cólica menstrual intensa) e sangramentos durante a ovulação que causam dor. Esse tipo de sangramento pode tornar-se grave, especialmente em portadoras com nível de FIX plasmático muito baixo. Há também um alto risco de hemorragia em cistos ovarianos devido ao aumento do sangramento interno durante a ovulação bem como o desenvolvimento de endometriose (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

1.3 Fator IX

1.3.1 Gene do fator IX

Em 1982, iniciaram-se os estudos de caracterização molecular do gene e do DNA complementar (cDNA) do FIX (CHOO et al., 1982; KURACHI; DAVIE, 1982). Nestes estudos, a caracterização parcial do gene foi estabelecida. Posteriormente, os mesmos grupos de pesquisa mostraram a caracterização completa do gene e do cDNA do FIX (ANSON et al., 1984; YOSHITAKE et al., 1985), passos esses essenciais para futuros estudos que visavam a clonagem e expressão do FIX em células de mamíferos. Neste mesmo período, Camerino e

colaboradores (1984) demonstraram a localização do gene do FIX no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1 (CAMERINO et al., 1984) (Figura 3).

Figura 3 – Localização do gene do FIX. O gene do FIX está situado no braço longo do cromossomo X na banda Xq27.1 (modificado de SPATZ; BORG; FEUNTEUN, 2004).

O gene do FIX contém 34 kilobases (Kb), incluindo 7 íntrons e 8 éxons. O maior éxon possui 1935 pares de bases (pb) (YOSHITAKE et al., 1985). O seu transcrito é composto por 2802 nucleotídeos e possui uma pequena região 5' não traduzida (29 bases), uma região entre o códon iniciador e o códon de término (1383 bases) e uma região 3' não traduzida (1390 bases) (ANSON et al., 1984).

1.3.2 Proteína do fator IX

O fator IX é uma glicoproteína plasmática cuja síntese é dependente de vitamina K e pertence à família das proteases que incluem a protrombina, os fatores VII e X e a proteína C. Sua síntese ocorre nos hepatócitos como uma proteína precursora de 461 aminoácidos e 57 kDa contendo um pré-peptídeo sinal de 28 resíduos e um pró-peptídeo de 18 resíduos (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991).

O pré-peptídeo sinal é responsável por encaminhar a proteína para o retículo endoplasmático, sendo clivado pela enzima peptidase sinal. O pró-peptídeo é reconhecido pela enzima γ -carboxilase dependente de vitamina K, responsável pela γ -carboxilação de

resíduos de ácido glutâmico. Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação (BOWEN, 2002).

A proteína madura, também conhecida como zimogênio de serina-protease, apresenta 415 aminoácidos (MA, 2010), peso molecular de 55 kDa, e sua ativação proteolítica ocorre via complexo FVIIa/FT ou FXIa, de acordo com o modelo celular da coagulação sanguínea, resultando na formação da sua forma ativada denominada FIXa (SCHMIDT; BAJAJ, 2003) (Figura 4).

Figura 4 – Fases de maturação do FIX. A proteína é sintetizada como uma forma precursora contendo um pré-peptídeo sinal e um pró-peptídeo. Esses dois segmentos peptídicos são removidos antes da proteína ser secretada para a circulação. Durante esse processo, o FIX sofre outras modificações pós-traducionais como glicosilação, sulfatação e fosforilação. A ativação do FIX ocorre no plasma após a liberação do peptídeo de ativação, resultando na formação de duas cadeias, a leve, contendo os domínios Gla e EGF 1 e 2, e a pesada formada pelo domínio serina-protease unidas por uma ponte dissulfeto. As cores dos éxons do gene do FIX correspondem às suas respectivas estruturas traduzidas. Abreviações: Pre - pré-peptídeo, Pro - pró-peptídeo, GLA - domínio do ácido γ -carboxiglutâmico, γ GLA - domínio γ -carboxilado, EGF 1 e 2 - semelhante ao fator de crescimento epidérmico 1 e 2 (modificado de CHAVALI et al., 2011).

A ativação do FIX ocorre no plasma após a clivagem em duas regiões (Arg¹⁴⁵-Arg¹⁴⁶ e Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹) liberando o peptídeo de ativação e resultando na formação de duas cadeias, a leve (resíduos 1-145) e a pesada (resíduos 181-415) unidas por uma ponte dissulfeto (SCHMIDT; BAJAJ, 2003).

Como todos os fatores de coagulação dependentes de vitamina K, o FIX apresenta quatro domínios. Na cadeia leve estão os domínios Gla (ácido γ -carboxiglutâmico) e EGF-like (semelhante ao fator de crescimento epidérmico) 1 e 2. Na cadeia pesada, localiza-se o domínio serina-protease (SCHMIDT; BAJAJ, 2003) (Figuras 5 e 6).

<

Figura 5 – Estrutura primária do FIX humano com sua sequência de aminoácidos e respectivos domínios. Os aminoácidos que apresentam modificação pós-traducional se

encontram destacados. No pré-peptídeo, o aminoácido metionina (M) é destacado em rosa. No domínio Gla, os 12 resíduos de Glu estão sublinhados e em laranja. No domínio EGF-1 as S53 e S61 estão em verde, e o D64 em vermelho. A posição de clivagem do peptídeo de ativação é encontrada em azul R145 e R180. No peptídeo de ativação, a Y155 sulfatada é destacada em amarelo, em vermelho e em roxo os resíduos glicosilados N157, N167, T159, T169, T172. Em verde, a S158 fosforilada.

O domínio Gla compreende da tirosina 1 ao ácido glutâmico 40. Neste domínio ocorre a γ -carboxilação de 12 resíduos de ácido glutâmico (Glu) em ácido γ -carboxiglutâmico, pela enzima γ -carboxilase, necessários para a ligação do FIX aos fosfolipídeos e às células endoteliais. Esse domínio é codificado pelos éxons 2 e 3, compreende a região N-terminal e esta organização reflete a função principal do domínio Gla, ou seja, ancorar e concentrar o fator de coagulação em uma membrana primariamente ativada via pontes de Ca^{+2} (ZÖGG; BRANDSTETTER, 2009).

Os domínios EGF-like 1 e 2 são formados pelo ácido aspártico 47 até a arginina 145. O domínio EGF-like 1 apresenta dois tipos de modificações pós-traducionais: a β -hidroxilação do ácido aspártico 64 e a glicosilação dos aminoácidos serina (Ser^{53} e Ser^{61}). As regiões N-terminal dos domínios EGF-like se ligam ao Ca^{+2} , que medeia uma interface para interações de ligação (HANDFORD et al., 1990), e possivelmente, também ao Mg^{+2} (SHIKAMOTO et al., 2003). Estes domínios estão relacionados com a propriedade de ligação do FIX aos fatores VIII e X e à incorporação do FIXa ao complexo tenase (complexo FIXa/FVIIIa). Esses domínios são codificados pelos éxons 4 e 5 (MA, 2010).

O peptídeo de ativação do FIX é codificado pelo éxon 6 e compreende da alanina 146 a arginina 180, sendo rico em glutamato e aspartato. São encontradas três modificações pós-traducionais principais nesse domínio: sulfatação na tirosina 155, N-glicosilação nos resíduos de asparagina 157 e 167, O-glicosilação nos resíduos de treonina 159, 167 e 172 e fosforilação na serina 158 (MAKINO et al., 2000). Essas modificações conferem alta solubilidade ao zimogênio e suprimem sua clivagem e ativação prematuras. A atividade enzimática do FIX só ocorre após a ativação proteolítica envolvendo a liberação do peptídeo de ativação do domínio catalítico (ZÖGG; BRANDSTETTER, 2009).

No domínio catalítico do FIX, codificado pelos éxons 7 e 8, encontra-se o sítio ativo serina-protease, caracterizada pela tríade catalítica conservada dessas enzimas (His^{221} , Ser^{365} e Asp^{264}). Este domínio está compreendido do resíduo de valina 181 ao resíduo de treonina 415 (VYSOTCHIN; MEDVED; INGHAM, 1993).

Figura 6 – Esquema estrutural da proteína FIX. S - pré-peptídeo sinal, P - pró-peptídeo, Gla - domínio Gla, EGF1 e EGF2 - domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, PA - peptídeo de ativação, Protease - domínio serina-protease. Sítios de modificações pós-traducionais: Gla - γ -carboxilação, Hya - β -hidroxilação, S - sulfatação, F - fosforilação, ♦ - N-glicosilação, ● - O-glicosilação. Os pontos de clivagem estão representados por triângulos (modificado de ORLOVA et al., 2012).

O FIX sofre complexas modificações pós-traducionais durante sua passagem pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi, como a β -hidroxilação, a glicosilação, a sulfatação e a fosforilação citadas anteriormente. Entretanto, a γ -carboxilação é a modificação crucial na formação do FIX funcional (RISHAVY; BERKNER, 2012).

1.3.3 Mutações no gene do fator IX e suas consequências na proteína

Há cerca de 1.101 tipos de mutações que podem ocorrer ao longo de todo o gene do FIX como mutações pontuais, deleções, inserções, rearranjos e inversões que provocam a hemofilia B (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012). Os polimorfismos podem ser de dois tipos: polimorfismo de um único nucleotídeo e polimorfismo de comprimento, também conhecido como microssatélite (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012).

As mutações pontuais são o defeito genético mais comum e estão presentes em, aproximadamente, 90% dos pacientes hemofílicos (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012). Entre essas, destacam-se as mutações *missense* que levam à troca de um aminoácido da proteína e causam um decréscimo ou perda total da sua atividade (MUKHERJEE et al., 2008). Sommer e colaboradores (1992) estimaram que as mutações *missense* causam 59% das hemofilias B moderada e grave e que essas mutações são, na maioria das vezes, de origem independente. Em contraste, esse tipo de mutação foi encontrado em, praticamente, todas as famílias (97%) com a doença de quadro leve e somente a minoria delas (41%) era de origem independente (SOMMER et al., 1992). Essas mutações podem ser classificadas em dois grandes grupos:

- Tipo I : mutações quantitativas, as quais resultam em níveis plasmáticos reduzidos da proteína normal.
- Tipo II: mutações qualitativas da proteína com sua função reduzida, podendo estar presente em quantidade normal ou inferior no plasma.

Muitas mutações *missense* podem se enquadrar em ambas categorias.

As mutações do tipo I podem resultar de uma mutação no peptídeo sinal, o qual direciona o tráfico intracelular da proteína e não possui efeito na função da forma circulante no plasma. Defeitos no peptídeo sinal podem levar à redução da quantidade de proteína secretada, promovendo um grande espectro de gravidade da doença. A maioria dos defeitos do tipo I são causados pela diminuição da transcrição ou secreção proteica, causando a hemofilia B grave (LEE; BERNTORP; HOOTS, 2011).

Todavia, aproximadamente 60% das mutações que causam a coagulopatia do tipo B são, predominantemente, do tipo II, característica incomum se comparada com deficiências de outros fatores de coagulação. Mutações que ocorrem nos resíduos da tríade catalítica do sítio ativo resultam em uma proteína sem atividade catalítica, o que acarreta no quadro grave da hemofilia B e aumento da incidência de inibidores. Outro exemplo de defeito do tipo II são mutações no pro-peptídeo, o qual medeia a interação com a γ -carboxilase. Alterações nessa região produzem proteínas com baixa atividade devido ao comprometimento da ligação fosfolipídica, resultando na doença leve a moderada (SAUNDERS; PERKINS, 2008).

As mutações *nonsense*, no qual um códon de parada é adicionado, ocorrem geralmente em códons CGA. O gene do FIX apresenta 6 desses códons e a substituição da base nitrogenada C por T resulta no códon de parada TGA, levando, geralmente, a uma forma de hemofilia grave (BOWEN, 2002).

As deleções são o segundo tipo de mutação do tipo II mais encontrada, presentes em, aproximadamente, 5 a 10% dos pacientes. Essas mutações incluem a deleção inteira ou parcial do gene, bem como deleções internas e microdeleções de um ou vários pares de bases, podendo ocasionar perda de domínios da proteína e da sua atividade. Estão normalmente associadas ao quadro grave da doença (BOWEN, 2002).

As inserções, assim como as deleções, podem ser grandes ou somente de um nucleotídeo e afetam a função gênica ou o seu produto de maneira adversa. Rearranjos e inversões são muito raros na população hemofílica (BOWEN, 2002).

O tipo de mutação designa não somente a gravidade da hemofilia B, como também a probabilidade que o paciente tem de desenvolver anticorpos inibidores durante a terapia de

reposição. As mutações associadas com a ausência do produto gênico, tais como as deleções ou mutações *nonsense*, proporcionam um alto risco para o desenvolvimento de inibidores. Mutações associadas com a presença do produto gênico, mesmo que em pequenas quantidades, proporcionam um risco menor de desenvolvimento dos mesmos (BOWEN, 2002). Entretanto, a caracterização da mutação ainda não possibilita prever o tipo de resposta imune que será desenvolvido pelo paciente, sendo que outros *loci* gênicos, como o complexo de histocompatibilidade principal (MHC), podem estar envolvidos (LOLLAR, 1999).

1.4 Tratamento da hemofilia B

1.4.1 Tipos de terapia

O intuito do tratamento das hemofilias é a prevenção ou controle de episódios hemorrágicos visando evitar artropatias incapacitantes e dano tecidual e melhorar a qualidade de vida e sobrevida, através da reposição dos fatores de coagulação ausentes (GATER; THOMSON; STRANDBERG-LARSEN, 2011).

As modalidades de tratamento da hemofilia são definidas pela periodicidade com que é realizada a reposição dos fatores de coagulação, podendo ser sob demanda (episódico) ou profilático. O objetivo principal do tratamento sob demanda é oferecer uma compensação imediata de FIX após um episódio hemorrágico e minimizar o impacto do sangramento na sobrevivência ou no dano a longo prazo. Por outro lado, a profilaxia consiste no uso regular de concentrados de fator de coagulação a fim de manter os níveis de fator suficientemente elevados, mesmo na ausência de hemorragias, para prevenir os episódios de sangramentos, podendo ser classificada em primária, secundária e terciária, ou intermitente (periódica ou de curta duração) (SRIVASTAVA et al., 2013) (Figura 7).

Figura 7 – Regimes de tratamento da hemofilia B. A profilaxia primária caracteriza-se pela reposição regular contínua com início antes de evidências de alteração osteocondral e iniciada antes da segunda hemartrose e idade até 3 anos. A profilaxia secundária define-se como um tratamento de reposição regular contínuo com início após duas ou mais hemartroses e antes do aparecimento de alteração osteocondral. Já a terciária, inicia-se após evidência de alteração osteocondral. O último tipo de profilaxia é o de curta duração que tem como objetivo prevenir sangramentos, sendo realizado por períodos inferiores a 45 semanas ao ano (modificado de COPPOLA; DI CAPUA; DE SIMONE, 2008).

A profilaxia primária caracteriza-se pela reposição regular contínua com início antes de evidências de alteração osteocondral e iniciada antes da segunda hemartrose e idade até 3 anos. A profilaxia secundária define-se como um tratamento de reposição regular contínuo com início após duas ou mais hemartroses e antes do aparecimento de alteração osteocondral. Já a terciária, inicia-se após evidência de alteração osteocondral. O último tipo de profilaxia é o de curta duração que tem como objetivo prevenir sangramentos, sendo realizado por períodos inferiores a 45 semanas ao ano (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

Diversos estudos demonstram os benefícios do regime profilático na qualidade de vida dos hemofílicos, como a redução dos riscos de hemorragias espontâneas e complicações

subsequentes das hemartroses (GOUW; VAN DER BOM; MARIJKE VAN DEN BERG, 2007; MANCO-JOHNSON et al., 2007; COPPOLA et al., 2012), bem como a prevenção de hemorragia intracranial e outros tipos de hemorragias graves, prevenção de dor e redução na incapacitação a longo prazo (COPPOLA et al., 2012), sendo, portanto, recomendado como a primeira linha de tratamento para crianças com hemofilia grave e ao longo dos anos, observa-se um aumento na profilaxia em pacientes adultos (BAUER, 2015).

Segundo dados da Federação Mundial de Hemofilia (2016), estima-se que no Brasil 89% dos hemofílicos acima de 18 anos de idade e 65% com menos de 18 anos recebem tratamento profilático (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016). Atualmente, um paciente com tratamento plasmático para hemofilia B custa para o SUS R\$ 49.917,00. De acordo com o volume da aquisição de FIX plasmático pelo governo em licitação, no período entre 13/08/2015 e 12/08/2016, foram adquiridos um total de 94.500.000 unidades internacionais (UI) de FIX derivado de plasma a um valor total de R\$ 51.795.450,00, resultando em um valor médio por UI de R\$ 0,55 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Estimativas sugerem que os fatores de coagulação correspondem a até 98% do total de gastos com o tratamento da hemofilia. Há diversos fatores que impactam nos custos médicos diretos do tratamento como o tipo de fator prescrito (derivado de plasma ou recombinante), tipo de tratamento (sob demanda ou profilático), idade dos pacientes e comorbidade (contaminação por HIV ou HCV) (GATER; THOMSON; STRANDBERG-LARSEN, 2011).

Estima-se que mais de 75% da população mundial de hemofílicos (cerca de 350.000 pessoas) não é tratada regularmente ou não recebe nenhum tipo de tratamento (ARRUDA; DOSHI; SAMELSON-JONES, 2017). As limitações são devido aos custos associados ao valor de mercado do fator (derivado do plasma ou recombinante), aos cuidados médicos e às possíveis complicações com a terapia (BERNTORP; SHAPIRO, 2012). Sem os tratamentos mais modernos, a expectativa de vida média é de 11 anos, o que é uma realidade em muitos países em desenvolvimento (DARBY et al., 2007).

1.4.2 Produtos disponíveis no mercado e suas limitações

A terapia de reposição para o tratamento da hemofilia B disponível baseia-se na infusão intravenosa do concentrado do fator deficiente, que pode ser de origem plasmática como o FIX derivado de plasma de pureza intermediária (*Konyne-80 & Bebulin®*); de alta

pureza (*AlphaNine[®] SD*, *Octanine[®]*, *ImmunineTM*); de ultra pureza (*Mononine[®]*; *Nonafact[®]*) ou recombinante (HORAVA; PEPPAS, 2017) (Tabela 3).

Tabela 3 – Produtos comercialmente disponíveis para o tratamento da hemofilia B

<i>Produto</i>	<i>Companhia farmacêutica</i>	<i>Tipo</i>	<i>Uso</i>	<i>Aprovação FDA</i>
Mononine[®]/ Berinin-P[®]	CSL Behring	Derivado de plasma	Demanda	1992
ImmunineTM	Baxter/Baxalta	Derivado de plasma	Demanda e profilaxia	-
AlphaNine SD[®]	Grifols	Derivado de plasma	Demanda	1996
Octanine[®]	Octapharma	Derivado de plasma	Demanda	-
Fator IX[®]	Grifols	Derivado de plasma	Demanda e profilaxia	-
BeneFIX[®]	Pfizer	Recombinante	Demanda	1997
RIXUBISTM	Baxter/Baxalta	Recombinante	Demanda e profilaxia	2013
ALPROLIX[®]	Biogen Idec	Recombinante de longa duração	Demanda e profilaxia	2014
IXINITY[®]	Cangene Emergent BioSolutions	Recombinante	Demanda	2015
IDELVION[®]	CSL Behring	Recombinante de longa duração	Demanda e profilaxia	2016
REBINYN[®]	Novo Nordisk	Recombinante de longa duração	Demanda e profilaxia	2017

Fonte: HORAVA; PEPPAS, 2017

O Brasil não apresenta tecnologia para a produção de concentrados de FIX derivado de plasma. O plasma brasileiro, proveniente de doações, é fracionado por companhias europeias e retorna ao país na forma de concentrado de fator liofilizado, tendo assim um

elevado custo. O FIX recombinante também precisa ser importado, o que acarreta em um alto valor de mercado. Em 2015, o Brasil utilizou mais de 103 milhões de UI de concentrados de FIX, dos quais 100% eram derivados de plasma humano (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016). A Tabela 4 apresenta um ranking mundial com os 10 principais consumidores de concentrados de FIX e a discriminação entre as frações derivada de plasma e recombinante.

Tabela 4 – Comparação de consumo de FIX derivado de plasma e recombinante pelos principais países consumidores de FIX.

<i>Países</i>	<i>Total UI</i>	<i>FIXdp</i>	<i>FIXr</i>	<i>% total de FIXdp</i>	<i>% total de FIXr</i>
Estados Unidos	492.300.000	80.100.000	412.200.00	16	84
Japão	128.700.000	57.200.000	71.500.000	44	56
Brasil	103.356.950	103.356.950	0	100	0
Rússia	99.140.361	99.140.361	0	100	0
Reino Unido	91.982.767	9.473.960	82.508.807	10	90
Alemanha	68.625.908	43.091.300	25.534.608	63	37
Rep. da Coréia	43.457.000	2.494.000	40.963.000	6	94
Colômbia	41.622.000	28.633.000	12.989.000	69	31
Polônia	33.652.200	32.402.200	1.250.000	96	4
Austrália	26.442.100	2.305.000	24.137.100	9	91

Abreviações: dp – derivado de plasma; r – recombinante

Fonte: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016

Atualmente, os FIX de origem plasmática com registro ativo junto à ANVISA são Octanine F[®] (Octapharma), Immunine[®] (Baxter), Berinin P[®] (CSL Behring) e Fator IX[®] (Grifols) e os recombinantes são Alprolix[®] (Biogen), BeneFIX[®] (Pfizer) e Rixubis[®] 8 (Baxter) (CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS, 2017). O fator IX de origem plasmática faz parte do rol de tecnologias ofertadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da hemofilia B, enquanto que os de origem recombinante não são disponibilizados pelo mesmo.

Os produtos derivados do plasma humano apresentavam o risco de transmissão de agentes infecciosos como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV). A utilização destes produtos contaminados, por exemplo, foi responsável pela transmissão generalizada do HIV em pacientes hemofílicos no início dos anos 1980 e pelo aumento subsequente da taxa de mortalidade ocasionada pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DARBY et al., 1995, 2007). Avanços nas tecnologias de triagem, de purificação e de inativação de patógenos do plasma melhoraram a segurança dos produtos modernos. Todavia, nos últimos anos, a hepatite E emergiu como uma fonte de preocupação causada pelo aumento das taxas de infectividade nos doadores de sangue (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

Há ainda o risco de transmissão de *prions* que causam a nova variante da doença de *Creutzfeldt Jacob* e de agentes infecciosos emergentes que podem ultrapassar a barreira interespecífica ou serem resistentes aos processos de inativação viral como o vírus aviário da influenza A (H5N1) (UNGCHUSAK et al., 2005; LUDLAM; TURNER, 2006) ou vírus não envelopados como o parvovírus B19 (SCHNEIDER et al., 2008).

Uma nova contaminação com o hepegivírus humano (HHpgV-1) foi identificada em bolsas de transfusão sanguínea e em pacientes hemofílicos que receberam concentrados de fator derivado de plasma. A transmissão de patógenos emergentes e re-emergentes, como os vírus de *West Nile*, Dengue, *Ross River* e *Hendra*, também é motivo de preocupação (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

Outra limitação na segurança dos concentrados derivados de plasma reside na presença de quantidades detectáveis de FIX ativo e níveis residuais de outros fatores pró-coagulantes, os quais resultam em um risco significativo de provocar episódios trombóticos (ORLOVA et al., 2012).

O principal efeito colateral da infusão de concentrados de FIX é o desenvolvimento de inibidores, que são anticorpos policlonais da classe IgG direcionados contra o FIX (aloanticorpos). Neste caso, os pacientes passam a não responder a infusão do fator deficiente e apresentam episódios hemorrágicos de difícil controle (FRANCHINI; MANNUCCI, 2011).

A prevalência de inibidores na hemofilia B é de cerca de 6%, acometendo mais frequentemente os pacientes com quadro grave e após as primeiras infusões do fator deficiente, em geral, dentro dos primeiros 150 dias de exposição ao concentrado de FIX (BERNTORP; SHAPIRO, 2012). O Brasil apresenta o segundo maior índice de prevalência

de inibidores no mundo (15 casos), superado apenas pelo Irã (16 casos) (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

O risco de se adquirir inibidores é, até certo ponto, determinado por fatores genéticos, particularmente grandes deleções do gene do FIX. Estas deleções estão relacionadas à ocorrência de reações anafiláticas após a infusão do fator (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012). Outros determinantes genéticos, tais como histórico familiar de inibidores, etnia, bem como vários fatores não genéticos, como técnicas de manufatura de concentrados do fator, tipo de produto utilizado, unicidade *versus* multiplicidade de diferentes produtos infundidos, idade do paciente à primeira infusão de concentrado, uso intensivo durante cirurgia, dentre outros, também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento destes aloanticorpos (JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012).

Desde a aprovação, em 1997, do primeiro produto de FIX recombinante licenciado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) para o uso clínico no tratamento da hemofilia B, o BeneFIX[®], diversos outros recombinantes foram lançados no mercado visando o tratamento sob demanda e profilaxia (HARTMANN; CROTEAU, 2016). Esses recombinantes proporcionaram uma gama de opções para o tratamento dos hemofílicos B, mas não oferecem nenhum novo benefício terapêutico. Cada um dos recombinantes é um agente hemostático eficiente com um tempo de meia-vida em torno de 25 horas. Assim, um regime profilático de infusões de duas vezes por semana é necessário para manter o nível plasmático do FIX acima de 1% (LAMBERT et al., 2007). A nova classe de recombinantes de longa duração, aprovada a partir de 2014, possui modificações estruturais como fusão com a porção Fc de IgG (Alprolix[®]) e fusão com a albumina humana (Idelvion[®]) e modificações químicas como a peguilação (Rebinyn[®]) que aumentam a meia-vida da proteína, apresentando potencial de impactar positivamente na qualidade de vida dos pacientes (HARTMANN; CROTEAU, 2016).

A grande maioria dos recombinantes é produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO), cultivadas em meio livre de componentes de origem animal. Com exceção do Alprolix[®] que é produzido em células de rim embrionário humano (HeK).

Alguns estudos sugerem que a utilização de produtos recombinantes produzidos em células murinas podem estar associados a um aumento no risco de desenvolvimento de inibidores (WIGHT; PAISLEY, 2003; JAYANDHARAN; SRIVASTAVA, 2012). Isso pode acontecer devido a duas diferenças críticas encontradas entre os humanos e a maioria dos mamíferos: os humanos perderam a habilidade de biosintetizar os epítomos Gal•1-3Galβ1-

(3)4GlcNac (α -Gal) e um importante ácido siálico, o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), estruturas que estão presentes em uma grande variedade de células de mamíferos. Estes epítomos glicanos não-humanos podem afetar potencialmente a imunogenicidade e/ou a eficácia de glicoproteínas terapêuticas (PADLER-KARAVANI; VARKI, 2011). Ainda, diferenças adicionais nas modificações pós-traducionais do FIX recombinante de murino como redução na sulfatação da tirosina 155 e ausência de fosforilação na serina 158 (POON et al., 2002), fazem com que sua meia-vida *in vivo* seja, aproximadamente, 30% menor se comparada com o concentrado derivado de plasma (FRANCHINI et al., 2013).

Em suma, os obstáculos oferecidos pelas duas opções de tratamento para a hemofilia B, tem incentivado a comunidade científica ao desenvolvimento de novas moléculas e formulações de FIX recombinante mais eficientes ou menos imunogênicas, tornando-o mais acessível à população de hemofílicos B (LAMBERT et al., 2007).

1.5 Bioengenharia do FIX recombinante

As últimas décadas de experiência clínica têm demonstrado a segurança e eficácia dos fatores de coagulação recombinantes. Com a adoção de estratégias de profilaxia, houve um progresso na prevenção de complicações ligadas à coagulopatia. Atualmente, o conhecimento da estrutura e função dos fatores de coagulação, dos mecanismos da hemofilia e seus inibidores, avanços na terapia gênica e a demanda mundial por concentrados desses fatores levaram a comunidade científica à busca por estratégias de biogenharia para melhorar o quadro terapêutico da doença (PIPE, 2005).

A bioengenharia dos fatores de coagulação recombinantes visando melhorar suas atividades promete superar algumas das limitações do tratamento atual como os altos custos da terapia e aumentar a disponibilidade para a população hemofílica mundial (PIPE, 2005). A figura 8 mostra estratégias de biogenharia para aumentar as propriedades funcionais do FIX recombinante.

Figura 8 – Exemplos de estratégias de biogenharia para aumentar as propriedades funcionais do FIX recombinante (modificado de PIPE, 2010).

1.5.1 Sistemas de expressão alternativos

Os fatores de coagulação são um grupo de proteínas complexas de difícil expressão (KUMAR, 2015). Mudanças na maquinaria intracelular de enovelamento ou de modificações pós-traducionais podem melhorar a produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos (WELLS; ROBINSON, 2017).

Utilizando ferramentas como pequenos RNAs de interferência (siRNA) e nucleases *zinc fingers* é possível diminuir e/ou silenciar a expressão de genes apoptóticos, como BAX/BAK, visando aumentar a produção de proteínas (LIM et al., 2006; COST et al., 2010). Graav e colaboradores (2015) realizaram um silenciamento triplo dos genes FUT8, BAX e BAK com CRISPR/Cas9 em três dias, gerando uma linhagem celular CHO robusta para a produção de proteínas, sem efeitos adversos em outros genes (GRAV et al., 2015).

Um dos exemplos mais relevantes sobre a melhoria da expressão de proteínas heterólogas em uma linhagem celular de mamífero é a superexpressão da proteína de ligação *X-box 1*, a qual é uma importante reguladora atuando em células plasmáticas controlando a diferenciação e a resposta a proteínas não enoveladas. Isso resultou no aumento da maquinaria

de secreção celular, isto é, do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, promovendo o aumento da produtividade em células CHO (TIGGES; FUSSENEGGER, 2006).

1.5.2 Tecnologias para a extensão da meia-vida do FIX recombinante

O foco no tratamento da hemofilia B atualmente está na modificação do FIX para melhorar alguns aspectos da sua biologia, mais notadamente, seu tempo de meia-vida, sua atividade funcional e sua imunogenicidade (LAFFAN, 2016).

Os benefícios do aumento da meia-vida do FIX são a manutenção de altos níveis da proteína por mais tempo com poucas infusões. Embora, essas modificações possam aumentar o risco de reações adversas, elas também podem reduzir a frequência de alguns efeitos indesejáveis, como a formação de inibidores. As novas tecnologias utilizam a fusão do fator de coagulação com outra molécula que pode ter uma meia-vida maior ou proteger o fator do seu próprio mecanismo de eliminação. As moléculas que estão em uso clínico são o polietilenoglicol (PEG), a albumina e a porção Fc da imunoglobulina G (IgG) (LAFFAN, 2016).

A meia-vida longa da IgG é devido ao seu mecanismo de reciclagem atípico. Após a endocitose, a IgG se liga ao receptor neonatal de Fc dentro do endossomo. Essa ligação a protege de ser destruída pelo lisossomo e, ao invés disso, é reciclada para o plasma (ROOPENIAN; AKILESH, 2007). A porção Fc é coexpressa juntamente com o FIX, formando um dímero ligado via ponte dissulfeto na extremidade C-terminal do FIX (DUMONT et al., 2012). O FIX-Fc foi aprovado pelo FDA em 2014 com o nome comercial de Alprolix[®].

A albumina apresenta extensão no tempo de meia-vida devido ao mesmo mecanismo de reciclagem da IgG (METZNER et al., 2009). O FIX-FP foi aprovado pelo FDA, em 2016, com o nome comercial de Idelvion[®].

Por fim, PEG é um polímero de óxido de etileno usado para aumentar a meia-vida de proteínas no plasma, bem como modificar a solubilidade, a estabilidade e a biodistribuição de drogas. A peguilação do FIX foi realizada nos N-glicanos do peptídeo de ativação, não interferindo na atividade da proteína (OSTERGAARD et al., 2011). O N9-GP foi aprovado pelo FDA, em 2017, com o nome comercial de Rebinyn[®].

1.5.3 Estratégias de bioengenharia visando o aumento da atividade biológica do FIX recombinante

O método mais utilizado na bioengenharia de proteínas é chamado “design racional”, o qual envolve mutagênese sítio dirigida de proteínas-alvo (ARNOLD, 1993). Essa abordagem permite a introdução/alteração de sequências em um gene alvo que levam à incorporação de aminoácidos específicos na proteína de interesse (ANTIKAINEN; MARTIN, 2005).

A substituição de um ou múltiplos aminoácidos em uma sequência alvo de uma proteína recombinante pode afetar drasticamente suas propriedades como especificidade de ligação, suscetibilidade à degradação e estabilidade, sendo uma importante ferramenta para a otimização de características terapêuticas das mesmas (SZLACHCIC; ZAKRZEWSKA; OTLEWSKI, 2011).

Simioni e colaboradores (2009) substituíram o aminoácido arginina na posição 338 do domínio catalítico da proteína FIX pelo aminoácido leucina, mimetizando uma mutação espontânea encontrada em uma família trombofílica da Itália denominada FIX Padua. Os indivíduos afetados apresentam 8 vezes mais atividade específica de FIX que as pessoas sem a referida mutação. No estudo *in vitro* utilizando um vetor lentiviral e células Hek 293, foi observado um aumento de 5 a 10 vezes na atividade específica do FIX mutante em relação à proteína selvagem, demonstrando que essa mutação resultou em um FIX hiperfuncional (SIMIONI et al., 2009).

Em 2013, Kao e colaboradores geraram uma nova variante de FIX recombinante denominada FIX-TripleL através da substituição dos aminoácidos valina, na posição 86, e glutamato, na posição 277, por resíduos de alanina e do aminoácido arginina por leucina (mutação Padua) no domínio catalítico da proteína. Essas mutações aumentaram 22 vezes a atividade de coagulação específica *in vitro* (KAO et al., 2013).

Essas variantes poderiam reduzir consideravelmente as infusões necessárias para se atingir a eficácia hemostática no futuro (PIPE, 2010).

Este trabalho parte da hipótese que mutações sítio dirigidas em regiões importantes do FIX como os domínios Gla e catalítico podem aumentar sua atividade biológica. Para tanto, torna-se necessária a busca por novas mutações que favoreçam esse aumento.

CONCLUSÃO

7 Conclusão

Neste trabalho, utilizando ferramentas de bioengenharia, desenvolvemos três novas variantes de FIX recombinante humano com maior atividade específica, sendo FIX-ALL a mais potente variante *in vitro* descrita até o momento. Dentre elas, FIX-YKALW apresentou maior proteção hemostática *in vivo*, com uma dose 5 vezes menor que a recomendada para o medicamento referência para o tratamento da população hemofílica B brasileira.

Mais estudos são necessários para caracterizar essas proteínas quanto aos riscos trombótico e imunogênico para garantir a sua segurança na aplicação clínica.

Entretanto, as variantes geradas aqui podem, no futuro, ser associadas à estratégia de terapia gênica no intuito de promover uma cura definitiva para a hemofilia do tipo B. De fato, um impacto mais imediato, seria adaptar esses novos FIX recombinantes para a produção comercial em linhagens celulares humanas como a SK-Hep-1 visando uma produção de concentrados de baixo custo, aumentando-se, assim, sua disponibilidade, em especial para os países em desenvolvimento, como o Brasil.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

8 Referências Bibliográficas

ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2878–2887, 26 mar. 2009.

ADAMS, P.; AFONINE, P.; BUNKOCZI, G.; CHEN, V.; DAVIS, I.; ECHOLS, N.; HEADD, J.; HUNG, L.; KAPRAL, G.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.; BUNKÓCZI, G. **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution**. *Acta Crystallogr.*, 1 jan. 2010. ..

AHMAD, S. S.; RAWALA, R.; CHEUNG, W. F.; STAFFORD, D. W.; WALSH, P. N. The role of the second growth-factor domain of human factor IXa in binding to platelets and in factor-X activation. **Biochem.J.**, v. 310 (Pt 2, n. 0264–6021, p. 427–431, 1995.

ANSON, D. S.; CHOO, K. H.; REES, D. J.; GIANNELLI, F.; GOULD, K.; HUDDLESTON, J. A.; BROWNLEE, G. G. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. **The EMBO journal**, v. 3, n. 5, p. 1053–60, maio 1984.

ANTIKAJINEN, N. M.; MARTIN, S. F. Altering protein specificity: techniques and applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2701–2716, 15 abr. 2005.

ARNOLD, F. H. Engineering proteins for nonnatural environments. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 9, p. 744–9, jun. 1993.

ARRUDA, V. R.; DOSHI, B. S.; SAMELSON-JONES, B. J. Novel approaches to hemophilia therapy: Successes and challenges. **Blood**, v. 130, n. 21, p. 2251–2256, 2017.

AZNAR, J. A.; LUCÍA, F.; ABAD-FRANCH, L.; JIMÉNEZ-YUSTE, V.; PÉREZ, R.; BATLLE, J.; BALDA, I.; PARRA, R.; CORTINA, V. R. Haemophilia in Spain. **Haemophilia**, v. 15, n. 3, p. 665–675, maio 2009.

BAKER, D. C.; BRASSARD, J. Review of continuing education course on hemostasis. **Toxicologic pathology**, v. 39, n. 1, p. 281–8, jan. 2011.

BAUER, K. A. Current challenges in the management of hemophilia. **The American journal of managed care**, v. 21, n. 6 Suppl, p. S112-22, mar. 2015.

BERNTORP, E.; SHAPIRO, A. D. Modern haemophilia care. **The Lancet**, v. 379, n. 9824, p. 1447–1456, 14 abr. 2012.

BOWEN, D. J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **Molecular pathology : MP**, v. 55, n. 2, p. 127–44, abr. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2009-2010**. 2ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. COORDENAÇÃO GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Manual de Hemofilia**. 2ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. **Alfanonacogue - Benefix® para hemofilia B em pacientes menores de 19 anos de idade**. Ministério da Saúde, Brasília, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS - CMED. **Lista de preços de medicamentos**. Disponível em: <<https://www.portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos>>. Acesso em: 20 set. 2017.

BRUNETTI-PIERRI, N.; GROVE, N. C.; ZUO, Y.; EDWARDS, R.; PALMER, D.; CERULLO, V.; TERUYA, J.; NG, P. Bioengineered factor IX molecules with increased catalytic activity improve the therapeutic index of gene therapy vectors for hemophilia B. **Human gene therapy**, v. 20, n. May, p. 479–485, 2009.

BUSBY, S.; KUMAR, A.; JOSEPH, M.; HALFPAP, L.; INSLEY, M.; BERKNER, K.; KURACHI, K.; WOODBURY, R. Expression of active human factor IX in transfected cells. **Nature**, v. 316, n. 6025, p. 271–273, jul. 1985.

CAMERINO, G.; GRZESCHIK, K. H.; JAYE, M.; DE LA SALLE, H.; TOLSTOSHEV, P.; LECOCQ, J. P.; HEILIG, R.; MANDEL, J. L. Regional localization on the human X chromosome and polymorphism of the coagulation factor IX gene (hemophilia B locus). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 2, p. 498–502, jan. 1984.

CAMIRE, R. M.; LARSON, P. J.; STAFFORD, D. W.; HIGH, K. a. Enhanced gamma-carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. **Biochemistry**, v. 39, n. 46, p. 14322–9, 21 nov. 2000.

CANTORE, A.; NAIR, N.; DELLA VALLE, P.; DI MATTEO, M.; MÀTRAI, J.; SANVITO, F.; BROMBIN, C.; DI SERIO, C.; D'ANGELO, A.; CHUAH, M.; NALDINI, L.; VANDENDRIESSCHE, T. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4517–20, 29 nov. 2012.

CASAÑA, P.; HAYA, S.; CID, A. R.; OLTRA, S.; MARTÍNEZ, F.; CABRERA, N.; AZNAR, J. a. Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 153, n. 3, p. 114–7, mar. 2009.

CHANG, J. Changing Residue 338 in Human Factor IX from Arginine to Alanine Causes an Increase in Catalytic Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12089–12094, 15 maio 1998.

- CHAVALI, S.; MAHAJAN, A.; GHOSH, S.; MONDAL, B.; BHARADWAJ, D. Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 4, p. 716–22, 9 set. 2011.
- CHOO, K. H.; GOULD, K. G.; REES, D. J.; BROWNLEE, G. G. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 178–80, 9 set. 1982.
- COPPOLA, A.; DI CAPUA, M.; DE SIMONE, C. Primary prophylaxis in children with haemophilia. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 6 Suppl 2, n. Suppl 2, p. s4-11, set. 2008.
- COPPOLA, A.; TAGLIAFERRI, A.; DI CAPUA, M.; FRANCHINI, M. Prophylaxis in Children with Hemophilia: Evidence-Based Achievements, Old and New Challenges. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 38, n. 1, p. 79–94, 7 fev. 2012.
- CORRÊA DE FREITAS, M. C.; BOMFIM, A. de S.; MIZUKAMI, A.; PICANÇO-CASTRO, V.; SWIECH, K.; COVAS, D. T. Production of coagulation factor VII in human cell lines Sk-Hep-1 and HKB-11. **Protein Expression and Purification**, v. 137, p. 26–33, set. 2017.
- COST, G. J.; FREYVERT, Y.; VAFIADIS, A.; SANTIAGO, Y.; MILLER, J. C.; REBAR, E.; COLLINGWOOD, T. N.; SNOWDEN, A.; GREGORY, P. D. *BAK* and *BAX* deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 2, p. 330–340, 1 fev. 2010.
- CUSHMAN, M.; O'MEARA, E. S.; FOLSOM, A. R.; HECKBERT, S. R. Coagulation factors IX through XIII and the risk of future venous thrombosis: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. **Blood**, v. 114, n. 14, p. 2878–2883, 1 out. 2009.
- DARBY, S. C.; EWART, D. W.; GIANGRANDE, P. L. F.; DOLIN, P. J.; SPOONER, R. J. D.; RIZZA, C. R. Mortality before and after HIV infection in the complete UK population of haemophiliacs. **Nature**, v. 377, n. 6544, p. 79–82, 7 set. 1995.
- DARBY, S. C.; KAN, S. W.; SPOONER, R. J.; GIANGRANDE, P. L. F.; HILL, F. G. H.; HAY, C. R. M.; LEE, C. A.; LUDLAM, C. A.; WILLIAMS, M. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 815–825, 19 abr. 2007.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363–70, 29 out. 1991.
- DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. **Science (New York, N.Y.)**, v. 145, n. 3638, p. 1310–2, 18 set. 1964.
- DE SOUSA BOMFIM, A.; CRISTINA CORRÊA DE FREITAS, M.; PICANÇO-CASTRO, V.; DE ABREU SOARES NETO, M.; SWIECH, K.; TADEU COVAS, D.; MARIA DE SOUSA RUSSO, E. Human cell lines: A promising alternative for recombinant FIX production. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 149–156, maio 2016.

DELOUGHERY, T. G. **Hemostasis and Thrombosis**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

DONELLO, J. E.; LOEB, J. E.; HOPE, T. J. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. **Journal of virology**, v. 72, n. 6, p. 5085–92, jun. 1998.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**. John Wiley & Sons, Canadá, 1998.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, S. H. Spectrophotometric studies. II - Preparation from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulphyhemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 112, p. 51-65, 1935.

DUMONT, J. A.; LIU, T.; LOW, S. C.; ZHANG, X.; KAMPHAUS, G.; SAKORAFAS, P.; FRALEY, C.; DRAGER, D.; REIDY, T.; MCCUE, J.; FRANCK, H. W. G.; MERRICKS, E. P.; NICHOLS, T. C.; BITONTI, A. J.; PIERCE, G. F.; JIANG, H. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3024–3030, 29 mar. 2012.

DUNN, A. L. Malignancy in patients with haemophilia: a review of the literature. **Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 16, n. 3, p. 427–36, maio 2010.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. *Coot*: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 12, p. 2126–2132, 1 dez. 2004.

ENJOLRAS, N.; DARGAUD, Y.; PÉROT, E.; GUILLAUME, F.; BECCHI, M.; NÉGRIER, C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. v. 130, p. 266–273, 2012.

FAIRMAN, M. P.; STILLMAN, B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. **The EMBO journal**, v. 7, n. 4, p. 1211–8, abr. 1988.

FINN, J. D.; NICHOLS, T. C.; SVORONOS, N.; MERRICKS, E. P.; BELLENGER, D. A.; ZHOU, S.; SIMIONI, P.; HIGH, K. A.; ARRUDA, V. R. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4521–4523, 29 nov. 2012.

FRANCHINI, M.; FRATTINI, F.; CRESTANI, S.; SISSA, C.; BONFANTI, C. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. **Biologics : targets & therapy**, v. 7, p. 33–8, jan. 2013.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 553–562, out. 2011.

FRANCISCHETTI, I. M. B. Does activation of the blood coagulation cascade have a role in malaria pathogenesis? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 258–263, jun. 2008.

FRIBOURG, C.; MEIJER, A. B.; MERTENS, K. The interface between the EGF2 domain and the protease domain in blood coagulation factor IX contributes to factor VIII binding and factor X activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 35, p. 10777–10785, 2006.

GATER, A.; THOMSON, T. A.; STRANDBERG-LARSEN, M. Haemophilia B: Impact on patients and economic burden of disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 106, n. 3, p. 398–404, 2011.

GEORGE, L. A.; SULLIVAN, S. K.; GIERMASZ, A.; RASKO, J. E. J.; SAMELSON-JONES, B. J.; DUCORE, J.; CUKER, A.; SULLIVAN, L. M.; MAJUMDAR, S.; TEITEL, J.; MCGUINN, C. E.; RAGNI, M. V.; LUK, A. Y.; HUI, D.; WRIGHT, J. F.; CHEN, Y.; LIU, Y.; WACHTEL, K.; WINTERS, A.; TIEFENBACHER, S.; ARRUDA, V. R.; VAN DER LOO, J. C. M.; ZELENIAIA, O.; TAKEFMAN, D.; CARR, M. E.; COUTO, L. B.; ANGUELA, X. M.; HIGH, K. A. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 23, p. 2215–2227, 7 dez. 2017.

GOUW, S. C.; VAN DER BOM, J. G.; MARIJKE VAN DEN BERG, H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4648–4654, 1 jun. 2007.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59–72, 1 jul. 1977.

GRAV, L. M.; LEE, J. S.; GERLING, S.; KALLEHAUGE, T. B.; HANSEN, A. H.; KOL, S.; LEE, G. M.; PEDERSEN, L. E.; KILDEGAARD, H. F. One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 9, p. 1446–1456, set. 2015.

HAMAGUCHI, N.; BAJAJ, S. P.; SMITH, K. J.; STAFFORD, D. W. The role of amino-terminal residues of the heavy chain of factor IXa in the binding of its cofactor, factor VIIIa. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1837–42, 1994.

HANDFORD, P. A.; BARON, M.; MAYHEW, M.; WILLIS, A.; BEESLEY, T.; BROWNLEE, G. G.; CAMPBELL, I. D. The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. **The EMBO journal**, v. 9, n. 2, p. 475–80, fev. 1990.

HARTMANN, J.; CROTEAU, S. E. 2017 Clinical trials update: Innovations in hemophilia therapy. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1252–1260, 2016.

HARTMANN, R.; DOCKAL, M.; KAMMLANDER, W.; PANHOLZER, E.; NICOLAES, G. a; FIEDLER, C.; ROSING, J.; SCHEIFLINGER, F. Factor IX mutants with enhanced catalytic activity. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 7, n. 10, p. 1656–62, out. 2009.

HENNECKE, M.; KWISSA, M.; METZGER, K.; OUMARD, A.; KRÖGER, A.; SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J.; HAUSER, H. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 16, p. 3327–34, 15 ago. 2001.

HONG, S.; HWANG, D.-Y.; YOON, S.; ISACSON, O.; RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G.; KIM, K.-S. Functional Analysis of Various Promoters in Lentiviral Vectors at Different Stages of In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 9, p. 1630–1639, set. 2007.

HORAVA, S. D.; PEPPAS, N. A. Recent advances in hemophilia B therapy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 3, p. 359–371, 2017.

JAYANDHARAN, G. R.; SRIVASTAVA, A. Hemophilia: Disease, Diagnosis and Treatment. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. 1, n. S1, p. 1–12, 2012.

KAO, C.-Y.; LIN, C.-N.; YU, I.-S.; TAO, M.-H.; WU, H.-L.; SHI, G.-Y.; YANG, Y.-L.; KAO, J.-T.; LIN, S.-W. FIX-Triple, a gain-of-function factor IX variant, improves haemostasis in mouse models without increased risk of thrombosis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 104, n. 2, p. 355–65, ago. 2010.

KAO, C.-Y.; YANG, S.-J.; TAO, M.-H.; JENG, Y.-M.; YU, I.-S.; LIN, S.-W. Incorporation of the factor IX Padua mutation into FIX-Triple improves clotting activity in vitro and in vivo. **Thrombosis and haemostasis**, v. 110, n. 2, p. 244–56, ago. 2013.

KATZ, J. Prevalence of factor IX inhibitors among patients with haemophilia B: results of a large-scale North American survey. **Haemophilia**, v. 2, n. 1, p. 28–31, 1 jan. 1996.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; FURIE, B. C.; FURIE, B.; SHOEMAKER, C. B. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 21, p. 9622–9628, jul. 1986.

KESSLER, C. M.; MARIANI, G. Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J.; MARDER, V. J.; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N., editors. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p. 887–904, 2006.

KITCHEN, S.; GRAY, E.; MERTENS, K. Monitoring of modified factor VIII and IX products. **Haemophilia**, v. 20, n. S4, p. 36–42, 2014.

KOLKMAN, J. A.; MERTENS, K. Insertion loop 256-268 in coagulation factor IX restricts enzymatic activity in the absence but not in the presence of factor VIII. **Biochemistry**, v. 39, n. 25, p. 7398–7405, 2000.

KOLKMAN, J. a; LENTING, P. J.; MERTENS, K. Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. **The Biochemical journal**, v. 339 (Pt 2, p. 217–221, 1999.

KUMAR, S. R. Industrial production of clotting factors: Challenges of expression, and choice of host cells. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 7, p. 995–1004, jul. 2015.

KURACHI, K.; DAVIE, E. W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 21, p. 6461–4, nov. 1982.

LAFFAN, M. New products for the treatment of haemophilia. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 1, p. 23–31, 2016.

LAMBERT, T.; RECHT, M.; VALENTINO, L. A.; POWELL, J. S.; UDATA, C.; SULLIVAN, S. T.; ROTH, D. A. Reformulated BeneFix : efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B. **Haemophilia**, v. 13, n. 3, p. 233–243, maio 2007.

LEE, C. A.; BERNTORP, E. E.; HOOTS, W. K. **Textbook of Hemophilia**. [s.l.] Wiley, 2011.

LIM, S. F.; CHUAN, K. H.; LIU, S.; LOH, S. O. H.; CHUNG, B. Y. F.; ONG, C. C.; SONG, Z. RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-batch cultures of CHO cells. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 6, p. 509–522, nov. 2006.

LIN, C. N.; KAO, C. Y.; MIAO, C. H.; HAMAGUCHI, N.; WU, H. L.; SHI, G. Y.; LIU, Y. L.; HIGH, K. a; LIN, S. W. Generation of a novel factor IX with augmented clotting activities in vitro and in vivo. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 8, n. 8, p. 1773–83, ago. 2010.

LOLLAR, P. Characterization of factor VIII B-cell inhibitory epitopes. **Thrombosis and haemostasis**, v. 82, n. 2, p. 505–8, ago. 1999.

LUDLAM, C. A.; TURNER, M. L. Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt Jakob disease by blood products. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 1, p. 13–24, jan. 2006.

MA, A. Molecular Basis of Disorders of Hemostasis and Thrombosis. In: [s.l.] Springer, Boston, MA, 2010. p. 511–528.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism and its Function as a Biochemical Amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498–499, 2 maio 1964.

MAKINO, Y.; OMICHI, K.; KURAYA, N.; OGAWA, H.; NISHIMURA, H.; IWANAGA, S.; HASE, S. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. **Journal of biochemistry**, v. 128, n. 2, p. 175–80, ago. 2000.

MANCO-JOHNSON, M. J.; ABSHIRE, T. C.; SHAPIRO, A. D.; RISKE, B.; HACKER, M. R.; KILCOYNE, R.; INGRAM, J. D.; MANCO-JOHNSON, M. L.; FUNK, S.; JACOBSON, L.; VALENTINO, L. A.; HOOTS, W. K.; BUCHANAN, G. R.; DIMICHELE, D.; RECHT, M.; BROWN, D.; LEISSINGER, C.; BLEAK, S.; COHEN, A.; MATHEW, P.; MATSUNAGA, A.; MEDEIROS, D.; NUGENT, D.; THOMAS, G. A.; THOMPSON, A. A.; MCREDMOND, K.; SOUCIE, J. M.; AUSTIN, H.; EVATT, B. L. Prophylaxis versus Episodic Treatment to Prevent Joint Disease in Boys with Severe Hemophilia. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 6, p. 535–544, 9 ago. 2007.

MANNO, C. S.; CHEW, A. J.; HUTCHISON, S.; LARSON, P. J.; HERZOG, R. W.; ARRUDA, V. R.; TAI, S. J.; RAGNI, M. V.; THOMPSON, A.; OZELO, M.; COUTO, L. B.; LEONARD, D. G. B.; JOHNSON, F. A.; MCCLELLAND, A.; SCALLAN, C.; SKARSGARD, E.; FLAKE, A. W.; KAY, M. A.; HIGH, K. A.; GLADER, B. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 2963–2972, 15 abr. 2003.

MANNO, C. S.; PIERCE, G. F.; ARRUDA, V. R.; GLADER, B.; RAGNI, M.; RASKO, J. J. E.; OZELO, M. C.; HOOTS, K.; BLATT, P.; KONKLE, B.; DAKE, M.; KAYE, R.; RAZAVI, M.; ZAJKO, A.; ZEHNDER, J.; RUSTAGI, P.; NAKAI, H.; CHEW, A.; LEONARD, D.; WRIGHT, J. F.; LESSARD, R. R.; SOMMER, J. M.; TIGGES, M.; SABATINO, D.; LUK, A.; JIANG, H.; MINGOZZI, F.; COUTO, L.; ERTL, H. C.; HIGH, K. A.; KAY, M. A.; KAY, M. A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p. 342–347, 12 mar. 2006.

MASTROMARINO, P.; CONTI, C.; GOLDONI, P.; HAUTTECOEUR, B.; ORSI, N. Characterization of Membrane Components of the Erythrocyte Involved in Vesicular Stomatitis Virus Attachment and Fusion at Acidic pH. **Journal of General Virology**, v. 68, n. 9, p. 2359–2369, 1 set. 1987.

MATHUR, A.; BAJAJ, S. P. Protease and EGF1 domains of factor IXa play distinct roles in binding to factor VIIIa. Importance of helix 330 (helix 162 in chymotrypsin) of protease domain of factor IXa in its interaction with factor VIIIa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 26, p. 18477–18486, 1999.

MCMICHAEL, M. New models of hemostasis. **Topics in companion animal medicine**, v. 27, n. 2, p. 40–5, maio 2012.

MESSIER, T. L.; PITTMAN, D. D.; LONG, G. L.; KAUFMAN, R. J.; CHURCH, W. R. Cloning and expression in COS-1 cells of a full-length cDNA encoding human coagulation factor X. **Gene**, v. 9, n.2, p. 291-294, março 1991.

METZNER, H. J.; WEIMER, T.; KRONTHALER, U.; LANG, W.; SCHULTE, S. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 4, p. 634–644, 2009.

MIYOSHI, H.; BLÖMER, U.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8150–7, out. 1998.

MUKHERJEE, S.; SAHA, a; BISWAS, P.; MANDAL, C.; RAY, K. Structural analysis of factor IX protein variants to predict functional aberration causing haemophilia B. **Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 14, n. 5, p. 1076–81, set. 2008.

NERICH, V.; TISSOT, E.; FARADJI, A.; DEMESMAY, K.; BERTRAND, M. A.; LORENZINI, J.-L.; BRIQUEL, M.-E.; POUZOL, P.; WORONOFF-LEMSI, M.-C. Cost-of-illness study of severe haemophilia A and B in five French haemophilia treatment centres. **Pharmacy World & Science**, v. 30, n. 3, p. 287–292, 18 jun. 2008.

OLDENBURG, J.; ALBERT, T. Novel products for haemostasis - current status. **Haemophilia**, v. 20, n. S4, p. 23–28, 2014.

ORLOVA, N. a; KOVNIR, S. V; VOROBIEV, I. I.; GABIBOV, a G. Coagulation Factor IX for Hemophilia B Therapy. **Acta naturae**, v. 4, n. 2, p. 62–73, abr. 2012.

OSTERGAARD, H.; BJELKE, J. R.; HANSEN, L.; PETERSEN, L. C.; PEDERSEN, A. A.; ELM, T.; MOLLER, F.; HERMIT, M. B.; HOLM, P. K.; KROGH, T. N.; PETERSEN, J. M.; EZBAN, M.; SORENSEN, B. B.; ANDERSEN, M. D.; AGERSO, H.; AHMADIAN, H.; BALLING, K. W.; CHRISTIANSEN, M. L. S.; KNOBE, K.; NICHOLS, T. C.; BJORN, S. E.; TRANHOLM, M. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2333–2341, 25 ago. 2011.

PADLER-KARAVANI, V.; VARKI, A. Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk. **Xenotransplantation**, v. 18, n. 1, p. 1–5, jan. 2011.

PEROT, E.; ENJOLRAS, N.; LE QUELLEC, S.; INDALECIO, A.; GIRARD, J.; NEGRIER, C.; DARGAUD, Y. Expression and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced in vitro and in vivo clotting activity. **Thrombosis Research**, v. 135, n. 5, p. 1017–1024, 2015.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PEYVANDI, F.; GARAGIOLA, I.; SEREGNI, S. Future of coagulation factor replacement therapy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. SUPPL.1, p. 84–98, 2013.

PIPE, S. W. The promise and challenges of bioengineered recombinant clotting factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1692–1701, 2005.

PIPE, S. W. Hemophilia: new protein therapeutics. **Hematology / American Society of Hematology**, p. 203–9, 2010.

POON, M.-C.; LILICRAP, D.; HENSMAN, C.; CARD, R.; SCULLY, M.-F. Recombinant factor IX recovery and inhibitor safety: a Canadian post-licensure surveillance study. **Thrombosis and haemostasis**, v. 87, n. 3, p. 431–5, mar. 2002.

POPA, I.; HARRIS, M. E.; DONELLO, J. E.; HOPE, T. J. CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 2057–67, abr. 2002.

QUADE-LYSSY, P.; MILANOV, P.; SCHÜTTRUMPF, J. Engineered Factor VII, Factor IX, and Factor X Variants for Hemophilia Gene Therapy. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. s1, p. 1–7, 2014.

RISHAVY, M. A.; BERKNER, K. L. Vitamin K Oxygenation, Glutamate Carboxylation, and Processivity: Defining the Three Critical Facets of Catalysis by the Vitamin K-Dependent Carboxylase. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 2, p. 135–148, 2012.

ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 715–725, 17 set. 2007.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 5 dez. 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 1989.

SAUNDERS, R. E.; PERKINS, S. J. CoagMDB: a database analysis of missense mutations within four conserved domains in five vitamin K-dependent coagulation serine proteases using a text-mining tool. **Human Mutation**, v. 29, n. 3, p. 333–344, mar. 2008.

SCHMIDT, A. E.; BAJAJ, S. P. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 13, n. 1, p. 39–45, jan. 2003.

SCHNEIDER, B.; FRYER, J. F.; OLDENBURG, J.; BRACKMANN, H.-H.; BAYLIS, S. A.; EIS-HÜBINGER, A. M. Frequency of contamination of coagulation factor concentrates with novel human parvovirus PARV4. **Haemophilia**, v. 14, n. 5, p. 978–986, set. 2008.

SHIKAMOTO, Y.; MORITA, T.; FUJIMOTO, Z.; MIZUNO, H. Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24090–4, 27 jun. 2003.

SICHLER, K.; KOPETZKI, E.; HUBER, R.; BODE, W.; HOPFNER, K. P.; BRANDSTETTER, H. Physiological fIXa activation involves a cooperative conformational rearrangement of the 99-loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 4121–4126, 2003.

SIMIONI, P.; TORMENE, D.; TOGNIN, G.; GAVASSO, S.; BULATO, C.; IACOBELLI, N. P.; FINN, J. D.; SPIEZIA, L.; RADU, C.; ARRUDA, V. R. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 17, p. 1671–5, 22 out. 2009.

SOMMER, S. S.; BOWIE, E. J.; KETTERLING, R. P.; BOTTEMA, C. D. Missense mutations and the magnitude of functional deficit: the example of factor IX. **Human genetics**, v. 89, n. 3, p. 295–7, maio 1992.

SPATZ, A.; BORG, C.; FEUNTEUN, J. X-Chromosome Genetics and Human Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 617–629, ago. 2004.

SRIVASTAVA, A.; BREWER, A. K.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E. P.; KEY, N. S.; KITCHEN, S.; LLINAS, A.; LUDLAM, C. A.; MAHLANGU, J. N.; MULDER, K.; POON, M. C.; STREET, A.; TREATMENT GUIDELINES WORKING GROUP ON BEHALF OF THE WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. Guidelines for the management of hemophilia. **Haemophilia**, v. 19, n. 1, p. e1–e47, jan. 2013.

SZLACHCIC, A.; ZAKRZEWSKA, M.; OTLEWSKI, J. Longer action means better drug: Tuning up protein therapeutics. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 4, p. 436–441, jul. 2011.
TIGGES, M.; FUSSENEGGER, M. Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 3, p. 264–272, maio 2006.

TRONO, D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. **Gene Therapy**, v. 7, n. 1, p. 20–23, 17 jan. 2000.

UNGCHUSAK, K.; AUEWARAKUL, P.; DOWELL, S. F.; KITPHATI, R.; AUWANIT, W.; PUTHAVATHANA, P.; UIPRASERTKUL, M.; BOONNAK, K.; PITTAYAWONGANON, C.; COX, N. J.; ZAKI, S. R.; THAWATSUPHA, P.; CHITTAGANPITCH, M.; KHONTONG, R.; SIMMERMAN, J. M.; CHUNSUTTHIWAT, S. Probable Person-to-Person Transmission of Avian Influenza A (H5N1). **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 333–340, 27 jan. 2005.

VAN HYLCKAMA VLIEG, A.; VAN DER LINDEN, I. K.; BERTINA, R. M.; ROSENDAAL, F. R. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3678–82, 15 jun. 2000.

VENKATESWARLU, D. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: A computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, n. 3, p. 408–414, 2014.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W. M.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 327–58, jan. 2013.

VYSOTCHIN, A.; MEDVED, L. V; INGHAM, K. C. Domain structure and domain-domain interactions in human coagulation factor IX. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8436–46, 25 abr. 1993.

WELLS, E.; ROBINSON, A. S. Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 1, 2017.

WELTERMANN, A.; EICHINGER, S.; BIALONCZYK, C.; MINAR, E.; HIRSCHL, M.; QUEHENBERGER, P.; SCHÖNAUER, V.; KYRLE, P. A. The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 1, n. 1, p. 28–32, jan. 2003.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. **Report on the Annual Global Survey 2016**. Disponível em: <<https://www.wfh.org/en/annual-report>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

WIGHT, J.; PAISLEY, S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. **Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 9, n. 4, p. 418–435, jul. 2003.

WU, Y.-M.; KAO, C.-Y.; HUANG, Y.-J.; YU, I.-S.; LEE, H.-S.; LAI, H.-S.; LEE, P.-H.; LIN, C.-N.; LIN, S.-W. Genetic Modification of Donor Hepatocytes Improves Therapeutic Efficacy for Hemophilia B in Mice. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 9, p. 1169–1180, 30 set. 2010.

YOSHITAKE, S.; SCHACH, B. G.; FOSTER, D. C.; DAVIE, E. W.; KURACHI, K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3736–50, 2 jul. 1985.

ZÖGG, T.; BRANDSTETTER, H. Activation mechanisms of coagulation factor IX. **Biological chemistry**, v. 390, n. 5–6, p. 391–400, 2009.

ZUFFEREY, R.; DONELLO, J. E.; TRONO, D.; HOPE, T. J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2886–92, abr. 1999.