UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estratégias para a produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em uma linhagem humana em condições de cultivo livres de soro e em suspensão

Angelo Luis Caron

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estratégias para a produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em
uma linhagem humana em condições de cultivo livres de soro e em
suspensão**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Angelo Luis Caron

Orientadora: Prof. Dra. Kamilla Swiech
Antonietto

Ribeirão Preto
2016

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

Caron, Angelo Luis

Estratégias para a produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em uma linhagem humana em condições de cultivo livres de soro e em suspensão. Ribeirão Preto, 2016.

94 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Kamilla Swiech Antonietto

1. Linhagens celulares humanas. 2. Meios livres de soro. 3. Cultivo em suspensão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angelo Luis Caron

Estratégias para a produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em uma linhagem humana em condições de cultivo livres de soro e em suspensão

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Kamilla Swiech

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À Professora Doutora Kamilla Swiech Antonietto pela ótima orientação, por estar sempre disponível e preocupada com o andamento do projeto e ter sempre me ajudado em tudo o que precisei.

Aos meus pais, Romildo e Evete, pelo apoio incondicional e por ficarem felizes e orgulhosos com tudo o que faço.

Ao meu irmão, Leozinho, por compartilhar comigo todo o seu crescimento e amadurecimento. Por me permitir acompanhar todo o seu esforço e superação para se tornar o menino lindo que você é e compartilhar suas paixões comigo.

A minha ruiva linda Ana Cristina, por andar sempre ao meu lado de mãos dadas não importando onde estivermos. Por dividir seus sonhos e planos comigo e me deixar ficar com você para sempre, meia.

À Claudia, José Mario e Ana Bea, por terem me acolhido tão maravilhosamente bem em sua família.

Aos amigos Amanda, Rafa, Robson, Aline, Luiza pelas tardes de exercício e alimentação balanceada. Marcela, por me transportar por aí discutindo estritamente ciência e Julinha pelas conversas formais diárias.

Aos amigos do laboratório de Cultura celular por toda a convivência e amizade. Um agradecimento especial ao Mario por toda a ajuda em diversos experimentos e também pela amizade.

Aos amigos remanescentes do laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto por terem me ajudado sempre que possível, principalmente a Daianne por todas as vezes que me levou de carona nos ensaios de PCR.

A todos os meus amigos da quadragésima quinta por estarem sempre presentes mesmo depois de tanto tempo de formados.

À mina República Xxt e nossos agregados por nunca estarem tão longe que não dê para estarmos sempre reunidos como sempre fazíamos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e todos os seus docentes e funcionários por todo o auxílio, principalmente aos funcionários da secretaria da pós-graduação por sempre me ajudarem no que precisei.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pela oportunidade e aos laboratórios que o compõem por toda a ajuda.

A todos mais que não foram citados pelo tempo que não me permiti.

Muito Obrigado!

Epígrafe

“The very cave you are afraid to enter
turns out to be the source of
what you are looking for. ”
Joseph Campbell

RESUMO

CARON, A. L. **Estratégias para a produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em uma linhagem humana em condições de cultivo livres de soro e em suspensão.** 2016. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A hemofilia A é uma doença ligada ao cromossomo X causada pela deficiência do fator VIII da coagulação sanguínea (FVIII). O tratamento disponível consiste na terapia de reposição da proteína do fator VIII derivada do plasma (FVIII_{dp}) ou recombinante (FVIII_r). Atualmente, dos 7 produtos recombinantes disponíveis no mercado, 6 são produzidos em linhagens celulares de roedores. A expressão dessa proteína em sistemas celulares não-humanos pode gerar uma molécula com perfil de modificações diferente do endógeno, podendo levar a reações imunogênicas e geração de inibidores anti-FVIII_r. Em função disso, novas estratégias de produção têm sido avaliadas, como a utilização de células hospedeiras mais eficientes no que diz respeito ao potencial de expressão da proteína de interesse. Dentre as linhagens de interesse, a linhagem hepática SK-HEP-1 tem se destacado por apresentar altos níveis de expressão do FVIII_r e potencial para o cultivo em suspensão em meios livres de soro fetal bovino (SFB). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de FVIII_r na linhagem celular humana SK-Hep-1 comparando duas estratégias para o estabelecimento de processos de produção em condições livres de soro e em suspensão: Estratégia 1 - adaptação para tais condições da linhagem já modificada geneticamente e Estratégia 2 - modificação gênica para a expressão da proteína já em células previamente adaptadas às tais condições. Para a estratégia 1, foram geradas duas linhagens recombinantes produtoras de FVIII_r, SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1 aderentes e em cultivos suplementados com SFB. Na caracterização da cinética e produção do FVIII_r as linhagens apresentaram taxas específicas máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de 0,064 e 0,0031h⁻¹ produzindo 1,0 e 0,78UI/mL de FVIII_r, respectivamente. Diversos protocolos de adaptação foram empregados, entretanto, não foi possível obter sucesso na adaptação das linhagens recombinantes para condições livres de soro e em suspensão. Para a estratégia 2, as células SK-HEP-1 selvagens adaptadas ao meio de cultura livre de SFB SFMII apresentaram um valor de $\mu_{\max}$ de 0,0186h⁻¹ e $X_{\max}$ de 1,9x10⁶cels/mL. Para as etapas de modificação gênica da linhagem selvagem foram utilizados os mesmos vetores lentivirais empregados para a geração das células recombinantes aderentes, pLVmpsvFVIII Δ B-Neo e pLVCMVFVIII Δ B-GFP. Para o primeiro, não foi possível gerar uma linhagem produtora do FVIII_r. Para o segundo, foi possível obter duas linhagens produtoras do FVIII_r com 0.14 e 0.12IU/mL de atividade pelo ensaio cromogênico. O presente trabalho mostrou que a linhagem humana Sk-Hep-1 é apropriada para a produção de altos níveis de FVIII_r. No entanto, maiores esforços devem ser voltados ao desenvolvimento de meios de cultura livres de soro específicos para a linhagem para possibilitar a produção eficiente do FVIII_r em suspensão em meios livre de soro.

Palavras-chave: Hemofilia A, linhagem celular humana, meio de cultura livre de soro fetal bovino, fator VIII recombinante, adaptação, SK-Hep-1, cultura em suspensão.

ABSTRACT

CARON, A. L. Strategies for the production of recombinant factor VIII (FVIIIr) in a human cell line cultured under serum-free suspension conditions. 2016. 94f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Hemophilia A is a genetic X-linked disorder caused by the coagulation factor VIII (FVIII) deficiency. The current treatment is the replacement therapy with plasma derived FVIII (pdFVIII) or recombinant FVIII (rFVIII) products. Nowadays, of the seven products available in the market, six are produced in rodent expression systems, which can result in a rFVIII molecule with different post-translational modifications and may lead to immune responses to non-human epitopes. Therefore, new production strategies have been evaluated, as the use of more efficient hosts in terms of protein expression potential. Among potential cell lines, the hepatic SK-HEP-1 cell line features high levels of rFVIII production and potential for serum-free suspension culture. In face of the exposed above, the goal of this study was to evaluate rFVIII production in the SK-HEP-1 human cell line comparing two strategies for the establishment of production process in a suspension serum-free condition: strategy 1 - adaptation to these conditions of a genetic modified cell line; strategy 2 - genetic modification of an already adapted cell line to rFVIII protein expression. For strategy 1, two adherent rFVIII producer cell lines were established in serum containing medium, SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1. Characterization of cell growth and rFVIII production showed a maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) of 0.064 and 0.00311h⁻¹ with rFVIII production of 1.0 and 0.78UI/mL, respectively. Different adaptation protocols were used; however, it was not possible to adapt the recombinant cell lines to growth in suspension serum-free conditions. For strategy 2, the wildtype SK-HEP-1 cell line adapted growth in SFMII BSF medium, showed a $\mu_{\max}$ of 0.0186h⁻¹ and a maximum cell concentration ($X_{\max}$) of 1.9x10⁶cells/mL. For the genetic modification, it were employed the same lentiviral vectors used for the recombinant adherent cells generation, pLVmpsvFVIII Δ B-Neo and pLVCMVFVIII Δ B-GFP. For the first, no attempts were successful. For the second, it was possible to generate two rFVIII producer populations with 0.14 and 0.12IU/mL activity, measured by chromogenic assay. These results demonstrate that the SK-HEP-1 cell line is appropriate for the production of high levels of rFVIII. Nevertheless, efforts should be made in developing specific medium to support efficient rFVIII production in suspension and suspension serum-free conditions.

Keywords: Hemophilia A, human cell line, bovine serum free culture medium, recombinant factor VIII, adaptation, SK-HEP-1, suspension culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e sítios de interação da proteína do FVIII. Estão representados os nove domínios da proteína de FVIII com os respectivos sítios de interação com FIX ativado (F9a), FX (F10), FX ativado (F10a), fator de von Willebrand (FvW) e fosfolipídios das plaquetas (PL). Retirado de Graw, Brackmann et al. 2005.....	2
Figura 2: A proteína ativada do FVIII com as cadeias leve e pesada associadas a um íon metálico (Cu^{2+}). Retirado de Graw, Brackmann et al. 2005.....	2
Figura 3: Protocolos de adaptação para meios livres de SFB utilizados neste trabalho para as células SK-HEP-FVIII/Neo E SK-HEP-FVIII/GFP.....	13
Figura 4: Análise da cinética de crescimento celular e produção do FVIIIr das linhagens SK-HEP-F8/Neo-E1 (A) e SK-HEP-F8/GFP-E1 (B) em condições aderentes e em meio SFB (n=3).....	21
Figura 5 Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB (n=1).....	23
Figura 6: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante adaptação gradual ao meio SFMII em garrafas estáticas (n=1).....	24
Figura 7: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle em garrafas estáticas (n=1).....	24
Figura 8: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 em garrafas estáticas (n=1).....	25
Figura 9: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CD293 em garrafas estáticas (n=1).....	26
Figura 10: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).....	27
Figura 11: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).....	27

Figura 12: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).....	28
Figura 13: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic f68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	29
Figura 14: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic f68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	30
Figura 15: Análise do crescimento e viabilidade das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	31
Figura 16: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax e Cellboost 5 em cultura estática (n=2).....	31
Figura 17: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax e Cellboost 5 em cultura estática (n=2).....	32
Figura 18: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (b) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax e Cellboost 5 em cultura estática (n=2).....	32
Figura 19: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=2).....	33
Figura 20 Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=2).....	33
Figura 21: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=2).....	34
Figura 22: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB (n=1).....	35

Figura 23: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS e Glutamax e Cellboost 5 em garrafas estáticas (n=1).....	36
Figura 24: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS e Glutamax e Cellboost 5 em garrafas estáticas (n=1).....	36
Figura 25: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 suplementado com ITS e Glutamax e Cellboost 5 em garrafas estáticas (n=1).....	37
Figura 26: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	38
Figura 27: Análise do crescimento e viabilidade das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	38
Figura 28: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=1).....	39
Figura 29: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens para retirada gradual do SFB nos meios SFMII (A e B), Freestyle (C e D) e CDM4 (E e F) suplementados com 10% de SFB em garrafas estáticas (n=1).....	40
Figura 30: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax e Cellboost 5 em cultura estática (n=2).....	41
Figura 31: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax e Cellboost 5 em cultura estática (n=2).....	42
Figura 32: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=2).....	42
Figura 33: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio	

CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e Cellboost 5 em frascos erlenmeyer (n=2).....43

Figura 34: Análise da cinética de crescimento e viabilidade da linhagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o cultivo em meio SFMII livre de SFB em frascos erlenmeyer (n=3).....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos recombinantes disponíveis no mercado. Modificado de Calvez et al. 2014.....	4
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

alfa -Gal	Epítopo Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
CD293	CD 293-AGT
CDM4	CDM4CHO
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
COS	Células de rim de macaco transformada com o gene do SV40
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
egr1	<i>Early Growth Response 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Eritropoietina
F68	Pluronic F68
Fapesp	Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIX	Fator IX da coagulação sanguínea
Freestyle	<i>FreeStyle 293 Expression Medium</i>
FVIII	Fator VIII da coagulação sanguínea
FVIII _{dp}	Fator VIII derivado do plasma
FVIII _r	Fator VIII recombinante
FvW	Fator de von Willebrand
FX	Fator X da coagulação sanguínea
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gln	Glutamina

HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
Hepa 1.6	Linhagem celular de hepatoma murino
HepG2	<i>Human Hepatocellular carcinoma</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
MLS	Meio livre de soro fetal bovino
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mpsv	<i>Myeloproliferative sarcoma vírus</i>
Neo	Neomicina
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pCMV8.91	Plasmídeo que codifica as proteínas do capsídeo viral
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pVSV-G	Plasmídeo que codifica as proteínas do envelope viral
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SFMII	293 SFMII
SK-Hep-1	Célula humana derivada de adenocarcinoma de fígado
Td	Tempo de duplicação
UI	Unidades internacionais
X	Concentração celular
β ACTN	Beta-actina
μ	taxa específica de crescimento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Hemofilia A e o fator VIII da coagulação.....	1
1.2 A terapia de reposição e a produção do FVIIIr.....	3
1.3 Cultivos em suspensão e meios livres de soro fetal bovino.....	7
1.4 Considerações finais.....	8
 2. OBJETIVOS.....	 10
2.1 Objetivos específicos.....	10
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 11
3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	11
3.2 Adaptação da linhagem recombinante para as condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB – Estratégia 1.....	12
3.3 Modificação gênica da linhagem SK-HEP-1 adaptada para o cultivo em suspensão – Estratégia 2.....	13
3.3.1 Transfecção da célula 293FT para a produção do vetor lentiviral.....	13
3.3.2 Transdução da linhagem SK-HEP-1 adaptada para o cultivo em suspensão.....	15
3.4 Métodos analíticos.....	15
3.4.1 Análise da concentração e viabilidade celular.....	15
3.4.2 Determinação do título lentiviral.. ..	15
3.4.3 Análise da expressão do FVIIIr.. ..	16
3.4.4 Análise da atividade biológica do FVIIIr.. ..	17
3.4.5 Quantificação do FVIIIr produzido por ELISA.....	18
3.5 Análise dos resultados.....	18
 4. RESULTADOS.....	 20
4.1 Estratégia 1 – Adaptação para o cultivo em suspensão e em meios de cultura livres de SFB das linhagens recombinantes.....	20
4.1.1 Geração e caracterização das linhagens recombinantes produtoras de FVIIIr - SK-HEP-F8/NEO-E1 E SK-HEP-F8/GFP-E1.....	20
4.1.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/NEO-E1 produtora de FVIII recombinante.....	22

4.1.2.1 Adaptação gradual da linhagem SK-HEPF8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em cultura estática...	23
4.1.2.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em suspensão...	28
4.1.3 Adaptação direta da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB.....	31
4.1.4 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 produtora de FVIII recombinante.....	34
4.1.4.1 Adaptação gradual da linhagem SK-HRP-F8/GFP-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em cultura estática.....	35
4.1.4.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/GFPP-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em suspensão.....	37
4.1.5 Adaptação da linhagem recombinante SK-HEP-F8/GFP-E1 para meios de adaptação suplementados com 10% de SFB.....	39
4.1.6 Adaptação direta da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 para o crescimento em meios livres de soro...	41
4.2 Estratégia 2 – Modificação gênica para a expressão do FVIII recombinante em células previamente adaptadas às condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB.....	43
4.2.1 Caracterização da linhagem selvagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o crescimento em suspensão em meio livre de SFB.....	43
4.2.2 Modificação gênica da linhagem SK-HEP-sus-E2 por meio de transdução com vetores lentivirais para a produção do FVIII recombinante.....	44
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1 Estratégia 1 – Adaptação para o cultivo em suspensão e em meios de cultura livres de SFB das linhagens recombinantes.....	46
5.2 Estratégia 2 – Modificação gênica para a expressão do FVIIIr em células previamente adaptadas às condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB.....	53
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICE.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hemofilia A e o fator VIII da coagulação

As hemofilias são distúrbios da coagulação sanguínea caracterizadas pela deficiência das proteínas plasmáticas necessárias para o processo normal de coagulação (CANCIO et al., 2013; SCHAUB, 2011). A hemofilia A, causada pela ausência ou anormalidade do fator VIII da coagulação sanguínea (FVIII), é o distúrbio hereditário da coagulação mais comum e estima-se que mais de 400.000 pessoas no mundo convivam com essa coagulopatia, representando 80% dos casos (Gater, Thomson, e Strandberg-Larsen 2011). Por ser uma doença relacionada ao cromossomo X, a maioria de pessoas acometidas são homens com incidência de 1 em cada 5000 nascimentos masculinos (CANCIO et al., 2013; GRAW et al., 2005). Os quadros clínicos da doença são caracterizados por hemorragias espontâneas ou causadas por traumas, comumente nas articulações (hemartroses), músculos (hematomas) e também em locais mais graves como órgãos internos e o sistema nervoso central (GRAW et al., 2005). Em indivíduos saudáveis os níveis de atividade do FVIII no plasma estão entre 100 e 200 ng.ml⁻¹(GRAW et al., 2005), sendo esse último valor considerado como 1 unidade internacional (UI) ou 100% de atividade. Com isso é possível classificar os níveis de hemofilia A em grave (< 1% de atividade); moderada (2-5% de atividade); e leve (5-30% de atividade) que ocorrem em uma proporção de 40%, 10% e 50%, respectivamente (GRAW et al., 2005).

O gene que codifica o FVIII foi descrito em 1984 e está presente no braço longo do cromossomo X (Xq28). A sequência compreende 186 kb com 26 exons. O transcrito apresenta 9 kb e codifica uma proteína precursora de 2.351 aminoácidos (TOOLE et al., 1984; VEHAR et al., 1984). Após a clivagem do peptídeo sinal, no retículo endoplasmático, forma-se uma proteína madura de 2.332 aminoácidos que é a forma inativa circulante do FVIII. Essa proteína é formada por três domínios principais (A, B e C) e três domínios menores (a1, a2 e a3), dispostos como apresentado na Figura 1. Nesses domínios se encontram importantes sítios de interação da proteína do FVIII com outras proteínas do processo de coagulação, como os fatores IX e X, e com o fator de von Willebrand, que se associa ao FVIII impedindo a sua proteólise no plasma sanguíneo (Figura 1) (GRAW et al., 2005; KAUFMAN et al., 1997).

O FVIII é uma molécula altamente glicosilada (KAUFMAN; WASLEY; DORNER, 1988). O FVIII nativo apresenta 25 sítios potenciais de N-glicosilação sendo, 19 no domínio B, 3 na cadeia leve (2 no domínio A1 e 1 no A2) e 3 na cadeia pesada (2 no domínio A3 e um no C1)(Figura 1) (BOVENSCHEN et al., 2005).

Figura 1: Estrutura e sítios de interação da proteína do FVIII. Estão representados os nove domínios da Proteína de FVIII com os respectivos sítios de interação com FIX ativado (F9a), FX (F10), FX ativado (F10a), fator de von Willebrand (FvW) e fosfolipídios das plaquetas (PL). Retirado de Graw, Brackmann et al. 2005.

O FVIII é ativado por proteólise catalítica pela trombina durante o processo de coagulação. As principais regiões de clivagem estão no lado C-terminal dos resíduos de arginina 372, 740 e 1689 (Bowen 2002). Por fim, a proteína ativa é um heterodímero onde a subunidade A1 se associa à cadeia leve por uma ligação metálica divalente e o domínio A2 fica livre associado ao domínio A1 por interações iônicas (Figura 2) (GRAW et al., 2005; KAUFMAN et al., 1997). Diversos estudos demonstraram que a remoção do domínio B não afeta a atividade do FVIII (MEULIEN et al., 1988; TOOLE et al., 1986). Ainda, moléculas do cDNA do FVIII construídas com o domínio B parcialmente deletado apresentaram maiores níveis de expressão em relação ao tipo selvagem (Dorner, Bole, e Kaufman 1987; Miao et al. 2004; Pittman et al. 1993).

Figura 2: A proteína ativada do FVIII com as cadeias leve e pesada associadas a um íon metálico (Cu^{2+}). Retirado de Graw, Brackmann et al. 2005.

1.2 A terapia de reposição e a produção do FVIIIr

Atualmente, a hemofilia A não tem cura e seu tratamento consiste na terapia de reposição com a administração de concentrados da proteína do fator VIII. O tratamento pode ser feito sob demanda – infusão venosa periódica do fator de coagulação após um episódio hemorrágico – ou de maneira profilática – infusão contínua do fator de coagulação (Carcao e Aledort 2004; Powell 2009). O objetivo do tratamento sob demanda é oferecer compensação imediata dos níveis de FVIII na circulação, interrompendo uma hemorragia e minimizando seu impacto futuro. Já o profilático visa manter constantes os níveis de FVIII no plasma sanguíneo prevenindo os episódios hemorrágicos (GATER; THOMSON; STRANDBERG-LARSEN, 2011). O tratamento profilático pode ser feito pelo próprio paciente em casa e garante melhor qualidade de vida, pois resulta na diminuição dos episódios hemorrágicos, das dores musculares e do número de internações hospitalares (Carcao e Aledort 2004; Pipe 2009).

O fator VIII disponível para a terapia pode ser derivado do plasma (FVIII_{dp}) ou ser recombinante (FVIII_r). Apesar de muitos países ainda utilizarem o FVIII_{dp} (ANTUNES, 2002; STONEBRAKER et al., 2010), este produto tem como desvantagens a disponibilidade limitada, dependente da doação de sangue voluntária e maiores riscos de contaminações virais (ORLOVA et al., 2013). Atualmente, mesmo com a melhora das técnicas de purificação e inativação de patógenos no plasma utilizado, ainda existe o risco de contaminação com príons ou doenças capazes de superar as barreiras interespecíficas (GATER; THOMSON; STRANDBERG-LARSEN, 2011). Dessa forma, o fator VIII produzido pela tecnologia do DNA recombinante surge como uma alternativa segura frente aos produtos derivados do plasma para o tratamento da hemofilia A.

Atualmente, 7 concentrados do FVIII recombinante podem ser encontrados no mercado, sendo divididos em produtos de primeira, segunda, terceira e quarta geração (Tabela 1), de acordo com a existência de material biológico animal em sua composição e seu tempo de meia-vida. Os produtos de primeira e segunda geração contém produtos de origem animal como aditivos no meio de cultivo, entretanto, os de segunda geração não empregam o uso de albumina no final do processo (JIANG et al., 2002). Os de terceira geração são produtos livres de qualquer material biológico

(MANNO, 2003). Por fim, os produtos de quarta geração, que ainda se encontram em fase de estudo clínico, incorporam tecnologias como a peguilação (adição de polietilenoglicol, PEG) ou a incorporação de imunoglobulinas à molécula do FVIII buscando aumentar consideravelmente o tempo de circulação da proteína no plasma (LAFFAN, 2016).

Tabela 1: Produtos Recombinantes disponíveis no mercado. Modificado de Calvez et al. 2014.

Nome do Produto	Empresa	Geração do Produto	Proteínas animais presentes no processo	Albumina como estabilizante	Linhagem celular	Ano de introdução no mercado
Recombinate®	Baxter Healthcare	Primeira (Molécula Selvagem)	Sim	Sim	CHO	1993
Kogenate® FSa	Bayer Healthcare	Primeira (Molécula Selvagem)	Sim	Sim	BHK	1994
ReFacto®	Wyeth Pharmaceuticals	Segunda (Molécula com Domínio B deletado)	Sim	Não	CHO	1999
Kogenate® FS/Bayer Helixate NexGen	Bayer Healthcare	Segunda (Molécula Selvagem)	Sim	Não	BHK	2000
Advate®	Baxter Healthcare	Terceira (Molécula Selvagem)	Não	Não	CHO	2004
Xyntha™	Pfizer	Terceira (Molécula com Domínio B deletado)	Não	Não	CHO	2009
Nuwiq®	Octapharma	Terceira (Molécula com domínio B deletado)	Não	Não	HEK293F	2015

Dos 7 produtos disponíveis no mercado, 6 são produzidos em linhagens celulares de roedores. A produção do FVIII endógeno compreende extensivas modificações pós-traducionais necessárias para a geração de uma molécula de FVIII inteiramente ativa e funcional, dentre elas a glicosilação e a sulfatação de resíduos. Com isso, a expressão heteróloga dessa proteína em sistemas celulares não-humanos pode resultar em uma molécula com um perfil de modificações diferente do endógeno, ocasionando problemas na funcionalidade da proteína (Brooks 2004; Kosloski, Miclea, e Balu-Iyer 2009; Lenting, Christophe, e Guéguen 2010; Leyte et al.

1991). Estudos demonstraram que o grau de sulfatação de resíduos específicos presentes no domínio A3 do FVIII tem estreita relação com a afinidade do FVIII pelo fator de von Willebrand (KANNICHT et al., 2013a; LEYTE et al., 1991). Na circulação o FVIII ocorre associado ao fator de von Willebrand, que age como um estabilizador e evita sua proteólise no plasma sanguíneo, sendo determinante para sua estabilidade *in vivo* (GRAW et al., 2005; KAUFMAN et al., 1997).

Além disso, as proteínas recombinantes produzidas em células murinas apresentam um padrão de modificação pós-traducional não homólogo ao das células humanas, pois não possuem algumas enzimas responsáveis pelo transporte de açúcares como α 2-6 sialiltransferase, α 1-3/4 fucosiltransferase e N-acetilglicosaminatransferase (GRABENHORST et al., 1999). Ainda, as proteínas produzidas nessas linhagens podem apresentar os epítomos Gal α 1-3Gal β 1-GlcNAc-R (alfa-Gal) e ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), que já se mostraram imunogênicos (KANNICHT et al., 2013b; SANDBERG et al., 2012b). Fliedl e colaboradores (2015) listaram algumas glicoproteínas recombinantes comerciais e o potencial de contaminação com ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) com base no seu sistema de expressão (Fliedl, Grillari, e Grillari-Voglauer 2015). Apesar das células humanas apresentarem um potencial de risco baixo, este é baseado no uso de SFB ou outros suplementos de origem animal adicionados na cultura. Dessa forma, esse risco é inexistente em produtos de terceira geração. Já as glicoproteínas produzidas em células de roedores, como CHO e BHK, o risco de contaminação se apresenta como alto (FLIEDL; GRILLARI; GRILLARI-VOGLAUER, 2015).

A exposição do paciente ao longo do tempo a essas moléculas recombinantes pode levar a uma reação imunogênica resultando na geração de inibidores anti-FVIIIr (Durocher e Butler 2009). A geração de inibidores é uma complicação grave com uma incidência que pode chegar a 30% dos pacientes que recebem o FVIIIr (BUTENAS et al., 2013). Em função disso, a utilização de linhagens humanas para a produção de proteínas recombinantes terapêuticas vem ganhando destaque. O perfil de glicosilação destas proteínas é semelhante ao encontrado *in vivo*, reduzindo assim a geração de respostas imunogênicas contra epítomos não humanos (Durocher e Butler 2009; da Rosa et al. 2012). Apesar disso, poucas linhagens celulares humanas têm sido utilizadas na produção de proteínas recombinantes em escala comercial (Swiech, Picanço-Castro, e Covas 2012).

A linhagem celular HEK293, derivada de células embrionárias humanas de rim (GRAHAM et al., 1977), é provavelmente a linhagem mais utilizada para pesquisas relacionadas à expressão de proteínas recombinantes (CASADEMUNT et al., 2012; DA ROSA et al., 2012). Uma das razões para a sua ampla aplicação é o fato dessas células crescerem facilmente em suspensão, e em meios livres de soro disponíveis comercialmente. Entretanto, essas células formam grandes agregados em biorreatores, dificultando o processo de escalonamento (Durocher e Butler 2009; da Rosa et al. 2012). Em 2015, o FDA aprovou o primeiro produto do FVIII recombinante humano (Nuwiq®, Octapharma AG, Suíça) produzido na linhagem HEK293F (WINGE et al., 2015). A combinação de um perfil de sulfatação completo e ausência de epítomos antigênicos não-humanos tem o potencial de minimizar reações intrínsecas à infusão da proteína recombinante (KANNICHT et al., 2013a). Em uma série de estudos clínicos, com um total de 135 pacientes hemofílicos A, a administração do Nuwiq® não resultou no desenvolvimento de inibidores nem em eventos adversos relacionados à terapia (VALENTINO et al., 2014). Além disso, em comparação com os produtos comerciais ReFacto®, Advate® e Kogenate®, Nuwiq® apresenta maior afinidade pelo fator de von Willebrand (SANDBERG et al., 2012a).

Apesar dos resultados iniciais promissores apresentados pelo Nuwiq®, mais estudos precisam ser realizados para otimizar a produção do FVIIIr, aumentando a disponibilidade do produto e diminuindo os custos do tratamento. De fato, quando comparado a outras proteínas recombinantes, como o fator V da coagulação, os níveis de expressão do FVIIIr são consideravelmente menores (KOLIND et al., 2010; PITTMAN; MARQUETTE; KAUFMAN, 1994). Além disso, em comparação com estratégias semelhantes de produção de proteínas recombinantes, a expressão do FVIIIr é até 3 ordens de magnitude menor (KAUFMAN et al., 1997; SWIECH et al., 2011). Como resultado, o custo para a aquisição de 1 unidade internacional de FVIIIr chega a ser 60% superior ao custo por unidade do FVIIIIdp (CONITEC, 2013).

A linhagem celular SK-HEP-1, derivada do fluído ascítico de pacientes com adenocarcinoma de fígado, já teve o seu potencial de produção do FVIIIr demonstrada em diferentes estudos. Herlitschka e colaboradores (1998) demonstraram uma produtividade em SK-HEP-1 até 4 vezes maior em comparação com células HEK293 e CHO (Chinese Hamster Ovary) (HERLITSCHKA et al., 1998). Já em Picanço et al (2006), a comparação dos níveis de expressão de FVIII em diferentes linhagens

hepáticas humanas mostrou que as células SK-HEP-1 eram capazes de produzir níveis de FVIII até 1,6 vezes maiores que as que outras linhagens de origem hepática, como HepG2 e Hepa 1.6 (PICANCO-CASTRO, 2006). Além disso, já foi demonstrado que a presença de determinados fatores hepáticos podem desempenhar um importante papel regulatório na expressão do FVIII (CHEN et al., 1999). Dessa forma, a linhagem humana SK-HEP-1 constitui uma interessante alternativa para o desenvolvimento de uma plataforma de produção otimizada do FVIIIr. Biaggio e colaboradores (2015) promoveram a adaptação da linhagem SK-HEP-1 para o cultivo livre de SFB em suspensão após sucessivas passagens e substituição gradual do meio contendo SFB para meio livre de soro. A linhagem adaptada apresentou níveis de crescimento e densidade celular comparáveis às da linhagem CHO-K1, o sistema de produção mais utilizado nos processos industriais (BIAGGIO et al., 2015).

Apesar de promissora, essa linhagem produtora de FVIII ainda não foi extensivamente caracterizada quanto a produção do FVIII quando cultivada em condições compatíveis com a escala industrial, ou seja, em suspensão empregando meios de cultura livres de soro fetal bovino.

1.3 Cultivos em suspensão e meios livres de soro fetal bovino

O maior objetivo da indústria biofarmacêutica é obter um processo com baixos custos e altos níveis de produção. O meio de cultura utilizado tem influência determinante na densidade celular, viabilidade e produtividade em um sistema de produção (RODRIGUES et al., 2013). Atualmente, os bioprocessos para produção de proteínas recombinantes envolvem o cultivo de células em meios quimicamente definidos e livres de soro fetal bovino (SFB) e em suspensão (WURM, 2004).

A presença de soro fetal bovino e outros derivados animais nos meios de cultura usados para a produção de proteínas terapêuticas é indesejável por diversos motivos. Do ponto de vista moral, o processo de coleta do soro por punção cardíaca causa sofrimento desnecessário para o feto bovino (VAN DER VALK et al., 2004). Do ponto de vista científico, o uso de SFB apresenta várias outras complicações: a composição do soro é desconhecida e apresenta variações quantitativas e qualitativas entre lotes, interferindo na reprodutibilidade dos experimentos; o SFB pode ser uma fonte potencial de contaminação por vírus, micoplasma ou príons; o SFB contém diferentes

proteínas que acabam dificultando as subseqüentes etapas de purificação do produto de interesse; e existem altos custos associados ao uso do SFB (BRUNNER et al., 2010; VAN DER VALK et al., 2004, 2010). Essas desvantagens impactam diretamente na complexidade do processo de produção, encarecendo o produto final. Dessa forma, o uso de produtos animais é fortemente desencorajado na produção de produtos terapêuticos de uso humano (VAN DER VALK et al., 2010).

Apesar disso, por conter suplementos essenciais ao crescimento das células, o uso de SFB é ainda muito comum nos estágios iniciais do desenvolvimento de uma linhagem celular produtora (ALAHARI ARUNAKUMARI et al., 2009). Visando uma futura aplicação comercial, as células recombinantes devem passar por um dispendioso e prolongado processo de adaptação para meios de cultura livres de SFB através da diminuição gradual do soro no meio de cultivo (COSTA et al., 2011). Este longo processo pode, no entanto, acabar por selecionar uma população celular com baixos níveis de produção da proteína de interesse.

Uma das principais vantagens da propagação da cultura em suspensão é a facilidade em relação ao escalonamento. O crescimento das células aderidas ao substrato é limitado pela área superficial disponível para a adesão celular e a passagem da cultura depende do uso de técnicas de dissociação enzimática (Trypsina) ou mecânica. Em contrapartida, os cultivos em suspensão permitem produzir e coletar grandes quantidades de células independentemente da área superficial. Esta característica possibilita o cultivo dessas células em biorreatores e o escalonamento do processo com relativa facilidade (Chico, Rodríguez, e Figueredo 2008; Freshney 2011; Wurm 2004). Entretanto, o crescimento da maioria das células de mamíferos depende de um substrato de ancoramento. Dessa forma, são necessários procedimentos específicos e meios de cultura adequados para a adaptação dessas células para o crescimento em suspensão (ZHU, 2012).

1.4 Considerações finais

A busca por novas e otimizadas plataformas de produção, pode resultar em produtos mais eficientes, seguros e com custo reduzido. Conforme mencionado anteriormente, a utilização de linhagens celulares humanas vem ganhando destaque no cenário atual, especialmente na produção de fatores de coagulação, onde a

presença de inibidores é uma importante limitação da terapia atual. Diversos estudos disponíveis na literatura e também estudos realizados por nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a linhagem celular humana SK-HEP-1 é capaz de produzir níveis elevados de FVIIIr. No entanto, todos estes estudos avaliaram a produção de FVIIIr nesta mesma linhagem em condições aderentes e na presença de SFB, condição não compatível com a escala comercial. Em função disso, este trabalho foi proposto com o intuito de estabelecer um processo de produção de FVIIIr utilizando a linhagem SK-HEP-1, em condições livres de SFB e em suspensão.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de FVIIIr na linhagem celular humana SK-Hep-1 (ATCC HTB-52) comparando duas estratégias para o estabelecimento de processos de produção em condições livres de soro fetal bovino (SFB) e em suspensão: Estratégia 1 - adaptação para tais condições da linhagem já modificada geneticamente e Estratégia 2 - modificação gênica para a expressão da proteína já em células previamente adaptadas à tais condições.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterização e adaptação para condições de cultivo em suspensão em meio livre de soro da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 recombinante, previamente estabelecida, com produção estável de FVIIIr (Estratégia 1);
- Geração, caracterização e adaptação para condições de cultivo em suspensão em meio livre de soro da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 recombinante com produção estável de FVIIIr (Estratégia 1);
- Produção de partículas lentivirais portadoras do cDNA do fator VIII recombinante com domínio B-deletado (FVIII Δ B) com elevado título lentiviral utilizando os vetores pLVmpsvFVIII Δ B-Neo e pLVCMVFVIII Δ B-GFP (Estratégia 2);
- Transdução de células SK-HEP-1, previamente adaptadas para as condições de cultivo em suspensão em meio livre de soro, para a geração de linhagens produtoras do FVIIIr (Estratégia 2);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a estratégia 1 foi utilizada a linhagem SK-HEP-1 (ATCC HTB-52) recombinante produtora da proteína do FVIII (SK-Hep-FVIII/Neo-E1), previamente estabelecida por Caron 2013 (IC Fapesp Processo 2012/00839-8). Alternativamente, também foi utilizada a linhagem SK-Hep-FVIII/GFP, estabelecida neste trabalho em condições aderentes e com suplementação de SFB. Ambas as células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagle's Medium – SIGMA cellculture™*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (*Hyclone*). O SFB utilizado foi inativado por 45 minutos a 56°C.

Para a estratégia 2 foi utilizada a linhagem SK-HEP-1 já adaptada para o crescimento em suspensão (SK-HEP-sus) no meio comercial livre de soro 293 SFM II (Gibco) suplementado com 10% de CellBoost5 (HyClone), 1% Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) 100X (Gibco), 1% Pluronic F68 100X (Gibco), e 1% Glutamax 100X (Gibco), como estabelecido por Biaggio e colaboradores (2015).

Para a produção de partículas lentivirais para transdução das células (estratégia 2) foi utilizada a linhagem celular 293FT (ATCC CRL-3216) obtida da American Type Culture Collection (ATCC).

O cultivo das células após descongelamento e para expansão inicial e manutenção foi realizado em frascos de 75 cm² (Greiner Bio-One) com 10 mL de meio de cultura. O crescimento em suspensão foi feito em frascos *erlenmeyer* (Corning) de 125 e 250 mL com volume de trabalho de 10-30 mL e 30-50 mL, respectivamente, e uma concentração inicial de 5x10⁵ cel/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação de 80 rpm em ambiente com 5% CO₂ a 37°C em incubadora *Steri-cult 200 (Forma Scientific – Thermoforma)* com 85% de umidade relativa.

3.2 Adaptação da linhagem recombinante para as condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB – Estratégia 1

A adaptação das linhagens recombinantes SK-Hep-FVIII/Neo e SK-Hep-FVIII/GFP foi realizada através da substituição do meio inicial de cultivo, DMEM com 10% de SFB, por meio comercial livre de soro (MLS). Foram testados 4 meios de cultura: FreeStyle 293 Expression Medium (FS, Invitrogen, GrandIsland, NY), CD 293 AGT (CD 293, Invitrogen, GrandIsland, NY), 293 SFM II (SFM II, Invitrogen, Grand Island, NY), e CDM4-CHO (CDM4, Thermo Scientific, SouthLogan, UT). Foram avaliados diversos protocolos de adaptação, conforme apresentado na Figura 3. Esta adaptação foi realizada tanto em garrafas de 25cm² quanto em frasco *erlenmeyer*. A viabilidade e o crescimento das células foram acompanhados a cada passagem.

Para o protocolo de adaptação gradual (protocolo 1), as células cultivadas em DMEM 10%SFB receberam 50% de meio de adaptação livre de soro. A cada 2-3 passagens, 25% do meio DMEM 10% SFB foi substituído até que todo o meio contendo SFB fosse substituído por meio de adaptação. O inóculo inicial de cada passagem foi de 1x10⁶ células totais para adaptação em garrafa de 25cm² e 5x10⁵cel/mL para adaptação em frasco *erlenmeyer*.

Para a adaptação direta (*Inside*) (protocolo 2), as células cultivadas em meio DMEM 10% SFB foram submetidas diretamente aos meios livres de soro testados. Durante as passagens o crescimento e viabilidade das células foi avaliado. Ao apresentar características de crescimento semelhantes às do controle as células seriam consideradas adaptadas.

Para o protocolo de redução do SFB em meio de adaptação (MLS) (protocolo 3), as células cultivadas em DMEM 10% SFB receberam 100% de meio de adaptação suplementado com 10% SFB. A cada 2-3 passagens, a concentração de SFB foi reduzida pela metade até que todo o SFB fosse retirado. O inóculo inicial de cada passagem foi de 1x10⁶ células totais para adaptação em garrafa de 25cm² e 5x10⁵cel/mL para adaptação em frasco *erlenmeyer*.

Figura 3: Protocolos de adaptação para meios livres de soro utilizados neste trabalho para as células SK-Hep-FVIII/Neo e SK-Hep-FVIII/GFP.

3.3 Modificação gênica da linhagem SK-HEP-1 adaptada para o cultivo em suspensão – Estratégia 2

Para a modificação gênica da linhagem SK-HEP-1 foram utilizados dois vetores lentivirais portadores do gene que codifica a expressão do FVIII recombinante: FVIIIrpLVmpsvFVIII Δ B-Neo (FVIII Δ B-Neo) portador do cDNAs do FVIII selvagem com o domínio B deletado e do gene da Neomicina, que confere resistência antibiótico genética, como marcador; e pLVCMVFVIII Δ B-GFP (FVIII Δ B-GFP) portador do cDNAs do FVIII selvagem com o domínio B deletado e do gene GFP (Green Fluorescent Protein) como marcador (PICANCO-CASTRO, 2006). A expressão da sequência do cDNA do FVIII está atrelada a expressão do seu respectivo marcador pela sequência IRES (Sítio de entrada interna do ribosso – do inglês “Internal ribosome entry site”). Para a produção das partículas lentivirais necessárias para a transdução foram também utilizados os vetores pCMV8.91 (codifica as proteínas do capsídeo viral) e pVSV-G (codifica as proteínas do envelope viral).

3.3.1 Transfecção em linhagem celular 293FT para produção do vetor lentiviral

A transfecção da célula 293FT para produção das partículas lentivirais foi realizada com dois métodos diferentes.

Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen): as células 293FT foram semeadas em uma garrafa de cultura de 75cm² entre 18-24 horas antes do procedimento. Para o

desenvolvimento do protocolo, a confluência deve estar entre 50-70%. Imediatamente antes da transfecção foram preparados um tubo de polietileno de 15mL estéril com 60µL do reagente com volume final de 500µL completado com meio D-MEM sem soro; e outro tubo de 15mL contendo os plasmídeos de interesse nas seguintes quantidades: 7,5µg de pLVmpsvFVIIIΔB-Neo (FVIIIΔB-Neo) ou pLVCMVFVIIIΔB-GFP (FVIIIΔB-GFP) (PICANCO-CASTRO, 2006), 5µg do pCMV8.91 (gene que codifica as proteínas do capsídeo viral) e 2,5µg do pVSV-G (gene que codifica as proteínas do envelope viral), com volume final de 500µL completado com meio D-MEM sem soro.

Os volumes foram misturados gota a gota em um único tubo. A mistura foi incubada por 30 minutos para a formação do complexo lipossomo:DNA. Ao término da incubação a mistura foi adicionada na placa contendo meio fresco por gotejamento. Após 24 horas o meio foi trocado por meio fresco. Foram feitas coletas do sobrenadante após 48 horas e após 72h da transfecção.

PEI (25-kDa linear polyethylenimine, Polysciences: as células 293FT foram semeadas em garrafas de cultura de 75cm² entre 18-24 horas antes do procedimento. Para o desenvolvimento do protocolo, a confluência deve estar entre 50-70%. Imediatamente antes da transfecção foi preparado, para cada garrafa de cultura, um tubo de polietileno de 15mL estéril contendo os plasmídeos de interesse nas seguintes quantidades: 14µg de pLVmpsvFVIIIΔB-Neo (FVIIIΔB-Neo) ou pLVCMVFVIIIΔB-GFP (FVIIIΔB-GFP) (PICANCO-CASTRO, 2006), 8,5µg do pCMV8. e 4,5µg do pVSV-G, com volume final de 2500µL completado com meio D-MEM sem soro. O reagente PEI (1mg/ml) foi adicionado na proporção de 3 partes de PEI para 1 de DNA por gotejamento sob agitação leve. A mistura foi incubada por 15 minutos para a formação do complexo PEI:DNA (polyplexo). Ao término da incubação a mistura foi adicionada na placa contendo meio fresco por gotejamento. Após 24 horas o meio foi trocado por meio fresco. Foram feitas coletas do sobrenadante após 48 horas e após 72h da transfecção.

O sobrenadante resultante da transfecção das células 293FT contendo os vetores lentivirais foi concentrado por ultracentrifugação a 40.000 x g por 1 hora e 40 minutos a 4°C.

3.3.2 Transdução da linhagem SK-HEP-1 adaptada para o cultivo em suspensão

Para a geração da linhagem celular produtora de FVIIIr já adaptada para crescimento em suspensão em meio livre de soro, o sobrenadante lentiviral foi adicionado no meio de cultura das células com uma multiplicidade de infecção (MOI) conhecida. Inicialmente, foram feitos 4 ciclos de transdução com MOI de 5 unidades infecciosas por célula. Posteriormente, após avaliar a viabilidade das células, adotamos o uso de um ciclo único com MOI de 1.

Para facilitar a passagem do vírus pela membrana plasmática foi adicionado 6 µg/mL de polibreno (*1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide, Sigma*). Este polímero neutraliza as cargas negativas encontradas na superfície da membrana celular diminuindo a repulsão eletrostática. Após aproximadamente 4 horas da transdução, o sobrenadante lentiviral foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X e colocadas em cultivo com meio fresco. O sobrenadante da cultura celular foi coletado após 72 horas e devidamente armazenado em *freezer* a -80°C para posterior análise da atividade do FVIIIr.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Análise da concentração e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e concentração de células foi utilizado o método de exclusão com o corante azul de tripan em hemacitômetro (FRESHNEY, 2011). Eventualmente, a viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo (BD FACS Calibur) utilizando o corante iodeto de propídeo (BD Biosciences) para comprovação da viabilidade que estava sendo determinada com azul de tripan.

3.4.2 Determinação do título lentiviral

Para o cálculo do título viral FVIIIIdB-Neo uma quantidade de 1×10^6 das células 293FT por poço foi plaqueada em placa de 6 poços (Corning Costar) e transduzida com 50 µL do sobrenadante concentrado contendo partículas lentivirais em um volume final de 2 mL (fator de diluição de 40x). Após 72 horas o DNA genômico de 293FT foi

extraído com o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), segundo as instruções do fabricante.

O título viral é expresso em unidades infecciosas por mililitro, e é determinado por RT-qPCR segundo os valores dos ciclos de amplificação de duas curvas padrão: uma relativa ao gene endógeno β -actina, feita com diluições seriadas do DNA genômico extraído das células 293FT selvagens; e outra relativa ao plasmídeo lentiviral, obtida com a diluição seriada do plasmídeo lentiviral pLVmpsvFVIII Δ B-Neo. O número de cópias amplificadas da sequência lentiviral pLVmpsvFVIII Δ B-Neo integrada no genoma das células transduzidas (Cópias LV) e o número de cópias do gene endógeno (Cópias β ACTN) são utilizado na seguinte equação (MATSUI et al., 2007):

$$TítuloViral = \frac{Cópias(LV)}{Cópias(\beta ACTN) \div 2(1cópia/célula)} \times 1 \times 10^6 \times \text{fator de diluição}$$

Para o cálculo do título viral FVIII Δ B-GFP foram plaqueadas 2×10^5 células 293FT em um volume final de 1ml por poço em uma placa de 6 poços. Em duplicata, foi feita uma diluição do sobrenadante viral em DMEM 10% sendo, 1:2 nos primeiros dois poços; 1:4 nos dois poços seguintes; e 1:8 nos últimos poços. Após 4 horas o meio foi trocado e, após 72 horas, as células foram recolhidas e analisadas por citometria em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson). As medidas de fluorescência (% GFP) foram então empregadas na formula:

$$TítuloViral = \%GFP \times diluição \times 2 \times 10^5$$

3.4.3 Análise da expressão do FVIIIr

A síntese do DNA complementar (cDNA) relativo ao RNAm do FVIII foi realizada com o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

O RNAm foi extraído com o Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. Para cada 2 μ g RNA total, foi adicionado 5,0 μ L de RT Buffer; 4,0 μ L de dNTP's (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados); 5,0 μ L Random Primers (Primers aleatórios) e 2,5 da enzima MultiScribe™ (Enzima transcriptase reversa); e 0,15 μ L de

inibidor de RNase. O volume final de 50µL foi completando com água livre de RNase. O material foi levado ao termociclador. As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizado para a análise dos níveis de expressão do RNA do FVIII presente nas amostras obtidas e, também, para o cálculo do título lentiviral do vírus FVIII_{dB}-Neo. A reação foi preparada com 2µL da amostra (Diluída 10 vezes); 7,5µL do reagente Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA); 0,75µL da sonda específica e 4,75µL de água. O volume final da reação foi 15µL. A reação foi realizada no termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Boston, MA, EUA). As sequências lentivirais foram amplificadas com os *primers* 5'-ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC-3' (sense) e 5'-CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC-3' (antisense) e a sonda LV2, 5'-FAM – AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC – IABkFQ3' (Integrated DNA Technologies, Inc). As sequências do gene endógeno β-actina foram amplificadas com os *primers* 5'-CAACTGGGACGACATGGAGAA-3' (sense) e 5'-GCCACACGCAGCTCATTGTA-3' (antisense) e a sonda 5'-VIC-TGGCACACACCTT-MGB3' (Applied Biosystems). As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O gráfico resultante relaciona o número de ciclos com a crescente emissão de fluorescência. Partindo deste gráfico de amplificação foi feito o cálculo comparativo entre as amostras e o controle endógeno para determinar os valores de expressão do gene de interesse com a fórmula $ddCt = 10.000/2^{dCt}$.

3.4.4 Análise da atividade biológica do FVIIIr

A determinação da atividade do FVIII no sobrenadante gerado nas culturas celulares por ensaio cromogênico foi feita com o kit COAMATIC® Factor VIII (Chromogenix Instrumentation Laboratory S.p.A.) segundo as instruções do fabricante. O teste se baseia na taxa de ativação do FX equivalente à presença de FVIII no meio. O FXa hidrolisa um substrato adicionado na reação que libera um grupo cromofórico. A reação colorimétrica foi analisada no espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices) em leitura de absorbância a 405 nm. Uma curva padrão foi

estabelecida conforme recomendado a partir de um plasma padrão (Siemens) com valor de atividade do FVIII conhecido e somente considerada satisfatória para valores de $r^2 > 0,95$. Para cada ensaio, foram utilizados uma amostra de plasma humano como controle positivo e o sobrenadante de cultura das células selvagens como controle negativo. Valores de atividade que ultrapassaram os limites da curva foram diluídos adequadamente e analisados novamente.

3.4.5 Quantificação do FVIIIr produzido por ELISA

O ensaio por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) permite quantificar o FVIII presente no sobrenadante por meio de uma reação imunoenzimática. Nesse ensaio, um anticorpo específico para o FVIII é utilizado, junto com um anticorpo secundário, que se liga ao anticorpo primário e contém uma enzima acoplada. É fornecido um substrato para essa enzima, que quando processado gera uma coloração que pode ser medida por absorbância. Como cada conjunto de anticorpos equivale a uma molécula de FVIII podemos detectar a concentração do FVIII na amostra. O ensaio foi feito com o Kit Asserachrom Factor VIII:Ag (Diagnostica Stago) de acordo com as instruções dos fabricantes. A curva-padrão só foi considerada satisfatória para valores de $r^2 > 0,95$. No ensaio de ELISA, cada 1 UI/mL de atividade biológica corresponde a 200 ng/mL de FVIII.

3.5 Análise dos resultados

A adaptação das células aos meios de cultivo livres de SFB foi acompanhada pela viabilidade celular e pelo tempo de duplicação celular (T_d), definido como o tempo necessário para duplicar o número de células presentes na cultura. O T_d foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$T_d = t \times \log 2 / [\log(N / N_0)]$$

onde t é o tempo de cultivo, N é o número de células final e N_0 é o número de células inicial.

A caracterização cinética das células adaptadas foi realizada levando em consideração a concentração celular máxima ($X_{\max}$) e a velocidade específica de

crescimento máxima ($\mu_{\max}$). Para a determinação de $\mu_{\max}$, foi utilizada a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

onde: μ é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}); X , a concentração celular (cel/mL) e t , o tempo de cultivo (h).

Na fase exponencial de crescimento da célula podemos considerar que:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \text{cte} = \mu_{\max}$$

Integrando esta equação da concentração inicial de células X_0 a uma concentração X num intervalo de tempo t , temos que,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \cdot t$$

Nesta expressão, o valor de $\mu_{\max}$ é o coeficiente angular do gráfico de $\ln X$ em função do tempo. Esta análise foi feita utilizando o programa Origin® (OriginLab Corporation).

4. RESULTADOS

Inicialmente, buscamos a adaptação da linhagem celular SK-HEP-F8/Neo-E1 gerada após múltiplos ciclos de transdução com o vetor lentiviral pLVmpsvFVIII Δ B-Neo (Estratégia 1). Entretanto, a dificuldade na adaptação das células para os meios livres de soro (MLS), levou-nos a considerar a influência do vetor e dos múltiplos ciclos de transdução na adaptabilidade das células. Dessa forma, geramos uma nova linhagem SK-HEP aderente produtora do FVIIIr após um único ciclo de transdução lentiviral com o vetor pLVCMVFVIII Δ B-GFP. Em função disso, na estratégia 2 deste trabalho, os dois vetores foram utilizados para a transdução da linhagem SK-HEP-sus.

4.1 Estratégia 1 – Adaptação para o cultivo em suspensão e em meios de cultura livres de SFB das linhagens recombinantes

4.1.1 Geração e caracterização das linhagens recombinantes produtoras de FVIIIr - SK-HEP-F8/NEO-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1

A linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 foi gerada após 7 ciclos de transdução lentiviral com o vírus FVIII Δ B-Neo, de acordo com o protocolo descrito por Spencer e colaboradores (2011). As células receberam um MOI de 5 partículas virais por células durante 4 ciclos de infecção, MOI de 10 no ciclo 5 e MOI de 20 nos ciclos 6 e 7. Após uma expansão inicial, a população foi tratada com o antibiótico geneticina. Como a expressão da sequência do FVIII está diretamente ligada a expressão do gene da Neomicina, a seleção das células resistentes ao antibiótico resultou em uma população homogênea produtora do FVIIIr.

A linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 foi gerada após um único ciclo de transdução com MOI 1 com o lentivírus FVIII Δ B-GFP. Da mesma forma, a expressão da sequência do FVIIIr está diretamente relacionada a expressão da sequência da GFP pela sequência IRES. Dessa forma, a detecção de células verdes por microscopia de fluorescência demonstra a presença de células produtoras do FVIIIr na cultura. Entretanto, a população não foi selecionada para conter apenas as células GFP-

positivas, não caracterizando uma população homogênea com 70% das células expressando o GFP.

Inicialmente, as linhagens foram caracterizadas quanto a suas cinéticas de crescimento e produção de FVIIIr. Foram inoculadas 2×10^5 células em garrafas de 25 cm^2 com 4mL de meio D-MEM contendo 10% de SFB (5×10^4 células/mL).

Para a linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1, a taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) foi de 0.064 h^{-1} , alcançando uma concentração final de $3,9 \times 10^6$ células/mL no terceiro dia, 20x maior que o inóculo inicial, conforme mostrado na Figura 4. Para a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1, a taxa de crescimento máximo específico (μ_{max}) foi de 0.00311 h^{-1} , alcançando uma concentração final de 3×10^6 células/mL após 96 horas, 15x maior que o inóculo inicial, conforme mostrado na Figura 4.

Para a linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1, a atividade máxima do FVIIIr, 1,0 UI/mL, foi atingida após 72 horas de cultivo e se manteve relativamente estável até o final do experimento. Para a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1, a atividade máxima do FVIIIr, 0,78 UI/mL, foi atingida após 144 horas, sendo que a mesma decaiu para 0,67 UI/mL no final do cultivo (Figura 4).

SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1 : Cinética de crescimento e produção do FVIIIr

Figura 4: Análise da cinética de crescimento celular e produção do FVIIIr das linhagens SK-HEP-F8/Neo-E1 (A) e SK-HEP-F8/GFP-E1 (B) em condições aderentes e em meio contendo SFB (n=3).

A transdução lentiviral resulta na integração da sequência contendo o cDNA do FVIIIr no genoma das células alvo. Dessa forma, acessamos o número de cópias integradas no genoma das células por qPCR. A análise das células SK-HEP-F8/Neo-

E1 mostrou 288,8 cópias integradas, e para as células SK-HEP-F8/GFP-E1 foram 5 cópias integradas. A análise da expressão do RNAm referente ao cDNA do FVIIIr mostrou uma expressão relativa de 9.473 e 5,6 vezes para SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1, respectivamente.

Após a caracterização das células recombinantes (SK-HEP-F8/NEO-E1 E SK-HEP-F8/GFP-E1) quanto a cinética de crescimento e a produção do FVIIIr, iniciou-se a etapa de adaptação das linhagens para condições livres de soro e em suspensão. Foram realizados diferentes protocolos de adaptação para a condição desejada. Inicialmente, as células foram submetidas ao protocolo de retirada gradual do SFB em culturas estáticas e em cultivo sob agitação orbital em frascos *erlenmeyer*. Para isso, o meio D-MEM contendo 10% de SFB foi gradualmente sendo substituído pelos meios de adaptação livres de soro em uma concentração crescente. Posteriormente, avaliamos a utilização dos meios de adaptação inicialmente suplementados com 10% de SFB para a diminuição gradual da concentração de SFB; e a passagem direta das células do meio D-MEM com 10% de SFB para os meios de adaptação.

4.1.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/NEO-E1 produtora de FVIII recombinante

Para a análise comparativa do crescimento das células durante as etapas de adaptação acompanhamos o crescimento das linhagens produtoras e comparamos com os parâmetros padrões de cultivo em DMEM com 10% de SFB (cultivo controle). Ao longo das passagens, foram acompanhadas a concentração e a viabilidade celular bem como o tempo de duplicação. O inóculo inicial foi de 1×10^6 células em garrafas de cultura de 25cm².

No experimento controle feito com as células SK-HEP-F8/Neo-E1 cultivadas em D-MEM 10% houve crescimento em todas as passagens (Figura 5A) e o tempo de duplicação (Td) médio foi de 44,3h (Figura 5B).

Figura 5: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB (n=1).

4.1.2.1 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em cultura estática

Inicialmente, testamos 4 meios de cultura livres de SFB: FreeStyle 293 Expression, CD 293 AGT, 293 SFM II, e CDM4-CHO sem qualquer suplementação adicional. As células foram inoculadas em uma concentração de 1×10^6 células em garrafas de cultura de 25 cm^2 de área.

As células no meio de cultura livre de SFB SFMII não apresentaram crescimento consistente. Apenas nas passagens 3, 5 e 9 o crescimento foi notável. Nas passagens 1, 3, 6, 7 e 8 o crescimento foi de no máximo 20% e nas demais passagens não houve aumento da população. Na primeira passagem para 90% de SFMII houve uma queda na viabilidade de 85% para 57% seguida de uma recuperação nas passagens subsequentes (Figura 6A). O tempo de duplicação das células só foi inferior à média do controle na passagem 5. Entretanto, houve uma queda no Td após a passagem 7, chegando próximo à 48h nas passagens 9 e 10 (Figura 6B). Além disso, as células foram gradativamente passando para o crescimento em suspensão ao longo das passagens. Após a passagem 10, quando as células receberam 100% de SFMII, ocorreu morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio SFMII não suplementado

Figura 6: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens durante adaptação gradual ao meio SFMII em garrafas estáticas (n=1).

As células em Freestyle apresentaram crescimento consistente ao longo da adaptação. Em todas as passagens a população celular ao menos dobrou, chegando a $5,98 \times 10^6$ células na passagem 8. A viabilidade se manteve acima de 80% (Figura 7A). O Td foi semelhante ao controle, com uma média de 40,8h (Figura 7B), e as células se mantiveram aderidas ao substrato durante toda a retirada do SFB. Após a passagem 10, quando as células receberam 100% de Freestyle, ocorreu morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle não suplementado

Figura 7: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle em garrafas estáticas (n=1).

As células em meio CDM4 apresentaram um comportamento semelhante às células em Freestyle, com crescimento consistente em todas as passagens com viabilidade acima de 80% (Figura 8A). O Td foi semelhante ao controle, com média de 45,6h, e apenas algumas células passaram a crescer em suspensão durante a retirada do SFB (Figura 8B). Após a passagem 10, quando as células receberam 100% de CDM4, ocorreu morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 não suplementado

Figura 8: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 em garrafas estáticas (n=1).

O processo de adaptação em meio CD293 não apresentou resultados promissores em nenhuma passagem do processo. A população celular só apresentou crescimento em duas passagens (Figura 9A) e, apenas na 5ª passagem o Td foi semelhante ao controle (Figura 9B). A viabilidade se manteve acima de 70% até a 6ª passagem quando houve queda até a morte da população celular quando as células estavam com 90% de CD293 (Figura 9A). Em função do desempenho das células neste meio, o mesmo não foi utilizado nas demais tentativas de adaptação.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio CD293 não suplementado

Figura 9: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CD293 em garrafas estáticas (n=1).

Na segunda tentativa de adaptação gradual em garrafas de 25cm², os meios passaram a receber suplementação com Glutamax, um dipeptídeo formado por L-alanina-L-glutamina, e ITS (Insulina, transferrina e selênio).

As células SK-HEP-F8/NEO-E1 em SFMII apresentaram crescimento consistente em todas as passagens com viabilidade acima de 80% (Figura 10A). Até a passagem 9, o Td médio das células foi de 35,7h, sendo menor que o do controle (Figura 10B). Entretanto, após a passagem 10, quando as células receberam 100% de SFMII, o crescimento da população foi pequeno e o Td de 390h. Após a passagem 11 houve morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS)

Figura 10: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).

As células em Freestyle apresentaram comportamento semelhante à primeira tentativa, com crescimento consistente e viabilidade acima de 90% (Figura 11A). As células continuaram aderidas ao substrato durante toda a retirada do SFB. O Td médio das células até a passagem 9 foi de 34,7h (Figura 11B). Entretanto, após a passagem 10, quando as células receberam 100% de Freestyle, ocorreu morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS)

Figura 11: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).

As células em CDM4 atingiram maior concentração celular em cada passagem em relação à primeira tentativa, com viabilidade acima de 80% (Figura 12A). O Td médio foi de 40,4h (Figura 12B), entretanto, 70% das células se mantinham aderidas ao substrato durante a retirada do SFB. Após a passagem 10, quando as células receberam 100% de CDM4, ocorreu morte celular até a completa perda da população.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS)

Figura 12: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 suplementado com ITS e Glutamax em garrafas estáticas (n=1).

4.1.2.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em suspensão

Uma vez que utilizando o protocolo de adaptação anterior, realizado em garrafas estáticas, não foi possível adaptar a célula SK-HEP-F8/NEO-E1 para crescimento nos meios testados, avaliou-se a adaptação aos meios diretamente em frascos *erlenmeyer* sob agitação de 80rpm. Foram testados três meios de cultura: SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5. O pluronic® F68 é um surfactante não iônico usado para proteger as células do cisalhamento presente nos cultivos sob agitação. O CellBoost 5 é um suplemento quimicamente definido e livre de proteínas animais para meios livres de soro, que contem importantes nutrientes como lipídeos, aminoácidos, vitaminas e fatores do crescimento. Dessa forma, esperávamos suprir todas as necessidades energéticas das células nos meios livres de soro testados neste trabalho.

As células em SFMII apresentaram crescimento na maioria das passagens da adaptação. Até a segunda passagem em 100% de meio de adaptação a viabilidade se manteve acima de 80% (Figura 13A). A partir da passagem 12 a população deixou de crescer e a viabilidade ficou abaixo dos 60% nas passagens 15 e 16, quando a população declinou e o experimento foi encerrado. O Td oscilou de 48h até 864h com uma média de 183,5h (Figura 13B).

Figura 13: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

A adaptação das células em Freestyle foi iniciada já com 75% de meio livre de soro. Apesar do declínio populacional na primeira passagem as células apresentaram crescimento até a segunda passagem com 90% de Freestyle. A viabilidade se manteve acima de 80% até a sétima passagem, quando a concentração celular já apresentava declínio (Figura 14A). O Td médio foi de 114h, menor que o Td médio do controle (Figura 14B). O experimento foi encerrado na passagem 9, quando as células ainda estavam com 90% de Freestyle.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 14: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

As células em CDM4 sobreviveram por apenas seis passagens. A viabilidade começou a declinar a partir da quarta passagem ficando abaixo de 20% (Figura 15). Como não houve crescimento celular em nenhuma passagem o tempo de duplicação não pode ser determinado.

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 15: Análise do crescimento e viabilidade das células SK-HEP-F8/NEO-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

4.1.3 Adaptação direta da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 para o crescimento em meios livres de SFB

Alternativamente aos protocolos de adaptação com retirada gradual do SFB, as células foram submetidas à passagem direta do meio D-MEM 10% SFB para os meios de adaptação livres de SFB. Foram testados três meios de cultura: SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax e CellBoost 5 para as tentativas em cultura estática, além de Pluronic F68 para os frascos *erlenmeyer*.

Para as tentativas de adaptação em cultura estática foram utilizadas garrafas de 75cm². As células em SFMII apresentaram crescimento apenas na primeira e quarta passagem (Figura 16A) e um tempo de duplicação médio de 160h (Figura 16B). A viabilidade decaiu ao longo das passagens até o encerramento do experimento na sexta passagem (Figura 16A).

Figura 16: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática (n=2).

As células em Freestyle apresentaram crescimento nas duas primeiras passagens (Figura 17A) e tempo médio de duplicação de 93,9h (Figura 17B). A viabilidade também caiu chegando a 40% na quarta passagem, quando o experimento foi encerrado (Figura 17A).

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação direta em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5)

Figura 17: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática (n=2).

As células em CDM4 apresentaram crescimento em 3 passagens (Figura 18A) com um Td médio de 305,8h (Figura 18B). A viabilidade se manteve acima de 80% até a passagem 5. Na sexta passagem a viabilidade chegou a 42% e houve morte celular, encerrando o experimento (Figura 18A).

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação direta em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5)

Figura 18: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática (n=2).

Para a adaptação direta em suspensão as células foram mantidas em frascos *erlenmeyer* de 125mL sob agitação de 80rpm. As células em SFMII sobreviveram por 9 passagens até o encerramento do experimento (Figura 19A). Só houve crescimento em duas passagens com um Td médio de 149,45h (Figura 19B). Apesar da viabilidade

ter ficado acima de 70%, houve um declínio constante até a última passagem (Figura 19A).

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação direta em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 19: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=2).

As células em Freestyle apresentaram crescimento em apenas duas passagens com um Td médio de 262,75h (Figura 20B). Apesar de terem sobrevivido por 9 passagens a viabilidade já ficou abaixo de 80% após a passagem 4, chegando a 24% na última passagem, quando o experimento foi encerrado (Figura 20A).

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação direta em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 20 Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=2).

As células em CDM4 apresentaram crescimento em 3 passagens e Td médio de 162,2h (Figura 21B). Apesar de não terem apresentado quedas na concentração celular ao longo do experimento e uma viabilidade acima de 80% o experimento foi encerrado na sexta passagem quando a viabilidade caiu para 42% e houve morte celular (Figura 21A).

SK-HEP-F8/Neo-E1: Adaptação direta em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 21: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=2).

4.1.4 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 produtora de FVIII recombinante

Novamente, para a análise comparativa do crescimento das células durante as etapas de adaptação acompanhamos o crescimento da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 no cultivo aderente em DMEM com 10% de SFB (cultivo controle). Ao longo das passagens, foram acompanhadas a concentração e a viabilidade celular bem como o tempo de duplicação. O inóculo inicial foi de 1x10⁶ células em garrafas de cultura de 25cm². As células apresentaram crescimento em todas as passagens (Figura 22A) e o tempo de duplicação (Td) médio foi de 45,6h (Figura 22B).

Figura 22: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB (n=1).

Em seguida, passamos para as etapas de adaptação das células para o cultivo nos meios livres de soro fetal bovino. Em razão dos resultados obtidos anteriormente com a adaptação gradual em cultura estática da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1, onde a utilização de meios de adaptação suplementados com I.T.S, Glutamax e cellboost 5 mostrou melhores resultados de crescimento, repetimos o mesmo protocolo com a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 partindo de 50% dos meios livres de soro.

4.1.4.1 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em cultura estática

As células em SFMII apresentaram crescimento até a segunda passagem em 75% de meio de adaptação (Figura 23A). A partir da passagem 6 a população deixou de crescer e o experimento foi encerrado na passagem 9. A viabilidade chegou a 60% nas passagens 3 e 4, mesmo com crescimento celular. O Td oscilou de 33,2h até 40,4h com uma média de 37,24h (Figura 23B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5)

Figura 23: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS e Glutamax e CellBoost 5 em garrafas estáticas (n=1).

As células em Freestyle apresentaram crescimento até a segunda passagem em 75% de meio livre de soro. Novamente, a viabilidade caiu abaixo de 80% mesmo em passagens com crescimento celular (Figura 24A). A partir da passagem 6 a população declinou e o experimento foi encerrado na passagem 9. O Td oscilou de 37,9h até 436,4h com uma média de 105,8h (Figura 24B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5)

Figura 24: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS e Glutamax e Cell Boost 5 em garrafas estáticas (n=1).

As células em CDM4 apresentaram um perfil de crescimento muito semelhante às células em SFMII com crescimento até a segunda passagem em 75% (Figura 25A).

A partir da passagem 6 a população deixou de crescer e declinou até o experimento ser encerrado. O Td oscilou de 37,9h até 41,9h com uma média de 38,9h (Figura 25B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5)

Figura 25: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual ao meio CDM4 suplementado com ITS e Glutamax e Cell Boost 5 em garrafas estáticas (n=1).

4.1.4.2 Adaptação gradual da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 para o crescimento em meios livres de SFB em suspensão

As células em SFMII apresentaram crescimento em duas passagens já com 75% de meio livre de soro. Nas primeiras 5 passagens a viabilidade se manteve ao redor de 80%(Figura 26A). O experimento foi encerrado na passagem 9 com a viabilidade abaixo dos 60%. O Td oscilou de 123,6h até 158,5h com uma média de 141,1h (Figura 26B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 26: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação gradual ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

As células em Freestyle não apresentaram crescimento em nenhuma passagem. A viabilidade chegou a 70% na segunda passagem e ficou próxima de 20% na passagem 5, quando o experimento foi encerrado após apenas duas passagens com 75% de meio livre de soro (Figura 27). Como não houve crescimento, o Td não foi determinado.

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e F68)

Figura 27: Análise do crescimento e viabilidade das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação gradual ao meio Freestyle suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

As células em CDM4 apresentaram crescimento até a segunda passagem com 75% de meio livre de soro. A viabilidade se manteve acima de 70% até a passagem

5 (Figura 28A). A partir da passagem 5 a população deixou de crescer e o experimento foi encerrado após 8 passagens. O Td oscilou de 82,1h até 317,4h com uma média de 168,2h (Figura 28B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, Cell Boost5 e Pluronic F68)

Figura 28: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=1).

4.1.5 Adaptação da linhagem recombinante SK-HEP-F8/GFP-E1 para meios de adaptação suplementados com 10% de SFB

Como não foi possível a adaptação das células utilizando os protocolos anteriores, um novo protocolo foi avaliado. As células cultivadas em meio DMEM 10% SFB foram passadas diretamente para os meios livres de soro suplementados com 10% de SFB. Nas passagens subsequentes a quantidade de SFB foi diminuída até atingir uma cultura em 100% MLS (Figura 3). Para todos os meios testados o experimento foi encerrado na 6ª passagem com as células ainda em meio de adaptação suplementado com 10% de SFB. Apesar das células terem apresentado um crescimento inicial nas primeiras passagens, a viabilidade caiu gradativamente até a total perda das populações na passagem 6 (Figura 29A,C e E). As médias dos tempos de duplicação para as células em SFMII, Freestyle e CDM4 foram 92,1 (Figura 29B), 73,6 (Figura 29D) e 53,4 (Figura 29 F) respectivamente, valores superiores a condição controle com Td de 45,6 horas.

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio SFMII suplementado com 10% de SFB

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio Freestyle suplementado com 10% de SFB

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação gradual em meio CDM4 suplementado com 10% de SFB

Figura 29: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens para retirada gradual do SFB nos meios SFMII (A e B), FreeStyle (C e D) e CDM4 (E e F) suplementados com 10% de SFB em garrafas estáticas (n=1).

4.1.6 Adaptação direta da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 para o crescimento em meios livres de soro

A linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 também foi submetida aos protocolos de passagem direta do meio D-MEM 10% SFB para os meios de adaptação livres de SFB. Foram testados apenas dois meios de cultura: SFMII e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax e CellBoost 5 para as tentativas em cultura estática e, também, Pluronic F68 para os frascos *erlenmeyer* sob agitação orbital.

As células em SFMII sobreviveram por 6 passagens, entretanto, só apresentaram crescimento em duas passagens (Figura 30A). A viabilidade se manteve acima de 75% e o Td médio foi de 93,3h (Figura 30B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação direta em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS, CellBoost5)

Figura 30: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática (n=2).

As células em CDM4 sobreviveram por apenas 4 passagens e a viabilidade caiu de 92% para 47% na passagem 3, apesar de ter ocorrido crescimento celular. Em seguida a viabilidade chegou a 27% e a população foi perdida (Figura 31A). O Td na passagem 3 foi de 64,2h (Figura 31B).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação direta em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, CellBoost5)

Figura 31: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática (n=2).

Em paralelo ao experimento em cultura estática as células foram submetidas ao mesmo protocolo em frascos *erlenmeyer* sob agitação orbital de 80rpm. As células em SFMII apresentaram crescimento em 3 passagens com um Td médio de 135.2h (Figura 32B). Apesar da população ter aumentado na passagem 5, a viabilidade já estava em 60%. O experimento foi encerrado na passagem 7 (Figura 32A).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação direta em meio SFMII suplementado (Glutamax, ITS, CellBoost5 e F68)

Figura 32: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio SFMII suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=2).

As células em CDM4 apresentaram crescimento apenas em duas das passagens iniciais, com um Td médio de 94,1h (Figura 33B). Após a passagem 3 a

viabilidade caiu de 94% para 70%, chegando a 12% na passagem 6 quando o experimento foi encerrado (Figura 33A).

SK-HEP-F8/GFP-E1: Adaptação direta em meio CDM4 suplementado (Glutamax, ITS, CellBoost5 e F68)

Figura 33: Análise do crescimento, viabilidade (A) e tempo de duplicação (B) das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta ao meio CDM4 suplementado com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer* (n=2).

4.2 Estratégia 2 – Modificação gênica para a expressão do FVIII recombinante em células previamente adaptadas às condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB

4.2.1 Caracterização da linhagem selvagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o crescimento em suspensão em meio livre de SFB

A segunda estratégia testada no presente trabalho visou a modificação gênica para a produção do FVIII recombinante da linhagem SK-HEP-1 previamente adaptada para o crescimento em suspensão em meio livre de soro (SK-HEP-sus). Esta célula foi adaptada para o meio de cultivo SFMII por Biaggio e colaboradores (2015).

Primeiramente, a cinética de crescimento da linhagem selvagem adaptada foi avaliada. O inóculo inicial foi de 5×10^5 células/mL em um volume de trabalho de 20mL, cultivadas em frasco *erlenmeyer* de 125mL a 80rpm. A linhagem adaptada SK-HEP-sus apresentou um crescimento satisfatório no meio quimicamente definido livre de SFB SFMII. A cultura atingiu um $X_{max} = 1,9 \times 10^6$ células/mL e um $\mu_{max} = 0,0186 \text{ h}^{-1}$ (Figura 34). Esses resultados mostram o potencial de crescimento dessa linhagem em condições compatíveis com a escala industrial.

Figura 34: Análise da cinética de crescimento e viabilidade da linhagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o cultivo em meio SFMII livre de SFB em frascos *erlenmeyer* (n=3).

4.2.2 Modificação gênica da linhagem SK-HEP-sus-E2 por meio de transdução com vetores lentivirais para a produção do FVIII recombinante

Inicialmente, buscamos a geração de uma linhagem produtora do FVIIIr seguindo o mesmo protocolo utilizado para a geração da linhagem celular SK-HEP-F8/Neo-E1. A linhagem celular SK-HEP-sus-E2 foi submetida a 4 ciclos de transdução com MOI 5. Anteriormente aos ciclos 5 com MOI 10, e ciclos 6 e 7 com MOI 20, a população foi parcialmente caracterizada quanto a atividade do FVIIIr no sobrenadante de cultura. O ensaio cromogênico detectou menos de 1% de atividade e o ensaio ELISA mostrou apenas 24,2ng/mL de proteína do FVIIIr no sobrenadante. Além disso, a viabilidade celular apresentou variadas quedas após os ciclos de transdução com MOI 5, ocasionando a perda da população celular. Foram feitas ainda outras duas tentativas de transdução com o MOI de 5 que resultaram em morte celular após apenas 48 horas. Dessa forma, nas etapas seguintes deste trabalho passamos a caracterizar as células após um único ciclo de transdução com um MOI de apenas 1 vírus por célula. No total, foram realizadas 12 transduções nestas condições (vírus FVIII_{dB}-Neo). Entretanto, em apenas duas ocasiões foi possível detectar atividade do FVIIIr, 0,03 e 0,14UI/mL, no meio SFMII da primeira passagem utilizando o ensaio

cromogênico. Além disso, após 3 passagens em cultura a viabilidade das células ficou abaixo de 20% e ambas as populações foram perdidas.

Para verificar se estes resultados estavam relacionados ao vírus utilizado (FVIIIIdB-Neo), novos experimentos foram realizados com o vírus FVIIIIdB-GFP, o mesmo utilizado para geração da célula aderente SK-HEP-F8/GFP também utilizada na estratégia 1. No total foram realizadas 22 tentativas de transdução com 1 ciclo e MOI de 1. Em uma ocasião, a população resultante apresentou uma atividade de 0,24UI/mL pelo ensaio cromogênico e 44,2ng/mL de FVIIIr pelo ensaio ELISA após 48 horas, em meio SFMII. Entretanto, novamente a população declinou após as passagens subsequentes de expansão da população celular.

Por fim, 2 populações foram novamente transduzidas com MOI 2 e MOI 1. Para a coleta dos sobrenadantes após 48 horas, uma parte das células foi cultivada em meio com 10% de SFB. O ensaio cromogênico detectou uma atividade de 0,14 e 0,12UI/mL, respectivamente. O ensaio ELISA detectou uma concentração de 25,5 e 18,9ng/mL, respectivamente. Até o momento, as células se encontram em cultura com boa viabilidade após 3 passagens. Após a expansão será possível caracterizar a cinética de crescimento e produção dessas linhagens SK-HEP-sus-F8/GFP-E2.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou avaliar duas estratégias para a obtenção de uma linhagem humana produtora da proteína recombinante do FVIII da coagulação em condições de cultivo em suspensão em meios livre de soro fetal bovino. A estratégia 1 consistiu na tentativa de adaptação de uma linhagem produtora do FVIIIr dependente de ancoramento em meio contendo SFB para as condições desejadas e a estratégia 2 consistiu na tentativa de modificação gênica de uma linhagem selvagem, previamente adaptada, com vetores lentivirais portadores da sequência do FVIIIr.

5.1 Estratégia 1 – Adaptação para o cultivo em suspensão e em meios de cultura livres de SFB das linhagens recombinantes

Inicialmente, caracterizamos as linhagens SK-HEP aderentes produtoras do FVIIIr. A linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 foi gerada após 7 ciclos de transdução com uma concentração crescente do vetor lentiviral FVIIIIdB-Neo (ciclos 1-4 com MOI 5, ciclo 5 com MOI 10 e ciclos 6-7 com MOI 20). Ao término dos ciclos, a população foi tratada com o antibiótico geneticina buscando a obtenção de uma população homogênea. A linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 foi gerada após um único ciclo de transdução com o vetor FVIIIIdB-GFP e um MOI de 1. Diferentemente da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1, a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 não passou pelo processo de eliminação das células que não receberam o vetor lentiviral, consistindo de uma população heterogênea.

A atividade do FVIIIr foi acessada durante a caracterização da cinética de crescimento e produção da proteína recombinante feita para ambas as linhagens. A atividade máxima do FVIIIr foi de 1,0 UI/mL após 72 horas para a linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 e de 0,78 UI/mL após 144 horas para a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1. Após 24 horas, atividade específica do FVIIIr foi de 2,38 UI/10⁶ células e 1,70 UI/10⁶ para as linhagens SK-HEP-F8/Neo-E1 e linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1, respectivamente. Esses valores foram semelhantes ou maiores que alguns encontrados na literatura. Herlitschka *et al* (1998), após transfecção plasmidial, detectou níveis de produtividade em SK-HEP-1 da ordem de 0,67 UI/10⁶ células em

24 horas (HERLITSCHKA et al., 1998). Da Rosa e colaboradores (2012) obtiveram valores de 2,1 UI/10⁶ células após 24 horas em cultura, com transdução em SK-HEP-1 (DA ROSA et al., 2012).

Para a adaptação das células, foram testados 3 protocolos comumente utilizados para tal finalidade: (1) redução gradual da concentração do SFB pela substituição do meio D-MEM 10%SFB por concentrações crescentes dos meios de adaptação em culturas estáticas e em cultivos sob agitação orbital; (2) passagem direta das células em D-MEM 10% de SFB para os meios de adaptação sem soro; e (3) redução gradual da concentração do SFB nos meios de adaptação inicialmente suplementados com 10% de soro. Entretanto, não obtivemos sucesso com a adaptação para o crescimento em suspensão em meio livre de soro fetal bovino das linhagens celulares recombinantes produtoras de FVIIIr. Em todas as estratégias de adaptação, a viabilidade da população celular declinou em algum momento da retirada do SFB do cultivo e a população celular foi perdida. Apenas nas tentativas de adaptação com retirada gradual do SFB em garrafas de 25cm² no cultivo da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 a população sobreviveu até a total retirada do SFB.

O primeiro processo de adaptação foi desenvolvido com a retirada gradual do SFB a partir da substituição do meio DMEM 10%SFB pelos meios de adaptação, sem qualquer suplementação adicional, em garrafas de cultura estáticas. Dos 4 meios iniciais testados, apenas o meio CD293 não apresentou um desempenho próximo ao do controle. As células apresentaram crescimento apenas em duas passagens e o experimento foi encerrado ainda nas etapas com 90% de MLS. As células em SFMII, Freestyle e CDM4 apresentaram crescimento até a primeira passagem em 100% e meio livre de soro, quando a viabilidade declinou e as células foram perdidas nas passagens subsequentes.

A maioria das células necessita de suplementos adicionais para sobreviver ou proliferar de maneira satisfatória (BRUNNER et al., 2010; GSTRAUNTHALER, 2003; VAN DER VALK et al., 2010). O SFB é uma fonte rica em carboidratos, aminoácidos, vitaminas, lipídios, hormônios, fatores de crescimento e proteínas; fatores essenciais para o desenvolvimento e proliferação celular. Em sua maioria, as células de mamíferos apresentam alta demanda energética e necessitam de suplementação adicional para sobreviver e proliferar em meio basal livre de soro (Brunner et al. 2010;

Gstraunthaler 2003; Hutchings e Sato 1978; van der Valk et al. 2010). Dessa forma, a retirada do SFB da cultura é um processo que ocasiona estresse para as células cultivadas na nova formulação (VAN DER VALK et al., 2010). Em função disso, para a segunda tentativa de adaptação da linhagem produtora do FVIIIr em garrafas estáticas passamos a suplementar os meios livres de soro a partir das passagens em 100% de meio livre de soro. Os suplementos utilizados foram GlutaMAX e ITS. O glutamax é um dipeptídeo formado por L-alanina-L-glutamina que é degradado lentamente por aminopeptidases liberadas pela célula. Essa formação promove maior estabilidade em meio aquoso, pois não se degrada espontaneamente, evitando a formação de amônia. A glutamina é um precursor essencial para a síntese de proteínas e ribonucleotídeos além de suprir o crescimento de células que usam a glicose de maneira ineficiente (Altamirano et al. 2013; Glacken 1988; Reitzer, Wice, e Kennell 1979; Zielke, Zielke, e Ozand 1984). O ITS contém insulina, essencial para a cultura celular e um dos hormônios mais comumente utilizados (VAN DER VALK et al., 2010); transferrina, uma proteína essencial para a transferência de ferro para as células (BJARE, 1992); e selênio, que protege as células do estresse oxidativo (HELMY et al., 2000; VAN DER VALK et al., 2010).

Na segunda tentativa de adaptação em garrafas estáticas apenas os meios SFMII, Freestyle e CDM4 foram utilizados. Apesar de as células terem apresentado um padrão de crescimento melhor que na primeira tentativa a viabilidade das populações também declinou a partir da segunda passagem em 100% de MLS. Dessa forma, passamos a questionar a influência da instabilidade genômica da população das células SK-HEP-F8/NEO-E1 no processo de adaptação

A geração de uma linhagem recombinante com produção estável de uma proteína requer a integração da sequência de interesse no genoma das células. Para a geração da linhagem SK-HEP-F8/NEO-E1, a integração da sequência foi conseguida após 7 ciclos de infecção com o vetor lentiviral com crescentes quantidades de partículas virais por célula. Apesar de apresentar um padrão de integração considerado menos genotóxico, os locais de inserção preferencias dos lentivirus ainda não estão totalmente elucidados. Já foi demonstrado que a inserção da sequência lentiviral pode ocorrer em regiões transcritas de genes expressos, aumentando as chances de desregulação da expressão desses genes por

interferência com o *splicing* e com a poliadenilação de transcritos primários (Moiani et al. 2012; Papayannakos e Daniel 2013).

Dessa forma, optamos pela geração da linhagem celular SK-HEP-F8/GFP-E1, utilizando outro vetor e apenas um ciclo de transdução lentiviral com um MOI de 1. O maior nível de atividade atingido durante a cinética de produção com a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 foi apenas 20% menor que o maior nível encontrado para a SK-HEP-F8/NEO-E1. Entretanto, a análise dos níveis de expressão do RNAm mostrou que as linhagens SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1 tem níveis de expressão 9.473,00 e 5,6 vezes maiores que os níveis de expressão na linhagem selvagem, respectivamente. Com isso, nota-se que não houve uma aparente vantagem da utilização de diversos ciclos de transdução com valores crescentes de MOI em termos de atividade da proteína recombinante após a geração da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1, já que a maioria dos transcritos não se traduz em proteína produzida. Além disso, os valores demonstrados para a linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 são referentes à população heterogênea, ainda não selecionada em relação a expressão do GFP.

Contudo, a repetição do protocolo de adaptação em garrafas estáticas, com substituição gradual do meio DMEM 10% de SFB por meio de adaptação suplementada, também não se mostrou promissora com as células SK-HEP-F8/GFP-E1. Com nenhum dos meios utilizados foi possível avançar além da passagem 9, já que a viabilidade das células em cultura declinou após a segunda passagem com 75% de MLS.

Apesar do protocolo de retirada gradual de SFB da cultura celular ser o mais recomendado, algumas linhagens celulares podem ser diretamente adaptadas para o crescimento em MLS. O protocolo de adaptação direta ou *inside* consiste na passagem das células em D-MEM 10% de SFB diretamente para o cultivo nos meios de adaptação desprovidos de SFB. Ambas as linhagens produtoras do FVIIIr foram submetidas à passagem direta aos meios de adaptação, tanto em cultura estática como em frascos *erlenmeyer*. Em nenhum dos casos as células apresentaram um crescimento consistente e não foi possível ir além da nona passagem.

Biaggio e colaboradores (2015) já demonstraram a adaptabilidade da linhagem SK-HEP-1 selvagem em meios livres de soro. A adaptação foi feita em garrafas de

cultura estáticas seguindo o mesmo protocolo de substituição gradual do meio DMEM 10% de SFB pelos meios de adaptação, suplementados com Glutamax[®] até a etapa de 100% de MLS, quando os meios receberam também ITS, Cell Boost 5 e Pluronic[®]. O protocolo foi aplicado na adaptação de 3 linhagens humanas selvagens (Sk-HEP-1, HKB-11 e HepG2) utilizando 4 meios quimicamente definidos (SFMII, Freestyle, CDM4 e CD293). Entretanto, a adaptação só foi possível para as linhagens SK-HEP-1 e HKB-11 e cada linhagem respondeu positivamente a adaptação em um meio específico, sendo SFMII e Freestyle, respectivamente.

O processo de adaptação pode ocasionar alterações na expressão gênica das células podendo resultar, inclusive, na ativação dos mecanismos apoptóticos (Di Matola et al. 2000; Ruoslahti e Reed 1994). Jaluria e colaboradores (2008), avaliaram a expressão gênica por microarray durante o processo de adaptação da linhagem humana HEK293 para o crescimento em meio livre de soro. O gene de resposta precoce ao crescimento (*egr1*), um dos genes que mostrou aumento dos níveis de expressão após a adaptação, está relacionado a funções como regulação do crescimento e viabilidade celular (JALURIA et al., 2008; LAFDIL et al., 2006). Além disso, esse gene é induzido em resposta a estimulação por fatores presentes no soro. O aumento na expressão desse gene nas células HEK293 adaptadas permitiu a ativação de outros genes necessários para o crescimento mesmo na ausência do estímulo do SFB (JALURIA et al., 2008). Matola e colaboradores (2000) mostraram a influência do soro nas culturas de fibroblastos. A adesão celular na presença de soro é dependente da interação entre integrina e a fibronectina produzida pelas células. A retirada de soro da cultura resultou na degradação da fibronectina, soltura das células e posterior apoptose (DI MATOLA et al., 2000). De fato, a relação das células com a matriz extracelular é extremamente importante para a regulação do ciclo celular, principalmente os eventos associados a entrada na fase S (ASSOIAN, 1997).

Durante o processo de retirada do SFB da cultura, muitas células se soltam e passam para a suspensão (González Hernández e Fischer 2007; Jaluria et al. 2008; Rodrigues et al. 2012). Buscando aumentar a viabilidade do processo de adaptação as células foram inoculadas em frascos *erlenmeyer* sob agitação de 80rpm durante a retirada gradual do SFB (BIAGGIO et al., 2015). O melhor resultado foi conseguido com a tentativa de adaptação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 em meio SFMII. O experimento foi mantido por 17 passagens e a viabilidade foi superior a 80% em 13

passagens. A população apresentou crescimento consistente até a segunda passagem com 100% de MLS mas a adaptação completa não foi possível. O experimento com Freestyle se manteve por 9 passagens quando foi encerrado após 6 passagens com 90% de MLS. As células em CDM4 não apresentaram crescimento em nenhuma passagem e o experimento foi encerrado ainda com 50% de MLS. Para as células SK-HEP-F8/GPF-E1, a adaptação ao meio SFMI se manteve por 9 passagens, mas a população cresceu em apenas duas passagens. As células em CDM4 apresentaram melhor crescimento, em 4 passagens, mas o experimento foi encerrado na passagem 8. Já as células em Freestyle não apresentaram crescimento e o experimento se manteve por apenas 5 passagens. O experimento com os 3 meios de adaptação foi encerrado ainda com 75% de meio livre de soro.

Os parâmetros de agitação em frascos *erlenmeyer* foram definidos por Biaggio e colaboradores (2015) durante a adaptação das linhagens selvagens Sk-HEP-1 e HKB-11. Entretanto, essas linhagens só foram submetidas a agitação após terem atingido a etapa de crescimento em 100% de MLS após adaptação com retirada gradual do SFB em garrafas estáticas. Rodrigues e colaboradores (2013), durante a adaptação da linhagem CHO-K1 pelo mesmo processo gradual em garrafas estáticas, não obtiveram o mesmo sucesso. As células CHO-K1 selvagens foram submetidas à agitação leve de 35 rpm após começarem a se soltar da placa em meio com apenas 0,31% de SFB. Contudo, após um curto período sob essas condições a viabilidade das células caiu e não foi possível recuperar a população, causando o encerramento do processo de adaptação após 98 dias.

Alternativamente aos protocolos anteriores, avaliamos o crescimento e a viabilidade das células SK-HEP-F8/GFP-E1 passadas diretamente para os MLS suplementados inicialmente com a concentração padrão de 10% de SFB. O padrão de crescimento apresentado foi semelhante para todos os meios utilizados. Houve crescimento apenas nas três primeiras passagens em MLS suplementado com 10% de SFB. A partir da terceira passagem a viabilidade caiu e a população apresentou morte celular. O desenvolvimento de um meio quimicamente definido leva em consideração o consumo de nutrientes, o acúmulo de substrato e o balanço entre a promoção do crescimento e a produção volumétrica (LI et al., 2010). Os meios disponíveis comercialmente foram otimizados, segundo esses parâmetros, para a manutenção da cultura de linhagens específicas. Até o momento, não existe nenhuma

formulação comercial específica para a linhagem SK-HEP-1. Dessa forma, é possível que, mesmo com a suplementação rica do SFB, os componentes necessários à manutenção do crescimento das células recombinantes não estejam sendo supridos. Entretanto, o meio SFMII já se mostrou favorável à manutenção das células SK-HEP-1 selvagens em cultivo livre de SFB e em suspensão, mesmo sem nenhuma suplementação adicional (BIAGGIO et al., 2015).

A adaptação de uma linhagem celular para as condições de crescimento em suspensão em meio livre de soro é um dos processos mais laboriosos da cultura celular. De fato, apenas 10-20% das tentativas de adaptação são bem-sucedidas (PAZOS et al., 2004). Além disso, diferentes protocolos de retirada do SFB apresentam respostas específicas para diferentes linhagens celulares dificultando o desenvolvimento de um protocolo universal (González Hernández e Fischer 2007).

Através da estratégia de retirada gradual do SFB das culturas, Hernández e Fischer (2007) foram capazes de adaptar 9 linhagens celulares para o cultivo em meio livre de soro. Entretanto, a adaptação de algumas linhagens só foi possível com a inclusão de etapas extras entre as etapas de 90% e 100% (por exemplo, 99,5% de meio de adaptação + 0,5% de meio contendo SFB). Além disso, as células adaptadas apresentaram um aumento no tempo de duplicação. O menor aumento ocorreu na adaptação da linhagem COS-7, que passou de 40 horas em meio de crescimento suplementado com SFB para 55 horas. O maior aumento ocorreu ao fim da adaptação da linhagem VERO, com um aumento de 2,5 vezes após 5 passagens em MLS.

Rodrigues e colaboradores (2013) analisaram o impacto da adaptação para a cultura em meio livre de soro no crescimento de uma linhagem CHO-K1 transfectada para a produção de um anticorpo monoclonal. Foram testadas 5 combinações de insulina com variações de elementos-traço na tentativa de suprir as necessidades das células em adaptação. Desses, apenas uma combinação (Insulina recombinante humana como fator de crescimento e metavanadato de amônia; cloreto de níquel e cloreto de estanho de função desconhecida) permitiu o sucesso na adaptação após 280 dias de desenvolvimento do protocolo. Além disso, duas outras linhagens adicionais foram testadas. Uma CHO-K1 selvagem e outra produtora do mesmo anticorpo monoclonal, mas transfectada com uma tecnologia distinta. Para ambas as

linhagens não foi possível obter sucesso no processo de adaptação, sendo o experimento encerrado após 156 dias (RODRIGUES et al., 2012).

Diversos trabalhos já demonstraram a perda de produtividade de uma proteína de interesse após a adaptação da célula produtora para o cultivo em meio livre de soro (Costa et al. 2013; Lee e Palsson 1990; Lefloch et al. 2006; Novo et al. 2014; Ozturk e Palsson 1990; Serrato et al. 2007). Le Floch e colaboradores (2006) analisaram os níveis de produção da proteína eritropoietina (EPO) na linhagem produtora CHO adaptada para o cultivo livre de soro após redução gradual. A linhagem adaptada alcançou densidade celular 2 vezes menor que da linhagem cultivada com SFB. Além disso, os níveis de produção da EPO caíram de 5 µg/mL para 0,45 µg/mL (LEFLOCH et al., 2006). Amaral e colaboradores (2016) adaptaram a linhagem 293T produtora do fator IX da coagulação para o cultivo em frascos *erlenmeyer* em meio livre de soro. Entretanto, após a adaptação não foi mais possível detectar níveis da proteína ativa nos sobrenadantes de cultura, apesar de ser possível mensurar a concentração da proteína por ensaio ELISA (DO AMARAL et al., 2016).

5.2 Estratégia 2 – Modificação gênica para a expressão do FVIIIr em células previamente adaptadas às condições de cultivo em suspensão em meio livre de SFB

O estabelecimento de células recombinantes em condições livres de soro e em suspensão geralmente emprega células que foram previamente modificadas para a expressão de uma proteína de interesse em condições aderentes e com meio suplementado com SFB (Berg, McClure, e Grinnell 1993; Broad, Boraston, e Rhodes 1991; Hayter et al. 1991; Keen e Rapson 1995; Mather 1990; Murata, Eto, e Shibai 1988; Perrin et al. 1995). Esta estratégia pode, no entanto, levar a perda da produtividade da proteína recombinante, conforme mencionado anteriormente. Em contrapartida, alguns estudos já utilizaram a estratégia de adaptação das células para o cultivo em suspensão em meio livre de soro anteriormente à modificação gênica em algumas linhagens, como, por exemplo, para as células CHO (GANDOR et al., 1995; SINACORE et al., 1996; ZANG et al., 1995) e células de mieloma murino (Kawamoto et al. 1983; Kovár e Franěk 1984).

Dessa forma, a estratégia 2 consistiu na modificação gênica da linhagem SK-HEP-1 previamente adaptada para as condições de cultivo em suspensão em meio SFMII livre de SFB (BIAGGIO et al., 2015). Durante a caracterização da cinética de crescimento em frascos *erlenmeyer* a cultura atingiu um $X_{\max}$ de $1,9 \times 10^6$ células/mL e um $\mu_{\max} = 0,0186 \text{ h}^{-1}$. Esses resultados mostram que a linhagem adaptada apresenta um crescimento satisfatório para as condições industriais (LOIGNON et al., 2008; SUN et al., 2006). Loignon e colaboradores (2008), cultivando a linhagem HEK293 em condições semelhantes em meio livre de soro obtiveram um $X_{\max}$ de 3×10^6 e $\mu_{\max}$ de $0,0148 \text{ h}^{-1}$.

Inicialmente, a tentativa de modificação gênica da linhagem em suspensão foi feita com a realização de múltiplos ciclos de transdução com multiplicidade de infecção crescente. Entretanto, após o quarto ciclo de transdução com MOI 5 a viabilidade celular caiu e a população foi perdida. Ainda, mesmo após essa grande carga viral a atividade do FVIIIr no sobrenadante da cultura foi de menos de 0,01UI/mL e a viabilidade da população declinou até a total morte celular. Estudos já demonstraram que o uso de um elevado MOI pode resultar em queda na viabilidade da população celular (BAEKELANDT et al., 2000; CASTELLANI et al., 2010; UCHIDA et al., 2011). Dessa forma, após outras duas tentativas de modificação gênica com alta carga viral que também resultaram em perda da população optamos por reduzir a carga viral. Entretanto, diversas tentativas de transdução foram feitas com os dois vetores disponíveis. Apesar da viabilidade das células se manter estável após o procedimento não foi possível detectar a atividade do FVIIIr no sobrenadante das culturas. Por fim, em 3 ocasiões utilizando o vetor FVIIIIdB-GFP foi possível obter em cultura células positivas para o GFP. Na primeira tentativa, as células apresentaram atividade de 0,24UI/mL pelo ensaio cromogênico e 44,2ng/mL de FVIIIr pelo ensaio ELISA mas após algumas passagens a viabilidade caiu e a população foi perdida. Por fim, duas populações foram geradas após transdução com MOI 2 e MOI 1 com atividade de 0,14 e 0,12UI/mL, pelo ensaio cromogênico e uma concentração de 25,5 e 18,9ng/mL pelo ELISA, respectivamente. Apesar dos níveis de atividade serem relativamente baixos quando comparados aos níveis detectados para as células aderentes, essas populações ainda representam uma população inicial heterogênea para a expressão de GFP. Enquanto a população aderente SK-HEP-F8/GFP-E1 apresenta 70% das células da população como GFP-positivas as populações SK-

HEP-sus geradas com MOI 2 e MOI 1 apresentam apenas, 8 e 6,15% de células GFP-positivas. Dessa forma, melhores resultados de produção da proteína do FVIIIr podem ser obtidos com a seleção de uma população homogênea para a expressão do GFP.

O sucesso no uso de vetores lentivirais já foi demonstrado em uma grande variedade de células como neurônios (NALDINI et al., 1996), macrófagos (Miyake, Miyake, e Shimada 2007), células-tronco hematopoiéticas (UCHIDA et al., 2011; ZHANG et al., 2007) e linhagens celulares humanas (DO AMARAL et al., 2016; PICANÇO et al., 2007; SENA-ESTEVEES et al., 2004; SPENCER et al., 2011). Entretanto, a produção a níveis satisfatórios da proteína de interesse depende da eficiência da transdução lentiviral, que pode variar com o tipo celular e as condições de cultivo (CARON, 2011; GAILLET et al., 2010; SPENCER et al., 2011). Gaillet e colaboradores (2010) testaram a eficiência da produção de uma proteína modelo (Fosfatase alcalina) após a transdução da linhagem CHO com diferentes MOIs. Os maiores níveis de produção foram alcançados na linhagem que recebeu 200 partículas virais por célula. Contudo, o número de cópias virais integradas no genoma das células não foi linear em relação ao MOI utilizado. As células que receberam um MOI 50 apresentavam uma média de 10 cópias por células, enquanto as células que receberam MOI 200 apresentavam 19 cópias em média, o que pode ser atribuído à exaustão das células (GAILLET et al., 2010).

No presente trabalho, o uso de MOIs elevados para a transdução das células em meio SFMII livre de SFB resultou em queda da viabilidade celular e perda da população. Entretanto, esse mesmo protocolo com múltiplos ciclos de infecção viral permitiu a geração da linhagem aderente SK-HEP-F8/Neo-E1 produtora do FVIIIr, cultivada em meio D-MEM contendo 10% de SFB (CARON, 2011). Em um estudo com células-tronco hematopoiéticas (CTH), Uchida e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de algumas variáveis na transdução dessas células com vetores lentivirais. A adição de 10% de SFB ao meio de transdução induziu maiores níveis de expressão da proteína GFP com MOI 5 mas, o uso de MOI 50 resultou em queda da expressão de GFP e da viabilidade da cultura (UCHIDA et al., 2011).

Além disso, mudanças nas condições de cultivo podem resultar em alterações fisiológicas nas células adaptadas. Esse processo envolve mudanças metabólicas associadas com o crescimento e a manutenção da população celular e indução ou

repressão da síntese de proteínas em resposta aos novos estímulos extracelulares (GONZÁLEZ HERNÁNDEZ; FISCHER, 2007; JALURIA et al., 2008). Dessa forma, a expressão de uma proteína complexa como o FVIIIr pode impactar a viabilidade das células. Ishaque e colaboradores (2007), demonstraram que células HKB-11 produtoras do FVIIIr apresentavam uma progressão mais acentuada do processo de apoptose e maior concentração intracelular de FVIIIr, em cultivos em batelada em MLS. A modificação dessas células para a expressão do gene anti-apoptótico codificante para a chaperona hsp70 resultou em maior produtividade do FVIIIr e viabilidade das células em cultura. A natureza altamente glicosilada da proteína do FVIIIr resulta em acúmulo de agregados de proteínas mal formadas no citosol, uma característica citotóxica que pode ser revertida pela presença da hsp70 (ISHAQUE et al., 2007).

Ainda, a expressão do FVIIIr sempre representou um desafio para a obtenção de linhagens celulares com produção eficiente dessa proteína. Em um trabalho de 1994, Pittman e colaboradores analisaram os níveis de expressão do RNAm e de produção da proteína recombinante dos fatores homólogos V e VIII da coagulação. Após transfeccção da linhagem celular derivada de macaco, COS-1, os níveis de expressão do RNAm do fator V foram 2 vezes maiores que os do FVIII. Além disso, a concentração da proteína secretada foi 10 vezes maior para o fator V, indicando ainda uma maior eficiência na expressão deste fator em comparação com o fator VIII (PITTMAN; MARQUETTE; KAUFMAN, 1994).

Por fim, a expressão do FVIIIr em meios de cultura livres de soro é particularmente mais difícil. Além da ausência de estabilizantes que podem estar presentes no SFB, como o fator de von Willebrand, os baixos níveis de FVIIIr encontrados em meios livres de soro podem estar relacionado com a ligação da proteína aos fosfolipídios da membrana celular (ISHAQUE et al., 2007; KOLIND et al., 2010; WINGE, 2006). Kolind e colaboradores (2010), após transfecção transiente da linhagem HEK293 em meio livre de soro demonstrou que aproximadamente 90% do total de FVIIIr secretado pelas células se encontrava associado às membranas. O FVIIIr pode ser liberado das membranas após adição de 0,5M de NaCl ao meio contendo as células produtoras (KOLIND et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível demonstrar o potencial da linhagem celular humana SK-HEP-1 para a produção do FVIIIr. Foram geradas duas linhagens com níveis de produção do FVIIIr semelhantes aos encontrados na literatura após transdução com dois vetores lentivirais diferentes. Além disso, foi possível demonstrar o potencial para a aplicação da linhagem celular SK-HEP-1 em cultivos em suspensão em meio livre de soro fetal bovino. Entretanto, não foi possível promover a adaptação das linhagens produtoras do FVIIIr cultivadas em meio com SFB para o cultivo em MLS (Estratégia 1). Maiores esforços devem ser voltados ao desenvolvimento de meios de cultura livres de soro específicos para a linhagem SK-HEP-1 para possibilitar a produção eficiente do FVIIIr em tais condições.

Nas etapas de modificação gênica da linhagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o cultivo em suspensão em meio SFMII livre de SFB, não foi possível reproduzir o protocolo com múltiplos ciclos de transdução com multiplicidade de infecção crescente que foi empregado na geração da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 (Estratégia 2). Entretanto, a utilização do vetor lentiviral FVIII_{DB}-GFP permitiu a obtenção de duas populações celulares com níveis detectáveis de atividade da proteína do FVIIIr. Apesar de baixos, esses valores representam uma população heterogênea com mais de 90% das células GFP-negativas. Dessa forma, a seleção das células de interesse para a obtenção de uma população homogênea pode resultar em uma linhagem celular produtora do FVIIIr cultivada em meio livre de SFB e em suspensão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAHARI ARUNAKUMARI, P. et al. The Impact of Cell Culture Medium on Cell Line and Process Development Timelines and Strategies. p. 4–15, 2 jun. 2009.

ALTAMIRANO, C. et al. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 15 maio 2013.

ANTUNES, S. V. Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. **Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 8, n. 3, p. 199–204, maio 2002.

ASSOIAN, R. K. Anchorage-dependent cell cycle progression. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 1, p. 1–4, 13 jan. 1997.

BAEKELANDT, V. et al. DNA-Dependent Protein Kinase Is Not Required for Efficient Lentivirus Integration. **Journal of Virology**, v. 74, n. 23, p. 11278–11285, 1 dez. 2000.

BERG, D. T.; MCCLURE, D. B.; GRINNELL, B. W. High-level expression of secreted proteins from cells adapted to serum-free suspension culture. **BioTechniques**, v. 14, n. 6, p. 972–8, jun. 1993.

BIAGGIO, R. T. et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. **Bioprocess and biosystems engineering**, 31 mar. 2015.

BJARE, U. Serum-free cell culture. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 53, n. 3, p. 355–374, jan. 1992.

BOVENSCHEN, N. et al. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 3, n. 6, p. 1257–65, jun. 2005.

BROAD, D.; BORASTON, R.; RHODES, M. Production of recombinant proteins in serum-free media. **Cytotechnology**, v. 5, n. 1, p. 47–55, jan. 1991.

BROOKS, S. A. Appropriate Glycosylation of Recombinant Proteins for Human Use: Implications of Choice of Expression System. **Molecular Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 241–256, 2004.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 53–62, jan. 2010.

BUTENAS, S. et al. Product-dependent anti-factor VIII antibodies.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia, v. 19, n. 4, p. 619–25, jul. 2013.

CALVEZ, T. et al. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. **Blood**, v. 124, n. 23, p. 3398–408, 27 nov. 2014.

CANCIO, M. I. et al. Developments in the treatment of hemophilia B: focus on emerging gene therapy. **The application of clinical genetics**, v. 6, p. 91–101, jan. 2013.

CARCAO, M. D.; ALEDORT, L. Prophylactic factor replacement in hemophilia. **Blood Rev**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 2004.

CARON, A. L. **Biologia Sintética para Produção de um Biofármaco para Hemofilia A**. [s.l.] University of São Paulo, 2011.

CASADEMUNT, E. et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. **Eur J Haematol**, v. 89, n. 2, p. 165–176, 2012.

CASTELLANI, S. et al. Impact of lentiviral vector-mediated transduction on the tightness of a polarized model of airway epithelium and effect of cationic polymer polyethylenimine. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 103976, 2010.

CHEN, C. et al. The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines. **Thrombosis research**, v. 95, n. 2, p. 105–15, 15 jul. 1999.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para Células Animais. In: MORAES, Â.; AUGUSTO, E.; CASTILHO, L. (Eds.). . **Tecnologia de Cultivo de Células Animais : De Biofármacos a Terapia Gênica**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. p. 528.

CONITEC. **FATOR VIII DE ORIGEM RECOMBINANTE PARA TRATAMENTO DE PACIENTES COM HEMOFILIA AFILIA A**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/images/Incorporados/FatorVIIIRecombinante-final.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

COSTA, A. et al. Strategies for adaptation of mAb-producing CHO cells to serum-free medium. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 8, p. P112, 2011.

COSTA, A. R. et al. The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. **New Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 563–572, 2013.

DA ROSA, N. G. et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human

recombinant factor VIII. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 8, p. 1435–1443, 2012.

DI MATOLA, T. et al. Serum withdrawal-induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin interaction. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1188–93, mar. 2000.

DO AMARAL, R. L. F. et al. Approaches for recombinant human factor IX production in serum-free suspension cultures. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 3, p. 385–94, mar. 2016.

DORNER, A. J.; BOLE, D. G.; KAUFMAN, R. J. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. **J Cell Biol**, v. 105, n. 6 Pt 1, p. 2665–2674, 1987.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n. 6, p. 700–707, 2009.

FLIEDL, L.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 673–9, 25 dez. 2015.

FRESHNEY, I. R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. In: **Culture of Animal Cells**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. i–xxxii.

GAILLET, B. et al. High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. **Biotechnology and bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 203–15, 1 jun. 2010.

GANDOR, C. et al. Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells. **FEBS letters**, v. 377, n. 3, p. 290–4, 27 dez. 1995.

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, set. 2011.

GLACKEN, M. W. Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. **Bio/Technology**, v. 6, n. 9, p. 1041–1050, set. 1988.

GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Y.; FISCHER, R. W. Serum-free culturing of mammalian cells--adaptation to and cryopreservation in fully defined media. **ALTEX**, v. 24, n. 2, p. 110–6, jan. 2007.

GRABENHORST, E. et al. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and glycosylation pathway in mammalian host cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 2, p. 81–97, 1999.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **The Journal of general virology**, v. 36, n. 1, p. 59–74, jul. 1977.

GRAW, J. et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 6, p. 488–501, 2005.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275–81, jan. 2003.

HAYTER, P. M. et al. Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 559–564, fev. 1991.

HELMY, M. H. et al. Effect of selenium supplementation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. **Toxicology**, v. 144, n. 1-3, p. 57–61, 3 abr. 2000.

HERLITSCHKA, S. E. et al. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of biotechnology**, v. 61, n. 3, p. 165–73, 13 maio 1998.

HUTCHINGS, S. E.; SATO, G. H. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 2, p. 901–4, 1 fev. 1978.

ISHAQUE, A. et al. Over-expression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 144–55, 1 maio 2007.

JALURIA, P. et al. Egr1 and Gas6 facilitate the adaptation of HEK-293 cells to serum-free media by conferring enhanced viability and higher growth rates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1443–52, 15 abr. 2008.

JIANG, R. et al. Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII. **Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 8 Suppl 2, p. 1–5, mar. 2002.

KANNICHT, C. et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. **Thrombosis Research**, v. 131, n. 1, p. 78–88, 2013a.

KANNICHT, C. et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. **Thrombosis research**, v. 131, n. 1, p. 78–88, jan. 2013b.

KAUFMAN, R. J. et al. Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. **Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 8 Suppl 2, p. S3–14, dez. 1997.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DORNER, A. J. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 13, p. 6352–62, 5 maio 1988.

KAWAMOTO, T. et al. Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas. **Analytical Biochemistry**, v. 130, n. 2, p. 445–453, abr. 1983.

KEEN, M. J.; RAPSON, N. T. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. **Cytotechnology**, v. 17, n. 3, p. 153–63, out. 1995.

KOLIND, M. P. et al. The B-domain of Factor VIII reduces cell membrane attachment to host cells under serum free conditions. **Journal of biotechnology**, v. 147, n. 3-4, p. 198–204, jun. 2010.

KOSLOSKI, M. P.; MICLEA, R. D.; BALU-IYER, S. V. Role of Glycosylation in Conformational Stability, Activity, Macromolecular Interaction and Immunogenicity of Recombinant Human Factor VIII. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 3, p. 424–431, 5 set. 2009.

KOVÁR, J.; FRANĚK, F. Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation: a novel composition of growth-supporting substances. **Immunology letters**, v. 7, n. 6, p. 339–45, jan. 1984.

LAFDIL, F. et al. Induction of Gas6 protein in CCl₄-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 228–239, jul. 2006.

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

LEE, G. M.; PALSSON, B. O. Immobilization can improve the stability of hybridoma antibody productivity in serum-free media. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, n. 10, p. 1049–55, 5 dez. 1990.

LEFLOCH, F. et al. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. **Cytotechnology**, v. 52, n. 1, p. 39–53, set. 2006.

LENTING, P. J.; CHRISTOPHE, O. D.; GUÉGUEN, P. The disappearing act of factor VIII. **Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia**, v. 16, n. 102, p. 6–15, maio 2010.

LEYTE, A. et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 2, p. 740–6, 15 jan. 1991.

LI, F. et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production. **mAbs**, v. 2, n. 5, p. 466–79, 2010.

LOIGNON, M. et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 65, 2008.

MANNO, C. S. The promise of third-generation recombinant therapy and gene therapy. **Seminars in Hematology**, v. 40, p. 23–28, jul. 2003.

MATHER, J. P. **Gene Expression Technology**. [s.l.] Elsevier, 1990. v. 185

MATSUI, H. et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 10, p. 2660–9, out. 2007.

MEULIEN, P. et al. A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII. **Protein Eng**, v. 2, n. 4, p. 301–306, 1988.

MIAO, H. Z. et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3412–3419, 2004.

MIYAKE, K.; MIYAKE, N.; SHIMADA, T. Development of targeted gene transfer into human primary T lymphocytes and macrophages using high-titer recombinant HIV vectors. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 3, p. 532–538, 2007.

MOIANI, A. et al. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 5, p. 1653–66, maio 2012.

MURATA, M.; ETO, Y.; SHIBAI, H. Large-scale production of Erythroid Differentiation Factor (EDF) by gene-engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells in suspension culture. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 5, p. 501–507, jan. 1988.

NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5259, p. 263–7, 12 abr. 1996.

NOVO, J. et al. Adaptation of glucocerebrosidase-producing CHO cells to serum-free suspension culture. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P46, 2014.

ORLOVA, N. A. et al. Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy.

Acta naturae, v. 5, n. 2, p. 19–39, abr. 2013.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Loss of antibody productivity during long-term cultivation of a hybridoma cell line in low serum and serum-free media. **Hybridoma**, v. 9, n. 2, p. 167–75, abr. 1990.

PAPAYANNAKOS, C.; DANIEL, R. Understanding lentiviral vector chromatin targeting: working to reduce insertional mutagenic potential for gene therapy. **Gene therapy**, v. 20, n. 6, p. 581–8, jun. 2013.

PAZOS, P. et al. Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin. **ALTEX**, v. 21, n. 2, p. 67–72, jan. 2004.

PERRIN, P. et al. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. **Vaccine**, v. 13, n. 13, p. 1244–50, set. 1995.

PICANÇO, V. et al. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, n. 8, p. 785–94, jan. 2007.

PICANCO-CASTRO, V. **Clonagem e Expressão do Fator VIII de Coagulação Humano**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

PIPE, S. Antihemophilic factor (recombinant) plasma/albumin-free method for the management and prevention of bleeding episodes in patients with hemophilia A. **Biologics**, v. 3, p. 117–125, 2009.

PITTMAN, D. D. et al. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 2925–2935, 1993.

PITTMAN, D. D.; MARQUETTE, K. A.; KAUFMAN, R. J. Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4214–25, 15 dez. 1994.

POWELL, J. S. Recombinant factor VIII in the management of hemophilia A: current use and future promise. **Ther Clin Risk Manag**, v. 5, n. 2, p. 391–402, 2009.

REITZER, L. J.; WICE, B. M.; KENNEL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 8, p. 2669–76, 25 abr. 1979.

RODRIGUES, M. E. et al. Comparison of commercial serum-free media for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production. **International journal of pharmaceuticals**, v. 437, n. 1-2, p. 303–5, 1 nov. 2012.

RODRIGUES, M. E. et al. Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 4, p. 1279–91, fev. 2013.

RUOSLAHTI, E.; REED, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 477–8, 20 maio 1994.

SANDBERG, H. et al. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 5, p. 808–817, 2012a.

SANDBERG, H. et al. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. **Thrombosis research**, v. 130, n. 5, p. 808–17, nov. 2012b.

SCHAUB, R. G. Recent advances in the development of coagulation factors and procoagulants for the treatment of hemophilia. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 2, p. 91–98, 2011.

SENA-ESTEVES, M. et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. **Journal of virological methods**, v. 122, n. 2, p. 131–9, 15 dez. 2004.

SERRATO, J. A. et al. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 47, n. Pt 2, p. 113–24, jun. 2007.

SINACORE, M. S. et al. CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins. **Biotechnology and bioengineering**, v. 52, n. 4, p. 518–28, 20 nov. 1996.

SPENCER, H. T. et al. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Mol Ther**, v. 19, n. 2, p. 302–309, 2011.

STONEBRAKER, J. S. et al. A study of reported factor VIII use around the world. **Haemophilia**, v. 16, n. 1, p. 33–46, 2010.

SUN, X. et al. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 11, p. 843–8, jun. 2006.

SWIECH, K. et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII - 1472-6750-11-114.pdf. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 114, jan. 2011.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein expression and purification**, v. 84, n. 1, p. 147–53, jul. 2012.

TOOLE, J. J. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 342–347, 1984.

TOOLE, J. J. et al. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 16, p. 5939–5942, 1986.

UCHIDA, N. et al. Optimal conditions for lentiviral transduction of engrafting human CD34+ cells. **Gene therapy**, v. 18, n. 11, p. 1078–86, nov. 2011.

VALENTINO, L. A. et al. The first recombinant FVIII produced in human cells - an update on its clinical development programme. **Haemophilia**, v. 20, n. s1, p. 1–9, jan. 2014.

VAN DER VALK, J. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 18, n. 1, p. 1–12, fev. 2004.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 4, p. 1053–63, jun. 2010.

VEHAR, G. A. et al. Structure of human factor VIII. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 337–342, 1984.

WINGE, S. **Method for isolation of recombinantly produced proteins**, 2006.

WINGE, S. et al. Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line. **Protein expression and purification**, v. 115, p. 165–75, nov. 2015.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004.

ZANG, M. et al. Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 13, n. 4, p. 389–92, abr. 1995.

ZHANG, F. et al. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable

transgene expression in hematopoietic cells. **Blood**, v. 110, n. 5, p. 1448–57, 1 set. 2007.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, 2012.

ZIELKE, H. R.; ZIELKE, C. L.; OZAND, P. T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. **Federation proceedings**, v. 43, n. 1, p. 121–5, jan. 1984.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Valores de quantidade de células viáveis, concentração celular (cels/mL), viabilidade (%), tempo de duplicação (T_D) e atividade do FVIIIr pelo ensaio cromogênico (UI/mL) dos experimentos com as linhagens celulares SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1.

Tabela A1: Análise da cinética de crescimento celular e produção do FVIIIr das linhagens aderentes SK-HEP-F8/Neo-E1 e SK-HEP-F8/GFP-E1.

Tempo (h)	SK-HEP-F8/Neo-E1		SK-HEP-F8/GFP-E1	
	Células viáveis	Atividade do FVIIIr (UI/mL)	Células viáveis	Atividade do FVIIIr (UI/mL)
0	2E+05	0	2,00E+05	0
24	4E+05	0.064	3.2E+05	0.049
48	1.35E+06	0.437	1.4E+06	0.153
72	3.09E+06	1.01	1.5E+06	0.203
96	2.4E+06	1074	3E+06	0.475
120	2.4E+06	0.921	2.4E+06	0.597
144			3E+06	0.783
168			1.5E+06	0.638

Tabela A2: Análise do crescimento e tempo de duplicação da linhagem SK-HEP-F8/Neo-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB.

SK-HEP-F8/Neo-E1		
Passagem	Células viáveis	Tempo de duplicação (h)
1	2,70E+06	41,87
2	2,60E+06	43,53
3	1,90E+06	64,79
4	3,00E+06	37,86
5	2,50E+06	45,39
6	2,00E+06	60
7	2,00E+06	60
8	2,50E+06	45,39

Tabela A3: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante adaptação gradual aos meios SFMII e Freestyle em garrafas estáticas

Passagem	SFMII			Freestyle		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	1,05E+06	86	39	2,88E+06	93	39
2	9,75E+05	86	53	2,19E+06	98	53
3	1,95E+06	77	46	2,46E+06	97	46
4	9,25E+05	82	37	3,04E+06	99	37
5	4,86E+06	83	41	2,75E+06	96	41
6	1,03E+06	85	41	2,79E+06	99	41
7	1,24E+06	85	62	1,95E+06	99	62
8	1,21E+06	57	27	4,58E+06	98	27
9	1,81E+06	70	23	5,98E+06	97	23
10	1,93E+06	70	39	2,90E+06	96	39
11	9,25E+05	76	0	9,13E+05	88	0
12	4,00E+05	70	0	3,50E+05	89	0

Tabela A4: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante adaptação gradual aos meios CDM4 e CD293 em garrafas estáticas

Passagem	CDM4			CD293		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	2,39E+06	84	48	9,13E+05	90	0
2	2,00E+06	98	60	1,06E+06	93	686
3	2,20E+06	97	53	7,63E+05	81	0
4	3,25E+06	80	35	8,88E+05	81	0
5	1,98E+06	95	61	2,65E+06	79	43
6	2,10E+06	97	56	7,13E+05	77	0
7	2,59E+06	94	44	1,03E+05	60	0
8	4,06E+06	95	30	6,25E+04	31	0
9	4,41E+06	94	28			
10	2,75E+06	90	41			
11	9,38E+05	85	0			
12	3,75E+05	69	0			

Tabela A5: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens durante a adaptação gradual aos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS e Glutamax em garrafas estáticas.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	4,00E+06	96	30	4,60E+06	97	30	4,60E+06	96	30
2	4,00E+06	96	30	4,00E+06	96	30	4,00E+06	96	30
3	4,68E+06	97	27	3,74E+06	97	32	5,20E+06	94	25
4	2,24E+06	98	52	3,24E+06	98	35	2,01E+06	98	59
5	2,65E+06	96	43	3,15E+06	96	36	3,86E+06	96	31
6	3,53E+06	98	33	3,71E+06	98	32	3,15E+06	98	36
7	3,24E+06	95	35	2,48E+06	96	46	2,03E+06	96	59
8	3,55E+03	98	33	3,48E+06	96	33	2,63E+06	97	43
9	4,76E+06	97	27	4,28E+06	98	29	4,00E+06	99	30
10	1,11E+06	87	390	1,18E	94	258	1,01E+06	89	3348
11	1,00E+06	63	0	1,00E+06	63	0	1,00E+06	67	0

Tabela A6: Análise do crescimento e viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação ao meio SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos erlenmeyer.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4	
	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)
1	1,09E+06	92	75	4,00E+05	90	0	4,80E+05	93
2	7,10E+05	96	166	1,10E+06	98	52,7	4,20E+05	80
3	5,35E+05	94	861	9,00E+05	91	70,8	4,00E+05	91
4	8,27E+05	96	116	8,50E+05	95	78,4	4,00E+05	92
5	9,48E+05	95	91	7,00E+05	95	123,6	2,00E+05	20
6	1,60E+06	95	50	5,00E+05	99	0		
7	7,08E+05	98	167	4,50E+05	90	0		
8	4,98E+05	95	0	1,60E+05	42	0		
9	1,17E+06	95	68	1,00E+04	25	0		
10	8,81E+05	97	103					
11	7,78E+05	95	132					
12	4,26E+05	90	0					
13	4,67E+05	86	0					
14	6,80E+05	66	189					
15	3,03E+05	55	0					
16	3,60E+05	56	0					

Tabela A7: Análise do crescimento e viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação aos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS e Glutamax em garrafas estáticas

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	6,20E+06	98	193,3	8,00E+06	97	88,5	7,20E+06	98	114,1
2	4,70E+06	93	0	7,60E+06	95	99,3	5,60E+06	98	367
3	3,60E+06	81	0	3,00E+06	66	0	5,00E+06	90	0
4	5,00E+06	50	126,6				5,50E+06	86	436,4
5	4,60E+06	56	0				4,90E+06	86	0
							1,00E+06	43	0

Tabela A8: Análise do crescimento e viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/Neo-E1 ao longo das passagens de adaptação aos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS e Glutamax Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer*.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)
1	3,00E+05	92	0	4,00E+05	75	0	7,70E+05	95	96,3
2	3,50E+05	94	0	4,50E+05	92	0	5,10E+05	89	0
3	9,00E+05	85	70,8	6,50E+05	84	158,5	6,00E+05	87	228,1
4	4,20E+05	86	0	5,60E+05	78	367	4,00E+05	43	0
5	6,00E+05	84	228,1	3,60E+05	65	0			
6	4,80E+05	80	0	1,00E+05	65	0			
7	4,60E+05	76	0	2,60E+05	65	0			
8	2,00E+05	78	0	2,00E+04	60	0			
9	1,60E+05	58	0	100	23	0			

Tabela A9: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação da linhagem SK-HEP-F8/GFP-E1 nas condições de cultivo padrão em D-MEM 10% de SFB.

SK-HEP-F8/GFP-E1		
Passagem	Células viáveis	Tempo de duplicação (h)
1	2,00E+06	60
2	2,00E+06	60
3	1,90E+06	64,8
4	3,00E+06	37,9
5	3,90E+06	30,6
6	3,30E+06	34,8
7	3,14E+06	36,3
8	2,80E+06	40,4

Tabela A10: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação aos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS e Glutamax Pluronic F68 e CellBoost 5 em garrafas estáticas.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	3,50E+06	96	33,2	1,10E+06	75	436,4	2,70E+06	82	41,9
2	1,00E+06	83	0	3,00E+06	83	37,9	1,00E+06	83	0
3	3,00E+06	60	37,9	3,00E+06	60	37,9	3,00E+06	65	37,9
4	2,90E+06	62	40,4	2,90E+06	60	39,1	2,90E+06	65	39,1
5	2,80E+06	98	36,8	2,60E+06	98	43,5	3,00E+06	98	37,9
6	3,10E+06	78	37,9	2,80E+06	79	40,4	3,00E+06	78	37,9
7	3,00E+05	40	0	2,00E+05	20	0	7,50E+05	42	0
8	2,00E+05	30	0	2,00E+05	20	0	2,00E+05	32	0

Tabela A11: Análise do crescimento e viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação aos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com ITS e Glutamax Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer*.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)
1	4,80E+05	93	0	4,60E+05	96	0	7,80E+05	86	39,5
2	4,20E+05	80	0	3,70E+05	72	0	6,30E+05	92	180
3	4,00E+05	91	0	5,00E+05	90	0	5,70E+05	76	317,4
4	5,00E+05	96	0	5,00E+05	64	0	5,00E+05	95	0
5	7,00E+05	93	123,6	1,20E+02	20	0	8,30E+05	94	82,1
6	2,20E+05	55	0				3,00E+05	70	0
7	6,50E+05	60	158,5				3,00E+05	42	0
8	1,70E+05	46	0						

Tabela A12: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens para retirada gradual do SFB nos meios SFMII, Freestyle e CDM4 suplementados com 10% de SFB em garrafas estáticas.

Passagem	SFMII			Freestyle			CDM4		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	8,00E+06	90	30	4,80E+06	94	47,5	5,10E+06	95	44,4
2	4,00E+06	79	60	3,60E+06	88	70,8	3,90E+06	8	62,3
3	2,50E+06	74	186,4	3,00E+06	73	102,6	2,00E+06	60	0
4	1,50E+06	60	0	2,00E+06	65	0	5,00E+05	40	0
5	6,00E+05	30	0	8,00E+05	40	0	2,00E+05	20	0

Tabela A13: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta aos meios SFMII e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax e CellBoost 5 em cultura estática.

Passagem	SFMII			CDM4		
	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis	Viabilidade (%)	Td (h)
1	4,20E+06	92	0	5,00E+06	88	0
2	1,80E+06	78	0	4,50E+06	92	0
3	3,60E+06	80	60	8,60E+06	47	64,2
4	5,00E+06	86	126,6	5,00E+05	20	0
5	4,00E+06	77	0			

Tabela A14: Análise do crescimento, viabilidade e tempo de duplicação das células SK-HEP-F8/GFP-E1 ao longo das passagens de adaptação direta aos meios SFMII e CDM4 suplementados com ITS, Glutamax, Pluronic F68 e CellBoost 5 em frascos *erlenmeyer*.

Passagem	SFMII			CDM4		
	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)	Td (h)
1	7,00E+05	98	123,6	7,40E+05	96	106,1
2	5,00E+05	96	0	5,00E+05	95	0
3	7,00E+05	93	123,6	8,30E+05	94	82,1
4	2,20E+05	55	0	3,00E+05	70	0
5	6,50E+05	60	158,5	3,00E+05	42	0
	1,70E+05	46	0	2,80E+02	12	0

Tabela A15: Análise da cinética de crescimento e viabilidade da linhagem SK-HEP-sus-E2 adaptada para o cultivo em meio SFMII livre de SFB em frascos erlenmeyer.

SK-HEP-sus-E2		
Passagem	Células viáveis (Cels/mL)	Viabilidade (%)
1	5,00E+05	94.31
2	7,23E+05	94.62
3	1,14E+06	96.94
4	1,53E+06	97.33
5	1,68E+06	96.46
6	1,80E+06	97.55
7	1,65E+06	97.61
8	1,73E+06	96.74
9	1,93E+06	96.68
10	1,60E+06	96.33
11	1,49E+06	96.97
12	1,54E+06	96.49
13	1,52E+06	95