UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial de crescimento e produção de proteínas recombinantes de células humanas adaptadas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Rafael Tagé Biaggio

Orientadora: Profa. Dra. Kamilla Swiech

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 29/10/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

RESUMO

BIAGGIO, R. T. **Avaliação do potencial de crescimento e produção de proteínas recombinantes de células humanas adaptadas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.** 2018. 178f Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Linhagens celulares humanas tem despertado interesse como plataformas de produção de proteínas terapêuticas recombinantes por sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas e de modo similar à humana, sem gerar epítomos imunogênicos como ocorre com proteínas produzidas em células de mamíferos. Para a produção de uma proteína com correta qualidade terapêutica, as agências regulatórias recomendam processos livres de componentes animais de modo a evitar contaminação com vírus e príons. Deste modo, esse trabalho visa a produção do fator VII da coagulação sanguínea recombinante (FVIIr) utilizada no tratamento de hemofílicos com inibidores em células humanas adaptadas para meios de cultura livres de soro fetal bovino. As linhagens humanas SK-Hep-1, HKB-11 e Huh-7 foram adaptadas para suspensão e meios livres de soro fetal bovino (SFB). Essas células adaptadas foram transfectadas de forma transiente com o vetor lentiviral p1054-GFP e o reagente polietilenimina. No entanto, a baixa eficiência de transfecção nas células SK-Hep-1 e Huh-7 mostraram que essas linhagens são difíceis de transfectar por esse método, e mesmo a transfecção da célula HKB-11 só foi possível após a variação de alguns parâmetros, resultando em uma transfecção de 49,5% de células HKB-11 GFP-positivas. Desta forma, a expressão estável foi avaliada e as células adaptadas foram transduzidas com um ciclo de lentivírus (MOI = 1) contendo o vetor p1054-FVII. Foram observadas porcentagens de células GFP-positivas acima de 35% nas três linhagens celulares humanas modificadas. As células transduzidas foram submetidas a dois processos de *sorting* por citometria de fluxo, no qual a população obtida apresentava mais de 90% de células GFP-positivas. As três células foram avaliadas com relação à expressão de FVIIr após a adição de vitamina K no cultivo, no entanto, não foi possível detectar níveis de FVIIr no sobrenadante de 48 horas do cultivo dessas células pelo teste ELISA. As células foram transduzidas com um segundo ciclo de lentivírus (MOI = 2). A quantificação por ELISA do sobrenadante de 48 horas de cultivo das três células detectou 240,96 ng/mL, 217,42 ng/mL e 78,46 ng/mL de FVII total, respectivamente, nos cultivos das células HKB-11-F7-2C, SK-Hep-1-F7-2C e Huh-7-F7-2C. A expressão relativa de RNA mensageiro por RT-PCR também foi observada nos três cultivos. Paralelamente, foi analisado o proteoma das três células adaptadas e não-adaptadas em triplicata sendo identificadas de forma abundante proteínas do citoesqueleto, do metabolismo celular, da síntese, enovelamento e degradação de proteínas, relacionadas à apoptose, ao ciclo celular e ao crescimento, proteínas contra estresse oxidativo e osmótico, com ação antioxidante, entre outras.

Palavras-chave: Células humanas, adaptação celular, meios de cultura livres de soro fetal bovino, fator VII da coagulação, hemofilia, cultura em suspensão, proteína recombinante.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas recombinantes terapêuticas e sistemas de expressão

Proteínas recombinantes terapêuticas são proteínas produzidas pela tecnologia do DNA recombinante que visam, na maioria das vezes, compensar a deficiência ou falta de uma proteína importante para o funcionamento do organismo (BERLEC e STRUKELJ, 2013). Estas proteínas estão inseridas na classe dos biofármacos, produtos terapêuticos ou de diagnóstico que utilizam células e/ou seus componentes no processo produtivo.

Desde a aprovação da primeira proteína recombinante terapêutica em 1982 pela agência americana Food and Drug Agency (FDA), a insulina recombinante humana (Humulin®R, Eli Lilly), o mercado biofarmacêutico encontra-se em expansão. Desde então, mais de 140 proteínas recombinantes foram aprovadas pelas agências regulatórias. Moléculas para o tratamento de doenças autoimunes, hematológicas, metabólicas, genéticas, entre outras (RADER, 2013; WALSH, 2014, DUMONT et al., 2015). Um levantamento realizado em 2014 mostrou que hormônios, anticorpos monoclonais (AcM) e fatores de crescimento são as classes com número de produtos aprovados desde 1982, com 22, 22 e 13 produtos aprovados, respectivamente. No entanto, os AcM são responsáveis pelo maior crescimento no período de 2010 a 2014, mostrando o aumento do interesse nessa molécula, sendo usada principalmente no tratamento de doenças autoimunes (WALSH, 2014). Além das novas moléculas, outro setor em expansão é o mercado de biosimilares. Estima-se que este mercado pode chegar a \$ 26 bilhões em 2020, sendo esperado um crescimento de 49,5% entre 2015 e 2020 (PETERS, 2016). As proteínas recombinantes terapêuticas podem ser produzidas por diferentes sistemas de expressão, cada um apresentando suas próprias vantagens e desvantagens. Dentre os sistemas disponíveis encontram-se as bactérias, leveduras, células de inseto, de mamíferos (incluindo células humanas), células vegetais, plantas e animais transgênicos. Outra opção recente é a produção em sistemas livres de célula, onde lisados celulares, aminoácidos e ATP são utilizados para produzir proteínas de difícil expressão ou citotóxicas para as células (CHONG, 2014; THORING et al., 2017). A escolha do sistema de expressão vai depender de fatores como velocidade específica de crescimento da célula, adaptação aos meios livres de

soro e em suspensão, nível de expressão e produção do gene de interesse, facilidade em isolar os clones produtores, estabilidade da linhagem na ausência do agente de seleção, susceptibilidade ao escalonamento, habilidade de realizar modificações pós-traducionais corretas, elevada produtividade específica da proteína terapêutica, dentre outros fatores (BERKNER, 1993, DUROCHER e BUTLER, 2009, WALSH, 2010, KUNERT e REINHART, 2016).

As características mais relevantes dos principais sistemas de expressão utilizados para produção de proteínas recombinantes terapêuticas encontram-se apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Comparação das principais características dos sistemas de expressão que estão sendo utilizados para produção de proteínas recombinantes terapêuticas.

	Bactéria	Levedura	Células de Plantas	Células de Inseto	Células de Mamíferos Murinas Humanas	
Crescimento celular	Rápido ($t_d \sim 30$ min)	Rápido ($t_d \sim 30$ min)	Moderado ($t_d \sim 18-24$ h)	Moderado ($t_d \sim 18-24$ h)	Lento ($t_d \sim 24$ h)	
Requerimentos nutricionais e custo do meio	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Alto	
Risco de contaminação do processo/produto	Alto (endotoxinas)	Baixo	Baixo	Baixo	Alto (viral)	
Modificação gênica	Fácil e bem estabelecida	Fácil e bem estabelecida	Moderada a fácil	Moderada	Moderada e bem estabelecida	
Expressão da proteína de interesse	Frequentemente em corpos de inclusão	Extracelular	Extracelular	Intra e Extracelular	Extracelular	
Rendimento	Alto	Alto	Moderado a baixo	Alto	Moderado a alto	
Modificações pós traducionais	Ausente	Glicosilação com alto teor de manose	Glicosilação com glicoformas específicas de plantas Não realizam sialilação	Glicosilação com glicoformas específicas de insetos. Alto teor de manose ou paucimanose Não realizam sialilação	Glicosilação semelhante à humana. Presença de possíveis resíduos imunogênicos	Glicosilação humana
Enovelamento da proteína	Re-enovelamento usualmente necessário	Re-enovelamento usualmente necessário	Adequado	Adequado	Adequado	Adequado
Custo do processo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado	Alto	Alto

Fonte: Elaborado pelo autor baseado em Walsh, 2010; Ghaderi et al., 2012; Zhu, 2012; Gomes et al., 2016; t_d : tempo de duplicação.

Dentre os sistemas mais utilizados, *Escherichia coli*, leveduras e células de mamíferos representaram a maior parte de todas as aprovações das proteínas recombinantes terapêuticas e correlatos (WALSH 2014, DUMONT et al., 2015; SANCHEZ-GARCIA et al., 2016). Em 2010, foram produzidas cerca de 26,4 toneladas de proteína recombinantes, sendo que 68% do total foram produzidos em sistemas bacterianos enquanto 32% foram produzidos em células de mamíferos (WALSH, 2014). Apesar de perderem um pouco do espaço para outros sistemas durante os anos, os sistemas bacterianos ainda são responsáveis pela produção de cerca de 30% dos biofármacos (SANCHEZ-GARCIA et al., 2016). Os sistemas bacterianos, onde destaca-se a *Escherichia Coli*, são fáceis de cultivar, transformar, não exigem meios complexos para o cultivo e produzem rapidamente proteínas em grande quantidade. No entanto, não são capazes de produzir proteínas complexas com diferentes modificações pós-traducionais (MPT).

As proteínas recombinantes terapêuticas, em sua maioria, necessitam de MPT para serem corretamente enoveladas, exercerem sua atividade biológica, reconhecerem ligantes, participarem da sinalização celular, interferirem no tempo de meia-vida, serem solúveis e estáveis, e aumentarem ou reduzirem a imunogenicidade da molécula (DUROCHER e BUTLER, 2009; WALSH, 2010; ALTAMIRANO et al., 2013; BERLEC e STRUKELJ, 2013; PICANÇO-CASTRO et al., 2013). As modificações pós-traducionais mais comuns são: N e O-glicosilação, γ -carboxilação, β -hidroxilação, fosforilação, pontes dissulfeto, proteólise, O-sulfatação, amidação, acilação, acetilação e ADP-ribosilação (DUROCHER e BUTLER, 2009; WALSH e JEFFERIS, 2006; BERLEC e STRUKELJ, 2013). No entanto, apenas algumas MPT são associadas as proteínas recombinantes, visto que modificações como fosforilação e ADP-ribosilação são mais comuns na regulação de processos intracelulares (WALSH e JEFFERIS, 2006). A glicosilação é a mais comum e mais complexa MPT encontrada tanto nas proteínas nativas como nas recombinantes, uma vez que cerca de 50% das proteínas humanas são glicosiladas (WALSH e JEFFERIS, 2006). Sua elevada complexidade ocorre pelo envolvimento de mais de 250 produtos gênicos no processo metabólico de glicosilação (GORETA et al., 2012, BUTLER e SPEARMAN, 2014). A glicosilação pode alterar de forma significativa a heterogeneidade da molécula pela inserção de diferentes oligossacarídeos, sendo um ponto importante para a manutenção da qualidade das proteínas, sua

reprodutibilidade e purificação (WALSH e JEFFERIS, 2006; BUTLER e SPEARMAN, 2014; MEURIS et al., 2014).

Sistemas de expressão mais complexos, como células de mamíferos, são capazes de produzir proteínas complexas, com adequadas MPT. No entanto, exigem meios de cultura mais complexos, controles mais rigorosos, e apresentam menor produtividade devido a sua complexa maquinaria celular. Dentre as diversas células de mamíferos, destacam-se as células de ovário de hamster chinês (CHO), responsáveis pela produção de cerca de 70% das proteínas recombinantes terapêuticas (KIM et al., 2012; BUTLER e SPEARMAN, 2014). O ativador do plasminogênio tecidual, primeiro biofármaco recombinante aprovado pelas agências regulatórias em 1986, foi produzido em células CHO e desde então, com a otimização desta célula foi possível obter de 1 a 10 g/L de anticorpos monoclonais (DUMONT et al., 2015). Devido a sua extensa caracterização e habilidade de produzir proteínas recombinantes de alta complexidade, a célula CHO tem maior aceitação perante as agências regulatórias (SWIECH et al., 2012; BUTLER e SPEARMAN, 2014). Um levantamento mostrou que cerca de 75% do total das publicações científicas na base de dados da livreria nacional americana de medicina (PubMed) referentes a expressão de proteínas recombinantes contem a célula CHO. Mesmo nos últimos dez anos, a célula CHO ainda foi utilizada em 73,3% das publicações científicas, seguida da célula humana HEK293, presente em 14,6% dos trabalhos (KUNERT e REINHART, 2016). Outras células de mamíferos (não-humanas) de destaque são o mieloma tipo linfoblastóide murino (NS0 e SP2/0-Ag14) e a células de rim de hamster neonato (BHK). Estas células, apesar de serem não humanas, tem sido utilizadas para produção de diversos produtos com propriedades terapêuticas aceitáveis perante as agências regulatórias, como o tPA, fator IIa, VII, VIII e IX da coagulação, anticorpos monoclonais, eritropoietina e diferentes tipos de hormônios (WALSH, 2014). Apesar de serem bem caracterizadas e possuírem um histórico de aprovações pelas agências regulatórias, as células murinas apresentam algumas desvantagens dependendo do tipo de proteína a ser expressa e da natureza da doença a ser tratada. Um exemplo dessa desvantagem foi reportado para a célula CHO, que γ -carboxila proteínas dependentes de vitamina K de forma ineficiente, não sendo, portanto, um sistema de expressão adequado para este tipo de proteína (BERKNER, 1993). Outro exemplo refere-se a formação de anticorpos anti-Neu5Gc, um tipo de ácido siálico denominado ácido N-glicililneuramínico e que

não é produzido por células humanas. A formação desses anticorpos podem levar a rápida eliminação do biofarmaco (PADLER-KARAVANI et al., 2008, GHADERI et al., 2010, 2012).

Desta forma, as células humanas apresentam-se como uma plataforma interessante para expressão de diferentes tipos de proteínas que possam desencadear respostas imunológicas devido a presença de MPT não similares as nativas humanas, como ocorre na produção em células murinas.

1.1.1 Células humanas e suas vantagens

A principal limitação do sistema de expressão baseado em células murinas está relacionada às diferenças metabólicas entre estas e as células humanas, sendo que a maquinaria murina não produz certas glicoproteínas de maneira homóloga às nativas humanas. As células murinas não possuem enzimas importantes no processo de glicosilação humano, como a α 2-6 sialiltransferase, α 1-3/4 fucosiltransferase e N-acetilglucosamina transferase. Além de não possuir essas enzimas humanas, as células murinas produzem dois epítomos altamente imunogênicos: Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R (α -Gal) e o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Esses dois epitopos são produzidos por enzimas que são inativas em humanos, no caso a α 1,3-galactosiltransferase, que produz o epítomo α -Gal, e a enzima ácido CMP-N-acetilneuramínico hidroxilase, a qual promove a hidroxilação do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), comum em humanos, em ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (PADLER-KARAVANI e VARKI, 2011; GHADERI et al., 2012; BUTLER e SPEARMAN, 2014). Estudos mostraram que todos os humanos possuem uma elevada quantidade de anticorpos anti-Neu5Gc e anti- α -Gal, o que corresponde a cerca de 0,1 a 0,2% e 1% do total de imunoglobulinas circulantes em humanos, respectivamente (PADLER-KARAVANI et al., 2008; GHADERI et al., 2010). Análises de amostras de sangue humano revelaram que a presença dos epítomos imunogênicos α -Gal e Neu5G gera uma resposta policlonal com o desenvolvimento de IgM, IgG e IgA circulantes (PADLER-KARAVANI et al., 2008). Diferentemente do epítomo α -Gal, o ácido Neu5Gc pode ser incorporado nos glicoconjugados das células humanas, apesar da presença de anticorpos policlonais anti-Neu5G circulantes. Desta forma, por ter elevado metabolismo, as células tumorais acumulam o epitopo Neu5Gc nas suas glicoproteínas. Por esses motivos,

é fundamental conhecer a procedência do meio de cultura utilizado, uma vez que a presença de componentes derivados de animais, como o soro fetal bovino contendo xeno-autoantígenos, pode afetar a distribuição de carboidratos pela proteína (PADLER-KARAVANI e VARKI, 2011, GHADERI et al., 2012). Em 2008 Chung e colaboradores avaliaram a imunogenicidade do anticorpo monoclonal glicosilado Cetuximab®, uma imunoglobulina quimérica murina-humana G1 (IgG1), utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer, como o câncer colorretal. Este biofármaco é produzido pela célula murina SP2/0 e por isso contém epítomos do tipo galactose- α -1,3-galactose e Neu5Gc. Os autores observaram que as amostras sanguíneas de 25 dos 76 pacientes apresentaram reatividade para a imunoglobulina E (IgE), responsável por reações de hipersensibilidade. Foram relatados em 17 pacientes IgE circulantes no pré-tratamento e com isso o uso desse biofarmaco, que é administrado via intravenosa por injeção, poderia ocasionar um choque anafilático nesses pacientes altamente responsivos. Em 2010, Ghaderi e colaboradores avaliaram a interação do Cetuximab® produzido em células murinas contra anticorpos anti-Neu5Gc de indivíduos saudáveis, e observaram que houve uma reação específica destes anticorpos contra o antígeno Neu5Gc.

Em 2012, um estudo listou alguns biofármacos que poderiam apresentar contaminação com o ácido siálico imunogênico Neu5Gc, dentre eles: Herceptin®, Humira®, Refacto®, Helixate® e Kogenate®, produzidos em células CHO; NovoSeven® produzido em BHK; Remicade®, Erbitux® e Zenapax®, produzidos em células Sp2/0 (GHADERI et al., 2012). Dentre todas as moléculas apresentadas, as duas com menor chance de contaminação com esse epítipo imunogênico eram o Xigris®, produzido em células HEK293, e Elaprase®, produzido em HT-1080, ou seja, ambas células humanas.

Como alternativa às células de mamíferos não-humanas, como as células de origem murina, a pesquisa com células humanas tem crescido nos últimos anos devido à correta produção de proteínas sem resíduos imunogênicos. Dentre as células mais relevantes no contexto comercial, destacam-se a HT-1080, PER.C6, CAP-T e HEK-293 (PICANÇO-CASTRO et al., 2013; DUMONT et al., 2015; KUNERT e REINHART, 2016). A linhagem HT-1080 é uma linhagem humana derivada de fibrosarcoma e utilizada pela empresa Shire para produzir 4 proteínas terapêuticas comerciais: Dynepo® (epoetina delta), Elaprase® (idursulfase), Replagal® (alfagalsidase) e VPRIV® (velaglucerase alfa) (SWIECH et al., 2012;

DUMONT et al., 2015). Já a linhagem humana PER.C6 (Crucell Holland BV e DSM Biologics) é uma célula embrionária de retina humana imortalizada com o gene E1 do adenovírus que cresce em suspensão em meios livres de soro e componentes animais. É utilizada para a produção de vacinas, anticorpos monoclonais e enzimas (PAU et al., 2001; JONES et al., 2003; BERDICHEVSKY et al., 2008; TCHOUDAKOVA et al., 2009; KRUIF et al., 2010; ROSS et al., 2012; SANDERS et al., 2013; DUMONT et al., 2015), sendo relatadas produtividades de até 27 g/L de anticorpos monoclonais em sistema de perfusão (KUCZEWSKI et al., 2011). Atualmente, a PER.C6 possui mais de 14 produtos biofarmacêuticos em fase clínica I/II, podendo ser citadas as vacinas para a raiva, tuberculose, malária e HIV, além da produção anticorpos contra artrite reumatóide e esclerose múltipla (DUMONT et al., 2015; GENZEL, 2015). A linhagem CAP é composta por células derivadas de fluido amniótico humano transformada para as funções EA1, E1B, pIX e adaptadas para crescimento em suspensão. Desenvolvida pela CEVEC, podem ser facilmente transfectadas com agentes comerciais e expressam estavelmente altas quantidades de proteínas recombinantes. Vários estudos demonstram seu potencial de produzir proteínas recombinantes e vacinas virais, como contra o vírus influenza (SCHIEDNER et al., 2000, 2008; ESSERS et al., 2011; FISCHER et al., 2012; SWIECH et al., 2012; GENZEL et al., 2013; GENZEL 2015). Apesar de promissoras estas linhagens não encontram-se disponíveis para pesquisas científicas, sendo possível apenas licenças para fins comerciais.

A célula HEK293 é uma linhagem derivada de células embrionárias humanas de rim transformada com os genes do adenovírus E1A e E1B (GRAHAM et al., 1977). Esta linhagem celular humana é provavelmente a mais utilizada para pesquisas relacionadas à expressão de proteínas recombinantes devido ao seu crescimento em suspensão e em meios livres de soro, a facilidade para transfecção transiente através de diferentes métodos e alta produtividade, como descrito em alguns trabalhos na literatura (SUN et al., 2006; ADAM et al., 2008; BACKLIWAL et al., 2008; LOIGNON et al., 2008; WAJIH et al., 2008; SONG et al., 2011; SWIECH et al., 2011; DUMONT et al., 2012; FISCHER et al., 2012; HACKER et al., 2013; KUNERT e REINHART, 2016). Por esses motivos, também é amplamente utilizada para a produção de vetores virais, como adenovírus, retrovírus, lentivírus e vírus adenoassociado, muitos em fase II e III de ensaios clínicos (KIM et al., 2009; HENRY et al., 2011; PETIOT et al., 2011). Devido ao seu grande espectro de uso,

diferentes clones foram isolados para fornecer linhagens com características mais específicas como: facilidade de crescimento em suspensão (HEK293-F); aderência elevada em culturas em monocamadas (HEK293-H); produção elevada de vetores virais (HEK293-T) e elevada velocidade de crescimento (HEK293-EBNA1). A célula HEK293-T é comumente utilizada para produção de vetores retrovirais, como os lentivirus, rotineiramente utilizados para modificar as células de modo permanente com o vetor de interesse (DUMONT et al., 2015). Utilizando as células HEK293, foram desenvolvidos 4 produtos comerciais aprovados pelas agências regulatórias: XIGRIS® (proteína C ativada, Eli Lilly corporation), Alprolix® (fator IX fusionada com a porção Fc do anticorpo; Bioverativ), ELOCTATE™ (factor VIII fusionada com a porção Fc do anticorpo, Bioverativ) e Nuwiq® (factor VIII humano, Octapharma). O XIGRIS® foi desenvolvido para o tratamento de sepse grave e foi aprovado em 2001 pela agência americana *Food and Drugs Agency* (FDA). Essa molécula possui duas MPT que não são realizadas de forma eficaz pela célula CHO, uma clivagem propeptídica e uma γ -carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico, e por isso a célula HEK293 foi escolhida para a produção. No entanto, em 2011 a empresa retirou o produto do mercado, uma vez que não houve um benefício farmacológico na redução da letalidade quando comparada com placebo (DUMONT et al. 2015). O ELOCTATE™ e Alprolix® foram aprovados em 2014 para tratamento da hemofilia A e B, respectivamente. O fator VIII contém seis sítios de sulfatação de tirosina, modificação essa essencial para a funcionalidade da proteína e sua ligação com o fator de von Willebrand. Estudos mostraram que as células humanas expressaram FVIII glicosilado e sulfatado de forma compatível com a proteína presente no plasma (DUMONT et al., 2015). O fator IX, por sua vez, é uma proteína dependente de vitamina K, e como tal, necessita ser γ -carboxilada nos 12 resíduos de Gla para sua correta atividade. Berkner e colaboradores (1993) verificaram que as células HEK293 tem maior capacidade de γ -carboxilação do que as células CHO. Outra vantagem observada pelos estudos é de que as moléculas produzidas em células HEK293 podem apresentar menor imunogenicidade por não apresentar os epitopos imunogênicos α -gal e Neu5Gc. Cerca de 30% e 5% dos pacientes com hemofilia A e B grave, respectivamente, adquirem anticorpos neutralizantes (inibidores) para os biofármacos recombinantes (GHADERI et al., 2012; DUMONT et al., 2015). Estudos clínicos com os fatores VIII e IX produzidos em células HEK293 em fase 1, 2a e 3, no entanto, não observaram formação de inibidores tratados com essas proteínas

recombinantes fusionadas (SHAPIRO et al., 2012; POWELL et al., 2012; MAHLANGU et al., 2014; DUMONT et al., 2015).

No entanto, comparada a outras linhagens, a HEK293 foi reportada como uma célula que forma grandes agregados em biorreatores, o que pode atrapalhar o processo de escalonamento e a produção de proteína recombinantes por meio de transfecção transiente (LIU et al., 2006; MEI et al., 2006; DUROCHER e BUTLER, 2009; ZHU, 2012). Pensando em uma forma de reduzir esses agregados da célula HEK-293, Cho e colaboradores desenvolveram em 2002 uma linhagem fusionada com polietilenoglicol composta pelas células HEK293S e 2B8 (derivada do linfoma de Burkitt's). Os autores visavam unir as características vantajosas de ambas as células, como o crescimento em suspensão em meios livres de SFB, fácil transfecção e expressão de grandes quantidades de proteína da célula HEK293S, juntamente com a eficiente secreção e baixa formação de agregado nos cultivos da célula 2B8 (CHO et al., 2002). Deste modo, foi produzida e patenteada pela Bayer a célula HKB-11 (CHO, 2000), sendo comercializada pela ATCC como CRL-12568™. Alguns trabalhos exemplificam sua elevada capacidade de produção (MEI et al., 2010; FISCHER et al., 2012; TANG et al., 2013, FREITAS et al., 2017). Por ter uma maquinaria de expressão idêntica à humana, glicoproteínas difíceis de expressar pelo seu tamanho e complexidade, como o fator VIII da coagulação, apresentaram níveis de expressão 8 superiores a HEK293 e 30 vezes superiores em relação a BHK-21 (MEI et al., 2006). Em outro estudo, as células HKB-11 apresentaram maior eficiência de transfecção e expressão de interleucina e anticorpos em relação às células 293S (ZHU, 2012). Outras proteínas como IgG, receptor de quinases, TGFβ, IL-4, ICAM-1 também foram expressas com sucesso (CHO et al., 2001; CHO et al., 2002; FISCHER et al., 2012). Em 2017, Freitas e colaboradores compararam a produção do fator VII recombinante (FVIIr) em célula humana HKB-11 e murina BHK-21, esta última usada para produzir o FVIIr comercial. Os autores obtiveram expressão 3,3 vezes superior do fator VII recombinante (FVIIr) em célula HKB-11, assim como 2,6 vezes mais secreção e duas vezes mais atividade biológica quando comparada ao FVIIr produzido pela célula BHK-21. Apesar do potencial, ainda não foram relatados produtos comerciais relacionados a esta célula.

A linhagem celular SK-Hep-1 foi estabelecida em 1971 e sua morfologia foi descrita primeiramente por Fogh e Trempe em 1975. É uma linhagem celular humana imortal, derivada do fluido ascítico de paciente com adenocarcinoma de

fígado. Apesar da localização do tumor, não apresenta características de uma célula hepática como a expressão de proteínas específicas desse tipo celular (albumina, α -fibrinogênio ou γ -fibrinogênio) (TURNER e TURNER, 1980), tratando-se de uma célula de origem endotelial. Outros estudos, no entanto, indicam que a célula SK-Hep-1 possui uma característica de célula mesenquimal, apresentando diversos marcadores clássicos de células mesenquimais (EUN et al., 2014). Em 1998, Herlitschka e colaboradores demonstraram que a linhagem SK-Hep-1 é uma excelente produtora de fator VIII, apresentando níveis de expressão superiores aos obtidos utilizando células CHO. Picanço e colaboradores (2007) realizaram a expressão de fator VIII em linhagens celulares humanas HepG2, 293T, SK-Hep-1 e em linhagem murina (Hepa 1-6) utilizando vetores lentivirais com diferentes promotores e concluíram que os melhores níveis de expressão foram obtidos com o promotor CMV na linhagem celular SK-Hep-1. Freitas e colaboradores (2017) avaliaram a produção de FVII recombinante nesta célula. Os autores obtiveram uma secreção 3 vezes superior de FVIIr em relação a célula BHK-21. A atividade biológica do FVIIr também foi superior na célula humana em comparação à murina, com valores 13,8 vezes mais elevados nas células humanas. A utilização desta célula para produção de proteínas recombinantes terapêuticas comerciais ainda não foi relatada.

A linhagem Huh-7 é derivada de um carcinoma hepatocelular caracterizado por Nakabayashi e colaboradores (1982), os quais procuravam células que mantinham as funções diferenciadas dos tecidos originais e que pudessem ser mantidas em meios quimicamente definidos sem a necessidade da adição de SFB. A Huh-7 possuía esses requisitos, uma vez que produz um grande número de proteínas plasmáticas e enzimas hepato-específicas, sendo uma linhagem de hepatocarcinoma bem diferenciada e não possui características de célula desdiferenciada, como ocorre com a SK-Hep-1 (NAKABAYASHI et al., 1982; WANG et al., 2015). Além disso, foi cultivada em meio RPMI 1640 livre de soro com adição de hidrolisado de lactoalbumina, apresentando duplicação celular superior quando comparada às células cultivadas em meio com soro (NAKABAYASHI et al., 1982). Em 2011, Kausar e colaboradores expressaram transientemente a eritropoietina, uma proteína que contém aproximadamente 40% da sua estrutura formada por carboidratos. Após análise por ELISA, foram obtidos níveis de produção semelhantes aos obtidos com a célula CHO, usualmente utilizada pela indústria para

produção desta glicoproteína. Em 2012, pesquisadores demonstraram que a linhagem Huh-7 pode ser uma alternativa viável a produção do fator de coagulação IX, uma vez que promove a correta γ -carboxilação, fosforilação e sulfatação da proteína, além de possuir naturalmente a maquinaria para expressão da vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR), não sendo necessária sua co-expressão (ENJOLRAS et al., 2012). Em 2015, pesquisadores avaliaram a produção de um fator IX mutado na célula Huh-7 e observaram o aumento da atividade de coagulação quando injetado em ratos (PEROT et al., 2015). Outros estudos demonstraram a produção de vírus e outras proteínas recombinantes nesta célula (NAKABAYASHI et al., 1984; SAINZ & CHISARI, 2006).

A busca de plataformas alternativas para produção de proteínas recombinantes menos imunogênicas, com correta qualidade terapêutica e economicamente viáveis é de grande interesse para a indústria. Neste sentido, nosso grupo tem focado em desenvolver plataformas de expressão de proteínas recombinantes em células humanas, como a produção do FVIII recombinante em célula humana SK-Hep-1, trabalho que gerou a patente US 8,969,041 B2 (DE SOUZA RUSSO CARBOLANTE et al., 2015) e do fator VII recombinante, trabalho que gerou a patente WO 2016/187683 A1 (COVAS et al., 2016). Além das patentes, outros trabalhos foram desenvolvidos com células humanas como a SK-Hep-1, a HKB-11, a HepG2 e a HEK293 (AMARAL et al., 2016; BIAGGIO et al., 2015; CARON et al., 2015; CASTILHO-FERNANDES et al., 2011; DE SOUSA BOMFIM et al., 2016; FANTACINI et al., 2016; FREITAS et al., 2017, PICANÇO-CASTRO et al., 2007; ROSA et al., 2012, SWIECH et al., 2011).

No entanto, não apenas o tipo de sistema de expressão é de extrema importância, mas também o meio de cultura no qual essas células serão cultivadas, uma vez que a composição do meio pode alterar significativamente o perfil de glicosilação da proteína dependendo dos componentes da formulação.

1.2 Cultivos em meios livres de soro fetal bovino e em suspensão

Diferentemente de um cultivo com microorganismos ou células de inseto, o cultivo de células de mamíferos exige condições rigorosas devido a sua complexa maquinaria celular. Para o cultivo adequado dessas células, parâmetros importantes devem ser avaliados como a escolha dos meios de cultura específicos para cada

linhagem, tipo de cultivo em monocamada ou em suspensão, controle das condições ambientais, como quantidade de oxigênio, CO₂, acidez e alcalinidade do meio, possíveis efeitos de tensão de cisalhamento e estresse mecânico, entre outros. A escolha correta do meio de cultura é um passo crítico para uma produção eficiente da proteína terapêutica de interesse, com elevado crescimento celular, perfil de glicosilação correto e facilidade na etapa de purificação. Espera-se que o meio de cultura escolhido supra as células com fontes de carbono e nitrogênio, fatores hormonais, proteínas que transportam hormônios, sais minerais, vitaminas e elementos traço, lipídeos, fatores de adesão e espalhamento, fatores de estabilização de pH, surfactantes contra as tensões de cisalhamento, entre outros (PRICE e GREGORY, 1982; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER et al., 2010; van der VALK et al., 2010; BUTLER e SPEARMAN, 2014).

As células de mamíferos são tradicionalmente cultivadas em meios de cultura basais, ou seja, meios com requisitos básicos para a sobrevivência de qualquer célula, suplementados com derivados humanos ou animais visando aumentar a viabilidade e produtividade das células. Dentre os suplementos mais usados, destaca-se o soro fetal bovino (SFB), que é um suplemento rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, hormônios, fatores de crescimento, proteínas, dentre outros fatores que auxiliam na manutenção, sobrevivência e duplicação celular. Devido a sua alta carga de nutrientes, a adição de SFB ao meio basal padrão permite que este seja usado para diversas linhagens celulares, que terão suas necessidades nutricionais supridas pelo suplemento (PRICE e GREGORY, 1982; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER et al., 2010). Além disso, alguns componentes do soro como a albumina podem ser utilizados como excipientes e estabilizadores da formulação final da proteína recombinante. Porém, a partir da década de 70 e 80, com o advento da transmissão de hepatite B, C e o vírus da HIV, iniciou-se uma discussão sobre o uso de derivados humanos, tanto para a produção de concentrados do sangue como para o uso em meios de cultura. Em seguida, a encefalopatia espongiforme bovina, a doença de Creutzfeld-Jakob e a febre aftosa alertaram sobre os riscos do uso de componentes de origem animal como o SFB na produção de proteínas recombinantes terapêuticas. Posteriormente, outros agentes adventícios preocuparam quanto à possibilidade de transmissão, como o vírus da hepatite A e o parvovírus humano B19. Apesar dos avanços nos processos de detecção e eliminação ou inativação desses vírus dos produtos biofarmacêuticos, a

possibilidade de surgimento de novas cepas virais pode comprometer a qualidade e segurança desses produtos. Visando sanar o risco de transmissão de agentes infecciosos (príons, vírus, bactérias, fungos e micoplasma), a comunidade científica focou no desenvolvimento de bioprocessos livres de derivados animais. Do ponto de vista econômico, o SFB, apesar de ser capaz de promover o crescimento de um vasto número de linhagens celulares, é extremamente dispendioso e dificulta o processo de purificação da proteína de interesse, uma vez que possui um alto número de proteínas na sua composição, como albumina, imunoglobulinas, antitripsina, transferrina, fibronectina, fator de crescimento epidérmico, dentre outros. Além disso, apesar de ser regularmente suplementado no meio de cultura basal na concentração de 5 a 20% (v/v), seu preço unitário costuma ser superior ao de meios de cultura quimicamente definidos em muitos casos. Do ponto de vista da qualidade do produto, o SFB possibilita a incorporação do resíduo imunogênico Neu5Gc nas proteínas expressas por células cultivadas em meios suplementados com tal produto, além de inserir uma alta variabilidade no processo devido a sua composição desconhecida e diferenças entre lotes e fornecedores. Pelo aspecto ético, o método de extração do SFB, por punção cardíaca, pode levar ao sofrimento do feto, que é sacrificado para a obtenção do produto. Desta forma, a remoção do soro fetal bovino ou qualquer outro componente derivado de animais do bioprocessos é recomendado pelas agências regulatórias (VAN DER VALK et al., 2010; GHADERI et al., 2012; PICANÇO-CASTRO et al., 2013; DUMONT et al., 2015; SHUKLA e ARANHA, 2015).

Visando estabelecer processos mais robustos e de acordo com as normas estabelecidas pelas agências regulatórias, as indústrias biofarmacêuticas e a comunidade científica focaram em produzir meios quimicamente definidos para diferentes linhagens celulares levando em consideração as características metabólicas específicas de cada célula. Desta forma, atualmente existem diferentes meios de cultura livres de SFB e quimicamente definidos contendo todos os componentes necessários ao crescimento celular de uma linhagem específica. . Deste modo, vários estudos utilizaram processos e/ou meios de cultura livres de SFB para produzir diversas proteínas recombinantes (ADAM et al., 2008; LOIGNON et al., 2008; MEI et al., 2010; KRUIF et al., 2010; SWIECH et al., 2011; CASADEMUNT et al., 2012; FISCHER et al., 2012; ROSS et al., 2012; SANDERS et al., 2013; SEO et al., 2013; MCCUE et al., 2015).

Além da remoção do soro, outro processo importante na produção de uma proteína recombinante terapêutica de qualidade e em larga escala é a adaptação das células para cultivos em suspensão. Células que crescem ancoradas a um substrato ficam limitadas a área superficial do sistema de cultivo, seja este uma garrafa de poliestireno ou um microcarregador. Uma célula adaptada para suspensão não necessita de substrato para crescer, de modo que o processo de produção torna-se volumétrico e não superficial, sendo capaz de atingir elevadas concentrações celulares. Essa característica permite o fácil escalonamento do cultivo em biorreatores de dezenas a milhares de litros (WURM, 2004; FRESHNEY, 2005; CHICO et al., 2008; DUROCHER e BUTLER, 2009; ZHU, 2012; DUMONT et al., 2015).

A adaptação da célula para meios livres de SFB geralmente ocorre pela: i) adaptação direta, na qual a célula previamente tripsinizada é ressuspendida diretamente em meio livre de soro e repicada neste meio por passagens subsequentes; ii) adaptação sequencial, na qual a proporção do meio livre de soro (MLS) é aumentada em 25% a cada passagem, até o cultivo da célula em meio totalmente livre de soro por algumas passagens subsequentes; iii) adaptação pela redução de SFB no meio de cultura padrão, sendo reduzida a suplementação de SFB no meio até o cultivo da célula em meio padrão livre de soro. A adaptação celular para suspensão pode ser realizada inoculando a célula em sistemas agitados como em frascos *spinner* ou *erlenmeyer* por passagens subsequentes até a adaptação. A adaptação celular para suspensão e em meio livre de SFB pode ser realizada concomitantemente ou por etapas. Antes de iniciar a adaptação, é recomendado utilizar as células na fase exponencial de crescimento e com uma viabilidade superior a 90%, uma vez que o processo de adaptação para MLS e suspensão pode gerar dano às células devido à retirada de nutrientes e estresse mecânico, respectivamente (GSTRAUNTHALER, 2003; MORAES et al., 2008; VAN DE VALK et al., 2010; BIAGGIO et al., 2015).

Desta forma, a geração de células adaptadas para suspensão e meios livres de soro fetal bovino é fundamental para um processo de produção que está de acordo com as recomendações das agências regulatórias e que visa a obtenção de maiores quantidades da proteína recombinante de interesse. Neste trabalho, a proteína recombinante de interesse escolhida foi o fator VII da coagulação sanguínea, por ser uma proteína que necessita modificações pós-traducionais

complexa e por estar inserida no desenvolvimento de soluções para o tratamento das hemofílias em colaboração com o Hemocentro de Ribeirão Preto, com o qual o grupo já estabeleceu parceria.

1.3 Coagulação sanguínea e a hemofilia

A hemostasia é a resposta fisiológica normal do corpo para a prevenção e interrupção de sangramentos e hemorragias, preservando o volume de sangue. Para garantir a hemostasia do sangue e interromper os sangramentos, o organismo gera um coágulo sanguíneo formado por plaquetas e fibrina, este último produzido no final da cascata de coagulação. A primeira resposta ao dano tecidual, ou hemostasia primária, ocorre quando o vaso é danificado e moléculas de colágeno presentes na camada subendotelial ficam expostas, promovendo a adesão das plaquetas através do complexo glicoprotéico (Gp) de membrana Ib/IX/V ou da integrina $\alpha_{Ib}\beta_3$ ativada, ambas mediadas pelo fator de von Willebrand. As plaquetas ativadas formam uma monocamada após mudança morfológica, cobrindo o dano tecidual no local da lesão. Outros receptores de adesão colaboram para a sustentação da monocamada plaquetária como a laminina, vitronectina, GpVI e outras formas de integrina. Após a formação da adesão plaquetária, ocorre a liberação do conteúdo de seus grânulos, como íons cálcio, ADP, entre outros, e a ligação de ADP no receptor GpIIb/IIIa altera a conformação do receptor permitindo o depósito de fibrinogênio e a agregação plaquetária. Tanto a adesão como a agregação plaquetária permitem a agregação das plaquetas em monocamada, de forma a interromper a perda de sangue (PALTA et al., 2014; PERIAYAH et al., 2017).

Na hemostasia secundária ocorre a formação de fibrina, molécula que auxilia no estancamento do sangue por depósito sobre o trombo plaquetário. Essa proteína é formada na última etapa da cascata de coagulação, um processo que envolve uma série de reações bioquímicas em cascata que visam ativar pró-enzimas. As 13 proteínas presentes na cascata são denominadas de fatores da coagulação (F), classificadas por números romanos de I a XIII (com exceção ao FVI, que não mais existe). Esses fatores são, em sua maioria, produzidos no fígado (com exceção dos fatores III, IV e VIII) e são serinoproteases (com exceção dos fatores III, V e VIII e XIII) inativas na forma de zimogênios proteolíticos, que quando clivados tornam-se ativos e clivam outras proteínas da cascata da coagulação. No modelo clássico, o

processo de coagulação ocorre por duas vias: a via extrínseca e a via intrínseca. No entanto, esse modelo foi revisado e atualmente a cascata é dividida em quatro etapas: fase de iniciação, fase de amplificação, fase de propagação e fase de estabilização (PALTA et al., 2014). A fase de iniciação ocorre após dano vascular, onde receptores de superfície celular e fatores teciduais (FT, também conhecido como FIII) externos à corrente sanguínea entram em contato com o FVII circulante no sangue para formar o complexo tenase (FT-FVIIa). O FVII também pode ser ativado por trombina (FIIa), pelo fator Xa, IXa e XIIa, e o próprio complexo tenase (THIM et al., 1988). Após a ativação do complexo FT-FVIIa, os fatores FIX e FX são ativados nas proteases FXa e FIXa. O FIXa se adere ao seu cofator (FVIIIa) e juntamente com fosfolípidos de membrana resultam na ativação de mais FX. O FXa formado se liga ao seu cofator (FVa) e a íons cálcio nos fosfolípidos de membrana para formar o complexo protrombinase (FVa-FVIIIa), responsável por ativar a protrombina em trombina (FIIa). No entanto, a formação de trombina por esse processo ocorre de forma menos intensa, podendo ser imediatamente inibida pelo inibidor do fator tecidual (IFT). Desta forma, inicia-se a fase de amplificação, onde a trombina (FIIa) produzida na fase de iniciação promove a produção de mais FIXa e FXa através da ativação dos fatores V e VIII. O acúmulo dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas, permite uma elevada e continuada produção de trombina na fase de propagação em quantidades suficientes para a produção de fibrina e do tampão plaquetário. A trombina converte o fibrinogênio (FI) em monômeros de fibrina (FIa) e ativa o fator XIII (fator estabilizador de fibrina). Na fase de estabilização, o FXIIIa polimeriza de forma covalente os monômeros de fibrina, gerando uma rede estável e insolúvel no tampão plaquetário. Além disso, o FXIIIa realiza uma ligação cruzada da fibrina e fibronectina e essa ao colágeno, estancando o sangramento através da formação do trombo. Após restabelecer o processo de hemostasia, esse coágulo é dissolvido por enzimas fibrinolíticas para evitar trombose (PALTA et al., 2014; PERIAYAH et al., 2017).

A hemofilia ocorre quando um dos fatores relacionados ao processo de coagulação está ausente ou em quantidade deficiente. Como consequência, o paciente pode apresentar um grave quadro clínico hemorrágico, como sangramento intra-articular (hemartrose), hematoma muscular, sangramento mucocutâneo, contraturas de flexão, artrite, doenças nas juntas, dor crônica, atrofia muscular, entre outras (UNIM et al., 2015). Nos casos severos da doença, estima-se uma

expectativa de vida em torno de 16 anos caso o tratamento não seja apropriado (HEDNER, 2015). A hemofilia é uma doença sem cura, mas possui algumas abordagens para o seu tratamento, como será posteriormente abordado.

A hemofilia A, causada pela deficiência do fator VIII da coagulação sanguínea, é a hemofilia com maior número de casos na população. A proporção estimada de hemofilia A varia entre 1 a cada 5.000 a 10.000 nascimentos do sexo masculino. No relatório anual de 2016 da *World Federation Hemophilia* (2017), foram registrados 295.866 pacientes com coagulopatias no mundo, sendo que cerca de 50% destes eram hemofílicos A. Em um levantamento feito pelo Ministério da Saúde em 2015, cerca de 43% dos 22.932 pacientes com coagulopatias eram hemofílicos A, corroborando com a porcentagem internacional. Trata-se de uma doença congênita recessiva que afeta majoritariamente homens, uma vez que está relacionada a uma mutação no cromossomo sexual X (Xq28). O paciente pode tanto produzir uma proteína não-funcional como proteína em baixas quantidades ou não produzir proteína (caso severo). O tratamento ocorre por reposição do fator VIII da coagulação, disponível para ser administrado na forma de derivado do plasma ou recombinante, produzido pela tecnologia do DNA recombinante. Dentre as formas recombinantes utilizadas atualmente, podemos citar Advate® (Shire), Recombinate® e Refacto® (Baxter), Kogenate® e Helixate® (Bayer), Eloctate™ (Bioverativ), Nuwiq® (Octapharma) e recentemente o Hemo-8r (Hemobrás).

A hemofilia B, de maneira semelhante à hemofilia A, é uma doença causada pela mutação no gene X (Xq27.1) responsável pela produção do fator IX, que atua na via intrínseca clássica da coagulação, ativando o fator X. A doença é a segunda maior em casos registrados na população hemofílica com desordens no cromossomo sexual X. Em 2016, foi relatado que cerca de 10% dos pacientes com desordens do sangue eram hemofílicos B (World Federation Hemophilia, 2017). No Brasil, foi registrado em 2015 que 8,5% dos pacientes com coagulopatias eram hemofílicos B (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estima-se que 1 a cada 35.000 a 50.000 nascimento masculinos são portadores da doença. Os efeitos da hemofilia B são os mesmos do fator VIII, como artrite, doenças nas juntas, dor crônica, entre outros. O tratamento da hemofilia B ocorre por reposição do fator IX da coagulação, que pode ser produzida pelo fracionamento do plasma humano ou de forma recombinante. Dentre as proteínas terapêuticas recombinantes utilizadas atualmente, podemos

citar o BeneFix® (Wyeth), o Idelvion® (CSL Behing), o Alprolix® (Bioverativ), entre outros.

Como descrito anteriormente, a hemofilia A e B são as doenças com maior incidência nos distúrbios da coagulação ligados ao cromossomo sexual. As deficiências de outros fatores como I, II, V, VII, X, XI e XIII são tratados como coagulopatias raras. Um dos grandes problemas da hemofilia A e B é a hemorragia grave nos casos severos e que exigem prevenção e extremo cuidado. Para classificar os pacientes de maior risco, a gravidade da doença foi dividida de acordo com a atividade dos respectivos fatores de coagulação VIII e IX, conforme a Tabela 1.2. Dessa forma a hemofilia é classificada em: 1) hemofilia leve, com atividade do fator variando de 5% a 40% ou de 0,05 a 0,40 UI/mL; 2) moderada, de 1% a 5% de atividade ou de 0,01 a 0,05 UI/mL; 3) grave, com menos de 1% de atividade ou concentração inferior a 0,01 UI/mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011, WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2016).

Tabela 1.2 - Classificação da gravidade de hemofilia.

Hemofilias	Tipo	%	UI/mL
	Leve	5 a 40	0,05 a 0,40
	Moderada	1 a 5	0,01 a 0,05
	Grave	<1	0,01

Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

O levantamento dos diagnósticos realizados em 2015 referente à hemofilia A mostrou que aproximadamente 39%, 25% e 23% dos casos descritos eram relativos à forma grave, leve e moderada, respectivamente. Com relação à hemofilia B, aproximadamente 33% dos diagnósticos eram referentes à forma moderada, enquanto 32% eram relacionados à forma grave e 22% eram relativos à forma leve (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A dosagem da terapia varia de acordo com a severidade do quadro clínico. Além disso, quanto mais cedo são tratados os episódios de sangramento, menor será a necessidade de ajuste para uma dosagem mais elevada. (UNIM et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2017).

Antigamente, os pacientes hemofílicos eram tratados sob demanda, para sanar episódios de sangramento. Atualmente, o tratamento é realizado maneira profilática, uma vez que apresenta vantagens significantes sobre o tratamento sob

demanda, a destacar: i) melhor qualidade de vida e saúde do paciente, devido a redução de sangramentos nas juntas (cerca de 83%), redução da dor corporal e menos complicações graves; ii) redução dos custos para o sistema de saúde, promovendo uma economia de US\$ 8 a 17 mil por episódio de sangramento em casos de hemofilia grave; iii) aumento da produtividade e melhora na vida social; iv) melhor relação de custo-benefício para o sistema de saúde e para o paciente (UNIM et al., 2015). O intuito do tratamento profilático é manter os fatores de coagulação em um nível basal em torno de 1%, de forma a reduzir o risco de sangramentos e prevenir danos às juntas. A reposição precoce dos fatores da coagulação antes da segunda hermatose é denominada profilaxia primária e após a segunda hermatose, profilaxia secundária ou tardia. A maior parte da dispensação de concentrado de fator VIII no Brasil em 2015 foi destinada a profilaxia secundária (52,13%), ao passo que a dose domiciliar correspondeu a 22,88%. A dispensação do concentrado de fator IX no Brasil foi dividida em 51,30% na profilaxia secundária, 22,90% na dose domiciliar e 16,50% no tratamento ambulatorial.

O custo do tratamento, porém, é alto por se tratar de uma doença crônica que requer infusão contínua durante toda a vida, como forma de estancar e prevenir sangramentos, e reduzir o risco de complicações frequentemente encontradas no quadro clínico hemorrágico (UNIM et al., 2015). Além do custo referente à administração contínua do medicamento, há ainda o custo relativo às complicações e efeitos adversos causados pelo medicamento, como a formação de anticorpos inibidores, e em alguns casos, choque anafilático. Vários fatores recombinantes citados acima são produzidos em células murinas e como descrito anteriormente, essas proteínas podem conter epítomos imunogênicos que podem desenvolver aloanticorpos nos pacientes e reduzir a eficácia do tratamento. Em hemofílicos A, a prevalência de inibidores varia entre 10 a 30%, enquanto na hemofilia B varia entre 1 a 5%. Deste modo, os pacientes devem passar por testes para verificar a presença de inibidores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; HEDNER, 2015). O título dos anticorpos inibidores é dado em unidades Bethesda (UB). Geralmente os pacientes com títulos de inibidor maior que 5 UB/mL são classificados como inibidores de alta resposta e não respondem a terapia com fatores VIII ou IX (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). De acordo com o “Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil” de 2015 do Ministério da Saúde, 7.512 pacientes com hemofilia A e 1.536 pacientes com hemofilia B foram testados para o desenvolvimento de inibidor e 7,66% dos

testados para a hemofilia A e 1,69% para a hemofilias B foram positivos para o teste. A imunotolerância é o tratamento que visa erradicar os inibidores contra o FVIII e FIX e envolve o uso de coadjuvantes da cascata da coagulação, como o FVIIa. Desta forma, os FVIII e FIX são infundidos periodicamente, visando criar tolerância no paciente. O FVIIa pode ser produzido tanto na forma de derivado do plasma (Concentrado de complexo protrombínico parcialmente ativado, CCPa), como na forma ativada recombinante (FVIIar), sendo o principal representante a proteína produzida pela empresa NovoNordisk, o NovoSeven®. O CCPa, ao contrário do NovoSeven® que possui apenas o FVIIar purificado, é composto por todos os fatores da coagulação dependentes de vitamina K, como o FII, FVII, FIX, FX, Proteína C e S e outras proteínas do plasma (HEDNER, 2015).

1.3.1 O fator VII na terapia das coagulopatias

Nos casos de pacientes hemofílicos que desenvolveram inibidores, apresentam deficiência congênita de fator VII, trombastenia de Glasmann, ou em casos de procedimentos invasivos como cirurgias, é recomendada a utilização de fator VII, seja na forma de CCPa ou FVIIar.

Em 2015, foram tratados 407 pacientes hemofílicos A e B e inibidor com o CCPa, sendo a categoria de pacientes hemofílicos A e inibidor com título entre 0,6 a 4,9 UB/mL responsáveis por 27,27% das infusões, seguido de 34,64% com título acima de 10,1 UB/mL e 13,76% com título entre 5 a 10%, ou seja, a maior parte foi destinada aos portadores de inibidores com altos títulos.

Com relação ao FVIIar, 233 pacientes com hemofilia A e B foram tratados com o complexo recombinante, o que corresponde a 38,70% com hemofilia A e inibidor e 2,01% com hemofilia B e inibidor. A categoria que recebeu maior número de infusões com o fator recombinante foi o paciente com hemofilia A e inibidor de baixa resposta (0,6 a 4,9 UB/mL), responsável por 22,32% do uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com a cartilha “Recomendações de uso do fator VII ativado recombinante para pacientes com hemofilia congênita e inibidor e deficiência hereditária de fator VII” feita pelo Ministério da Saúde (2011), a dose para hemofílicos com inibidores deve ser administrada de forma repetida por via endovenosa em uma proporção de 90 a 120 µg/kg/dose ou 4,5 KUI/kg/Dose a cada

2, 3, 4, 6, 8 ou 12 horas. Vale salientar que o fator VII é o fator com menor tempo de meia-vida dentre os fatores, de 3 a 6 horas, conforme descrito na figura 1.1 abaixo.

Figura 1.1 - Tempo de meia-vida dos fatores recombinantes no sangue.

Fonte: Elaborado pelo autor baseado em Monroe et al., 2010.

As quantidades administradas devem ser cuidadosamente determinadas, uma vez que vários estudos mostraram a presença de efeitos colaterais indesejados e severos como trombose, acidente vascular cerebral, infarto, entre outros relacionados ao uso excessivo dos fatores de coagulação. Geralmente esses efeitos colaterais ocorrem quando o paciente já apresenta outros fatores de predisposição ao risco como os pacientes mais idosos e com doença aterosclerótica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Um dos efeitos adversos reportados com o uso do FVIIa é a tromboembolia venosa e arterial, que pode ser fatal. Desta forma, o fator VII recombinante deve ser utilizado com cuidado em pacientes com doenças do coração, fígado, em processo de pós-operatório, em neonatos ou caso haja qualquer possibilidade de um risco tromboembólico. Além disso, apesar de raro, pacientes que recebem reposição do fator VII podem desenvolver anticorpos anti-FVII durante a terapia (LEVITT et al., 2010). Caso a atividade de FVII não cesse o sangramento, deve-se avaliar a formação de inibidores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.4 Fator VII da coagulação

O fator VII da coagulação sanguínea é uma serinoprotease dependente de vitamina K, composta por uma cadeia única com 406 aminoácidos (Figura 1.2), que atua na fase de iniciação da cascata de coagulação. O gene relacionado à proteína está localizado no cromossomo 13 (13q34) (WION et al. 1985; HAGEN et al., 1986; THIM et al, 1988).

Figura 1.2 – Representação da estrutura bidimensional do fator VII da coagulação.

Fonte: Extraído de Persson e Akarp (2007).

Esta protease é um heterodímero sintetizado no fígado e secretado no sangue como uma pró-enzima não ativa (zimogênio) de cadeia única com massa molecular de 50 kDa. Quando ativada, apresenta-se como uma cadeia leve e uma pesada, composta por 152 aminoácidos (20 kDa) e 254 aminoácidos (30 kDa), respectivamente (Figura 1.3). Ambas as cadeias são ligadas por uma ponte dissulfeto (WION et al. 1985; HAGEN et al., 1986; THIM et al, 1988). Está presente no sangue na concentração de aproximadamente 0,5 mg/L (THIM et al., 1988). A molécula de FVII possui diversas modificações pós-traducionais, entre elas 10 resíduos de ácido glutâmico γ -carboxilados, 2 resíduos de asparagina N-glicosilados, 1 resíduo de O-glicosilação, e 1 resíduo de ácido aspártico β -hidroxilado. Essas

modificações são necessárias para a secreção e atividade biológica do FVII, interação com o FT e FX, entre outras (HAGEN et al., 1986; THIM et al., 1988; BOHM et al., 2015). Importante destacar que a região Gla deve permanecer intacta para ser adsorvida na membrana de fosfolípidos das células (BOROWSKI et al., 1985; THIM et al., 1988). Outro fator importante a ser avaliado é a correta escolha do sistema de expressão, uma vez que o processo de gama-carboxilação é limitante em diversas linhagens celulares e desta forma, a escolha correta da linhagem é de extrema importância para a obtenção de uma proteína com adequada qualidade terapêutica (BERKNER, 1993).

Figura 1.3 – Representação da estrutura do fator VII da coagulação. Zimogênio com massa molecular de 50 kDa, apresentando a cadeia leve de 20 kDa (N-terminal) e a pesada de 30 kDa (C-terminal) ligadas por uma ponte dissulfeto. A cadeia leve possui 2 domínios do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF-1 e 2), 1 domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA). A cadeia pesada apresenta o sítio catalítico e a enzima é ativada quando o FXa cliva a ligação peptídica entre Arg152-Ile153.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O fator VII, assim como os fatores II, IX, X e as proteínas C, S e Z, são dependentes da vitamina K para serem carboxilados pela γ -glutamil carboxilase e exercerem sua função biológica. A ausência de vitamina K prejudica a coagulação podendo gerar sangramentos descontrolados.

1.4.1 Gama-carboxilação do fator VII e ciclo da vitamina K

Após sintetizado, o fator VII na forma inativa sofre gama-carboxilações no retículo endoplasmático, no qual o carbono γ do resíduo de ácido glutâmico é carboxilado pela enzima γ -glutamil carboxilase dependente de vitamina K (GGCX), gerando o resíduo de ácido γ -carboxiglutâmico (GLA). O processo de gama-carboxilação forma aproximadamente 10 resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico na parte amino-terminal da proteína (HAGEN et al., 1986; HALABIAN et al., 2009). Essa gama-carboxilação na cadeia leve do fator VII é fundamental para a atividade biológica, uma vez que a presença de dois grupos carboxila no domínio GLA favorece a ligação aos íons cálcio, o que permite a interação com outras proteínas, dando sequência ao processo de coagulação (HAGEN et al., 1986; HALABIAN et al., 2009).

Para ter sua atividade, a γ -glutamil carboxilase necessita do seu cofator, a forma reduzida da vitamina K hidroquinona (K_1H_2). A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que existe em duas formas principais, vitamina K_1 (filoquinona) e vitamina K_2 (menaquinona), sendo a vitamina K_1 majoritariamente utilizada nos processos de coagulação. Para ser o cofator da GGCX, a vitamina K precisa estar na sua forma reduzida, e esta redução é realizada pela vitamina K 2,3-epóxido redutase (VKOR). A forma reduzida, denominada vitamina K hidroquinona (K_1H_2), será oxidada pela GGCX concomitantemente com a gama-carboxilação do ácido glutâmico (Glu) à γ -carboxiglutâmico (Figura 1.4). Essa oxidação da vitamina K gera energia necessária para a remoção do hidrogênio gama do resíduo de Glu e incorporação de CO_2 pela carboxilase (TIE et al., 2011; LEFEBVRE et al., 2016). A vitamina K 2,3 epóxido produzida não é descartada, sendo reduzida novamente pela enzima vitamina K 2,3 epóxido redutase. Posteriormente, o intermediário é reduzido pela enzima vitamina K quinona redutase gerando o cofator vitamina K hidroquinona, que ficará disponível para um novo ciclo de oxidação, como detalhado na Figura 1.4 (TIE et al., 2011; LEFEBVRE et al., 2016). Por esse motivo, a ingestão de pequenas quantidades de vitamina K são suficientes para o correto funcionamento da enzima GGCX, ao passo que a deficiência ou o uso de antagonistas da vitamina K, como a varfarina, podem levar a sangramentos e a anticoagulação (PALTA et al., 2014). Uma revisão publicada em 2008 mostra a importância da vitamina K em duas doenças autossomais recessivas raras, nas quais mutações pontuais nas duas

principais proteínas relacionadas ao ciclo da vitamina K, a GGCX e a VKOR, podem levar a hemorragia moderada a grave, e a terapia de reposição com vitamina K se faz necessária para restabelecer o processo de coagulação rompido pela falta de atividade dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K (WESTON e MONAHAN, 2008).

Figura 1.4 – Representação da atuação da γ -glutamil carboxilase e ciclo de regeneração da vitamina K.

Fonte: Adaptada de Lefebvre et al., (2016).

A vitamina K quando adicionada ao meio de cultura atua imediatamente, sendo armazenada pelas células por semanas e fazendo com que a proteína previamente produzida seja secretada em até 24 horas pela célula (BERKNER, 1993). Cerca de 2 a 5 vezes mais proteína dependente de vitamina K, como FVII, FIX e Proteína C podem ser secretadas quando a vitamina K está presente no meio (BERKNER, 1993). Além disso, a ausência da vitamina K pode levar a uma redução do nível de expressão de uma proteína dependente de vitamina K. Em sua tese de doutorado, Marcela de Freitas observou que a ausência de vitamina K nos cultivos das linhagens humanas HepG2, SK-Hep-1 e HKB-11 transduzidas com o FVII

resultou em uma expressão de RNA mensageiro (RNAm) cerca de 7, 14 e 45 vezes menor quando comparada aos cultivos contendo a vitamina K das células HepG2, SK-Hep-1 e HKB-11, respectivamente. Além disso, a suplementação da vitamina K no cultivo da célula HepG2 não transduzida, que naturalmente expressa o RNA mensageiro endógeno, foi suficiente para aumentar em 480 vezes a expressão do RNAm nesta célula (FREITAS, 2015).

1.5 Produção do fator VII recombinante

Os fatores de coagulação utilizados na terapia de reposição são tradicionalmente obtidos e fracionados do plasma de doadores. Porém, devido à possibilidade dos derivados do sangue conter patógenos como vírus, príons, entre outros, e a produção ser irregular por depender da quantidade de doadores e bancos de sangue, os fatores de coagulação recombinantes vieram como uma promessa de serem mais seguros, reprodutíveis e com a possibilidade de serem produzidos em larga escala, aumentando a disponibilidade dos fatores para tratamento. No caso específico do fator VII, este encontra-se em concentrações muito baixas no sangue, de forma que se torna inviável obter quantidades suficientes de FVII da coagulação para tratamento dos pacientes (THIM et al., 1988).

No início da década de 70, os hemofílicos que desenvolviam inibidores eram tratados com CCPa para diversos tipos de sangramentos (HILGARTNER et al., 1983). No entanto, eventos tromboembólicos (BLATT et al., 1974; DAVEY et al., 1976) e o aumento do título de inibidores anti-FVIII (HILGARTNER et al., 1983) foram relatados para o uso de CCPa, além do possível risco de transferência de patógenos decorrentes do sangue. Estudos foram realizados com o CCPa e verificaram que o FVIIa era um dos fatores com menor risco de induzir eventos tromboembólicos. Além disso, o uso do FVIIa derivado do plasma (pdFVIIa) era efetivo no tratamento de sangramentos musculares e na manutenção da hemostasia em pacientes com inibidores (HEDNER e KISIEL, 1983). No entanto, o uso de pdFVIIa não era uma solução escalonável em termos de produção (HEDNER, 2015).

Com o estabelecimento da tecnologia de DNA recombinante, foi possível clonar o gene do fator VII em um vetor de expressão e com isso incorporar esse gene em uma célula de mamífero para expressar e secretar a proteína de forma contínua no meio de cultura. Em 1986, Hagen e colaboradores produziram diversos

clones de bacteriófagos λ gt11 codificantes de fator VII, cujo material genético foi extraído da célula hepática humana HepG2. Os clones produtores foram testados por uma reação com o anticorpo monoclonal específico para o FVII e os clones positivos foram isolados e purificados. O DNA complementar (cDNA) foi extraído e analisado apresentando semelhança com a sequência presente na proteína humana. Posteriormente, o vetor contendo o gene para o FVII foi testado nas células HepG2, SK-Hep-1 e BHK cultivadas em meio suplementado com 1 a 10% de SFB. As células HepG2, apesar de produzirem de forma endógena as proteínas dependentes de vitamina K, possuíam crescimento lento e baixo nível de produção, com uma produtividade volumétrica diária observada de 0,02 a 0,10 $\mu\text{g/mL/dia}$ de FVIIa. A célula SK-Hep-1 produziu 2,5 $\mu\text{g/mL/dia}$ de FVII ativo e a célula BHK, 4,9 $\mu\text{g/mL/dia}$. Em patente depositada em 1991, Hagen e colaboradores (2013) discorrem a produção acumulada de até 0,975 $\mu\text{g/mL}$ de FVII em 6 dias.

Thim e colaboradores (1988) compararam a produção de FVII em células de rim de hamster neonato (BHK) com a produção obtida pelo fracionamento do plasma e observaram que o fator VII recombinante produzido tinha o esqueleto estrutural idêntico ao plasma humano. Foi observado que ocorreu γ -carboxilação completa nos resíduos 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 de ácido glutâmico, sendo a única diferença encontrada no resíduo 35, na qual a proteína do plasma é totalmente γ -carboxilada, ao passo que na proteína recombinante produzida por BHK, a proteína é parcialmente γ -carboxilada. As glicosilações presentes tanto no FVII recombinante como no plasma são semelhantes e apresentam na sua estrutura manose, fucose, galactose, ácido siálico e *N*-acetilglucosamina. No entanto, algumas diferenças foram notadas, como o maior número de fucose e menor número de ácido siálico na proteína expressa pela célula murina BHK. Essa presença reduzida na quantidade de ácido siálico pode ser explicada por uma glicosilação parcial (66%) no resíduo Asn145 da proteína recombinante, sendo que o mesmo resíduo é totalmente glicosilado na proteína do plasma humano. Com relação à β -hidroxilação do ácido aspártico, não foi observado sua presença tanto na proteína do plasma como recombinante. Esse fator VII recombinante foi purificado por troca aniônica, e os autores observaram uma autoativação da enzima durante o processo, o que pode ocorrer pela pequena atividade proteolítica do FVII em sua forma de cadeia única (aproximadamente 4%)(THIM et al., 1988).

A companhia Novo Nordisk aprovou o projeto para a produção do FVIIa recombinante em 1985 (HEDNER, 2015). O gene do fator VII foi clonado a partir do material genético da célula hepática HepG2 e o vetor contendo o gene foi inserido e expresso em células murinas BHK em meio contendo soro fetal bovino, conforme descrito anteriormente (BERKNER et al., 1986; HAGEN et al., 1986). A proteína recombinante (FVIIr) apresentou sequência primária de aminoácidos idêntica ao FVII derivado do plasma (pdFVII).

A partir de março de 1988, os pacientes hemofílicos com inibidores foram efetivamente tratado pela FVIIar em diversos casos. A partir da década de 90, estudos pré-clínicos e clínicos foram realizados pela empresa Novo Nordisk para garantir a segurança e eficácia da proteína recombinante. A etapa de purificação foi capaz de remover ou inativar vírus exógenos, especificamente MuLV, SV40, Pox virus, Reovirus, BEV e IBR vírus. Desta forma, o FVIIa recombinante produzido em células murinas BHK foi aprovado entre 1996-2000 pelas agências europeia, norte-americanas e japonesas, sendo comercializado com o nome de NovoSeven®/ NiaStase RT®, um pó liofilizado com dosagem entre 1 a 8 mg/vial (50 a 400 KUI/vial) (HEDNER, 2015).

Em 2007, um estudo randomizado multicêntrico comparando a eficácia do NovoSeven® com o FEIBA® em 48 hemofílicos A com inibidores foi realizado (ASTERMARK et al., 2007). No desenho do estudo, os autores consideraram que uma diferença de 15% na porcentagem de pacientes responsivos a ambos os tratamentos seria considerado como se os produtos fossem equivalentes em eficácia. Desta forma, os autores encontraram que o tratamento com os dois produtos apresentaram um efeito semelhante no tratamento de sangramentos das juntas, apesar da resposta entre os pacientes ser distinta. Essa distinção ocorreu especialmente nas primeiras 12 horas após início dos sintomas, sendo que a prevenção precoce (até 6 horas) é fundamental para prevenir a degradação das juntas. A maior similaridade entre os produtos ocorreu após 24 e 48 horas do início as infusões, com interrupção do sangramento em ambos os tratamentos em mais de 85% (24 h) e 92% (48h) dos casos.

O fator VII recombinante tradicionalmente é produzido em células BHK-21. No entanto, por ser uma linhagem de origem murina, o perfil de glicosilação da proteína recombinante produzida nessa plataforma pode ser diferente da proteína produzida em células humanas, interferindo na terapia. Em 2015, Bohm e colaboradores

compararam as diferentes modificações pós-traducionais do fator VII derivado do plasma e recombinante, sendo este último produzido em três células: BHK, CHO (células de mamífero não-humanas) e HEK293 (célula humana). As linhagens BHK, CHO e HEK293 produtoras de FVII foram preparadas inserindo o vetor contendo o gene por precipitação por fosfato de cálcio. As proteínas produzidas pelas células CHO (CHO-FVIIr), HEK293 (HEK293-FVIIr) e BHK (BHK-FVIIr) apresentaram atividades específicas de 2.000, 2.300 e 1.800 UI/mg de proteína, respectivamente. Esses valores são similares ao valor referente ao FVII derivado do plasma, em torno de 2.000 UI/mg. Após purificar as proteínas por etapas de troca iônica, as modificações pós-traducionais foram analisadas por espectroscopia de massas. De forma geral, o autor observou que a estrutura das três proteínas recombinantes e a derivada do plasma eram idênticas e a maioria das modificações pós-traducionais eram semelhantes com algumas pequenas diferenças, com exceção da N-glicosilação. A análise constatou que para todas as proteínas os 8 primeiros resíduos de Glu foram totalmente γ -carboxilados. No entanto, no resíduo 10 de Glu, todos os FVII recombinantes foram menos γ -carboxilados do que o FVII do plasma, com cerca de 50% e 82% de γ -carboxilação no resíduo 10 do ácido glutâmico, respectivamente. Entre os FVII recombinantes, não foram observadas diferenças significativas com relação à γ -carboxilação, sendo o resíduo 10 de Glu parcialmente carboxilado 53, 56 e 53% para as células CHO, HEK293 e BHK, respectivamente. O perfil de O-glicosilação foi semelhante nas proteínas recombinantes e na derivada do plasma, exceto para a molécula BHK-FVIIr, que apresentou menor quantidade de xilose. Os resíduos de N-glicanos da célula CHO-FVIIr mostraram menor complexidade com relação às outras linhagens. A maior diferença entre as proteínas das células de mamífero não-humanas BHK-FVIIr e CHO-FVIIr foi a ausência de resíduo N-acetilgalactosamina na célula CHO. Com relação à HEK293-FVIIr, o perfil distinto de N-glicosilação da molécula não pode ser comparável com o perfil observado no pdFVII ou no FVIIr produzido nas outras duas células. A proteína HEK293-FVIIr apresentou alta diversidade do seu perfil de N-glicosilação com um alto percentual relativo a moléculas ligadas ao N-terminal contendo galactose e N-acetilgalactose (GalNAc), baixo perfil de glicanas ácidas, sendo a maioria formada por oligossacarídeos neutros N-ligados. Essas terminações, como a GalNAc, podem se ligar a receptores do tipo asialoglicoproteínas, acarretando em uma rápida eliminação da circulação e com isso, reduzindo o tempo de meia-vida do fator VII.

Deste modo, o autor conclui que a proteína derivada da célula CHO seria a melhor representante para terapia de reposição em hemofílicos, uma vez que não possui terminação contendo GalNAc e possui elevado grau de sialilação. Apesar das três linhagens produzirem proteínas com características semelhantes e diferirem quanto ao grau de N-glicosilação, o autor não cita diferenças dos fatores VII recombinantes produzidos com relação aos sítios imunogênicos, como o ácido 5-glicolil neuramínico e epítopos do tipo α -Gal, presente em células murinas mas não em humanas, e como isso poderia afetar o tempo de meia-vida da molécula e a formação de inibidores anti-FVII. Além disso, as proteínas foram produzidas em meio contendo SFB em *roller bottles* (frascos giratórios) ou frascos multicamadas, ou seja, sem adequado controle das condições da cultura (pH e oxigênio dissolvido por exemplo), o que pode interferir no perfil de glicosilação das mesmas.

Em 2017, Freitas e colaboradores avaliaram a produção do fator VII recombinante em três linhagens humanas SK-Hep-1, HKB-11 e HepG2, além da célula murina BHK-21, utilizada para a produção comercial do fator VII. Todas as células produtoras foram geradas por transdução lentiviral. As proteínas recombinantes produzidas por todas as células tiveram peso molecular semelhante ao fator VII comercial NovoSeven[®] (aproximadamente 50 kDa). Foi detectada pela análise por ELISA uma elevada produção na linhagem HepG2-FVIIr ($1176,57 \pm 465,65$ ng/mL), seguida da célula SK-Hep-1-FVIIr ($702,36 \pm 59,42$ ng/mL), HKB-11-FVIIr ($585,44 \pm 128,08$ ng/mL), e BHK-21-FVIIr ($222,60 \pm 112,71$ ng/mL). No entanto, o maior nível de produção não se traduziu necessariamente no maior nível de atividade da proteína. A atividade biológica observada do FVII recombinante foi de 2,22 UI/mL (SK-Hep-1-FVIIr), 1,02 UI/mL (HepG2-FVIIr), 0,17 UI/mL (HKB-11-FVIIr) e 0,16 UI/mL (BHK-11-FVIIr).. Portanto, como foi observado na relação das células SK-Hep-1 e HepG2 por exemplo, a maior produção e secreção na célula HepG2 não significou maior atividade biológica da proteína, que foi observada na célula SK-Hep-1, menos produtora. Diferentemente do encontrado por Bohm e colaboradores (2015), a produção acumulada do FVIIr por 4 dias nas linhagens humanas foi da ordem de 3 a 4 vezes maior que na linhagem murina. A maior produção ocorreu na célula HepG2 e foi cerca de 5 vezes superior a produção em BHK-21. O cultivo que gerou a proteína com maior atividade biológica foi obtido na célula SK-Hep-1 (1,88 UI/mL), sendo essa proteína 17 vezes mais ativa do que a produzida em célula BHK-21 (0,11 UI/mL). Desta forma, os autores observaram que a produção do fator VII

recombinante em células humanas foi superior ao da célula murina utilizada para a produção da proteína comercial, no caso a BHK-21. Devido ao prolongado tempo de crescimento da célula HepG2, esta foi descartada de posteriores análises. Visando aplicações compatíveis à escala industrial, foram realizados cultivos das células SK-Hep-1-FVIIr e HKB-11-FVIIr em meio contendo 10% de SFB e em suspensão utilizando microcarregadores Cytodex 3 em sistema agitado *spinner*. A célula SK-Hep-1-FVIIr produziu maior quantidade de proteína acumulada do que a célula HKB-11-FVIIr, sendo obtidas 202,6 µg e 152 µg após 7 dias de cultivo, respectivamente, ou seja, 1,3 vezes mais FVII da coagulação. Em termos de atividade biológica, a proteína produzida em SK-Hep-1-FVIIr apresentou 4 UI/mL, ao passo que no cultivo da HKB-11-FVII, foi obtida 0,8 UI/mL, um valor 5 vezes menor do que a encontrada na célula SK-Hep-1-FVIIr.

Frente ao anteriormente exposto, no presente trabalho foram selecionadas 4 células humanas (SK-Hep-1, HKB-11, Huh-7 e HEK293SF-3F6) adaptadas para o cultivo em meios livres de soro e em suspensão para serem analisadas quanto ao potencial de expressão do fator VII da coagulação.

1.6 Métodos para a produção de proteínas recombinantes

A produção da proteína de interesse a partir de sistemas de expressão, como as células de mamíferos, depende da inserção do gene exógeno na célula hospedeira, processo que recebe o nome de transfecção. A transfecção do gene de interesse pode ocorrer de forma estável, quando o DNA se integra ao genoma do hospedeiro, ou de forma transiente, quando o material não é incorporado ao núcleo celular. No primeiro método, a célula transfectada expressa de modo permanente e estável o gene, ao passo que no segundo método, a expressão do transgene é transitória, pois conforme a célula transfectada se divide o material genético de interesse não é herdado pela célula-filha. Esses dois tipos de expressão serão abordados a seguir.

1.6.1 Expressão gênica transiente

A principal vantagem da expressão gênica transiente reside no fato de ser possível analisar os produtos da expressão de 2 a 5 dias após a transfecção, de

forma rápida e sem a necessidade de isolar clones altamente produtores, economizando tempo e recursos. Muitas vezes, esse método é utilizado como prova de conceito em estudos pré-clínicos para demonstrar a expressão de determinada proteína recombinante em um sistema desejado (BALDI et al., 2007; ZHU et al., 2012; MOLINAS et al., 2014).

Para inserir o transgene de interesse, existem diversas técnicas de transfecção que podem ser empregadas, dependendo do tipo de célula, da proteína, dos parâmetros do cultivo e do nível de produção desejado. Neste sentido, é fundamental escolher a melhor técnica de transfecção para se obter uma eficiência ótima e reprodutibilidade dos resultados. Além disso, deve ser levado em conta outros fatores como o tipo de vetor a ser utilizado, o tipo e a concentração de reagentes de transfecção, a citotoxicidade do processo, o meio de cultura adequado e a eficiência de transfecção para o sistema de expressão testado. A escolha correta do meio de cultura é importante uma vez que alguns produtos comerciais podem conter agentes inibitórios ao processo de transfecção, enquanto outros meios de cultura são desenvolvidos especificamente para suportar a transfecção, possibilitando a otimização do sistema e o aumento da produtividade. Os métodos de transfecção mais utilizados podem ser divididos em: biológico, químico e físico. Nesse trabalho, os métodos de transfecção químico e biológico serão abordados.

A transfecção por reagente químico se baseia na neutralização da carga negativa da molécula de DNA através da formação de um complexo para a introdução na célula, que é protegida por uma membrana de fosfolípidos, também de carga negativa. Dentre os reagentes mais comumente utilizados na transfecção transiente por reagente químico, destacam-se o polímero catiônico polietilenimina (PEI) e o fosfato de cálcio (CaPi), uma vez que são escalonáveis e possuem melhor custo. Os lipossomos catiônicos, apesar de serem altamente eficazes em diversas transfecções, possuem custo bastante elevado, o que não os tornam o melhor candidato quando se deseja o escalonamento (BALDI et al., 2007; HACKER et al., 2013).

A transfecção utilizando a co-precipitação com CaPi, apesar de ter um baixo custo e ser relativamente fácil de aprender e realizar, está propensa a variações na eficiência devido a sua alta sensibilidade ao pH, temperatura e concentração de sais, além de ser citotóxica à algumas células. Em alguns, estudos, a variação de pH de 0,1 resultou em diferenças significativas na transfecção transiente (TANG et al.,

2015). Desta forma, o uso do polímero catiônico PEI se tornou bastante difundido, devido a sua escalonabilidade, baixo custo e maior estabilidade no momento da transfecção transiente.

A polietilenimina possui um grupo amina e dois carbonos alifáticos que se repetem de na estrutura formando o polímero catiônico ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), podendo ser esta forma linear ou ramificada. As estruturas ramificadas podem se repetir, originando estruturas dendriméricas. Dependendo da estrutura, a polietilenimina pode apresentar uma amina secundária na polietileninima linear ou primária, secundária e/ou terciária nas ramificadas.

A eficiência da formação de complexos de PEI com plasmídeos de fita dupla de DNA vai depender da densidade da carga residual do PEI, determinada pela porcentagem de grupos amino não protonáveis, como o grupo *N*-propionil. A síntese do PEI pode ocorrer com a polimerização de duas oxazolinias substituídas e após a reação ainda pode conter na sua estrutura unidades de *N*-propionil (Figura 1.5). Para remover essas unidades, o polímero é hidrolizado por excesso de ácido clorídrico e desta forma, a estrutura final do PEI vai depender eficiência desta reação de hidrólise (KADLECOVA et al., 2012).

Figura 1.5 – Formas comerciais do polímero catiônico polietilenimina.

Fonte: Adaptada de Kadlecova et al., (2012).

Os grupos fosfato carregados negativamente presentes na molécula de DNA interagem com os grupos amino positivamente carregados presentes na molécula de PEI. Desta forma, as moléculas de DNA são condensadas e compactadas formando particulados positivamente carregados, que podem se aderir à substratos

negativamente carregados como as proteoglicanas ou fosfolipídeos presentes na superfície das células, internalizando o complexo por endocitose ou fagocitose (GODBEY et al., 1999; KOPATZ et al., 2004). Uma vez internalizados, os complexos são transportados pelos endossomos ou lisossomos e são protegidos de degradação por endonucleases por estarem condensadas com o polímero. No entanto, alguns dos gargalos relativos ao uso de PEI para transfecção transiente estão relacionados à translocação do material genético do citoplasma até o núcleo celular, a competência de transcrição do DNA plasmidial no núcleo, o processamento do RNA mensageiro, a translocação ao citoplasma, a síntese proteica, e sua secreção (HAN et al., 2009; HACKER et al., 2013; RAJENDRA et al., 2015). Outro problema se refere à citotoxicidade do reagente, que ocorre tanto pelo rompimento da membrana celular (processo necrótico), como por apoptose após internalização. Por isso, é interessante avaliar a concentração ótima da polietilenimina no processo. A eficiência de transfecção e citotoxicidade está atrelada aos complexos estruturais e ao peso molecular do PEI utilizado (HAN et al., 2009).

Deste modo, para se obter uma transfecção transiente com alta eficiência, alguns procedimentos devem ser seguidos: produzir e manter um material genético com alta pureza e qualidade, livres de contaminantes como RNA, proteínas, e solventes; utilizar células com viabilidade acima de 90% e na fase logarítmica de crescimento, uma vez que células em divisão incorporam melhor o DNA devido ao rompimento da membrana nuclear durante a mitose; as células devem ser cultivadas nos meios de cultura apropriados e livres de contaminação, como micoplasma. Uma vez que se deseja escalonar o processo de produção utilizando transfecção transiente, é fundamental duas propriedades para se obter um processo econômico: 1) as células serem capazes de crescer em suspensão a altas densidades (acima de 5×10^6 células/mL) e de modo unitário sem agregados (*single-cells*); 2) serem altamente transfectáveis (eficiência de transfecção do DNA acima de 50%) com um veículo de *delivery* de DNA de baixo custo, como o PEI. Além disso, recomenda-se evitar a suplementação do meio de cultura com soro fetal bovino para reduzir a complexidade e custos da purificação (GRILLBERGER et al., 2009; van der VALK et al., 2010; HACKER et al., 2013).

A expressão transiente da proteína de interesse já foi utilizada em diversos tipos celulares como as células de rim de macaco COS (BLASEY et al., 1996), as células de hamster chinês CHO (MULLER et al., 2005; HALDANKAR et al., 2006;

BOHM et al., 2015) e a murina BHK (BOHM et al., 2015), as células humanas HEK-293 (DUROCHER et al., 2002; PHAM et al., 2006; BALDI et al., 2007; ANSORGE et al., 2009; SWIECH et al. 2011; JÄGER et al., 2013; MOLINAS et al., 2014; AMARAL et al., 2016), SK-Hep-1 (ROSA et al., 2012; FREITAS et al., 2017), Huh-7 (ENJOLRAS et al., 2012), HKB-11 (CHO et al., 2002; MEI et al., 2006; FISCHER et al., 2012), entre outras. Especificamente o polímero catiônico polietilenimina (PEI) foi utilizado em biorreatores de até 150 L (TUVESON et al., 2008) e no sistema WAVE™ com volume de trabalho de 10 L (GEISSE et al., 2005; HALDANKAR et al., 2006).

O aumento do volume de cultivo consequentemente possibilita o aumento da produção da proteína recombinante. Juntamente com a otimização de vetores, dos meios de cultivo e das estratégias de controle e alimentação do processo, grandes quantidades de proteínas foram atingidas. Backliwal e colaboradores (2008), após realizarem um estudo de otimização do promotor do vetor de expressão, de reguladores do ciclo celular, e de suplementos como o ácido valpróico, conseguiram produzir mais de 1g/L de imunoglobulina G em meio livre de soro em um biorreator de 2 litros.

Em 2011, Swiech e colaboradores conseguiram expressar o FVIII da coagulação através de transfecção com PEI. O FVIII é uma proteína complexa de difícil expressão devido ao grande tamanho (2332 a.a.) e peso (~300kDa) e por suas complexas modificações pós-traducionais. Para tanto, os autores utilizaram a célula HEK293SF-3F6 em suspensão cultivadas em meio livre de SFB porém suplementada com 5% de Cell Boost 5 (HyClone). Foi utilizada uma estrutura do FVIII com o domínio B-deletado e promotor forte CMV. Foram testadas 3 concentrações diferentes de DNA e duas de temperatura (34°C e 37°C), sendo que a melhor condição foi estabelecida em 0,4 µg DNA / 10⁶ células à 34°C onde uma produtividade de 0,58 ng de FVIIIr / 10⁶ células x hora foi alcançada e 49,3 UI de FVIII recombinante ativo foram obtidos após 6 dias de cultivo em *erlenmeyer* com 20 mL de volume de trabalho.

Fischer e colaboradores (2012) expressaram diversas proteínas (receptores de membrana, IgG1, citocinas, etc) de forma transiente, nas células CAP-T e HKB-11 e compararam a eficiência do PEI com outros agentes como lipossomas catiônicos comerciais (Lipofectamine™, FuGene®, SuperFect™, entre outros). Após avaliar o meio de transfecção, as concentrações de PEI e DNA usados, uso de

suplementos como inibidores de histona deacetilase, os autores conseguiram aumentos na produtividade de todas as proteínas testadas.

Jäger e colaboradores (2013), otimizaram um conjunto de etapas para aumentar a produção de anticorpos no formato scFv-Fc utilizando a transfecção transiente com PEI em células HEK293. Os autores conseguiram um aumento de 20 a 30 vezes partindo de uma produção inicial de 10 a 20 mg/L e obtendo uma concentração final de 400 a 600 mg/L. Esse resultado foi obtido após os autores alterarem a célula produtora, uma célula aderente (HEK293T) para uma célula em suspensão (HEK293-E) e em meios livres de SFB, otimizar o promotor do vetor contendo a proteína de interesse e otimizar o anticorpo através de uma biblioteca utilizando bacteriófagos.

Vale ressaltar que, além do uso para expressão de proteínas, a transfecção transiente é muito utilizada para a produção de partículas virais para a produção de vacinas, como o caso do vírus da influenza (MILLIÁN et al., 2017), assim como para a produção de lentivirus, usados na transdução de células com o gene de interesse (TANG et al., 2015; FREITAS et al., 2017).

1.6.2 Expressão gênica estável

A expressão gênica estável se baseia na integração do gene exógeno ao cromossomo da célula hospedeira. Quando o material genético exógeno é inserido no genoma do hospedeiro através de vírus, recebe o nome de transdução viral. A célula também pode ser transfectada estavelmente por sistemas não-virais, quando ocorre a seleção das células modificadas com o vetor contendo um marcador de seleção por agentes de pressão introduzidos na meio de cultura. Esses marcadores selecionarão as células que contem o vetor perante as outras que não o possuem. Exemplos de marcadores de seleção são a dihidrofolato redutase (DHFR), higromicina B fosfotransferase, neomicina, zeocina, geneticina, glutamina sintetase, entre outros. (KIM e EBERWINE, 2010; ZHU, 2012; JIN et al., 2014).

A inserção do DNA exógeno por infecção viral é uma alternativa para linhagens de difícil transfecção por meio de métodos transientes, como a co-precipitação com CaPi ou polímeros e lipossomos catiônicos. Desta forma, o vírus insere eficientemente o gene na célula hospedeira. No entanto, cuidados com relação ao sítio de inserção no genoma para não silenciar outros genes, além de

aspectos de biossegurança com relação à geração, manuseio e descarte dos vírus devem ser levados em conta.

Dentre os vírus possíveis de serem utilizados, os lentivirus possuem algumas vantagens como habilidade de transduzir células quiescentes como macrófagos, o que difere de outros vírus, que só transduzem células em divisão. Além disso, devido a sua larga capacidade de empacotamento, conseguem integrar o DNA exógeno no genoma da célula, sem gerar uma resposta inflamatória ou imunológica, acarretando em uma expressão a longo prazo *in vivo* e *in vitro* (TANG et al., 2015; NALDINI et al., 2016). Dentre os lentivirus, os mais utilizados foram derivados do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). Para se replicar, o vírus HIV contém diferentes estruturas fundamentais relacionadas ao seu desenvolvimento: região terminal de repetição de nucleotídeos (LTR), *gag* (proteínas estruturais), *pol* (proteínas envolvidas na replicação), *env* (glicoproteína do capsídeo viral), *psi*, proteínas auxiliares (*tat*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), entre outras. Foram desenvolvidas três gerações de vetores derivados da estrutura genômica do HIV-1. O primeiro é o vírus HIV contendo um envelope viral mais promíscuo, o VSV-G. O vírus HIV, por possuir um tropismo restrito à alguns tipos de linfócitos e mielócitos, reduz seu espectro de ação. Desta forma, o gene *env* responsável pelo envelope viral foi substituído por um gene viral com maior tropismo celular, no caso, o envelope glicoproteico do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), que tem a capacidade de infectar diversos tipos celulares e não entregar gene viral ao hospedeiro. Por ser mais estável, o uso desse envelope permitiu concentrar as partículas lentivirais por ultracentrifugação, aumentando mais de cem vezes o título viral (NALDINI et al., 1996, 2016). No entanto, o lentivirus ainda possuía alguns genes responsáveis por sua virulência. Desta forma, os genes responsáveis pela replicação viral que não eram importantes para a transdução foram removidos. Nos sistemas lentivirais de segunda geração, os genes *vpr*, *vif*, *vpu* e *nef* foram removidos, o promotor viral foi substituído por um promotor fraco (5'LTR), e o gene do envelope viral (*env*) foi inserido em um vetor separado. Desta forma, uma tripla transfecção juntamente com o vetor contendo os outros genes estruturais e o vetor contendo o transgene são necessários para gerar o lentivírus. Porém, este sistema ainda contém os genes *gag*, *pol*, *rev* e *tat* em um único vetor. Foram removidos dos vetores de terceira geração o gene *tat* do cassete de expressão sendo substituído por um promotor endógeno modificado de LTR, reduzindo assim as características patogênicas do vírus. Além disso, sequências da

região U3 contidas dentro da região terminal 3' LTR foram removidas pelo desenho de alta inativação (SIN), eliminando as chances de alta replicação do lentivírus produzido de forma recombinante. Desta forma, os três genes principais foram mantidos: *gag* (proteínas estruturais), *pol* (proteínas envolvidas na replicação) e *env* (glicoproteína do capsídeo viral). O gene *rev* foi adicionado a um quarto vetor, aumentando a segurança do sistema (PICANÇO et al., 2007; JIN et al., 2014; NALDINI et al., 2016; FREITAS et al., 2017). Desta forma, vetores mais seguros e eficientes foram construídos como o p1054-CIGWS, o qual gerou diferentes plasmídeos, dentre eles o vetor bicistrônico não replicante cPPT-C(FVIII)IGWS contendo o transgene do fator VIII da coagulação ou o p1054(FVII)CIGWS, contendo o transgene do fator VII da coagulação sanguínea e a proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) (PICANÇO et al., 2007; FREITAS et al., 2017).

Vale ressaltar que deve ser sempre avaliado o número de cópias integradas e se essa integração não causou nenhum silenciamento gênico e nem genotoxicidade à célula, assim como se a expressão do transgene está correto. Desta forma, é importante controlar o número de cópias integradas por célula, além de analisar a distribuição de cópias do vetor nas unidades celulares para garantir a eficácia e segurança da linhagem gerada.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível inferir que as células humanas adaptadas para suspensão e meios livres de soro fetal bovino HKB-11, SK-Hep-1 e Huh-7 podem ser utilizadas como plataformas de produção de proteínas recombinantes como o FVII da coagulação sanguínea, após modificação por transdução lentiviral. Nos dados encontrados para a proteína estudada, as células HKB-11 e SK-Hep-1 foram as que apresentaram os resultados mais promissores para a produção do Fator VII da coagulação sanguínea recombinante. A expressão estável foi escolhida pois as células adaptadas SK-Hep-1 e Huh-7 apresentaram baixa eficiência de transfecção quando foi utilizado o método químico para expressão transiente com o polímero catiônico polietilenimina e o vetor contendo a proteína verde fluorescente GFP. Outro aspecto importante foi a adaptação direta da célula Huh-7 para o cultivo em suspensão no meio FreeStyle 293 Expression Medium livre de soro fetal bovino e a seleção de meios de cultura para o cultivo das células e produção da proteína recombinante que foram diferentes dos meios nos quais as células se adaptaram.

As células HKB-11, SK-Hep-1 e Huh-7 adaptadas e não-adaptadas aos meios livres de SFB e suspensão apresentaram proteínas estruturais, de metabolismo e síntese de proteínas semelhantes em ambas as condições, principalmente em relação às proteínas de estresse oxidativo e chaperonas, uma vez que essas proteínas estão relacionadas à atividade de células tumorais, o que ocorre em ambas as condições. Deste modo, análises adicionais deverão ser realizadas antes de focar em uma proteína específica relacionada ao processo de adaptação celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, E.; SARRAZIN, S.; LANDOLFI, C.; MOTTE, V.; LORTAT-JACOB, H.; LASSALLE, P.; DELEHEDDE, M. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 369, p. 297-302, 2008.
- ALTAMIRANO, C.; BERRIOS, J.; VERGARA, M.; BECERRA, S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16 n. 3, p. 1-14, 2013.
- AMARAL, R. L.; DE SOUSA BOMFIM, A.; DE ABREU-NETO, M. S.; PICANÇO-CASTRO, V.; DE SOUSA RUSSO, E. M.; COVAS, D. T.; SWIECH, K. Approaches for recombinant human factor IX production in serum-free suspension cultures. **Biotechnol Lett.**, v. 38, n. 3, p. 385-94, 2016.
- ANSORGE, S.; LANTHIER, S.; TRANSFIGURACION, J.; DUROCHER, Y.; HENRY, O.; KAMEN, A. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. **J. Gene. Med.**, v. 11, p. 868–876, 2009.
- ASTERMARK, J.; DONFIELD, S. M.; DIMICHELE, D. M.; GRINGERI, A.; GILBERT, S. A.; WATERS, J.; BERNTORP, E.; FENOC STUDY GROUP. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 546-51. 2007.
- BACKLIWAL, G.; HILDINGER, M.; HASIJA, V.; WURM, F. M. High-Density Transfection With HEK-293 Cells Allows Doubling of Transient Titers and Removes Need for A Priori DNA Complex Formation With PEI. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 721-727, 2008.
- BAIK, J. Y.; HABAIK, T. K. Proteomic Understanding of Intracellular Responses of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Adapted to Grow in Serum-Free Suspension Culture. **Biotechnol. Prog.**, v. 27, p. 1680–1688, 2011.
- BALDI, L.; HACKER, D. L.; ADAM, M.; WURM, F. M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnol Lett.**, v. 29, n. 5, p. 677 - 84, 2007.
- BARLOW, G. H.; FIRESTONE, S. L.; ROBBINS K. C. Identification of the plasminogen activator (S) produced by the transformed liver cell line, SK-HEP-1. **Thrombosis Research**, v. 32; p. 29-34, 1983.
- BELIN, V.; ROUSSELLE, P. Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. **Protein Expression and Purification**, v. 48, p. 43–48, 2006.
- BERDICHEVSKY, M.; GENTILE, M.; HUGHES, B.; MEIS, P.; PELTIER, J.; BLUMENTALS, I.; AUNINÜS, J.; ALTARAS, N. E. Establishment of Higher Passage PER.C6 Cells for Adenovirus Manufacture. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, p. 158–165, 2008.

BERKNER, K. L. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII. **Methods Enzymol.**, v. 222, p. 450-77, 1993.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 257–274, 2013.

BIAGGIO, R. T. **Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino.** 2014. 117f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

BIAGGIO, R.T.; ABREU-NETO M.S.; COVAS D.T.; SWIECH, K. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth and cryopreservation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p.1495-507, 2015.

BLASEY, H. D.; AUBRY, J-P.; MAZZEI, G. J.; BERNARD, A. R. Large scale transient expression with COS cells. **Cytotechnology**, v. 18, p. 183–192, 1996.

BLATT PM, LUNDBLAD RL, KINGDON HS, MCLEAN G, ROBERTS HR. Thrombogenic materials in prothrombin complex concentrates. **Ann. Intern. Med.**, v. 81, p. 766-70, 1974.

BÖHM, E.; SEYFRIED, B. K.; DOCKAL, M.; GRANINGER, M.; HASSLACHER, M.; NEURATH, M.; KONETSCHNY, C.; MATTHIESSEN, P.; MITTERER, A.; SCHEIFLINGER, F. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. **BMC Biotechnol.**, v. 87, p. 1-15, 2015.

BOROWSKI, M.; FURIE, B. C.; GOLDSMITH, G. H.; FURIE, B. Metal and phospholipid binding properties of partially carboxylated human prothrombin variants. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9258-9264, 1985.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free Cell Culture: The Serum –free Media Interactive Online Database. **Altex**, v. 27, n.1, p.53-62, 2010.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.68, p. 283-291, 2005.

BUTLER, M.; SPEARMAN, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 30, p. 107-12, 2014.

CARISSIMI, C.; BACCON, J.; STRACCIA, M.; CHIARELLA, P.; MAIOLICA, A.; SAWYER, A.; RAPPSILBER, J.; PELLIZZONI, L. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 11, p. 2348-54, 2005.

CARON, A. L.; PICANCO-CASTRO, V.; SVEN, A.; COVAS, D. T.; KAMEN, A.; SWIECH, K. Production of Lentiviral Vectors Encoding Recombinant Factor VIII Expression in Serum-Free Suspension Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 923-928, 2015.

CASADEMUNT, E.; MARTINELLE, K.; JERNBERG, M.; WINGE, S.; TIEMEYER, M.; BIESERT, L.; KNAUB, S.; WALTER, O.; SCHRÖDER, C. The first recombinant human

coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. **Eur J Haematol.**, v. 89, n. 2, p. 165-76, 2012.

CASTILHO-FERNANDES A.; FONTES, A.; GONSALES, N.; SWIECH, K.; PICANCO-CASTRO, V.; FACA, S.; COVAS, D. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. **Biotechnol Appl Biochem.**, v. 58, n. 4, p. 243-9, 2011.

CERVERA, L.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; MARTÍNEZ, M.; BLANCO, J.; GÒDIA, F.; SEGURA, M. M. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, 2013.

CERVERA, L.; FUENMAYOR, J.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, I.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; SEGURA, M. M.; GÒDIA, F. Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 99, n. 23, p. 9935-49. 2015.

CHICO, E; RODRÍGUEZ, G; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 9, p. 216-254.

CHO, M. S, Bayer Corporation. **Human hybrid host cell for mammalian gene expression**. US 6,136,599, 24 Out. 2000.

CHO, M. S.; YEE, H.; BROWN, C.; JEANG., K.; CHAN, S. An oriP expression vector containing the HIV-1 Tat/TAR transactivation axis produces high levels of protein expression in mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 37, p. 23–30, 2001.

CHO, M. S.; YEE, H.; CHAN, S. Establishment of a Human Somatic Hybrid Cell Line for Recombinant Protein Production. **J Biomed Sci**; v. 9, p. 631-638, 2002.

CHO, M. S.; YEE, H.; BROWN, C.; MEI, B.; MIRENDA, C.; CHAN, S. Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins. **Biotechnol. Prog.**, v.19, n. 1, p. 229-32, 2003.

CHONG, S. Overview of Cell-Free Protein Synthesis: Historic Landmarks, Commercial Systems, and Expanding Applications. **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, v. 108, p. 1-11, 2014.

CHU, L.; ROBINSON D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 180-187, 2001.

CHUNG, C. H.; MIRAKHUR, B.; CHAN, E.; LE, Q. T.; BERLIN, J.; MORSE, M.; MURPHY, B. A.; SATINOVER, S. M.; HOSEN, J.; MAURO, D.; SLEBOS, R. J.; ZHOU, Q.; GOLD, D.; HATLEY, T.; HICKLIN, D. J.; PLATTS-MILLS, T. A. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 11, p. 1109-17, 2008.

COCO-MARTIN, J. M.; HARMSSEN. M. M. A Review of Therapeutic Protein Expression By Mammalian Cells. **BioProcess International**, cap. 4, p. 28-33, 2008.

COTÉ, M. T. J.; KAMEN, A. A.; MASSIE, B. National Research Council of Canada. **Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors**. US 6,210,922 B1, 03 Apr. 2001.

COVAS, D. T.; FREITAS, M. C. C.; PICANÇO E CASTRO, V.; SWIECH, K. **Processo de produção do fator vii de coagulação sanguínea e fator vii de coagulação sanguínea**. WO 2016/187683 A1, 01 Dez. 2016.

DALLA-FAVERA, R.; BREJNI, M.; ERIKSON, J.; PATTERSON, D.; GALLO, R.C; CROCE, C. M. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 7824-7827, 1982.

DAVEY, R. J.; SHASHATY, G. G.; RATH, C. E. Acute coagulopathy following infusion of prothrombin complex concentrate. **Am. J. Med.**, v. 60, p. 719-22, 1976.

DE BELLE, I.; HUANG, R. P.; FAN, Y.; LIU, C.; MERCOLA, D.; ADAMSON, E. D. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. **Oncogene**, v. 18, n. 24, p. 3633–3642, 1999.

DE SOUSA BOMFIM, A.; FREITAS, M. C. C.; PICANÇO-CASTRO, V.; DE ABREU SOARES NETO, M.; SWIECH, K.; COVAS, D. T.; RUSSO, E. M. S. Human cell lines: A promising alternative for recombinant FIX production. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 149-156, 2016.

DE SOUZA RUSSO CARBOLANTE, E. M.; SWIECH, K.; COVAS, D. T.; PICANÇO E CASTRO, V. **Large scale and stable production of human FVIII in the human cell line Sk-Hep-1**. US 8,969,041 B2, 03 Mar. 2015.

DELAFOSSSE, L.; XU, P.; DUROCHER, Y. Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells. **J. Biotechnol.**, v. 227, p. 103-111, 2016.

DIETMAIR, S. NIELSEN, L. K.; TIMMINS, N. E. Engineering a mammalian super producer. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 86, p. 905–914, 2011.

DRAGANOV, M.; MURDJEVA, M. A. ; KAMBEROV, E. Development of a new serum-free cell culture system, McCoy–Plovdiv. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 36: p. 284–286, 2000.

DUMONT, J. A.; LIU, T.; LOW, S. C; *et al.* Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3024-3030, 2012.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 36, n. 6, p. 1110-1122, 2015.

DUROCHER, Y.; PERRET, S.; KAMEN, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 2, p. 1-9, 2002.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20; p. 700–707, 2009.

ENJOLRAS, N.; DARGAUD, Y.; PÉROT, E.; GUILLAUME, F.; BECCHI, M.; NÉGRIER, C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. **Thromb Res.**, v. 130, n. 5, p. e266-73, 2012.

ESSERS, R.; KEWES, H.; SCHIEDNER, G. Improving volumetric productivity of a stable human CAP cell line by bioprocess optimization. **BMC Proceedings**, v. 5(Suplem. 8), p. 1-3, 2011.

EUN, J. R.; JUNG, Y. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; TSCHUDY-SENEY, B.; RAMSAMOOJ, R.; WAN, Y. J.; THEISE, N. D.; ZERN, M. A.; DUAN, Y. Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1 - 8, 2014.

FALLAUX, F. J. ; BOUT, A.; VAN DER VELDE, I.; *et al.* New Helper Cells and Matched Early Region 1-Deleted Adenovirus Vectors Prevent Generation of Replication-Competent Adenoviruses. **HUMAN GENE THERAPY**, v. 9, p. 1909-1917, 1998.

FANTACINI, D. M. C.; FONTES, A. M.; DE ABREU NETO, M. S.; COVAS, D. T.; PICANÇO-CASTRO, V. The F309S mutation increases factor VIII secretion in human cell line. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, p. 135-140, 2016.

FISCHER, S.; CHARARA, N.; GERBER, A.; WÖLFEL, J.; SCHIEDNER, G.; VOEDISCH, B.; GEISSE, S. Transient Recombinant Protein Expression in a Human Amniocyte Cell Line: The CAP-T[®] Cell System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 2250-2261, 2012.

FOGH, J.; TREMPER, G. Human tumor cells in vitro. New York: **Plenum Press**; 1975.

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

FREITAS, M. C. C.; BOMFIM, A. S.; MIZUKAMI, A.; PICANÇO-CASTRO, V.; SWIECH, K.; COVAS, D. T. Production of coagulation factor VII in human cell lines Sk-Hep-1 and HKB-11. **Protein Expr. Purif.**, v. 137, p. 26-33, 2017.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5th Ed. **Wiley-Liss**, New York, 2005.

GEISSE, S., JORDAN, M.; WURM, F. Large-scale transient expression of therapeutic proteins in mammalian cells. In: Smales C, James D (eds). Therapeutic proteins. **Humana Press**, Totowa NJ, p. 87–98, 2005.

GENZEL, Y.; BEHRENDT, I.; RÖDIG, J.; *et al.* CAP, a new human suspension cell line for influenza virus production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 111–122, 2013.

GENZEL, Y. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?. **Biotechnol J.**, v.10, n. 5, p. 728-40, 2015.

GHADERI, D.; TAYLOR, R. E.; PADLER-KARAVANI, V.; DIAZ, S.; VARKI, A. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. **Nat Biotechnol.**, v. 28, n. 8, p. 863-7, 2010.

GHADERI, D.; ZHANG, M.; HURTADO-ZIOLA, N.; VARKI, A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 28, p. 147-176, 2012.

GIRARD, P.; DEROUAZI, M.; BAUMGARTNER, G.; BOURGEOIS, M.; JORDAN, M.; JACKO, B.; WURM, F. M. 100-liter transient transfection. **Cytotechnology**, v. 38, p. 15–21, 2002.

GLASGOW, J. E.; COLMAN, R. W. Fibronectin Synthesized by a Human Hepatoma Cell Line. **Cancer Research**, v. 44, p. 3022-3028, 1984.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 5177–5181, 1999.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. B. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 346-356, 2016.

GORETA, S. S.; DABELIC, S.; DUMIC, J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 22, p. 156-170, 2012.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W.; NAIRN, C. R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol**, v. 36, p. 59-67, 1977.

GRILLBERGER, L.; KREIL, T. R.; NASR, S.; REITER, M. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 186-201, 2009.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

HACKER, D. L.; KISELJAK, D.; RAJENDRA, Y.; THURNHEER, S.; BALDI, L.; WURM, F. M. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 67-76, 2013.

HAGEN, F. S.; GRAY, C. L.; O'HARA, P.; GRANT, F. J.; SAARI, G. C.; WOODBURY, R. G.; HART, C. E.; INSLEY, M.; KISIEL, W.; KURACHI, K.; et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 8, p. 2412-6, 1986.

HAGEN, F. S. et al.; ZymoGenetics, Inc. **Expression of factor VII and IX activities in mammalian cells**. US 8,603,777 B1, 10 Dec. 2013.

HALABIAN, R.; FATHABAD, M. E.; MASROORI, N.; et al. Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology. **Blood Transfus.**, v. 7, n. 4, p. 305–312, 2009.

HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 336-346, 1999.

HALDANKAR, R.; LI, D.; SAREMI, Z.; BAIKALOV, C.; DESHPANDE, R. Serum-free suspension large-scale transient transfection of CHO cells in WAVE bioreactors. **Mol. Biotechnol.**, v. 34, n. 2, p. 191-9, 2006.

HAN, X.; SUN, L.; FANG, Q.; LI, D.; GONG, X.; WU, Y.; YANG, S.; SHEN, B. Q. Transient expression of osteopontin in HEK 293 cells in serum-free culture. **Enzyme and Microbial**

Technology, v. 41, p. 133–140, 2007.

HAN, X.; FANG, Q.; YAO, F.; WANG, X.; WANG, J.; YANG, S.; SHEN, B. Q. The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. **Cytotechnology**, v. 60, p. 63-75, 2009.

HASANBASIC, I.; CUERQUIS, J.; VARNUM, B.; BLOSTEIN, M. D. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, p. H1207–H1213, 2004.

HAUDEK, K.C.; SPRONK, K. J.; VOSS, P.G.; et al. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 2, p. 181-9, 2010.

HEDNER, U. Recombinant activated factor VII: 30 years of research and innovation. **Blood Rev.**, v. 29 S1, p. S4-8, 2015.

HEDNER, U., KISIEL, W. The use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia patients with high-titer inhibitors. **J. Clin. Invest.**, v. 71, p. 1836–1841, 1983.

HEFFELFINGER, S. C.; HAWKINS, H. H.; BARRISH, J.; TAYLOR, L.; DARLINGTON, G. J. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. **In Vitro Cell Dev Biol.**, v. 28A, n. 2, p. 136-42, 1992.

HENRY, O.; JOLICOEUR, M.; KAMEN A. Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactateisotopomer analysis. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 34, p. 263–273, 2011.

HERLITSCHKA, S. E.; SCHLOKAT, U.; FALKNER, F. G., DORNE, F. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**, v.61, p. 165-173, 1998.

HERNÁNDEZ, Y. G.; FISCHER, R. W. Serum-free Culturing of Mammalian Cells – Adaptation to and Cryopreservation in Fully Defined Media. **ALTEX**, v. 24, n. 2, 2007.

HERNANDEZ, J. C.; PIERA, C. M. Ares Trading S.A. **Serum-free cell culture medium for mammalian cells**. US 7,709,229 B2, 04 Mai. 2010.

HO, R. Proteomic Analysis of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Glycosylated Monoclonal Antibodies. 2013. 169 folhas. **Dissertação de mestrado**. University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.

HU, W. S.; AUNINS, J. G. Large-scale mammalian cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 148-153, 1997.

HUTCHINGS, S. E.; SATO, G. H. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 2, p. 901-904, 1978.

JÄGER, V.; BÜSSOW, K.; WAGNER, A.; WEBER, S.; HUST, M.; FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. **BMC Biotechnol.**, v. 13, n. 52, p.1-20, 2013.

JALURIA, P.; KONSTANTOPOULOS, K.; BETENBAUGH, M.; SHILOACH, J. *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. 1443-1452, 2008.

JIA, M.; SOUCHELNYTSKYI, S. Proteome profiling of heat shock of human primary breast epithelial cells, a dataset report. **Cell Stress Chaperones**, v. 16, n. 4, p. 459-67, 2011.

JIN, L.; ZENG, X.; LIU, M.; DENG, Y.; HE, N. Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. **Theranostics**, v. 4, n. 3, p. 240-255, 2014.

JONES, D.; KROOS, N.; ANEMA, R.; et al. High-Level Expression of Recombinant IgG in the Human Cell Line PER.C6. **Biotechnol. Prog.**, n. 19, p. 163-168, 2003.

KADLECOVA, Z.; NALLET, S.; HACKER, D. L.; BALDI, L.; KLOK, H. A.; WURM, F. M. Poly(ethyleneimine)-mediated large-scale transient gene expression: influence of molecular weight, polydispersity and N-propionyl groups. **Macromol. Biosci.**, v. 12, n. 5, p. 628-36, 2012.

KANG, S.; SONG, J.; KANG, H.; et al. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, p. 147–155, 2003.

KANG, H. C.; KIM, J. Y.; LEE, B. S.; KIM, H. U.; CHOI, I. Y.; KWON, S. C. Hanmi Pharmaceutical Co Ltd. **Method for mass production of factor vii/viia derivatives**. US 0215278 A1, 28 Jul. 2016.

KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; PRCHAL, J.; LEVI, M. M.; PRESS, O. W.; BURNS, L. J.; CALIGIURI, M. Williams Hematology. 9ª Edição. McGraw-Hill Education / Medical, 2008, Cap. 115.

KIM, E. J.; KIM, N. S.; LEE, G. M. Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v. 35, p. 178-182, 1999.

KIM, K.; KIM, M. S.; MOON, J. H.; et al. Enhancement of Recombinant Antibody Production in HEK 293E Cells by WPRE. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 633-638, 2009.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 397, p. 3173 – 3178, 2010.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 93, p. 917-930, 2012.

KIM, M.Y.; LEE, J.U., KIM J.H., et al. Phosphorylation of Heat Shock Protein 27 is Increased by Cast Immobilization and by Serum-free Starvation in Skeletal Muscles. **J Phys Ther Sci.**, v. 26, n. 12, p. 1975-7, 2014.

KNOWLES, B. B.; ADEN, D. P. The Wistar Institute of Anatomy and Biology. **Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses thereof**. US 4,393,133, 12 Jul. 1983.

KOPATZ, I.; REMY, J.S.; BEHR, J.P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. **J. Gene Med.**, v. 6, p. 769–776, 2004.

KRUIF, J.; KRAMER, A.; NIJHUIS, R.; ZANDE, V.; BLANKEN, R.; CLEMENTS, C.; VISSER, T.; KEEHNEN, R.; HARTOG, M.; THROSBY, M.; LOGTENBERG, T. Generation of Stable Cell Clones Expressing Mixtures of Human Antibodies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, p. 741-750, 2010.

KUCZEWSKI, M.; SCHIRMER, E.; LAIN, B.; ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. **Biotechnol J.**, v. 6: p. 56 - 65, 2011.

KUNERT, R.; REINHART, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, n. 8, p. 3451-61, 2016.

LANGER, E. On the Horizon: New Expression Systems to Become Common Industry Platforms. The economics and increased simplicity of new platforms make them better alternatives to the currently dominant *E. coli*, yeast, and CHO systems. **BioPharm International**, n. 1, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.biopharminternational.com/biopharm/Business/On-the-Horizon-New-Expression-Systems-to-Become-Co/ArticleStandard/Article/detail/601408>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

LEFEBVRE, S.; BENOIT, E.; LATTARDET, V. Comparative Biology of the Resistance to Vitamin K Antagonists: An Overview of the Resistance Mechanisms. **INTECH**, 2016, Cap. 2, p1-29.

LEVITT, M.S.; TOPILOW, A. A.; LERNER, W. L.; et al. A Case of FVII Inhibitor. **Blood**, v. 116, p. 3655, 2010.

LIU, X. M.; LIU, H.; WU, B. C.; et al. Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 72, p. 1144–1151, 2006.

LOIGNON, M.; PERRET, S.; KELLY, J.; BOULAIS, D.; CASS, B.; BISSON, L.; AFKHAMIZARREH, F.; DUROCHER, Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-16, 2008.

MAHLANGU, J.; POWELL, J. S.; RAGNI, M. V.; et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. **Blood**, v. 123, p. 317–25, 2014.

MARANGA, L.; AUNINS, J. G.; ZHOU, W. Characterization of Changes in PER.C6TM Cellular Metabolism During Growth and Propagation of a Replication-Deficient Adenovirus Vector. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 5, 2005.

MCCUE, J.; KSHIRSAGAR, R.; SELVITELLI, K.; LU, Q.; ZHANG, M.; MEI, B.; PETERS, R.; PIERCE, G. F.; DUMONT, J.; RASO, S.; REICHERT, H. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. **Biologicals**, v. 43, n. 4, p. 213-9, 2015.

MEI, B.; CHEN, Y.; CHEN, J.; PAN, C. Q.; MURPHY, J. E. Expression of human coagulation factor VIII in a Human Hybrid Cell line, HKB-11. **Molecular Biotechnology**, v.34, p.165-178, 2006.

MEI, B.; PAN, C.; JIANG, H.; TJANDRA, H.; *et al.* Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. **BLOOD**, v. 116, n. 2, 2010.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 16, p. 384-402.

MEURIS, L.; SANTENS, F.; ELSON, G.; FESTJENS, N.; BOONE, M.; DOS SANTOS, A.; DEVOS, S.; ROUSSEAU, F.; PLETS, E.; HOUTHUYS, E.; MALINGE, P.; MAGISTRELLI, G.; CONS, L.; CHATEL, L.; DEVREESE, B.; CALLEWAERT, N. GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins. **Nat Biotechnol.**, v. 32, n. 5, p. 485-9, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. **Hemofilia Congênita e Inibidor - Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos**. 1ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. **Recomendações de uso do fator VII ativado recombinante para pacientes com hemofilia congênita e inibidor e deficiência hereditária de fator VII**. 1ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2015**. 1ª Ed. – Ministério da Saúde, Brasília, 2017.

MILIÁN, E.; JULIEN, T.; BIAGGIO, R.; VENEREO-SANCHEZ, A.; MONTES, J.; MANCEUR, A. P.; ANSORGE, S.; PETIOT, E.; ROSA-CALATRAVA, M.; KAMEN, A. Accelerated mass production of influenza virus seed stocks in HEK-293 suspension cell cultures by reverse genetics. **Vaccine**, v. 35, n. 26, p. 3423-3430, 2017.

MOLINAS, M. M. B.; BEER, C.; HESSE, F.; WIRTH, M.; WAGNER, R. Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring. **Cytotechnology**, v. 66, p.493–514, 2014.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H. R. In: Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. In: Kaushansky, K et al. **Williams Hematology**. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional Publishing; 2010. Chapter 115; p. 614–6.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 5, p. 105-121.

MORAN, N. Shire's replacement enzymes validate gene activation. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 1139–1140, 2010.

MORETTI, P.; BEHR, L.; WALTER, J. G.; *et al.* Characterization and improvement of cell line performance *via* flow cytometry and cell sorting. **Eng. Life Sci.**, v. 10, n. 2, p. 130–138, 2010.

MULLER, N.; GIRARD, P.; HACKER, D. L.; JORDAN, M.; WURM, F. M. Orbital Shaker Technology for the Cultivation of Mammalian Cells in Suspension. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 4, 2005.

NAKABAYASHI, H.; TAKETA, K.; MIYANO, K.; YAMANE, T.; SATO, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer Res.**, v. 42, n. 9, p. 3858-63, 1982.

NAKAMURA, N.; NAKAMINE, H.; TAMARU, J.; et al. The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse Large B-cell Lymphoma with c-myc rearrangement. **Mod Pathol**, v. 15, n. 7, p. 771-776, 2002.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, p. 263–267, 1996.

Naldini, L. et al., **Science**, v. 272, n. 263, p. (1996).

NALDINI, L.; TRONO, D.; VERMA, I. M. Lentiviral vectors, two decades later. A deadly virus became an effective gene delivery tool. **Gene Therapy**, v. 353, n. 6304, p. 1101-1102, 2016.

NISHIKAWA, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. **Cancer Lett.**, v. 266, n. 1, p. 53-9, 2008.

ORINO, K.; LEHMAN, L.; TSUJI, Y.; AYAKI, H.; et al. Ferritin and the response to oxidative stress. **Biochem. J.**, v. 357, p. 241–247, 2001.

PADLER-KARAVANI, V.; Yu, H.; Cao, H.; et al. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. **Glycobiology**, v. 18, n. 10 p. 818–830, 2008.

PADLER-KARAVANI, V.; VARKI, A. Potential Impact of the Non-Human Sialic Acid *N*-Glycolylneuraminic Acid on Transplant Rejection Risk. **Xenotransplantation**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2011.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth.**, v. 58, n. 5, p. 515-23, 2014.

PASCHOAL, J. F. B. **Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PASCHOAL, J. F. B. **Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro.** Tese (Doutorado em Biotecnologia). São Paulo: 2016, 114 f.

PAU, M. G.; OPHORST, C.; KOLDIJK, M. H.; SCHOUTEN, G.; MEHTALI, M.; UYTDEHAAG, F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2716–2721, 2001.

PAZ, A.; HAKLAI, R.; ELAD-SFADIA, G; et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane Anchorage and cell transformation. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p. 7486-93, 2001.

PAZOS, P.; BOVERI, M.; GENNARI, A.; CASADO, J.; FERNANDEZ, F.; PRIETO, P. Culturing Cells Without Serum: Lessons Learnt Using Molecules of Plant Origin. **ALTEX**, v. 21, p. 67-72, 2004.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; SAAD, A. Z. M. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. **Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.**, v. 11, n. 4, p. 319–327, 2017.

PEROT, E.; ENJOLRAS, N.; LE QUELLEC, S.; INDALECIO, A.; GIRARD, J.; NEGRIER, C.; DARGAUD, Y. Expression and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced in vitro and in vivo clotting activity. **Thromb Res.**, v. 135, n. 5, p. 1017-24, 2015.

PERSSON, E.; AKARP, A. Novo Nordisk HealthCare A/G. **COAGULATION FACTOR VII DERIVATIVES**. US 7,235,638 B2, 26 JUN. 2007.

PETIOT, E.; JACOB, D.; LANTHIER, S.; LOHR, V.; ANSORGE, S.; KAMEN, A. A. Metabolic and Kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 84, p. 1-12, 2011.

PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Mol Biotechnol.**, v. 34, n. 2, p. 225-37, 2006.

PICANÇO-CASTRO, V.; HEINZ, S.; BOTT, D.; BEHRMANN, M.; COVAS, D.T.; SEIFRIED, E.; TONN, T. 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.785-794 , 2007.

PICANÇO-CASTRO, V.; BIAGGIO, R. T.; COVAS, D. T.; SWIECH, K. Production of Recombinant Therapeutic Proteins in Human Cells: Current Achievements and Future Perspectives. **Protein & Peptide Letters**, v. 20, p. 1373-1381, 2013.

PIPE, S.W. Recombinant clotting factors. **Thromb Haemost.**, v. 99, n. 5, p. 840-50, 2008.

POWELL, J. S.; JOSEPHSON, N. C.; QUON, D.; RAGNI, M. V.; CHENG, G.; LI, E.; JIANG, H.; LI, L.; DUMONT, J. A.; GOYAL, J.; ZHANG, X.; SOMMER, J.; MCCUE, J.; BARBETTI, M.; LUK, A.; PIERCE, G. F. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3031-7, 2012.

PRICE, P. J.; GREGORY, E. A. Relationship between *in vitro* growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. **IN VITRO**, v. 18, n. 6, 1982.

RACHIDI, S.; SUN, S.; WU, B. X.; JONES, E.; DRAKE, R. R.; OGRETMEN, B.; COWART, L. A.; CLARKE, C. J.; HANNUN, Y. A.; CHIOSIS, G.; LIU, B.; LI, Z. Endoplasmic reticulum heat shock protein gp96 maintains liver homeostasis and promotes hepatocellular carcinogenesis. **J Hepatol.**, v. 62, n. 4, p. 879-88, 2015.

RADER, R. A. FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. **BioProcess International**, v. 11, n. 3, p. 18-27, 2013.

RAJENDRA, Y.; KISELJAK, D.; BALDI, L.; WURM, F. M. Transcriptional and Post-Transcriptional Limitations of High-Yielding, PEI-Mediated Transient Transfection with CHO and HEK-293E Cells. **Biotechnol. Prog.**, v. 00, n. 00, 2015.

RISBUD, M. V.; FERTALA, J.; VRESILOVIC, E. J.; ALBERT, T. J.; SHAPIRO, I. M. Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal. **Spine**, v. 30, p. 882–889, 2005.

ROSA, N. G.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M.; SOARES NETO, M. A.; DE CASTILHO-FERNANDES, A.; FAÇA, V. M.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnol Lett.**, v. 34, n. 8, p. 1435-43, 2012.

ROSS, D.; BROWN, T.; HARPER, R.; PAMARTHI, M.; NIXON, J.; BROMIRSKI, J.; LI, C. M.; GHALI, R.; XIE, H.; MEDVEDEFF, G.; LI, H.; SCUDERI, P.; ARORA, V.; HUNT, J.; BARNETT, T. Production and characterization of a novel human recombinant alpha-1-antitrypsin in PER.C6 cells. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 262-273, 2012.

SAINZ, B. JR.; CHISARI, F. V. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. **J Virol.**, v. 80, n. 20, p.10253-7, 2006.

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

SANCHEZ-GARCIA, L.; MARTÍN, L.; MANGUES, R.; FERRER-MIRALLES, N.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microb Cell Fact.**, v. 15, n. 33, p. 1-7, 2016.

SANDERS, B. P.; EDO-MATAS, D.; CUSTERS, J. H. H. V.; KOLDIJK, M. H.; KLAREN, V.; TURK, M.; LUITJENS, A.; BAKKER, W. A. M.; UYTDEHAAG, F.; GOUDSMIT, J.; LEWIS, J. A.; SCHUITMAKER, H. PER.C6[®] cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: A potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. **Vaccine**, v. 31, p. 850- 856, 2013.

SCHAMBERGER, C J.; GERNER, C.; CERNI, C. Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 302, p. 115 – 128, 2005.

SCHIEDNER, G.; HERTEL, S.; KOCHANKEK, S. Efficient Transformation of Primary Human Amniocytes by E1 Functions of Ad5: Generation of New Cell Lines for Adenoviral Vector Production. **Human Gene Therapy**, v. 11, p. 2105– 2116, 2000.

SCHIEDNER, G.; HERTEL, S.; BIALEK, C.; KEWES, H.; WASCHÜTZ G.; VOLPERS, C. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2008.

SCHRÖDER, M.; MATISCHAK, K.; FRIEDL, P. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p. 279–292, 2004.

SCHRÖDER, M. Engineering eukaryotic protein factories. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 187–196, 2008.

SEO, J. S.; KIM, Y. J.; CHO, J. M.; BAEK, E.; LEE, G. M. Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 °C and 37.0 °C. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 5283–5291, 2013.

SHAPIRO, A. D.; RAGNI, M. V.; VALENTINO, L. A.; et al. Recombinant factor IX-Fc fusion protein (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B patients. **Blood**, 119, 666–72, 2012.

SHUKLA, A. A.; ARANHA, H. Viral clearance for biopharmaceutical downstream processes. **Pharm. Bioprocess**, v. 3, n. 2, 2015.

SINACORE, M. S.; DRAPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of Mammalian Cells to Growth in Serum-Free Media. **Molecular Biotechnology**, v. 15, p. 249-257, 2000.

SONG, M.; RAPHAELLI, K.; JONES, M. L.; et al. Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 1, n. 86, p. 935–994, 2011.

SUN, X.; GOH, P. E.; WONG, K. T. K.; MORI, T.; YAP, M. G. S. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 843–848, 2006.

SUN, X.; HIA, H. C.; GOH, P. E.; YAP, M. G. S. High-Density Transient Gene Expression in Suspension-Adapted 293 EBNA1 Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, 2008.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 385–394, 2010.

SWIECH, K.; KAMEN, A.; ANSORGE, S.; DUROCHER, Y.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; ABREU NETO, M. S.; COVAS, D. T. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, n.114, p. 1-10, 2011.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 84, p. 147–153, 2012.

TANG, L.; LEONG, L.; SIM, D.; et al. von Willebrand factor contributes to longer half-life of PEGylated factor VIII *in vivo*. **Haemophilia**, v. 19, p. 539–545, 2013.

TANG, Y.; GARSON, K.; LI, L.; VANDERHYDEN, B. C. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. **Oncol Lett.**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2015.

TCHOUDAKOVA, A.; HENSEL, F.; MURILLO, A.; ENG, B.; FOLEY, M.; SMITH, L.; SCHOENEN, F.; HILDEBRAND, A.; KELTER, A.-R.; ILAG, L. L.; VOLLMERS, H. P.; BRANDLEIN, S.; MCININCH, J.; CHON, J.; LEE, G.; CACCIUTTOLO, M. High level expression of functional human IgMs in human PER.C6[®] cells. **mAbs**, v. 1, 163-171, 2009

THIM, L.; BJOERN, S.; CHRISTENSEN, M.; NICOLAISEN, E. M.; LUND-HANSEN, T.; PEDERSEN, A. H.; HEDNER, U. Amino acid sequence and posttranslational modifications of

human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. **Biochemistry**, v. 27, n. 20, p. 7785-93, 1988.

THORING, L.; DONDAPATI, S. K.; STECH, M.; WÜSTENHAGEN, D. A.; KUBICK, S. High-yield production of "difficult-to-express" proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

TIE, J.K.; JIN, D.Y.; STRAIGHT, D. L.; STAFFORD, D. W. FUNCTIONAL STUDY OF THE VITAMIN K CYCLE IN MAMMALIAN CELLS. **Blood**, v.117, n. 10, p. 2967-74, 2011.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Lett.**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, n. 7, p. 579-91, 2009.

TURNER, B. M.; TURNER, V. S. Secretion of alpha-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. **Somatic Cell Genetics**, v. 6, p. 1-14; 1980.

TUVESSON, O.; UHE, C.; ROZKOV, A.; LÜLLAU, E. Development of a generic transient transfection process at 100 L scale. **Cytotechnology**, v. 56, n. 2, p. 123–136, 2008.

UNIM, B.; VENEZIANO, M. A.; BOCCIA, A.; RICCIARDI, W.; TORRE, G. Haemophilia A: Pharmacoeconomic Review of Prophylaxis Treatment versus On-Demand. **The Scientific World Journal**, p. 9, 2015.

VALDÉS, R. ; IBARRA, N.; GONZÁLEZ, M.; *et al.* CB.Hep-1 hybridoma growth and antibody production using protein-free medium in a hollow fiber bioreactor, **Cytotechnology**, v. 35, p. 145–154, 2001.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; *et al.* The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 1–12, 2004.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; *et al.* Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. **Toxicology in Vitro**, n.24, p. 1053-1063, 2010.

VIROLLE, T.; KRONES-HERZIG, A.; BARON, V.; DE GREGORIO, G.; ADAMSON, E. D.; MERCOLA, D. Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 14, p. 11802–11810, 2003.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced Functional Recombinant Factor VII Production by HEK 293 Cells Stably Transfected with VKORC1 where the Gamma-Carboxylase Inhibitor Calumenin is Stably Suppressed by shRNA Transfection. **Thromb Res.**, v. 122, p. 405-410, 2008.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nat Biotechnol.**, v. 24, n. 10, p. 1241-52, 2006.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17/18, 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 992-1000, 2014.

WANG, R. C.; HUANG, C. Y.; PAN, T. L.; CHEN, W. Y.; HO, C. T.; LIU, T. Z.; CHANG Y. J. Proteomic Characterization of Annexin I (ANX1) and Heat Shock Protein 27 (HSP27) as Biomarkers for Invasive Hepatocellular Carcinoma Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 10 p. 1-22, 2015.

WEI, Y. C.; NADERI, S.; MESHRAM, M.; BUDMAN, H.; SCHARER, J. M.; INGALLS, B. P.; MCCONKEY, B. J. Proteomics analysis of chinese hamster ovary cells undergoing apoptosis during prolonged cultivation. **Cytotechnology**, v. 63, p. 663–677, 2011.

WEISKOPF, R. B. Recombinant-activated coagulation factor VIIa (NovoSeven): current development. **Vox Sang**, v. 92, p. 281–288, 2007.

WESTON, B. W.; MONAHAN, P. E. Familial deficiency of vitamin K-dependent clotting factors. **Haemophilia**, v. 14, n. 6, p. 1209-13, 2008.

WION, K. L.; KELLY, D.; SUMMERFIELD, J. A.; TUDDENHAM, E. G.; LAWN, R. M. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. **Nature**, v. 317, p. 726-9, 1985.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2017. **Report on the Annual Global Survey 2016**. Disponível em: <<https://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1669.pdf>> Acesso em 15 de Fevereiro de 2018.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n.11, 2004.

YALLOP, C.; CROWLEY, J.; COTE, J.; HEGMANS-BROUWER, K.; LAGERWERF, F.; GAGNE, R.; MARTIN, J.C.; OOSTERHUIS, N.; OPSTELTEN, D.J.; BOUT, A. PER.C6[®] Cells for the Manufacture of Biopharmaceutical Proteins, in: J. Knablein (Ed.), Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization, **Wiley-VCH**, Weinheim, p. 779–807, 2008.

YANG, Z.; ZHUANG, L.; SZATMARY, P.; WEN, L.; SUN, H.; LU, Y.; XU, Q.; CHEN, X1. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma. **Int J Med Sci.**, v. 12, n. 3, p. 256-63, 2015.

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