

Erika de Simone Molina

**Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação humano
recombinante no modelo murino de hemofilia A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

Erika de Simone Molina

**Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação humano
recombinante no modelo murino de hemofilia A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Marcos Angelo Almeida Demasi

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Molina, Erika de Simone.

Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação humano recombinante no modelo murino de hemofilia A / Erika de Simone Molina. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Angelo Almeida Demasi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção e caracterização de biofármacos.

Versão do título para o inglês: Immunogenicity evaluation of recombinant clotting factor VIII in a murine model of hemophilia A.

1. Biofármaco 2. Fatores de coagulação sanguínea 3. Fator VIII
4. Hemofilia 5. Inibidores 6. Biotecnologia I. Demasi, Prof. Dr. Marcos Angelo Almeida II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0111/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Erika de Simone Molina.

Título da Dissertação: Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação humano recombinante no modelo murino de hemofilia A.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcos Angelo Almeida Demasi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO Nº 20/2012

Certifico que os Projetos “**Avaliação da indução de resposta imune ao fator VIII da coagulação humano recombinante em modelo murino de hemofilia tipo A**”, desenvolvidos sob responsabilidade da **Profa. Mari Cleide Sogayar**, estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 07/12/2012.

We attest that the project entitled “**Avaliação da indução de resposta imune ao fator VIII da coagulação humano recombinante em modelo murino de hemofilia tipo A**”, developed under the responsibility of **Dr. Mari Cleide Sogayar**, in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 12/7/2012.

São Paulo, 7 de dezembro de 2012.

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

Aos Hemofílicos e suas Famílias; aos Animais de Experimentação; e a Todos que possam vir a se beneficiar desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Mari Cleide Sogayar por sua confiança, acolhimento e co-orientação. Também pelo admirável equipe-laboratório em que pude desenvolver esta dissertação e outras tantas vivências, histórias e conquistas que incentivam nosso trabalho.

Ao Dr. Marcos Angelo Almeida Demasi pela oportunidade de ter sido sua aluna e pela valiosa orientação. Agradeço especialmente pela disponibilidade, paciência ilimitada e toda parceria durante esta jornada. Pela constante inspiração, sobretudo na coragem para a atividade da Ciência. Pelo incomensurável tudo que pude aprender e discutir.

A todos os companheiros do Nuclel, em especial à Dra. Ana Cláudia Carreira, juntamente com Dra. Theri Degaki, Gustavo Belchior, Dr. Erik Halcsik e Tatiane Maldonado pelas discussões recombinaentes e, incluindo Marina Lima, Dra. Maria Fernanda Forni e Prof. Dra. Letícia Labriola, pelos conselhos de bancada, de carreira, aos engraçados momentos de descontração e muitas conversas químico-biológicas. À Gisella Grazioli, Dra. Ana Lúcia Campanha, Ms. Marluce Mantovani, Dra. Ana Cristina Milobar, Dra. Letícia Terra, Dra. Patrícia Kossugue, Aline Maia, Roberta Ferrari, Rosângela Waillemann, Matheus Aoki, Dr. Fernando Lojudice, Fernanda Sodré, Luiz Santos, Dra. Katiúcia Paiva, Túlio Pereira e Ladislau Jr. pela agradável convivência, contribuição e ajuda nos apuros de laboratório. Ao Prof. Dr. André Fujita pela disponibilidade e colaboração. Aos queridos alunos de iniciação científica (Gabriel Levin, Caio Carriel, Tatiene Garcia, Adauto Spindola e Thais Ribas) pela disposição e divertido senso de humor. Especialmente à Zizi de Mendonça, Débora Cristina Lopes, Sandra Souza e Ricardo Oliveira por todo trabalho técnico, ensinamentos e gentilezas. À Sylvania Neves, Renata Spalutto, Flavia Ong e Maria de Fátima Souza do Biotério FCF-IQ/USP por todo suporte.

À Prof. Dra. Ana Clara Schenberg pela orientação acadêmica e à Fabia Vilanova, Marcos Lourenço e Eliane Gouveia da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pelo atendimento e assistência; ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) e ao Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo e seus funcionários, em especial à Mônica Amaral da biblioteca do ICB. Ao meu orientador de iniciação científica Dr. Marco Del Lama e à Universidade Federal de São Carlos, aos Professores Dra. Nelsy Verani, Dr. Marco Batalha, Dra. Heloísa Araújo, Dr. Ivan Moreno e Dra. Ana Cristina Pomarico pelas Ciências Biológicas e sementes em mim plantadas. Ao Ministério da Saúde pela doação de fator VIII derivado de plasma e à Secretaria de Saúde do

Distrito Federal pela doação do fator VIII recombinante; à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos.

Aos meus pais, Simone Salotti e Valter Molina, e à minha família, em especial Olívia Salotti, à Vózinha e Antônio Lemos pelo carinho, todo o amor e apoio incondicional. Aos meus queridos primos Ms. Bruno Turra, Gustavo Turra, Vinícius Félix, Edilene Dimov e Fernanda Molina por todo estímulo e torcida. À Ms. Bianca Peres, Ms. Ana Carolina Martin, Ms. Diego Orts e madrinha Ms. Silvia Cobelo, unidos pela Academia e seus percalços. Ao Thiago Namba, Lia Fernanda Lima, João Galante, Ivana Cabral, Debby Chu, Flavia Scarmagnani, Cassius Vinícius e Rafael Pimentel, meus queridos amigos que, por vezes sem entender, acompanharam e/ou participaram dos muitos casos sobre o fator VIII.

“Ignoramus et ignorabimus”

(BOIS-REYMOND, 1874)

“*What* really is this "Will to Truth" in us? In fact we made a long halt at the question as to the origin of this Will - until at last we came to an absolute standstill before a yet more fundamental question. We inquired about the *value* of this Will. Granted that we want the truth: *Why not rather* untruth? And uncertainty? Even ignorance?”

(NIETZSCHE, 1886)

“And the entire process (evolution of scientific ideas) may have occurred, as we now suppose biological evolution did, without a benefit of a set goal, a permanent fixed truth, of which each stage in the development of scientific knowledge is a better exemplar”

(KUHN, 1962)

RESUMO

MOLINA, E. S. **Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação humano recombinante no modelo murino de hemofilia A.** 2013. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

O fator VIII da coagulação (FVIII) é utilizado para o tratamento da hemofilia A, um distúrbio hemorrágico causado pela deficiência plasmática deste fator, o qual pode ser obtido a partir de concentrados do plasma humano ou na sua forma recombinante. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece majoritariamente o FVIII derivado de plasma, cuja importação anual de aproximadamente 250 milhões de unidades internacionais (UI), correspondente a cerca de 90 milhões de dólares, tendo sido destinada quase que exclusivamente ao tratamento emergencial dos pacientes. A fim de contribuir para a produção de biofármacos hemoderivados recombinantes no Brasil, nosso laboratório tem explorado uma alternativa mais eficiente para a produção do FVIII recombinante (rFVIII) em células de mamíferos, utilizando uma forma modificada da proteína. No entanto, variantes artificiais do rFVIII podem apresentar propriedades antigênicas imprevisíveis e induzir a formação diferenciada de anticorpos inibidores do FVIII, sendo, atualmente, a principal complicação associada à terapia de reposição de FVIII, acometendo 30% dos portadores da forma severa da hemofilia A. Nesse sentido, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a imunogenicidade do variante artificial do rFVIII humano produzido em nosso laboratório (rFVIII-lab) utilizando um modelo murino de hemofilia A baseado em camundongos nocaute para o *FVIII*, tendo, como objetivos experimentais específicos, a purificação, caracterização de sua atividade funcional *in vivo* e caracterização da eventual imunogenicidade do rFVIII-lab, quando comparado a produtos de referência, um derivado de plasma (Fanhdi[®]) e outro recombinante disponível comercialmente (Kogenate[®]). A purificação do rFVIII-lab foi realizada a partir de meio de cultura condicionado pelo clone celular superprodutor do rFVIII-lab CHO-DG44 H6A, cultivado em monocamada aderente e suplementado com soro fetal bovino, através de duas etapas cromatográficas (troca aniônica e afinidade à heparina) e uma etapa final de ultrafiltração, resultando na eliminação das principais impurezas contidas no meio de partida e obtenção do rFVIII-lab com atividade específica intermediária quando comparada aos produtos de referência. A caracterização da atividade funcional *in vivo* do rFVIII-lab foi realizada através de um ensaio estabelecido no laboratório, baseado na interrupção de um evento hemorrágico induzido em camundongos-modelo da hemofilia A, buscando-se uma avaliação quantitativa da eficácia de terapias anti-hemofílicas através de quatro parâmetros: tempo de sangramento, probabilidade de correção do fenótipo hemofílico, dose efetiva (ED₅₀) e atividade plasmática do FVIII correspondente (EC₅₀). Dados obtidos com um número ainda limitado de animais indicam que a atividade funcional observada para o rFVIII-lab foi similar quando comparada aos produtos de referência. A imunogenicidade do rFVIII-lab no plasma dos animais modelo da hemofilia A, submetidos a um regime de imunização, foi avaliada através da quantificação de anticorpos totais anti-FVIII utilizando-se ensaio imunoenzimático e anticorpos inibidores pelo ensaio Bethesda, tendo sido menos intensa quando comparada à imunogenicidade observada para os produtos de referência. A expectativa é que o presente estudo colabore para o estabelecimento de uma plataforma de produção do rFVIII no país visando o tratamento dos pacientes hemofílicos brasileiros.

Palavras-chave: Biofármaco. Fatores de coagulação sanguínea. Fator VIII. Hemofilia. Inibidores. Biotecnologia.

ABSTRACT

MOLINA, E. S. **Immunogenicity evaluation of recombinant clotting factor VIII in a murine model of hemophilia A.** 2013. 140 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Factor VIII replacement therapy employing either Factor VIII (FVIII) concentrates from blood plasma or, alternatively, recombinant FVIII, is the standard care for management of hemophilia A, a genetic bleeding disorder caused by plasmatic deficiency of FVIII. In Brazil, the National Health System (SUS) provides annually about 250 million international units (IU) of imported plasma-derived FVIII which is almost exclusively used for on demand treatment of hemophilic patients, corresponding to estimated costs of USD \$90 million. In order to contribute to the establishment of a standardized process to produce recombinant blood products locally, our group has been exploring a more efficient alternative for recombinant FVIII production in mammalian cells employing an engineered artificial variant of the protein. However, rFVIII artificial variants may present unpredictable antigenic properties and promote differential immune responses associated with generation of FVIII inhibitors. Since this naturally occurs in 30% of severely affected hemophilic patients, being currently considered the main complication related to FVIII replacement therapy, the main objective of this study was to evaluate the immunogenicity of the recombinant clotting factor VIII artificial variant produced in our laboratory (rFVIII-lab), using a murine model of hemophilia A. The specific experimental objectives of this work were to purify and evaluate the *in vivo* functional activity and immunogenicity of rFVIII-lab compared to plasma derived (Fanhdi[®]) and the commercially available recombinant (Kogenate FS[®]) reference products. The starting material for rFVIII-lab purification was conditioned culture medium harvested from the highly producing CHO-DG44 H6A cell clone grown under adherent monolayer culture with fetal bovine serum supplemented medium. Our purification strategy was based on two chromatographic steps (anion exchange and heparin affinity), followed by an ultrafiltration step. Upon removal of the major impurities from the starting material, the purified rFVIII-lab presented an intermediary specific activity when compared to the reference products. The functional activity of rFVIII-lab was evaluated *in vivo* using *Fviii* knockout mice by a tail bleeding assay modified in our laboratory to quantitatively assess the efficacy of anti-hemophilic therapies using four parameters, namely: the bleeding time, the probability of hemophilic phenotype correction, the effective dose (ED₅₀) and its corresponding plasma FVIII activity (EC₅₀). Data obtained from a still limited number of animals indicated that rFVIII-lab functional activity was similar to that observed using the reference products. The immunogenicity of rFVIII-lab was evaluated by quantification of total anti-FVIII antibodies through immunoenzymatic assay and inhibitors antibodies through Bethesda assay in the plasma of immunized hemophilic mice and our data revealed a reduced FVIII immune response to rFVIII-lab when compared to the response of mice treated with reference products. Characterization of the immunogenicity of rFVIII-lab is expected to contribute to the establishment of a platform for local production of recombinant FVIII, aiming at treatment of Brazilian hemophilic patients.

Keywords: Biopharmaceutical. Clotting factors. Factor VIII. Hemophilia A. Inhibitors. Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção do fator FVIII recombinante durante a adaptação do clone celular F5 ao cultivo em suspensão	51
Figura 2 - Análise comparativa da atividade específica do fator VIII recombinante produzido no laboratório em diferentes meios de partida	54
Figura 3 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório rFVIII-lab através de cromatografia de troca aniônica	56
Figura 4 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório rFVIII-lab através de cromatografia de afinidade à heparina	60
Figura 5 - Avaliação da complexidade da mistura de proteínas e integridade estrutural do rFVIII-lab ao longo do protocolo de purificação	65
Figura 6 - Avaliação do protocolo alternativo de interrupção de um evento hemorrágico realizado em animais normais e hemofílicos	70
Figura 7 - Análise quantitativa da eficácia do tratamento de animais modelo da hemofilia A com os produtos de referência Kogenate FS® e Fanhdi® através de regressão logística	72
Figura 8 - Tempo de sangramento observado em relação às doses de fator VIII administradas	74
Figura 9 - Avaliação da atividade plasmática de fator VIII	77
Figura 10 - Atividade funcional do fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório	79
Figura 11 - Quantificação da indução de resposta imunológica (anticorpos totais) ao fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório comparada aos produtos de referência no modelo murino de hemofilia A	82
Figura 12 - Quantificação da indução de resposta imunológica (anticorpos inibitórios) ao fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório comparada aos produtos de referência no modelo murino de hemofilia A	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos produtos de fator VIII recombinantes comerciais. 24

Tabela 2 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - "*Bovine Serum Albumin*"

CHO-DG44 - linhagem celular gerada a partir de ovário de hamster chinês e cujas células são deficientes na expressão da enzima dihidrofolato redutase.

CHO-DG44 H6A - clone superprodutor de Fator VIII derivado da linhagem CHO-DG44.

CHO-DG44 F5 - clone superprodutor de Fator VIII derivado da linhagem CHO-DG44.

FVIII - fator VIII da coagulação sanguínea.

FVIIIa - fator VIII da coagulação sanguínea humano ativado.

HA - hemofilia humana do tipo A, causada por deficiência de Fator VIII da coagulação.

HCh - cadeia pesada do Fator VIII, composta pelos domínios A1-a1-A2-a2-B.

LCh - cadeia leve do Fator VIII, contendo os domínios a3-A3-C1-C2.

LCh-B – variante artificial da cadeia leve do Fator VIII, fusionada à parte do domínio B.

MTX - metotrexato.

Min – minuto.

NBU - Unidades Nijmegen-Bethesda, unidade para medida de atividade de inibidores do Fator VIII.

PBSA - solução salina fosfato tamponada, sem adição de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

pFVIII - fator VIII da coagulação sanguínea derivado de plasma humano.

rFVIII - fator VIII da coagulação sanguínea humano recombinante.

rFVIII-lab - fator VIII da coagulação sanguínea humano recombinante produzido no laboratório.

RPM - rotações por minuto.

SFB - soro setal bovino.

TBS - solução tampão tris-salina.

TBST - solução Tampão Tris-Salina-Tween.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A hemofilia A e o fator VIII da coagulação	16
1.1.1 Tratamento para hemofilia A	21
1.1.2 Desafios atuais no manejo da hemofilia A	23
1.1.3 Tratamento da hemofilia no Brasil.....	29
1.2 A produção do fator VIII recombinante no NUCEL-USP	30
1.3 Imunogenicidade de proteínas terapêuticas	32
2 OBJETIVOS	34
2.1.1 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Soluções	35
3.2 Fator VIII da coagulação comercial	35
3.3 Manutenção das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab	36
3.4 Adaptação das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab para cultivo em suspensão e meio definido	37
3.5 Coleta do meio condicionado das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab	37
3.6 Purificação do Fator VIII recombinante	38
3.6.1 Cromatografia de troca iônica.....	38
3.6.2 Cromatografia de troca iônica afinidade à heparina	39
3.6.3 Ultrafiltração	39
3.7 Ensaio de atividade in vitro de Fator VIII	40
3.8 Avaliação da preparação final do rFVIII-lab purificado	40
3.8.1 Quantificação de proteínas totais	41
3.8.2 Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida desnaturante	42
3.8.3 Ensaio de western blotting para detecção da cadeia leve.....	42
3.9 Modelo murino de Hemofilia A	43
3.10 Caracterização da atividade funcional do fator VIII	44
3.10.1 Ensaio de atividade in vivo	44
3.10.2 Ensaio de atividade ex-vivo	45
3.11 Indução de resposta imune ao fator VIII	46
3.12 Dosagem de anticorpos anti-Fator VIII totais	47
3.13 Quantificação de anticorpos inibitórios da atividade do fator VIII	48

4 RESULTADOS	50
<i>4.1 Purificação do Fator VIII humano recombinante produzido no laboratório</i>	50
<i>4.2 Caracterização da atividade funcional in vivo do Fator VIII</i>	68
<i>4.3 Avaliação da indução de resposta imune ao Fator VIII recombinante</i>	80
<i>4.3.1 Quantificação de anticorpos totais anti-Fator VIII</i>	81
<i>4.3.2 Quantificação de anticorpos inibidores da atividade de Fator VIII</i>	83
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÕES	112
7 PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE A - Currículo	133
APÊNDICE B - Ficha do aluno	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 A hemofilia A e o fator VIII da coagulação

As coagulopatias são distúrbios hemorrágicos causados por um aumento significativo no tempo de coagulação sanguínea, manifestando-se através de hemorragias excessivas e/ou espontâneas. A forma mais comum de coagulopatias é conhecida como hemofilia do tipo A (HA) ou clássica¹, e refere-se à deficiência funcional de uma glicoproteína não enzimática, denominada fator VIII da coagulação (FVIII), incidindo em aproximadamente 1: 10.000 indivíduos, predominantemente do sexo masculino, devido à herança recessiva do fenótipo hemofílico ligada ao cromossomo X (OLDENBURG; ANANYEVA; SAENKO, 2004; STONEBRAKER et al., 2010). A gravidade da hemofilia A é classificada de acordo com a disponibilidade plasmática de FVIII nos pacientes. Na hemofilia A classificada como leve há entre 6 e 35% de FVIII circulante e menor risco de sangramentos espontâneos, sendo mais frequente hemorragias excessivas após cirurgias ou traumatismos. Na hemofilia A classificada como moderada há entre 1 a 5% de FVIII circulante, e na classificada como severa há menos de 1% de FVIII circulante, estando esta última associada a um maior risco de hemorragias espontâneas em tecidos internos, principalmente articulações e músculos, podendo ser fatais quando intracraniais (KONKLE et al., 2000). A principal causa de morbidez entre os hemofílicos quando não tratados deriva dos sangramentos nas articulações, denominados hemoartroses, os quais levariam comumente ao comprometimento do joelho, cotovelo, tornozelo, quadril e/ou ombro quando reincidentes, e assim prejudicando ou até mesmo impossibilitando a movimentação e locomoção desses indivíduos. Apesar do mecanismo pelo qual o sangramento na articulação induziria à artropatia não estar completamente esclarecido, tem sido sugerido que diversos constituintes do sangue, como enzimas, citocinas, fatores de crescimento e, em especial, o depósito de hemosiderina, um produto da hemólise, na membrana sinovial, estimulariam o processo de degeneração e colapso articular (LUCK et al., 2004; VALENTINO, 2010).

Geralmente, a deficiência de FVIII é causada por mutações, deleções e/ou inserções no loco *FVIII* (OLDENBURG; EL-MAARRI, 2006). O gene *FVIII* localiza-se na banda 28 do braço longo do cromossomo X, compreende 186 kpb e 26 fragmentos exônicos, codificando

¹ A segunda variante mais comum de hemofilia (1: 25.000 indivíduos) é do tipo B, causada pela deficiência do Fator IX da coagulação sanguínea no plasma (LARSON; HIGH, 1992).

para um polipeptídeo precursor de 2.351 resíduos de aminoácidos, sendo que os 19 resíduos da extremidade N-terminal compõem o peptídeo sinal (GITSCHIER et al., 1984). Após sua síntese, o polipeptídeo precursor, com aproximadamente 330 kDa e formada por três tipos de domínios distintos (A, B e C) e três regiões acídicas (a), organizados em A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, é direcionado para o retículo endoplasmático, local em que interage com proteínas chaperonas como calreticulina, calnexina (PIPE SW, MORRIS JA, SHAH J, 1998) e proteína ligante de imunoglobulinas Bip (BiP – Binding immunoglobulin Protein), que participam do processo de dobramento protéico assistido do FVIII (SWAROOP et al., 1997). No retículo endoplasmático também tem início as modificações pós-traducionais, em especial a N-glicosilação de 25 sítios de arginina potenciais, 19 deles localizados apenas no domínio B (KOSLOSKI; MICLEA; BALU-IYER, 2009), e então a molécula é direcionada ao aparelho de Golgi, local em que continua a ser processado pós-traducionalmente por O-glicosilação, modificação dos oligossacarídeos N-ligados, sulfatação de seis resíduos de tirosina e também processamento proteolítico da molécula, resultando em uma clivagem no resíduo Arg 1648 por endoprotease(s) da família das furinas (LENTING; VAN MOURIK; MERTENS, 1998). Após o processamento proteolítico, o FVIII maduro é secretado e encontrado no plasma como um heterodímero composto por uma cadeia pesada (HCh), contendo os domínios A1-a1-A2-a2-B, e de massa molecular estimada em aproximadamente 220 kDa, associada, através de interações dependentes de cátions divalentes, à cadeia leve (LCh), contendo os domínios a3-A3-C1-C2, e de massa molecular estimada em aproximadamente 80 kDa (FANG; WANG; WANG, 2007; KAUFMAN et al., 1997). Na circulação sanguínea, o FVIII apresenta uma meia vida de aproximadamente 12 horas quando estabilizado pelo fator de Von Willebrand (vWF)², outra proteína plasmática multimérica, e que, entre outras funções, direciona o FVIII aos sítios de perda da integridade vascular (FISCHER et al., 2009; LENTING; VAN MOURIK; MERTENS, 1998). O FVIII possui um papel fundamental na propagação de uma cascata de eventos proteolíticos, conhecida como via intrínseca da coagulação sanguínea, que ocorre como parte da resposta a perda de integridade do sistema vascular, conhecida como hemostasia, e cuja principal função é interromper o sangramento.

Quando ocorre uma lesão de um vaso sanguíneo, a resposta hemostática é iniciada através da vasoconstrição e da aderência das plaquetas sobre o colágeno adjacente exposto, formando o tampão plaquetário primário, sendo esta resposta inicial conhecida como

² Deficiência de fator de Von Willebrand no plasma resulta em uma doença hemorrágica hereditária e autossômica conhecida como doença de Von Willebrand (GOODEVE, 2010).

hemostasia primária. A vasoconstrição é um evento importante para reduzir a perda sanguínea inicial, principalmente nos microvasos. Desconhecem-se quais os mecanismos que governam a resposta de vasoconstrição, devendo ser controlada, provavelmente, pela ação conjunta de fatores liberados pelas células endoteliais e plaquetas. A adesão inicial plaquetária é promovida por interações de receptores de superfície das plaquetas, principalmente a glicoproteína de membrana IV e a integrina $\alpha 2\beta 1$, com o colágeno e outras proteínas da matriz extracelular presentes no tecido subendotelial (FARNDALE et al., 2004). A estabilização e propagação do tampão plaquetário primário é promovido, em parte, pela ação do vWF, proveniente do plasma e da secreção das células endoteliais e das próprias plaquetas. O vWF, na sua forma multimérica, interage com o colágeno e com a glicoproteína de membrana plaquetária Ib, acentuando, desta forma, as interações entre as plaquetas e o colágeno, bem como entre as próprias plaquetas (MEYER et al., 1991). A formação desse agregado plaquetário primário faz com que ocorra a ativação plaquetária, iniciando assim a modificação da sua morfologia, bem como a liberação de grânulos armazenados no seu citosol para o meio extracelular. O conteúdo desses grânulos inclui vários mediadores químicos, entre eles a serotonina, o fator ativador de plaquetas, adenosina difosfato e o tromboxano A₂, e proteínas, como o fator plaquetário 4 e o vWF, os quais contribuem para a propagação da ativação plaquetária (FARNDALE, 2006). No entanto, os eventos de vasoconstrição e formação do tampão plaquetário primário, de natureza instável e facilmente removido pela ação do fluxo sanguíneo, não são suficientes para interromper um sangramento de forma permanente. Para a estabilização do tampão plaquetário primário é necessário que ocorra, concomitantemente com a resposta hemostática primária, o processo de hemostasia secundária para a formação de um tampão impermeável e interrupção permanente do sangramento. Esse processo promove a formação de uma malha proteica sobre o tampão plaquetário, composta principalmente de um polímero de uma proteína filamentar conhecida como fibrina, através da interação coordenada de várias proteínas plasmáticas, de superfície celular e da matriz extracelular, conhecida como cascata da coagulação (ARNOUT; HOYLAERTS; LIJNEN, 2006).

O modelo atual que descreve o mecanismo da cascata da coagulação é baseado em vários estudos conduzidos ao longo dos últimos 150 anos que identificaram os componentes bioquímicos desse processo; descreveram parâmetros termodinâmicos, estequiométricos e catalíticos destes componentes e das reações em que participam; identificaram as interações moleculares entre estes componentes; e descreveram a dinâmica fisiológica destas interações

e aspectos clínico-patológicos associados à disfunção de determinados componentes (HOCKIN et al., 2002; HOFFMAN; MONROE, 2001; VIRCHOW, 1856)

O conceito de reações proteolíticas sequenciais, nas quais um precursor inativo é convertido na sua forma ativa, o qual, por sua vez, promove a ativação do componente subsequente da via culminando com a ativação da trombina, a enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, surgiu no início da década de 1960 após a identificação bioquímica de vários dos componentes desta cascata de sinalização (MACFARLANE, 1964). Posteriormente, esse conceito foi refinado no sentido de incluir as observações de que alguns componentes dessa cascata eram na verdade cofatores enzimáticos, que não possuíam atividade proteolítica (NEMERSON; FURIE, 1980). Baseando-se em ensaios funcionais *in vitro*, postulou-se uma configuração para cascata de coagulação em forma de Y, onde duas vias de ativação, as vias extrínseca e intrínseca, aparentemente independentes e redundantes, culminavam em uma via comum de ativação do fator X, que, associado ao fator V ativado, ativaria a trombina, levando assim à formação de fibrina. Segundo esse modelo, a via extrínseca de coagulação seria iniciada pela interação do fator VII ativado com uma glicoproteína de membrana conhecida como fator tecidual (TF – Tissue Factor) ou fator III, este último um fator extrínseco à circulação sanguínea. Já a via intrínseca seria composta apenas por fatores plasmáticos, e seria iniciada pela ativação do fator XII em um contexto de lesão vascular (NOSSEL, 1967).

Entretanto, esse modelo não era suficiente para explicar algumas observações clínicas, como, por exemplo, o fato dos portadores da forma severa das hemofilias A e B, nos quais a via intrínseca não é funcional, apresentarem um fenótipo grave de sangramentos quando, teoricamente, esta disfunção poderia ser compensada pela atividade natural da via extrínseca da coagulação. O mesmo ocorre no caso contrário, na deficiência congênita da proconvertina (disfunção do fator VII), um tipo grave de hemofilia congênita associada à disfunção da via extrínseca, e que também não é compensada pela atividade normal da via intrínseca. Por outro lado, a disfunção dos fatores que iniciam a via intrínseca da coagulação (cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína e fator XII), não causa um fenótipo hemofílico (HOFFMAN; MONROE, 2005; MONROE; HOFFMAN, 2006).

Atualmente, o modelo mais aceito da cascata da coagulação é aquele que associa os mecanismos fisiológicos da resposta hemostática à atividade de três complexos enzimáticos com atividade pró-coagulante (HOFFMAN; MONROE, 2001). Esses complexos enzimáticos são formados em superfícies membranares específicas, e são compostos por serino-proteases dependentes da vitamina K, associadas à cofatores enzimáticos ligados a estas superfícies

membranares. A formação desses complexos enzimáticos requerem a apresentação de uma superfície membranar particular gerada por lesão ou ativação celular, a conversão de um zimogênio em uma serino-protease ativa, e a ativação proteolítica de um pró-cofator enzimático plasmático, no casos dos fatores V e VIII, ou a expressão de um cofator de membrana, no caso do fator tecidual. Atualmente é consenso que a cascata da coagulação se inicia através da formação do complexo enzimático composto por uma pequena do fração Fator VII plasmático que circula na forma ativa, e o fator tecidual na superfície das células subendoteliais. A atividade desse complexo é suficiente para ativar pequenas quantidades dos fatores XI, IX e X, e, subsequentemente, de trombina. Em uma alça de retro-alimentação positiva, a trombina ativa, através de eventos proteolíticos, vários fatores, entre eles o próprio fator VII, e os cofatores V e VIII, possibilitando a formação dos outros dois complexos enzimáticos na superfície de plaquetas ativas, a tenase intrínseca, que converte o fator X na sua forma ativa, formado pela forma ativa do fator IX e seu cofator, o fator VIII ativado, e a pró-trombinase, que converte a pró-trombina em trombina, formado pelo fator X ativo e seu cofator, o fator V ativado. Assim, nesse modelo, a relação funcional entre as antigas vias extrínseca e intrínseca da coagulação é mais intrincada, sendo que o papel da via extrínseca seria iniciar o processo e o da via intrínseca de amplificação e propagação da cascata. Esse processo é limitado ao sítio de lesão devido a necessidade de superfícies celulares específicas que são mantidas segregadas no caso de um endotélio íntegro e normofuncional, e também devido a atividade de proteínas com atividade anti-coagulantes e alças de retro-alimentação negativas (MONROE; HOFFMAN, 2006). O resultado final é a conversão, apenas no sítio de lesão, do fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina, e a formação de uma malha insolúvel de fibrina pela ação do fator XIII, também ativado pela trombina (WOLBERG; CAMPBELL, 2009). Segundo esse modelo, a hemofilia A seria caracterizada por uma extensão moderada da duração da fase de iniciação da cascata da coagulação e uma redução moderada na formação de fibrina, acompanhadas por uma supressão severa da fase de propagação e amplificação, e, conseqüentemente, da geração de trombina ativada. Nesse contexto, a principal consequência fisiológica da disfunção do FVIII é um aumento no tempo para a formação do coágulo (MANN, 1999). Segundo esse modelo também, a disfunção do FVIII poderia ser compensada por derivação enzimática, o que é explorado em algumas alternativas terapêuticas, como descrito mais adiante.

Como mencionado acima, a trombina catalisa a ativação do Fator VIII da coagulação, clivando-o em três sítios específicos (Arg372, Arg740 e Arg1689). Após a clivagem do FVIII pela trombina, são liberados o domínio B e a região a3, e o FVIII assume a sua forma ativa

(FVIIIa), de configuração trímera A1/A2/A3-C1-C2, apta a atuar como cofator na via intrínseca do sistema de coagulação sanguínea. Esse trímero é extremamente instável, sendo inativado principalmente pela sua dissociação (LENTING; VAN MOURIK; MERTENS, 1998). O montante representativo de FVIII encontrado no plasma humano é estabelecido como uma atividade internacional (UI) de FVIII, servindo como padrão de referência internacional e fornecendo uma base estável para calibrações secundárias, utilizadas em estudos realizados com o FVIII (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

1.1.1 Tratamento para hemofilia A

O primeiro tratamento efetivo para hemofilia A foi obtido em 1840 através de transfusões sanguíneas (FARR, 1981), que foram substituídas, a partir de 1957, por concentrados de FVIII obtidos a partir da crioprecipitação de plasma de doadores humanos (ALLAIN, 1979). A introdução dos concentrados de FVIII alterou drasticamente o prognóstico dos portadores da hemofilia A, principalmente da forma severa, elevando de forma significativa as suas expectativas de vida. A partir da década de 1960, a expectativa de vida dos portadores da forma severa da hemofilia A, que era de 11 anos ou menos, passou para cerca de 70 anos (JONES; RATNOFF, 1991). A introdução dos concentrados também possibilitou a adoção da terapia domiciliar aos hemofílicos, o que permitiu uma redução marcante da morbidade associada à doença, e uma melhora na qualidade de vida destes pacientes. O sucesso alcançado com a terapia de reposição do FVIII nos pacientes hemofílicos durante as décadas de 1960 e 1970 sofreu um importante retrocesso no início da década de 1980 devido à contaminação viral dos concentrados de FVIII. Na época, não existiam critérios rigorosos para a seleção dos doadores, e os concentrados obtidos não eram submetidos a nenhum tratamento para inativação viral. Estima-se que durante a década de 1980 a maioria dos pacientes hemofílicos foi contaminada com os vírus causadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS, a sigla em inglês), e das hepatites B e C (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012; MANNUCCI et al., 2008). Durante o período de 1981 a 1984, estima-se que mais de 50% da população de pacientes hemofílicos americanos foram contaminados com o vírus da imunodeficiência humana (EVATT, 2006). Esses fatos contribuíram para que a mortalidade dos hemofílicos americanos, entre os anos de 1987 e 1989, triplicasse, sendo que as principais causas de óbito mudassem de sangramento

intracranial e outros sangramentos em tecidos moles, para complicações decorrentes da AIDS ou cirrose associada à hepatite (CHORBA et al., 1994).

Este cenário fez com que se estabelecessem medidas mais rígidas para a obtenção dos concentrados de FVIII a partir de plasma de doadores humano. Desde então, o FVIII obtido de plasma passa por um processamento e controle extremamente rigorosos, fazendo com que sua utilização seja segura, principalmente quanto ao potencial de transmissão de vírus, como os causadores da AIDS e das hepatites B e C (EVATT, 2012). Outra modificação importante que ocorreu no manejo dos pacientes hemofílicos, catalisada pela crise da década de 1980, foi a obtenção e comercialização da forma recombinante do FVIII humano (rFVIII). O rFVIII é obtido através da engenharia genética de células de mamífero em cultura de forma que estas células passem a produzir o rFVIII e secretá-lo para o meio extracelular, de onde então ele pode ser purificado. O primeiro rFVIII foi produzido pela Baxter, sendo seus primeiros testes clínicos iniciados em 1987 e a seu licenciamento obtido em 1992 (WHITE GC, MCMILLAN CW, KINGDON HS, 1989). A primeira geração desses biofármacos envolvia a utilização de produtos de origem humana ou animal durante o processo de obtenção e formulação do rFVIII, o que conferia um risco teórico de contaminação viral destes produtos, embora este risco fosse percebido como menor do que àquele associado à utilização do FVIII derivado de plasma. A segunda geração de produtos, introduzida no final da década de 1990, não utilizava produtos de origem humana ou animal na formulação, e, a partir da primeira metade dos anos 2000, foram introduzidos os produtos da terceira geração, cujo processo de obtenção e formulação são completamente livres de proteínas de origem humana ou animal (FRANCHINI; LIPPI, 2010). Com a utilização do rFVIII de terceira geração o risco de contaminação viral dos pacientes hemofílicos é praticamente inexistente. Existe uma tendência, principalmente nos países da Europa Ocidental e América do Norte, de se adotar exclusivamente o rFVIII para o tratamento de seus pacientes hemofílicos. Nos Estados Unidos, cerca de 70% do FVIII utilizado é recombinante, sendo que no Canadá e Irlanda, o uso exclusivo da forma recombinante foi adotado como parte das políticas nacionais de Saúde nesses países (MANNUCCI, 2003).

A terapia de reposição do FVIII para o tratamento dos pacientes hemofílicos pode ser realizada sob demanda, ou seja, após a ocorrência do episódio hemorrágico, ou de maneira profilática, a qual pode ser subdividida em profilaxia primária ou secundária. O tratamento profilático idealmente tem sido recomendado para os pacientes portadores da hemofilia A severa buscando prevenir as hemoartroses, e consequentemente a morbidez entre esses pacientes, sendo que o tratamento profilático primário envolve a reposição ininterrupta do

FVIII por longo prazo e previamente ao início do dano articular, em geral antes dos três anos de idade. Já o tratamento profilático secundário envolve os pacientes em idade adulta, e pode ser realizado a curto ou longo prazo, dependendo do risco potencial de traumas, tendo muitas vezes início após o estabelecimento de artropatias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). O tratamento profilático tem sido adotado principalmente nos países da Europa Ocidental e América do Norte, especialmente na Suécia (KHAIR et al., 2008).

1.1.2 Desafios atuais no manejo da hemofilia A

Na última década, a segurança se tornou uma questão secundária no tratamento da hemofilia, não tendo sido reportado um único caso de contaminação de pacientes hemofílicos, tratados com FVIII derivado de plasma ou recombinante, desde 1996 (MANNUCCI, 2008), embora exista um risco teórico, associado principalmente à utilização do FVIII purificado de plasma, quanto ao aparecimento de patógenos ainda não caracterizados, e que, eventualmente, poderiam deixar de ser removidos ou inativados com a tecnologia de produção destes concentrados utilizada atualmente (MEEKS; JOSEPHSON, 2006). Nos últimos 15 anos, outras questões de grande interesse, relacionadas ao manejo da hemofilia A, têm direcionado os esforços em pesquisa e desenvolvimento nesta área.

Uma dessas questões é o fato da produção de FVIII derivado de plasma e rFVIII ser insuficiente para atender uma demanda mundial crescente. Estima-se que cerca de 80% da população mundial de hemofílicos não tenha acesso a qualquer tipo de terapia (MANNUCCI, 2003). Além disso, essa produção limitada do FVIII impede que o protocolo de profilaxia primária seja oferecido de forma mais abrangente, principalmente nos países em desenvolvimento (BERNTORP; FISCHER; MINERS, 2012). No caso do fator VIII derivado de plasma, um dos principais problemas é a crescente escassez de plasma humano, matéria-prima para a purificação do pFVIII, e que está associada à uma demanda cada vez maior por proteínas derivadas de plasma humano (BURNOUF, 2011; FARRUGIA et al., 2002). No caso do rFVIII, apesar de ser uma fonte potencialmente inesgotável de FVIII, ele ainda é produzido em quantidades insuficientes para atender a demanda mundial. Um dos fatores que contribuem para esse cenário é o fato da produção comercial de rFVIII permanecer centralizada e restrita a poucas empresas, sendo que cerca de sete produtos estão ou já estiveram licenciados para o tratamento da hemofilia A, como descrito na Tabela 1 (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2006; FRAMPTON; WAGSTAFF, 2008).

Tabela 1 - Características dos produtos de fator VIII recombinantes comerciais.

Nome comercial	Kogenate [®]	Recombinate [®]	Kogenate [®] FS	Helixate [®]	Refacto [®]	Advate [®]	Xyntha [®]
Fabricante	Bayer	Baxter	Bayer	CSL Behring	Pfizer	Baxter	Pfizer
Geração	Primeira	Primeira	Segunda	Segunda	Segunda	Terceira	Terceira
Nome Internacional não Proprietário	Octocog alfa	Octocog alfa	Octocog alfa	Octocog alfa	Moroctocog alfa	Octocog alfa	Moroctocog alfa
Molécula	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Domínio B deletado	Selvagem	Domínio B deletado
Linhagem celular	BHK	CHO	BHK	BHK	CHO	CHO	CHO
Aditivos em cultura (humano ou animal)	HSA ^a	Insulina e albumina sérica bovinas	HSA ^a	HSA ^a	HSA ^a	-	- ^a
Processos Purificação	I ^b , IE, U	I ^b , IE	I ^b , IE, S/D, U	I ^b , IE, S/D, U	I ^b , IE, S/D, N	I ^b , IE, S/D	I ^c , IE, S/D, N
Formulação	HSA	HSA	Sacarose	Sacarose	Sacarose	Trealose	Sacarose
Ativ. específica (UI/mg)	- ^d	10	4.000	4.000	13.000	7.000	7.700

Octocog alfa: estrutura da molécula de fator VIII intacta.

Moroctocog alfa: estrutura da molécula de VIII encurtada em duas cadeias, na qual o domínio B foi excluído da cadeia pesada.

^a Meio de cultura contém insulina recombinante.

^b Cromatografia de imunoafinidade baseada em anticorpo monoclonal murino anti-FVIII.

^c Cromatografia de imunoafinidade baseada em peptídeo sintético.

^d Não encontrada na literatura.

BHK = Baby hamster kidney; **CHO** = Chinese hamster ovary; **HSA** = Albumina sérica humana; **I** = Imunoafinidade; **IE** = troca iônica; **N** = Nanofiltração; **S/D** = Solvente/detergente; **U** = Ultrafiltração.

Os produtos de fator VIII recombinantes que estão ou já estiveram licenciados para o tratamento da hemofilia A, classificados como de primeira, segunda ou terceira geração, estão descritos de acordo com suas características de produção (molécula e linhagem celular), purificação e formulação do rFVIII, incluindo os valores de atividade específica do produto final, com base em dados descritos na literatura (FRAMPTON; WAGSTAFF, 2008; LEE; BERNTORP; HOOTS, 2011).

Outro fator relacionado a produção industrial insatisfatória do rFVIII está ligado à complexidade associada ao próprio processo de obtenção do rFVIII. A produção do rFVIII exige a utilização de células eucarióticas, em especial devido à complexidade do seu processamento durante sua biossíntese, sendo essenciais para a atividade biológica da molécula. Dessa forma, o rFVIII é produzido em sistemas de expressão em células de mamíferos (KAUFMAN; WASLEY; DORNER, 1988), principalmente utilizando linhagens derivadas das células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) e BHK (*Baby Hamster Kidney*). No entanto, a produção de rFVIII em sistemas de expressão em células de mamíferos apresenta baixos níveis de rendimento, sendo cerca de duas a três ordens de magnitude menor do que outras proteínas recombinantes de pesos moleculares similares e obtidas através de estratégias semelhantes (LYNCH et al., 1993). Diversos fatores já foram descritos como sendo limitantes para uma produção mais eficiente do rFVIII, entre os quais: a) a expressão do mRNA do

FVIII ser reprimida por um silenciador de transcrição presente em sua região codificadora (HOEBEN et al., 1995) b) o acúmulo de mRNA do FVIII ser inibido por sequências de nucleotídeos distribuídas em sua região codificadora; c) a necessidade de um mecanismo específico de dissociação de agregados do FVIII no interior do retículo endoplasmático (TAGLIAVACCA; WANG; KAUFMAN, 2000); d) a necessidade de outro mecanismo específico de transporte do retículo endoplasmático para as cisternas do aparelho de Golgi (KAUFMAN et al., 1997); e) a secreção do FVIII ser inibida por regiões de aminoácidos presentes em sua região codificadora (MARQUETTE; PITTMAN; KAUFMAN, 1995); f) a instabilidade do rFVIII após a sua secreção para meio extracelular (WISE et al., 1991).

O conhecimento acumulado nas últimas três décadas sobre a estrutura, função e a via biossintética do Fator VIII tem permitido a obtenção de variantes artificiais do rFVIII com o objetivo de contornar algumas dificuldades associadas à sua produção. Neste sentido, uma linha de pesquisa e desenvolvimento muito ativa no campo da hemofilia A é a obtenção de formas artificiais do rFVIII associadas com uma maior produtividade em plataformas industriais baseadas no sistema de expressão em células de mamíferos, como, por exemplo, variantes contendo deleções parciais do domínio B, como, por exemplo, o variante conhecido como N8 (CHRISTIANSEN et al., 2010), atualmente em ensaios clínicos de fase 3 (MARTINOWITZ et al., 2011), ou contendo mutações associadas à uma secreção mais eficiente do rFVIII, como o variante conhecido como F309S (MIAO et al., 2004).

Outro desafio atual associado ao manejo da hemofilia é melhorar os regimes de administração profilática do FVIII, atualmente realizada a cada dois ou três dias devido a meia-vida curta do FVIII, de cerca de 12 horas (FISCHER et al., 2009). Neste sentido, tem-se buscado modificar a sequência do rFVIII com o objetivo de se aumentar a meia-vida plasmática da molécula, como, por exemplo, o variante conhecido como IR8, que é resistente à inativação por proteólise e dissociação do trímero ativo (PIPE; KAUFMAN, 1997) e o variante conhecido como rFVIII-Fc, obtido através da deleção parcial do domínio B do FVIII e fusão da sequência polipeptídica remanescente com a região Fc da imunoglobulina humana IgG1 (DUMONT et al., 2012). Outra alternativa que tem sido perseguida buscando o aumento da meia-vida consiste na modificação da apresentação do rFVIII, como, por exemplo, a formulação contendo complexos não covalentes entre o rFVIII e lipossomos peguizados, conhecidos como rFVIII-PEG-Lip (DI MINNO et al., 2010). Atualmente, dois desses complexos rFVIII-PEG-Lip, denominados BAX 855 (Baxter) e BAY 94-9027 (Bayer), tem sido avaliados em estudos clínicos (IVENS et al., 2013).

Outra linha de investigação bastante ativa está relacionada à busca de modalidades terapêuticas mais duradouras, ou até mesmo a cura da hemofilia A. Neste contexto, existem vários trabalhos na literatura descrevendo modalidades terapêuticas alternativas para a hemofilia A baseadas em protocolos experimentais envolvendo as terapias gênica e celular. A hemofilia A é uma doença genética particularmente interessante para esse tipo de abordagem por ser monogênica, e também devido à possibilidade de pequenos aumentos nos seus níveis plasmáticos se traduzirem em ganhos clínicos importantes (HIGH, 2012). A terapia gênica, no caso da hemofilia A, envolve a utilização de sequências codificantes funcionais do FVIII, que, através da utilização de vetores ou metodologias de entrega gênica, são internalizadas, idealmente, por células somáticas do organismo, as quais passam a produzir a proteína. Os avanços mais significativos no campo da terapia gênica têm sido obtidos através da utilização de vetores virais como ferramenta de entrega gênica, como, por exemplo, lentivírus e o vírus adeno-associado (AAV), sendo que, no caso da hemofilia A, todos os trabalhos publicados são estudos pré-clínicos. O resultado mais promissor descrito até o momento foi obtido recentemente em um estudo clínico envolvendo seis pacientes com a forma severa da hemofilia B, os quais foram submetidos a uma infusão venosa de AAV do sorotipo 8 recombinante para expressão do fator IX especificamente no fígado, sendo que, quatro deles, ao longo de dois anos após o procedimento, deixaram de necessitar de infusões profiláticas primárias do fator IX (NATHWANI et al., 2011). Embora os resultados sejam promissores, ainda existem muitas questões técnicas e relacionadas à biossegurança envolvendo a utilização dessa alternativa, como, por exemplo, os efeitos adversos de genotoxicidade decorrentes da incorporação do material genético exógeno ao genoma das células somáticas (BOHNE; CATHOMEN, 2008), ou ainda a possibilidade de incorporação desse material genético exógeno ao genoma de células germinativas dos pacientes, e assim conferir a transmissão vertical da informação (MARSHALL, 2001).

Já a terapia celular como abordagem terapêutica para o tratamento da hemofilia A é uma modalidade que envolve o transplante de células vivas, modificadas geneticamente ou não, em pacientes hemofílicos com o intuito de restabelecer, ainda que parcialmente, a produção do fator VIII. Parte das abordagens descritas envolvem a modificação genética de células autólogas *in vitro*, como, por exemplo, megacariócitos (OHMORI et al., 2006), precursores circulantes de células endoteliais (MATSUI, 2012), células tronco hematopoiéticas (IDE et al., 2010), linfócitos B (RAMEZANI; ZWEIER-RENN; HAWLEY, 2011), e o posterior transplante destas células em modelos animais de hemofilia A. Em outras abordagens, o transplante é realizado com células normais que naturalmente expressam o

FVIII, como o transplante de células endoteliais sinusoidais hepáticas no fígado (KUMARAN et al., 2005), ou de células que potencialmente podem se diferenciar em células produtoras de FVIII, como, por exemplo, o transplante das células de Kupfer no fígado (FOLLENZI et al., 2012), de células progenitoras do baço (ARONOVICH et al., 2006), ou de células-tronco de pluripotência induzida (YAKURA et al., 2013). Todos os trabalhos envolvendo abordagens de terapia celular publicados até o momento consistem de estudos pré-clínicos, e os dados quanto a eficácia e segurança, apesar de promissores, ainda necessitam ser confirmados por mais estudos.

Finalmente, o principal desafio no manejo da hemofilia A está relacionado com a formação de aloanticorpos neutralizantes do FVIII, conhecidos como inibidores, atualmente a principal complicação associada ao tratamento da hemofilia (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2009). Estima-se que em cerca de 30% dos pacientes hemofílicos, em geral pacientes portadores de hemofilia A severa, ocorra uma resposta imunológica ao serem tratados com o FVIII, culminando na formação de anticorpos que reconhecem domínios funcionais do FVIII administrado e interferem em sua atividade coagulante. A formação de anticorpos inibidores torna a quantidade de FVIII administrada aos pacientes menos efetiva e/ou insuficiente para o tratamento da hemofilia A (EHRENFORTH et al., 1992; WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2009).

Os anticorpos inibidores formados durante a terapia de reposição do FVIII são policlonais de classe IgG, cuja produção em humanos e camundongos acredita-se ser célula T dependente (QIAN et al., 2000; REIPERT et al., 2001). Tipicamente, células apresentadoras de antígenos imaturas, mediante sinalização de perigo (*danger signal*), são ativadas e apresentam os antígenos do FVIII administrado associado a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Quando células T CD4⁺ reconhecem o peptídeo apresentado no contexto de MHC, juntamente com moléculas co-estimulatórias, as células T CD4⁺ podem se diferenciar e intensificar a produção de anticorpos pelos linfócitos B, evento crítico para o desenvolvimento dos inibidores (REIPERT et al., 2007). No entanto, até o momento não há evidências de que a molécula do FVIII contenha em sua própria estrutura quaisquer padrões moleculares associados à indução da regulação de moléculas co-estimulatórias ou a expressão de citocinas pró-inflamatórias necessárias para o co-estímulo e efetiva ativação das células T CD4⁺ (PFISTERSHAMMER et al., 2006). Uma hipótese sugere que a imunogenicidade ao FVIII poderia ser influenciada pela formação de trombina, gerada através da atividade pró-coagulante do FVIII em um processo retro-alimentado positivamente, a qual seria capaz de conferir a co-estimulação necessária para a indução de

uma resposta imunológica e formação de inibidores (SKUPSKY et al., 2009; TORDAI et al., 1993).

Vários fatores de risco para o desenvolvimento de anticorpos inibidores de FVIII têm sido identificados em pacientes portadores da HA, entre os quais fatores genéticos, tais como: severidade da hemofilia, tipo de mutação (DASGUPTA et al., 2007; OLDENBURG; EL-MAARRI; SCHWAAB, 2002), etnia (ZHANG; SKUPSKY; SCOTT, 2009), histórico familiar de formação de inibidores (MEDZHITOV, 2009) e genótipo de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (LAMBRECHT et al., 2009); e não genéticos: idade do primeiro tratamento (RAGNI MV, BONTEMPO FA, 1989), intensidade do tratamento (EVANS et al., 1998), infusão contínua (QIAN et al., 2000) e troca de produto (REIPERT B M et al., 2001). Atualmente, a influência da fonte de FVIII utilizada, rFVIII ou pFVIII, na indução da formação de inibidores ao FVIII em pacientes portadores de HA severa é pouco compreendida. Alguns relatos indicam que o risco relativo da formação de inibidores nos pacientes hemofílicos tratados apenas com rFVIII é maior quando comparado a pacientes que foram tratados apenas com pFVIII (GOUDEMANT et al., 2006; ZHANG; SKUPSKY; SCOTT, 2009), embora em outros trabalhos tais achados não tenham sido confirmados (GOUW et al., 2007, 2013). Em um trabalho descrito na literatura, foi demonstrado que o tratamento com pFVIII resulta na expressão de fator de crescimento tumoral (TGF) e de citocinas que induzem respostas imunológicas classificadas como do tipo Th2, originando um microambiente distinto do encontrado ao tratamento com rFVIII, o qual induz a expressão de IL-10 e de citocinas que induzem respostas do tipo Th1 (QADURA et al., 2009). Além disso, em estudos clínicos realizados com variantes do rFVIII foi demonstrado que moléculas de rFVIII contendo o domínio B deletado podem apresentar perfil de imunogenicidade diferenciado, associado a um maior risco de desenvolvimento de inibidores quando comparado com a molécula do FVIII selvagem (ALEDORT; NAVICKIS; WILKES, 2011). Existem várias iniciativas descritas na literatura com o objetivo de contornar as dificuldades associadas ao aparecimento da resposta imune frente ao FVIII. Algumas dessas iniciativas buscam reduzir seu caráter imunogênico, como, por exemplo, o variante do rFVIII suíno, conhecido como OBI-1, atualmente em ensaios clínicos de fase 3 (KEMPTON et al., 2012) ou moléculas do FVIII híbridas contendo sequências polipeptídicas do FVIII humano e suíno, como, por exemplo, o variante HP9 (PARKER et al., 2004). Outras iniciativas envolvem a utilização de linhagens celulares de origem humana para a produção do rFVIII, sendo que um desses produtos se encontra em ensaios clínicos de fase 2 (CASADEMUNT et al., 2012; OCTAPHARMA, 2013). Ainda outras iniciativas tentam desenvolver alternativas de

derivação enzimática da via intrínseca da coagulação para o tratamento de pacientes hemofílicos com altos títulos de anticorpos inibitórios. Atualmente, o principal fator utilizado é o FVII ativado recombinante (ABSHIRE; KENET, 2004). Entretanto, existem estudos explorando, por exemplo, o desenvolvimento de um variante do fator IX com atividade enzimática independente da atividade cofatora do FVIII (MILANOV et al., 2012), ou, ainda, um anticorpo que substitui o FVIII na formação do complexo tenase intrínseca (KITAZAWA et al., 2012), ou, ainda, um aptâmero antagonista do inibidor da via do fator tecidual (TFPI), permitindo assim a coagulação independentemente da ativação da cascata intrínseca e, portanto, do FVIII (WATERS et al., 2011).

1.1.3 Tratamento da hemofilia no Brasil

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece majoritariamente o pFVIII derivado de plasma, para o tratamento de aproximadamente 9.000 hemofílicos tipo A cadastrados, o que correspondeu a aproximadamente 250.000.000 unidades internacionais (UI) de FVIII distribuídas em 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Estima-se que o FVIII importado em 2010 demandou cerca de 87.500.000 dólares e foi destinado principalmente ao tratamento emergencial dos pacientes (HEMOBRÁS, 2012). Recentemente, o rFVIII, no caso, um produto de segunda geração, foi adotado pelo Ministério da Saúde para o tratamento de pacientes hemofílicos recém diagnosticados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). No entanto, o preço do rFVIII importado chega a ser de um dólar para cada UI, contra 20 a 25 centavos para cada UI do pFVIII (COORDENAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS, 2009). Além disso, também recentemente foram adotados protocolos de profilaxia primária para crianças portadoras da hemofilia A grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) e de imunotolerância nos pacientes hemofílicos acometidos da formação de inibidores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Nesse sentido, os valores gastos com o tratamento dos portadores da hemofilia A têm se elevado.

Diante dos elevados custos com a importação dos hemoderivados no Brasil, o Ministério da Saúde iniciou, em 2004, a criação e implantação da Hemobrás, uma empresa para qualificação e fracionamento do plasma brasileiro. Em 2011, a Hemobrás inaugurou a primeira etapa da obra civil da fábrica em Goiana-PE, estando prevista para entrar em operação a partir de 2014 (HEMOBRÁS, 2011) e atender a cerca de 30% da demanda atual de FVIII, considerando seu funcionamento em plena capacidade, de 500.000 litros/ ano de

plasma (COORDENAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS, 2009). Além disso, a Hemobrás também tem buscado o desenvolvimento de produtos hemoderivados recombinantes, entre eles o rFVIII, em parceria com o Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (Coppe) e o Laboratório de Engenharia e Cultivos Celulares da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HEMOBRÁS, 2013). Outra medida, tomada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia em 2000 através da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), foi a criação uma Rede Brasileira de Clonagem e Expressão de Fatores da Coagulação Recombinantes coordenada pelo Hemocentro de Ribeirão Preto/FMRP-USP e composta por quatro laboratórios públicos nacionais, um deles o Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo (NUCEL-USP), com objetivo de estabelecer recursos científicos e tecnológicos para o desenvolvimento de produtos hemoderivados recombinantes (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2006). Outra medida, tomada pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo em 2008, foi a criação de uma fábrica de hemoderivados no Instituto Butantan, onde tem sido estudadas novas estratégias para o processo de purificação do pFVIII e outras proteínas de interesse terapêutico (INSTITUTO BUTANTAN, 2012).

1.2 A produção do fator VIII recombinante no NUCEL-USP

Estrategicamente, o Ministério da Ciência e Tecnologia, através da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), criou, em 2000, a Rede Brasileira de Clonagem e Expressão de Fatores da Coagulação Recombinantes, composta por quatro laboratórios públicos nacionais, sendo, um deles, o Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo (NUCEL-USP), com o objetivo de estabelecer recursos científicos e tecnológicos para a produção de biofármacos hemoderivados recombinantes (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2006).

O Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo (NUCEL – USP) é um centro de pesquisa translacional na área de saúde. Diante do grande interesse de estabelecimento no país de recursos técnicos que permitam a produção de fatores da coagulação, após a dissolução da Rede Brasileira de Clonagem e Expressão de Fatores da Coagulação Recombinantes, em 2007, o NUCEL-USP tem perseguido o aperfeiçoamento dos bioprocessos para a produção dos fatores VIII e IX da coagulação recombinantes através do Programa Nacional de Pós Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Projeto No.: 559158/2008-4) concedido ao Dr. Marcos Demasi.

Considerando os baixos níveis de rendimento de rFVIII em sistemas de produção em células de mamíferos (LYNCH et al., 1993), uma das estratégias utilizadas em nosso laboratório foi explorar a produção de um variante artificial do rFVIII envolvendo a co-expressão independente das HCh e LCh do heterodímero do FVIII, esta última um variante artificial da LCh, contendo um pequeno trecho da porção C-terminal do domínio B fusionada a sua porção N-terminal (LCh-B). A opção por esta estratégia de produção foi baseada em dados da literatura, os quais mostram que: a) o domínio B não é essencial para a atividade do FVIII maduro como cofator para o fator IX na via intrínseca da via de coagulação e, de fato, este domínio é clivado vagarosamente no plasma (TOOLE et al., 1984); b) a deleção parcial da região codificadora correspondente ao domínio B, aliada à co-expressão das HCh e LCh separadamente, levam à expressão mais elevada do FVIII (CHEN et al., 1999; KOLIND et al., 2010; YONEMURA et al., 1993). Além disso, a co-expressão das duas cadeias tem sido uma das configurações mais utilizadas em metodologias visando à terapia gênica para a Hemofilia A (BURTON et al., 1999; CHEN et al., 2007).

Para a geração de linhagens celulares super produtoras do rFVIII em nosso laboratório, as regiões codificadoras correspondentes as HCh e LCh-B, amplificadas a partir de um cDNA contendo a região codificadora completa do FVIII, foram subclonadas num vetor plasmideal de expressão em células de mamíferos desenvolvido em nosso laboratório, o pIQ-ID. Essas construções foram co-transfectadas estavelmente em um mutante das células CHO (Chinese Hamster Ovary), conhecido como CHO-DG44. As células CHO-DG44 foram geradas a partir de um mutante auxotrófico para a prolina das células CHO gerado em 1968 (KAO; PUCK, 1968), e, posteriormente, mutado, por radiação gama, para deleção do locus do gene da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) (URLAUB et al., 1983). A DHFR é uma enzima monomérica que catalisa a conversão do ácido fólico em tetrahydrofolato, o qual é um cofator necessário para a biossíntese de glicina, purinas e a timidina. Sendo assim, as células CHO-DG44 são mutantes auxotróficas triplas, e requerem que o meio de cultivo seja suplementado com glicina, hipoxantina e timidina. O vetor de expressão pIQID possui a região codificadora da enzima DHFR selvagem murina, permitindo a seleção de transfectantes estáveis a partir das células CHO-DG44 através do cultivo em meio sem suplementação com glicina, hipoxantina e timidina. A seleção com base na expressão da enzima DHFR também permite que se explore o fenômeno de co-amplificação gênica, permitindo a obtenção de clones celulares contendo várias cópias do locus contendo o vetor de expressão e, conseqüentemente, um grande aumento da produção da proteína de interesse (JUN et al., 2005).

Os clones celulares estáveis obtidos em nosso laboratório, segundo a estratégia acima descrita, expressam grandes quantidades do rFVIII funcional. Entretanto, o processamento proteolítico do polipeptídeo precursor variante da cadeia leve B-LCh nesses clones celulares é parcial, fazendo com que eles secretem para o meio de cultivo, além da forma madura da LCh, com massa molecular aproximada de 80 kDa, o polipeptídeo precursor variante B-LCh, com massa molecular estimada em 90 kDa. Desconhece-se o possível impacto dessa heterogeneidade de formas da cadeia leve no potencial imunogênico do rFVIII produzido no laboratório. Por um lado, como a maior parte do domínio B foi deletada para produção do rFVIII no laboratório, seu perfil de isoformas é menos heterogêneo quando comparado ao encontrado em produtos de rFVIII comerciais, gerados através da molécula do FVIII selvagem, os quais apresentam uma mistura de várias formas truncadas devido ao processamento proteolítico que ocorre em regiões presentes no domínio B (JANKOWSKI et al., 2007). Por outro lado, apesar de estar bem estabelecido que a ausência de processamento proteolítico associada a alguns variantes do Fator VIII humano recombinante não interfere em sua síntese, secreção ou ativação (PITTMANS et al., 1994), existe a preocupação de que alguma característica estrutural desse variante de 90 kDa (B-LCh), por se tratar de uma configuração artificial da LCh, não encontrada naturalmente, configure-se como um neoantígeno e apresente um perfil diferenciado de imunogenicidade quando comparado aos produtos de rFVIII atualmente licenciados para o tratamento da hemofilia A (BAKER et al., 2010; HERMELING et al., 2004).

1.3 Imunogenicidade de proteínas terapêuticas

O uso de proteínas terapêuticas, apesar de, no geral, ser considerado seguro, não apresentando toxicidade aos pacientes, podem induzir a reações alérgicas e formação de anticorpos neutralizantes da droga (*Anti-drug antibody*). Exemplos de proteínas terapêuticas cujo uso está associado à indução de anticorpos neutralizantes incluem a insulina, hormônio de crescimento, fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF), eritropoietina, interferons e o FVIII da coagulação (SCHELLEKENS; CASADEVALL, 2004). No entanto, o risco de desenvolvimento e o efeito clínico da formação de anticorpos neutralizantes variam entre as proteínas terapêuticas, sendo que, no caso do FVIII, o risco de formação de anticorpos neutralizantes, mais conhecidos como inibidores, é mais elevado quando comparado a outras proteínas terapêuticas (EBBERS et al., 2012; KOREN et al., 2008).

A formação de anticorpos neutralizantes interfere na eficácia e segurança do produto terapêutico, comprometendo também os estudos não clínicos de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica necessários ao seu licenciamento. Nesse sentido, a caracterização da imunogenicidade de uma proteína terapêutica tem sido recomendada em associação aos seus estágios de desenvolvimento, uma vez que diversos fatores relacionados à produção e purificação da proteína terapêutica estão diretamente relacionados ao seu potencial imunogênico, como, por exemplo: estrutura da molécula, modificações pós traducionais, como o perfil de glicosilação e de processamento proteolítico, presença de impurezas, e estado de agregação das moléculas (BARBOSA, 2011; KOREN et al., 2008; SINGH et al., 2012). No caso do pFVIII, dois surtos de desenvolvimento de inibidores ocorreram em pacientes previamente tolerantes após serem tratados com um pFVIII submetido à um método modificado de inativação viral (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2009).

Considerando a importância da avaliação da imunogenicidade de proteínas terapêuticas ainda durante as fases de pesquisa e desenvolvimento, modelos preditivos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* têm sido utilizados. A utilização de modelos animais geneticamente modificados tem sido útil para a avaliação do potencial imunogênico de diversas proteínas terapêuticas em ensaios pré-clínicos, mesmo considerando algumas limitações associadas à utilização destes modelos (BARBOSA, 2011; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008). Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar, de forma comparativa, a imunogenicidade do variante do fator VIII recombinante produzido no laboratório frente àquela de produtos utilizados como referência, com o objetivo de fundamentar o estabelecimento de um processo de produção deste variante do rFVIII.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade do variante do fator VIII recombinante produzido no laboratório (rFVIII-lab), em comparação com os produtos de referência utilizando-se o modelo murino de hemofilia A.

2.1 *Objetivos específicos*

- Purificação do rFVIII-lab em escala laboratorial a partir do meio de cultivo condicionado pelos clones celulares super-produtores deste fator, e obtenção do rFVIII-lab purificado com uma atividade específica próxima àquela obtida com o produto de referência Kogenate FS[®] (rFVIII);
- Caracterização da atividade funcional e eficácia do rFVIII produzido e purificado no laboratório, em comparação aos produtos de referência Fanhdi[®] (pFVIII) e Kogenate FS[®] (rFVIII);
- Avaliação da indução da resposta imunológica ao tratamento com o rFVIII produzido e purificado no laboratório, em comparação aos produtos de referência Fanhdi[®] (pFVIII) e Kogenate FS[®] (rFVIII).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções

- Tampão salina fosfato (PBS): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,2.
- Salina: 0,9% m/v NaCl.
- B1 - cromatografia de troca aniônica: 5 mM CaCl₂.
- B2 - cromatografia de troca aniônica: 5 mM CaCl₂; 2M NaCl.
- B1 - cromatografia de afinidade à heparina: 150 mM NaCl; 5 mM CaCl₂.
- B2 - cromatografia de afinidade à heparina: 150 mM NaCl; 500 mM CaCl₂.
- Pré-formulação do fator VIII (10X): 13% m/v Sacarose; 230 mM Histidina; 800 µg/ml Polissorbato 80; 0,06 µg/ml CuCl₂; pH 7,3.
- Formulação do fator VIII (1X): 1,3% m/v Sacarose; 25 mg/ml Glicina; 23 mM Histidina; 36 mEq/L NaCl; 80 µg/ml Polissorbato 80; 20 mM Imidazol; 0,06 µg/ml CuCl₂; pH 7,3.
- Tampão de amostra para proteínas (três vezes concentrado): 150 mM Tris-HCl; 6% m/v SDS; 30% v/v Glicerol, 15% v/v β-mercaptoetanol; 0,3% m/v Azul de Bromofenol; pH 6,8.
- Tampão de corrida para SDS-PAGE: 25 mM Tris; 250 mM Glicina; 0,1% m/v SDS.
- *Coomassie brilliant blue* coloidal: 1g/L *Coomassie brilliant blue* G-250; 1,27 M (NH₄)₂SO₄; 3% v/v H₃PO₄; 34% v/v Metanol.
- Tampão de transferência para *western blotting*: 48 mM Tris; 39 mM Glicina; 0,037% m/v SDS; 20% v/v Metanol; pH 8,3.
- Tampão Tris-Salina (TBS): 150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl; pH 7,5.
- Tampão Tris-Salina-Tween (TBST): TBS acrescido de 0,05% v/v Polissorbato-20.

3.2 Fator VIII da coagulação comercial

O fator VIII comercial derivado de plasma *Fanhdi*[®] (Lote IBVC0XEXG1) da Grifols (Instituto Grifols, Parets del Valles, BA, Espanha) foi obtido através de doação pelo Programa de Coagulopatias do Ministério da Saúde.

O fator VIII recombinante comercial *Kogenate FS*[®] (Lote 27N2JP2) da Bayer (Bayer AG, Leverkusen, NRW, Alemanha) foi obtido através de doação da Secretaria de Saúde do Distrito Federal.

3.3 Manutenção das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab

Os clones celulares CHO DG44 H6A (H6A) e CHO DG44 F5 (F5), super produtores do fator VIII recombinante humano (rFVIII), foram previamente isolados a partir da co-transfecção estável dos vetores de expressão da cadeia pesada (HCh) e da cadeia leve, a qual foi fusionada a um pequeno trecho do domínio B (LCh-B), e selecionados através de amplificação gênica utilizando doses crescentes de metotrexato (MTX) em células CHO-DG44 derivadas de ovário de Hamster chinês e deficientes para o gene da enzima dihidrofolato-redutase (*Chinese Hamster Ovary* DG44) (DEROUAZI et al., 2006).

Os clones celulares H6A e F5 foram cultivados em frascos T para cultura em monocamada aderente utilizando meio de cultivo α -MEM sem nucleosídeos e deoxinucleosídeos (Lotes 889728, 936752) da Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos) e suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) (Lotes 003/10 e 004/10) da Vitrocell (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) dialisado, 3 μ M de metotrexato (Lote D00104920) da Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha) e 1,2 g/l de bicarbonato de sódio em atmosfera com 2% de CO₂. O clone H6A também foi cultivado em monocamada aderente utilizando meio de cultivo α -MEM sem nucleosídeos e deoxinucleosídeos e suplementado com 1% de albumina sérica humana (HSA) (Lote IBAB8L1001) da Grifols (Instituto Grifols, Parets del Valles, BA, Espanha) e 1 X de suplemento comercial contendo insulina, transferrina e selênio (ITS) (Lote 936531) da Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos). As células foram subcultivadas quando atingiram 85% da confluência utilizando solução 0,1% de tripsina (Lote n° 548978) da Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos) em solução tampão salina fosfato. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 10% SFB dialisado e 10% de dimetilsulfóxido em reservatório contendo nitrogênio líquido. Para o preparo de SFB dialisado foram utilizados tubos de celulose benzoilados com corte de 8 kDa (Lote 030M7006) da Spectrum Medical Industries (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, Estados Unidos).

3.4 Adaptação das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab para cultivo em suspensão e meio definido

Para adaptação dos clones celulares H6A e F5 ao cultivo em suspensão foi adotado o protocolo de adaptação sequencial. A monocamada foi tripsinizada, ressuspensa em meio α -MEM suplementado com 7% de SFB dialisado e em seguida centrifugado a 500 RPM por 5 min. O sedimento celular foi ressuspensa e diluído, em proporção 1:1 do meio original de cultivo e meio de cultivo Select CHO da BD Biosciences (BD Biosciences, Sparks, MD, Estados Unidos), previamente suplementado com 4mM de glutamina e 0,1% de Pluronic F-68. As células em suspensão foram transferidas para frascos T25 cm² não aderentes (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Alemanha) para cultura celular não aderente estacionária (sem agitação) e mantidas a 37 °C em atmosfera de 2% de CO₂. Sempre que as células atingiram uma densidade de 1-2x10⁶ células viáveis/ml, um subcultivo foi realizado mantendo metade do meio de cultivo condicionado e reconstituindo o volume original com meio Select CHO fresco, de tal forma que a densidade celular retornasse a 5x10⁵ células viáveis/ml. Esse processo foi repetido a cada três ou quatro dias, até substituição completa do meio de cultivo para o Select CHO suplementado com glutamina e Pluronic F-68. Para determinação da viabilidade celular, uma alíquota do meio de cultivo contendo as células em suspensão foi homogeneizada em proporção 1:1 com solução de azul de tripan da Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos). As células foram contadas com aumento de 1.000 vezes em câmara de Neubauer e auxílio de microscópio invertido *Eclipse TE300* (Nikon Corp., Kawasaki, Japão), sendo a viabilidade celular do cultivo em suspensão estimada através da razão entre o número de células viáveis, as quais não apresentaram o citoplasma corado, e o número de células totais, multiplicada por 100 (STROBER, 2001).

3.5 Coleta do meio condicionado das linhagens celulares produtoras do rFVIII-lab

O meio de cultivo condicionado durante 24 a 48 horas pelos clones celulares H6A e F5 cultivados em monocamada aderente e/ou suspensão estacionária foi coletado, filtrado em membranas de PVDF com poro de 0,45 μ m (Millex 33mm) da Millipore e imediatamente congelado em gelo seco para as posteriores análises e/ou processo de purificação do fator VIII recombinante (rFVIII-lab).

3.6 Purificação do Fator VIII recombinante

A purificação do rFVIII-lab foi realizada a partir meio de cultivo condicionado por 24 a 48 horas pelo clone H6A cultivado em monocamada aderente utilizando meio de cultivo α -MEM sem nucleosídeos e deoxinucleosídeos, suplementado com 7% de SFB. O processo de purificação do rFVIII-lab foi dividido em três etapas, sendo duas cromatográficas e uma de ultrafiltração.

3.6.1 Cromatografia de troca iônica

A primeira etapa de purificação do rFVIII-lab a partir do meio de cultivo condicionado foi realizada diretamente através de cromatografia de troca aniônica utilizando a coluna comercial *Hitrap Q-sepharose Fast Flow* (partículas de 90 μ m, dimensão de 16 x 25 mm, 5 ml de volume) (Lote 10064453) da GE Healthcare (General Electric Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) com auxílio do sistema cromatográfico Akta Purifier UPC 100 e programa Unicorn 5.31 da Amersham (General Electric Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia). As soluções tampões utilizadas e denominadas B1 troca iônica e B2 troca iônica, tamponadas pelo sistema cromatográfico com solução 100 mM Tris-HCl para pH 7,4, foram introduzidas na coluna com fluxo de 5 ml/min. O equilíbrio da coluna foi realizado utilizando 5 volumes de coluna (VC) de solução B1, 5 VC de solução B2 e novamente 13 VC de solução B1. A coluna foi carregada inicialmente com 10 ml de meio de cultivo, recém-descongelado, condicionado pelo clone H6A. Em seguida, a coluna foi desacoplada do sistema e novamente carregada, com auxílio de bomba peristáltica, com 80 ml restantes do meio de cultivo condicionado recém descongelado e mantido em gelo, totalizando em 90 ml de meio de partida. A coluna foi desacoplada da bomba peristáltica, novamente acoplada ao sistema cromatográfico e lavada com 2 VC de 3.8% v/v de solução B2 troca iônica em relação a solução B1 troca iônica. A eluição foi realizada em fluxo de 4 ml/min e em degrau, utilizando três concentrações diferentes de NaCl: 5 VC de 26% v/v, 5 VC de 50% v/v e 5 VC de 100% v/v de solução B2 troca iônica. As frações de eluição foram coletadas em volumes de 5 ml, imediatamente congeladas em gelo seco e mantidas a -20 °C para posterior quantificação da atividade de FVIII e obtenção do rFVIII-lab.

3.6.2 Cromatografia de afinidade à heparina

O procedimento foi realizado utilizando coluna comercial *Hitrap Heparin HP* (partículas de 34 μm , dimensão de 0,7 x 2,5 mm e 1 ml de volume) (Lotes 10032688 e 10110887) da GE Healthcare (General Electric Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) com auxílio do sistema cromatográfico Akta Purifier UPC 100 e programa Unicorn 5.31 da Amersham (General Electric Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia). As soluções de trabalho utilizadas e denominadas B1 heparina e B2 heparina, tamponadas pelo sistema com solução 100 mM Tris-HCl para pH 7,4, foram introduzidas na coluna com fluxo de 2 ml/min. O equilíbrio da coluna foi realizado utilizando 5 VC de solução B1 heparina, 5 VC de solução B2 heparina e 25 VC de solução B1 heparina. A coluna foi carregada inicialmente com 10 ml de uma mistura descongelada das frações de eluição obtidas durante a cromatografia de troca iônica (frações coletadas no intervalo de condutividade de 30,5 a 42 mS/cm), diluídas por um fator de três vezes em solução 5 mM CaCl_2 . A coluna foi desacoplada do sistema e novamente carregada, com auxílio de bomba peristáltica, com 35 ml da mistura restante, totalizando em 45 ml de meio de partida. Para lavagem da coluna foi utilizado 2 VC de 1% v/v de solução B2 heparina em relação a solução B1 heparina. O sistema foi lavado com 18 VC de 24% de solução B2 heparina e, em seguida, a eluição da coluna foi realizada utilizando 5 VC de 24% de solução B2 heparina e 12 VC de 100% de solução B2 heparina. As frações de eluição foram coletadas em volumes de 2 ml, a atividade FVIII foi estabilizada adicionando-se solução de pré-formulação para concentração final 1x para então serem imediatamente congeladas em gelo seco e estocadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior quantificação da atividade de FVIII e obtenção do rFVIII-lab.

3.6.3 Ultrafiltração

Para concentração e formulação do rFVIII-lab foi realizada uma etapa final de ultrafiltração. As frações de eluição obtidas durante a cromatografia de afinidade a heparina (frações coletadas no intervalo de condutividade de 12 a 19,5 mS/cm) estabilizadas em solução de pré-formulação 1x foram submetidos a dois ciclos de concentração por um fator de oito vezes através de ultrafiltração a $1.500 \times g$ e $4\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando membranas de celulose *Amicon Ultra-4* com corte nominal de 100 kDa (Lote R9PN61816) da Millipore (Millipore Corporation, Carrigtwohill, CO, Irlanda). Ao final de cada ciclo, o volume retido foi novamente diluído por um fator de oito vezes com solução de formulação. Após o segundo

ciclo, o homogeneizado foi novamente concentrado por um fator de oito vezes através de ultrafiltração e o volume retentado, com cerca de 500 µl, foi imediatamente congelado em gelo seco e armazenado a -80 °C. Para finalização do rFVIII-lab, os volumes purificados em cinco procedimentos independentes realizados foram descongelados, homogeneizados, esterilizados em membrana estéril de PVDF com poro de 0,22 µm (Millex 25mm) e por fim concentrados por um fator de seis vezes através de uma etapa final de ultrafiltração. O rFVIII-lab ao final purificado foi aliquotado, imediatamente congelado em gelo seco e depois armazenado a -80 °C.

3.7 Ensaio de atividade in vitro de Fator VIII

A quantificação da atividade de FVIII foi realizada através de ensaio cromogênico utilizando-se o kit comercial *Coatest VIII:C/4* (Lotes N0301468, N0201564, N0817333 e N052997) da Chromogenix (Chromogenix Instrumentation Laboratory, Milano, LO, Itália), o qual é baseado na ativação do fator X bovino, ativação essa proporcional à concentração de atividade de FVIII presente na amostra. Uma vez ativado, o fator X hidrolisa o substrato cromogênico N-a-Benzoyloxycarbonyl-Darginyl-L-glycyl-L-arginine-pnitroaniline-dihydrochloride, liberando e permitindo a quantificação espectrofotométrica do grupo p-Nitroanilina liberado. O ensaio foi realizado de acordo com instruções do fabricante para medidas de atividade entre 12 e 200 mUI/ml ou 210 e 1.500 mUI/ml de FVIII, utilizando 1/5 do volume de reagentes indicado para ensaio em microplaca. A curva-padrão foi obtida utilizando como padrão 1UI/ml de pFVIII (Fanhdi[®]) e como branco meio de cultivo Select CHO, ou α-MEM suplementado com SFBd, ou solução de formulação. Foi utilizada a modalidade de ensaio envolvendo a interrupção da reação com 20% v/v de ácido acético e os valores de absorbância foram obtidos através de leitura espectrofotométrica em 405nm com auxílio do leitor de microplaca SpectraMax M2 e programa SoftMaxPro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). A concentração de atividade de FVIII nas amostras foi calculada em mUI/mL através de uma curva-padrão obtida a partir da interpolação dos valores de absorbância obtida por regressão linear com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

3.8 Avaliação da preparação final do rFVIII-lab purificado

3.8.1 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas amostras de meio condicionado pelos clones produtores do rFVIII-lab cultivados em diferentes condições foi realizada através de ensaio colorimétrico baseado no ácido bicinonínico, utilizando kit comercial *BCA Protein Assay* (Lote CI48587) da Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) e curva-padrão com albumina sérica bovina (BSA) para medidas entre 0,5 e 100 µg/ml de proteínas, de acordo com instruções do fabricante. Os valores de absorvância foram obtidos através de leitura espectrofotométrica em 562 nm com auxílio do leitor de microplaca *SpectraMax M2* e programa *SoftMaxPro* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). A concentração de proteínas nas amostras foram calculadas em mg/ml através da curva-padrão obtida através da interpolação dos valores de absorvância obtidos por regressão linear com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

A quantificação de proteínas totais nas amostras obtidas durante a purificação do rFVIII-lab foi realizada através de ensaio colorimétrico baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o corante *coomassie brilliant blue*. Para avaliação das amostras de meio condicionado pelo clone H6A, e após as etapas de cromatografia de troca iônica e de afinidade à heparina, foi utilizada uma curva-padrão utilizando BSA para determinação de concentrações entre 0,01 a 0,4 mg/ml de proteínas. Para as amostras obtidas após a etapa de ultrafiltração, do rFVIII-lab final e do rFVIII comercial Kogenate[®] foi utilizada curva-padrão utilizando BSA para a determinação de concentrações entre 0,1 a 4 mg/ml de proteínas. As curvas-padrão foram obtidas adicionando-se 10 µl do veículo das amostras a serem analisadas, de 1 a 8 µl de BSA (estoque 100 ng/ml ou 1 mg/ml), água ultrapura qsp 80 µl e, em seguida, 20 µl de reagente *Bio-Rad Protein Assay* (Lote 970067) da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). As amostras foram homogeneizadas e os valores de absorvância foram obtidos através de leitura espectrofotométrica em 595nm com auxílio do leitor de microplaca *SpectraMax M2* e programa *SoftMaxPro* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos). A concentração de proteínas nas amostras foram calculadas em mg/ml através da curva-padrão obtida por interpolação dos valores de absorvância obtidos por regressão linear com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

3.8.2 Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida desnaturante

Para a caracterização de proteínas totais durante o processo de purificação do rFVIII-lab e nos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®], as amostras obtidas foram diluídas em tampão de amostra para proteínas e analisadas através de fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em condições desnaturantes, na presença do detergente SDS (SDS-PAGE), utilizando marcador de peso molecular *Benchmark Protein Ladder 10748-010* (Lote 1034767) da Invitrogen (Life Technologies, Burlingame, CA, Estados Unidos). As proteínas resolvidas foram fixadas por uma hora com solução de fixação (50% v/v Etanol, 40% água ultrapura e 10% v/v Ácido Acético glacial) e detectadas através de incubação por 16 horas utilizando solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal (1 g/L de *coomassie brilliant blue G-250*; 1,27 M de (NH₄)₂SO₄; 3% v/v de H₃PO₄; 34% v/v de metanol). Após a coloração, o gel foi lavado com água ultrapura, levemente descorado com solução 20% v/v de etanol e ao final escaneado para geração da imagem digitalizada.

3.8.3 Ensaio de Western blotting para detecção da cadeia leve do rFVIII-lab

As amostras obtidas durante o processo de purificação do rFVIII-lab foram avaliadas através de ensaio de *Western blotting* para detecção específica da cadeia leve (LCh) do FVIII. As amostras, incluindo os produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®], foram diluídas em tampão de amostra para proteínas e analisadas através de fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em condições desnaturantes, na presença do detergente SDS (SDS-PAGE), utilizando o marcador de peso molecular *Benchmark Protein Ladder 10748-010* (Lote 1034767) da Invitrogen (Life Technologies, Burlingame, CA, Estados Unidos). As proteínas resolvidas foram transferidas via úmida em tampão de transferência para membrana de nitrocelulose Amersham Hybond ECL da GE Healthcare (General Electric Healthcare Life Sciences, Easton Turnpike Fairfield, CT, Estados Unidos). Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução contendo 5% de leite desnatado em solução tampão tris-salina contendo 0,05% v/v de Polissorbato-20 (TBST) a 4 °C por cerca de 16 horas. Em seguida, após seis lavagens com solução TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo murino primário anti-LCh do FVIII *Mab-038* da Chemicon (Millipore Corporation, Billerica, MA, Estados Unidos) diluído 1:1.000 na mesma solução utilizada para bloqueio por 20 min em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas seis vezes com

TBST e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com peroxidase da Invitrogen (Life Technologies Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) na mesma solução utilizada para bloqueio por 20 min em temperatura ambiente. Os sinais quimioluminescentes foram gerados utilizando o reagente comercial *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* da Millipore (Merck Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), de acordo com instruções do fabricante, e detectados em filmes fotossensíveis *Hyperfilm ECL* da Amersham (General Electric Healthcare Life Sciences, Easton Turnpike Fairfield, CT, Estados Unidos).

3.9 Modelo murino de Hemofilia A

A linhagem geneticamente modificada de camundongos B6;129S4- $F8^{tm1Kaz}/J$, comercializada pelo *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, Estados Unidos), foi importada mediante aprovação da Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Química da USP, sob licença (nº 01200.005375/1996-33) da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e autorização do Departamento de Saúde Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A linhagem B6;129S4- $F8^{tm1Kaz}/J$ foi gerada a partir da disrupção do éxon 16 do loco *Fviii* e apresenta menos de 1% da atividade plasmática do FVIII da coagulação normalmente encontrada em animais selvagens, recapitulando as principais características encontradas na hemofilia A humana (BI et al., 1995). Os animais foram entregues em gaiola apropriada para padrão sanitário *Specific Pathogen Free* (SPF) e aclimatados por duas semanas na instalação padrão SPF da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade São Paulo. Ninhadas desses animais B6;129S4- $F8^{tm1Kaz}/J$ foram obtidas por reprodução monogâmica, entre fêmeas homozigóticas e machos hemizigóticos para a mutação no éxon 16 do loco *Fviii*. A linhagem de camundongos selvagens 129/Sv foi obtida através do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após o período de aclimação, os animais B6;129S4- $F8^{tm1Kaz}/J$ e 129/Sv a serem utilizados experimentalmente foram mantidos em grupos de 3-4 por gaiola de polipropileno (CG111, Beiramar, São Paulo, Brasil) contendo maravalha, algodão e um iglu vermelho opaco (Igloo, Alesco, Montemor, Brasil), utilizado para enriquecimento ambiental, todos autoclavados a 121 °C durante 20 min. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração (Nuvital, Quimtia, Curitiba, Brasil) e água através de garrafas de polipropileno (BP250, Beiramar, São Paulo, Brasil). A temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 2 °C, a umidade relativa do ar entre 50% e 70% e

o ciclo artificial de claro-escuro em 12:12 horas. Os protocolos de experimentação envolvendo a utilização desses animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CEUA) do Instituto de Química da USP.

3.10 Caracterização da atividade funcional do fator VIII

3.10.1 Ensaio de atividade *in vivo*

Para caracterização da atividade funcional do FVIII *in vivo* foram utilizados camundongos machos ou fêmeas modelo da hemofilia A (linhagem B6;129S4-F8^{tm1Kaz}/J) e camundongos selvagens (linhagem 129/Sv) de 6-8 semanas e pesando cerca de 20 gramas. Os animais foram divididos em grupos experimentais, cada grupo com cinco animais (n=5) e correspondendo ao tratamento com uma dose diferente dos produtos de referência rFVIII (Kogenate FS[®]) ou pFVIII (Fanhdi[®]) ou do rFVIII produzido no laboratório (rFVIII-lab). Os animais foram anestesiados através da inalação de vapor de isoflurano (Lotes 10042787, 11075117, 12086046) da Cristália (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil) dissolvido em oxigênio através de vaporizador 1500 da Moriya Vitalvet (J. G. Moriya, São Paulo, SP, Brasil). Após os animais apresentarem sinais de anestesia foi administrada a dose de interesse de Kogenate FS[®] (1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50, 75 ou 100 UI/Kg) ou Fanhdi[®] (5; 10; 25; 50, 75 ou 100 UI/Kg) ou rFVIII-lab (5; 25 ou 50 UI/Kg), previamente ajustada para um volume final de 70 µl com solução fisiológica de *ringer* com lactato *Ecoflac plus* (Lote 9194124C34) da B. Braun (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), utilizada como veículo, pela via do plexo venoso retro-orbital utilizando agulha 29G. Os animais foram mantidos anestesiados, e, após 10 min da administração, foi induzido um evento hemorrágico através da transecção da porção terminal da cauda utilizando-se como molde uma ponteira para pipetadores de 200 µl com a extremidade cortada, e lâmina nº11 de bisturi para remoção do tecido sobressalente da cauda, de aproximadamente 1 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento, momento em que foi iniciado a contagem do tempo de sangramento. Os animais foram retirados da anestesia, retornados à gaiola, e o sangramento pela extremidade da cauda foi monitorado e registrado a cada 15 min com a utilização de papel de filtro de celulose *Whatmann* (GE HealthCare Life Sciences, Fairfield, CT, Estados Unidos) por até 120 min. Após esse período de observação, o ferimento dos animais em que não ocorreu a interrupção do sangramento foi cauterizado utilizando caneta cauterizadora *Cautery System* da

Gemini (SouthPointe Surgical Supply, Coral Springs, FL, Estados Unidos). Ao término do ensaio, a eutanásia dos animais foi realizada através da administração via intraperitoneal de sobredose anestésica com 300 mg/kg de cetamina *Vetanarcol* (Lote 009/07) da Konig (Laboratórios Konig, Avellaneda, BA, Argentina) previamente misturada com 30 mg/kg de xilazina *Xilazin* (Lote 004/2011) da Syntec (Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brasil). As respostas observadas de interrupção ou não do sangramento pela extremidade da cauda por até 120 min nos animais tratados com as diferentes doses de FVIII administradas foram utilizadas para uma avaliação quantitativa, buscando comparar a eficácia entre as diferentes fontes de FVIII administrado, através da determinação das doses efetivas em que 50% dos animais avaliados (DE_{50} ou ED_{50}) apresentaram resposta (interrupção do sangramento) por regressão logística com auxílio do programa SPSS da IBM (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos). De modo a testar a significância estatística da diferença entre a eficácia dos produtos de referência, as respostas observadas para o tratamento foram avaliadas através de análise de regressão logística (HOSMER; LEMESHOW, 1989) segundo o modelo: $logit\{Pr(Y = 1|\mathbf{x})\} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \varepsilon$; onde Y representa o vetor de variáveis que assume o valor de 1 se o animal apresentou interrupção do sangramento e como 0 caso contrário. Os vetores x_1 , x_2 , x_3 são os indicadores do tratamento, representando como 1 se o animal foi tratado com Kogenate FS[®] e 0 caso tratado com Fanhdi[®], a dose de Kogenate FS[®] e a dose de Fanhdi[®], respectivamente. Os parâmetros estimados foram o vetor de resíduos ε , a intercepção β_0 e vetores de inclinação β_1 , β_2 , e β_3 . O tamanho dos vetores foi determinado pelo número de animais observados. A significância estatística entre os ED_{50} referentes ao tratamento com Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] foi averiguada através do teste de Wald's, avaliando se o conjunto de parâmetros β_0 , β_1 , β_2 , e β_3 são zero ou não. Os cálculos foram realizados no software R, utilizando a função glm (R CORE TEAM, 2012).

3.10.2 Ensaio de atividade de FVIII ex-vivo

Para caracterização da atividade do FVIII *ex vivo* foram utilizados camundongos modelo da hemofilia A (linhagem B6;129S4-F8^{tm1Kaz}/J) e camundongos selvagens (linhagem 129/Sv) de 6-8 semanas e pesando cerca de 20 gramas. Os animais hemofílicos foram divididos em grupos experimentais, sendo, cada grupo, com cinco animais ($n=5$) e correspondendo ao tratamento com uma dosagem diferente dos produtos de referência rFVIII

(Kogenate FS[®]), pFVIII (Fanhdi[®]) ou do rFVIII produzido no laboratório (rFVIII-lab). Os animais foram anestesiados através da inalação de vapor de isoflurano (Lotes 10042787, 11075117, 12086046) da Cristália (Cristalia Produtos Químicos Farmaceuticos, Itapira, SP, Brasil) dissolvido em oxigênio através de vaporizador 1500 da Moriya Vitalvet (J. G. Moriya, São Paulo, SP, Brasil). Após os animais apresentarem sinais de anestesia foi administrada a dose de interesse de Kogenate FS[®] (1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50, 75 ou 100 UI/Kg) ou Fanhdi[®] (5; 10; 25; 50, 75 ou 100 UI/Kg), previamente ajustada para um volume final de 70 µl com solução fisiológica de *Ringer* com lactato *Ecoflac plus* (Lote 9194124C34) da B. Braun (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), utilizada como veículo, pela via do plexo venoso retro-orbital utilizando agulha 29G. Após 10 min da administração foram coletados 90 µl de sangue dos animais através de punção da veia submandibular, com auxílio de agulha 18G, em tubos contendo 9:1 (v/v) de solução 130 mM de citrato de sódio. As amostras foram mantidas no gelo por alguns instantes e em seguida centrifugadas 2.000xg por 5 min. O plasma das amostras foi coletado, imediatamente congelado em gelo seco e estocado a -20°C para posterior quantificação da atividade de FVIII através de ensaio de atividade *in vitro*, conforme anteriormente descrito. Os valores de concentração de FVIII obtidos nas amostras de plasma referente ao tratamento com as diferentes doses de Kogenate FS[®] e Fanhdi[®], obtidos em mUI/ml, foram ajustados através de curva de dose-resposta sigmoidal (inclinação variável) com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). O parâmetro farmacocinético “taxa de recuperação inicial incremental *in vivo* após 10 min da administração” foi estimado dividindo-se o valor médio da atividade plasmática de FVIII nos animais hemofílicos, expressa em porcentagem da média da atividade plasmática de FVIII nos animais selvagens, pela respectiva dosagem do FVIII administrado.

3.11 Indução de resposta imune ao fator VIII

Para a indução de resposta imunológica ao FVIII, camundongos modelo da hemofilia A (linhagem B6;129S4-F8^{tm1Kaz}/J) foram divididos em quatro grupos experimentais, cada grupo com cinco animais (n=5) e correspondendo ao tratamento com quatro administrações semanais de 50 UI/kg do rFVIII-lab produzido e purificado no laboratório; ou produto de referência rFVIII (Kogenate FS[®]); ou produto de referência pFVIII (Fanhdi[®]); ou apenas solução de formulação. Após cinco semanas do início do tratamento dos animais hemofílicos com FVIII foram coletados 180 µl de sangue dos animais, através de punção da veia submandibular com auxílio de agulha 18G, em tubos contendo 9:1 (v/v) de solução 130 mM

de citrato de sódio. As amostras foram mantidas no gelo por alguns instantes e em seguida centrifugadas 2.000xg por 5 min. O plasma das amostras foi coletado, imediatamente congelado em gelo seco e estocado a -20°C para posterior avaliação da formação de anticorpos anti-FVIII.

3.12 Dosagem de anticorpos anti-Fator VIII totais

Para avaliação da formação dos anticorpos anti-FVIII totais, os títulos de imunoglobulinas G (IgG) foram dosados, em duplicata, no plasma dos animais modelo da hemofilia A tratados com rFVIII-lab, Fanhdi[®], Kogenate FS[®] ou veículo, conforme descrito no item 3.11, através de ensaio imunoenzimático (Elisa). Para a dosagem do título dos anticorpos IgG anti-FVIII, placas de 96 poços *MaxiSorp* da Nunc (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) foram incubadas com 0,05 µg/ poço de FVIII (Kogenate FS[®]) em 50 µl de tampão carbonato pH 9.4 por 16 h a 4 °C. Após o período de incubação, a lavagem dos poços foi realizada, por três vezes, utilizando solução tampão salina fosfato e 0,1% Tween 20, e em seguida, os sítios inespecíficos da placa foram bloqueados com 200 µl de solução 2% m/v de albumina sérica bovina (BSA) em solução tampão salina fosfato a temperatura ambiente e atmosfera úmida por 2 horas. Após o período de incubação, a lavagem dos poços foi realizada, por três vezes, utilizando solução tampão salina fosfato e 0,1% Tween 20, e em seguida, os poços foram incubados com 100 µl do plasma dos animais hemofílicos, diluídos serialmente em solução de bloqueio, referentes ao tratamento com rFVIII-lab (diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000), Kogenate FS[®] (diluições 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:25.000), Fanhdi[®] (diluições 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:25.000, 1:50.000 e 1:75.000) e veículo (diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000) por 2 horas a 37 °C. Após o período de incubação, a lavagem dos poços foi realizada, por três vezes, utilizando solução tampão salina fosfato e 0,1% Tween 20, e em seguida, os poços foram incubados com anticorpo secundário anti IgG de camundongo da Invitrogen (Life Technologies, Burlingame, CA, Estados Unidos) conjugados com peroxidase e diluídos a 1:2.000 na solução de bloqueio, em temperatura ambiente e atmosfera úmida por 1 hora e 30 min. Após o período de incubação, a lavagem dos poços foi realizada por três vezes utilizando solução tampão salina fosfato e 0,1% Tween 20 e, para a revelação, os poços foram incubados com 100µl de solução preparada do kit *TMB Elisa* (Lote NA165706A) da Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) por cinco min, seguida da interrupção da reação através da adição de 100 µl de solução 2 M de ácido sulfúrico. As absorbâncias foram medidas com auxílio do leitor de Elisa

SpectraMax M2 da Molecular Devices (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) a 405 nm. Os títulos dos anticorpos foram estimados através das maiores diluições do plasma dos animais analisados que apresentaram sinal positivo, cujo valor de absorbância foi maior que a média do valor de absorbância do controle negativo somada ao seu valor de desvio padrão multiplicado três vezes, valor estimado em 0,05. A análise de variância entre os diferentes grupos avaliados foi realizada através de teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de teste *post hoc* Dunn's com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

3.13 Quantificação de anticorpos inibitórios da atividade do fator VIII

A avaliação da formação dos anticorpos inibitórios da atividade do FVIII (inibidores) no plasma dos animais modelo da hemofilia A tratados com rFVIII-lab, Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou veículo foi realizada baseada no ensaio Bethesda modificado por Nijmegen (VERBRUGGEN et al., 1995). Primeiramente, as amostras de plasma foram incubadas a 58°C por 90 min para inativação de uma eventual atividade de FVIII e centrifugadas a 4.000 x g por 2 min para remoção de debris. As amostras de plasma dos animais avaliados foram diluídas serialmente em plasma humano comercial deficiente em FVIII *Factor VIII Deficient Plasma* (Lote DP8-0275) da Affinity (Affinity Biologicals Inc, Ancaster, Ontário, Canadá) sendo que para o tratamento com rFVIII-lab foram utilizadas as diluições 1:5 e 1:25, para o Kogenate FS[®] 1:10 e 1:50), para o Fanhdi[®] 1:20, 1:30, 1:100 e 1:150, e para o veículo 1:4 e 1:20, sendo definidas como “plasmas-teste”. Em seguida, uma amostra em triplicata de plasma deficiente em FVIII, definida como “plasma-controle”, juntamente com as amostras referentes aos “plasmas-teste”, foram incubadas por 2 horas a 37°C com igual volume (45 µl) de uma solução 2 UI/ml de FVIII (Fanhdi[®]) em uma solução de plasma deficiente em FVIII contendo 100 mM de imidazol a pH 7,4, utilizada em substituição ao *pool* de plasma humano normal proposto no método originalmente descrito. Após o período de incubação, as amostras “plasmas-teste” e “plasmas-controle” foram avaliadas através de ensaio cromogênico de atividade *in vitro* do FVIII. A atividade de FVIII obtida nas amostras “plasmas-teste” foi expressa em relação à obtida nas amostras “plasmas-controle”, e denominada “atividade remanescente de FVIII (%)”, sendo utilizadas para a quantificação dos inibidores do FVIII apenas quando essa atividade remanescente foi estimada entre 25% a 75% da atividade média de FVIII quantificada nas amostras “plasmas-controle”, intervalo em que a correlação entre a atividade remanescente de FVIII e a presença de inibidores é linear (VERBRUGGEN; VAN

HEERDE; LAROS-VAN GORKOM, 2009). A quantificação dos inibidores no plasma dos animais em unidades Bethesda (UB)/ml foi realizada através de regressão linear dos valores de atividade restante de FVIII em escala semi-logarítmica, sendo definido que 100% de atividade restante de FVIII corresponde à 0,0 UB/ml e 50% de FVIII à 1,0 UB/ml. Os valores de UB/ml obtidos no plasma dos animais avaliados foram corrigidos pelos fatores de diluição utilizados e, nos casos em que as UB/ml obtidas para as diferentes diluições de cada plasma avaliado foram divergentes após essa correção, o cálculo das UB/ml foi realizado com base apenas no resultado obtido com o menor fator de diluição utilizado. A análise de variância entre as UB/ml quantificadas no plasma dos animais avaliados para o tratamento com o rFVIII-lab, Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] foi realizada através de teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* Dunn's com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

4.1 *Purificação do Fator VIII humano recombinante produzido no laboratório*

Como primeiro passo no estabelecimento de um protocolo de purificação do Fator VIII humano recombinante produzido no laboratório (rFVIII-lab) buscamos diminuir a complexidade da mistura de proteínas presente no meio de cultivo condicionado por dois clones celulares independentes super-produtores do rFVIII-lab, os clones celulares CHO DG44 H6A (H6A) e CHO DG44 F5 (F5). Desta forma, buscou-se adaptar os clones celulares H6A e F5, normalmente cultivados em monocamada aderente e em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB), ao cultivo em suspensão, para obtenção de densidades celulares mais elevadas, e em meio de cultura de composição definida, totalmente livre de aditivos de origem animal ou humana. Idealmente, este meio de cultivo deve ser compatível com a manutenção da viabilidade celular em altas densidades celulares, bem como com a produção e estabilidade do rFVIII secretado para o meio de cultivo. O meio definido utilizado (Select CHO – BD Biosciences) é livre de proteínas de origem animal, sendo suplementado com um hidrolisado de proteínas vegetais e insulina humana recombinante (BD BIOSCIENCES, 2009). A adaptação dos clones celulares superprodutores do rFVIII-lab H6A e F5 para crescimento em suspensão e em meio de cultivo de composição definida e livre de metotrexato (MTX) foi realizada através do protocolo de adaptação sequencial, conforme descrito em Métodos. Este protocolo de adaptação consistiu no cultivo das células em suspensão através da utilização de garrafas de cultura não aderentes, e a adaptação para o crescimento em meio de cultivo livre de soro fetal bovino (SFB), realizada em várias etapas, utilizando-se quantidades progressivamente menores de SFB, até que se atingisse uma condição na qual as células mantivessem sua capacidade proliferativa e de produção do rFVIII-lab na ausência de SFB e MTX. Ao final de cada etapa de adaptação, foram avaliados o número de células viáveis e a produtividade volumétrica de rFVIII-lab. Na figura 1 estão representados os dados referentes ao processo de adaptação do clone F5 após a estabilização da viabilidade celular em valores acima de 90%, o que aconteceu cerca de 30 dias após o início do processo de adaptação.

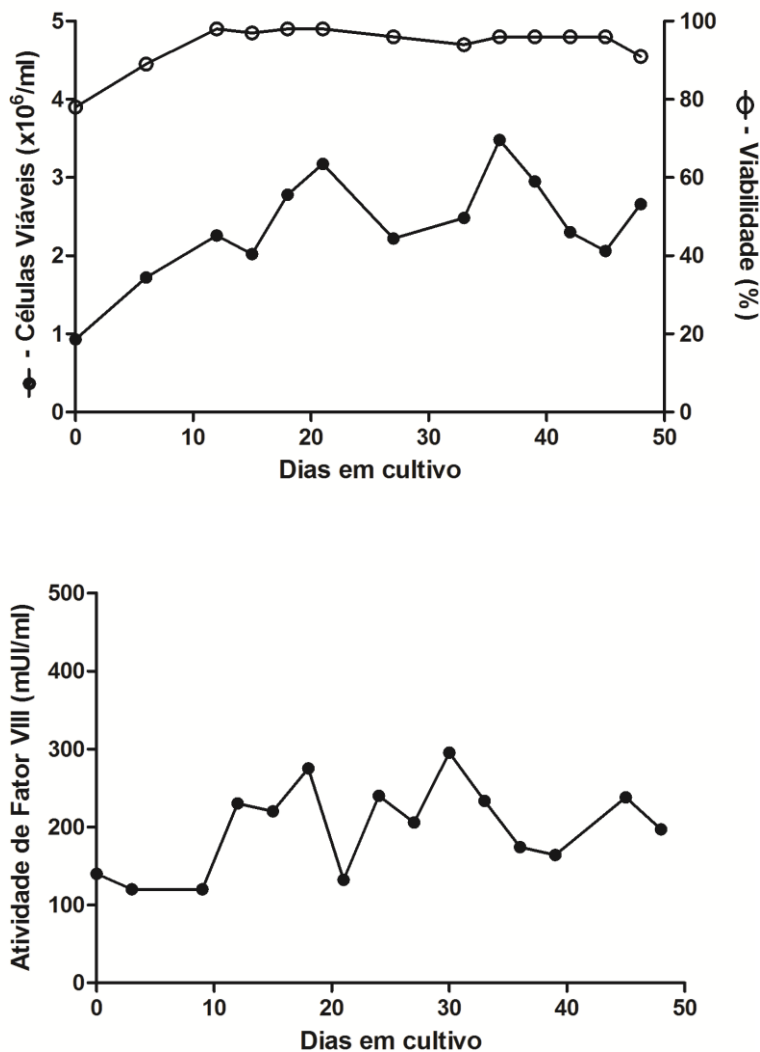


Figura 1 - Produção do fator FVIII recombinante durante a adaptação do clone celular F5 ao cultivo em suspensão. A produção do FVIII recombinante e a adaptação do clone F5 ao cultivo em suspensão estacionária e em meio de composição definida e livre de metotrexato foram avaliados através de amostras da suspensão de células e do meio de cultivo condicionado obtidas a cada 72 horas durante 48 dias, realizadas após um período de 30 dias para a estabilização da viabilidade das células F5 em valores acima de 90%. (A) Avaliação da densidade de células viáveis ($\times 10^6/\text{ml}$) e da viabilidade celular (%) ao longo do processo de adaptação do clone F5 para cultivo em suspensão e em meio de cultura de composição definida. (B) A produtividade volumétrica de fator VIII (mUI/ml) foi quantificada através de ensaio cromogênico de atividade do Fator VIII *in vitro*.

A figura 1 representa a avaliação da produtividade volumétrica do rFVIII-lab associada ao processo de adaptação da população celular F5, realizada por 48 dias após a estabilização da viabilidade celular em valores acima de 90%, o que aconteceu cerca de 30 dias após o início do processo de adaptação. Esta avaliação foi realizada com culturas estacionárias das células F5 em frascos de cultivo T25 não aderentes. Estão representadas nos gráficos da figura 1 a densidade de células viáveis, a porcentagem de células viáveis e as

medidas de atividade de Fator VIII acumulada após 72 horas de cultivo. Pode-se observar no gráfico A da figura 1 que a viabilidade celular se manteve elevada, ao redor de 95%, em boa parte do período avaliado. Observa-se também que houve um aumento da densidade de células viáveis. Partindo-se de inóculos iniciais de 1×10^6 células viáveis/ml, o dobramento do número de células foi alcançado após três dias de cultivo em boa parte do período avaliado (Figura 1 – gráfico A), o que está dentro dos valores esperados, segundo o protocolo de adaptação sequencial recomendado pelo fabricante do meio de cultivo definido (BIOSCIENCES, 2009). Estes resultados indicam que as células F5 foram adaptadas com sucesso ao cultivo em suspensão e em meio definido. Durante o período avaliado, observou-se um aumento da quantidade acumulada de rFVIII no meio de cultivo condicionado após o 10º dia, mantendo-se em torno de 200 mUI/ml durante o período de avaliação de 48 dias (Figura 1 - gráfico B).

Os resultados obtidos com a população celular F5 demonstram que o rFVIII produzido em nosso sistema é ativo no meio de cultivo de composição definida Select CHO sem suplementação com albumina, um estabilizador conhecido da atividade do fator VIII (Chan et al., 1998). Estes resultados também indicam que a produção do rFVIII pelas células F5 é estável na ausência do agente seletivo MTX, pelo menos no período total de 80 dias avaliado. Entretanto, a produtividade e/ou estabilidade do rFVIII produzido pelas células F5 é bem menor quando comparada às mesmas células cultivadas em monocamada e com meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino ou albumina sérica humana (HSA). Enquanto a quantidade acumulada do rFVIII no meio de cultivo condicionado por cerca de $2,5 \times 10^6$ células F5 (número de células no momento da coleta), cultivadas em monocamada e meio de cultivo suplementado com 7% de SFBd, é de cerca de 2,5 UI após 24 horas, no caso das mesmas células, quando cultivadas em suspensão estacionária e em meio definido sem suplementação com albumina humana, a quantidade acumulada do rFVIII-lab no meio de cultivo condicionado por cerca de 1×10^7 células (número de células no momento da coleta) é de cerca de 1UI após 72 horas. Obteve-se resultados similares com a população celular H6A após a adaptação para crescimento em suspensão e meio de cultivo definido (dado não mostrado), a não ser por uma diminuição mais drástica na quantidade acumulada do rFVIII-lab no meio condicionado. A quantidade acumulada do rFVIII-lab no meio de cultivo condicionado por cerca de $2,5 \times 10^6$ células, cultivadas em monocamada e meio de cultivo suplementado com 7% de SFBd, é de cerca de 7,5 UI após 24 horas, enquanto que as mesmas células, quando cultivadas em suspensão estacionária e em meio definido sem suplementação

com HSA, a quantidade acumulada do rFVIII-lab no meio de cultivo condicionado por cerca de 1×10^7 células é de cerca de 0,75UI após 72 horas.

Na sequência, para a escolha do meio de partida a ser utilizado para o processo de purificação do rFVIII-lab, buscou-se determinar a condição de cultivo com maior atividade específica do rFVIII. Assim, avaliou-se a atividade específica do rFVIII-lab produzido pelas células que apresentaram maior produtividade em suspensão e meio definido, as células F5, frente a atividade específica da população celular cultivada em monocamada aderente com maior produtividade, as células H6A, cultivadas em meio de cultivo suplementado com 7% de SFB dialisado (SFBd) ou 1% de albumina humana (HSA) (Grifols) e 1X do suplemento comercial composto de insulina, transferrina e selênio (ITS, Invitrogen). Assim, amostras de meio Select CHO condicionado por 24 horas pelas células F5 cultivadas em suspensão estacionária e amostras de meio α -MEM suplementado com 7% de SFBd ou com 1% de HSA e 1 X ITS, condicionadas 24 horas pelas células H6A cultivadas em monocamada aderente, foram avaliadas através da quantificação da concentração da atividade acumulada de FVIII e de proteínas totais. A atividade específica nos diferentes meios de partida foi determinada através da razão obtida da concentração de atividade pela concentração de proteínas totais (Figura 2).

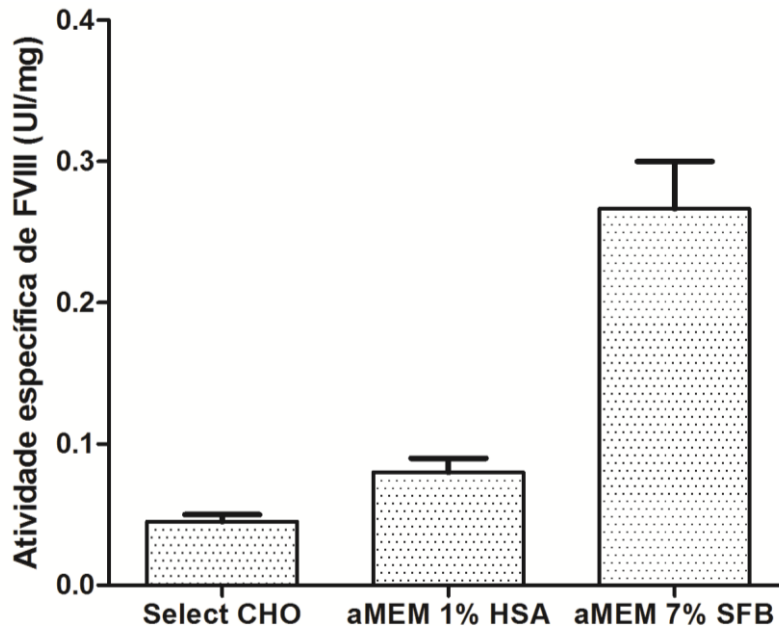


Figura 2 - Análise comparativa da atividade específica do fator VIII recombinante produzido no laboratório em diferentes meios de partida. A atividade específica do rFVIII-lab (UI/mg) foi obtida através da razão entre os valores de atividade de FVIII e os de proteínas totais acumuladas nos diferentes meios de partida avaliados. A atividade total acumulada de fator VIII (UI) após 24 horas de cultivo foi estimada através de ensaio cromogênico comercial de atividade *in vitro* e normalizada pelo número de células no momento da coleta. A quantidade de proteínas totais acumuladas (mg) após 24 horas de cultivo foi estimada através de ensaio colorimétrico comercial baseado no ácido bicinonínico e normalizada pelo número de células no momento da coleta. Foram avaliadas as seguintes condições de produção do rFVIII-lab: Células F5 cultivadas em suspensão estacionária e em meio Select CHO suplementado com glutamina e Pluronic F-68, representada no gráfico com Select CHO; Células H6A cultivadas em monocamada aderente e em meio de cultivo α MEM sem nucleosídeos suplementado com 1% de albumina sérica humana e 1x de suplemento composto de insulina, transferrina e selênio, representada no gráfico como aMEM 1% HSA; Células H6A cultivadas em monocamada aderente e em meio de cultivo α MEM sem nucleosídeos suplementado com 7% de soro fetal bovino dialisado, representadas no gráfico como aMEM 7% SFB.

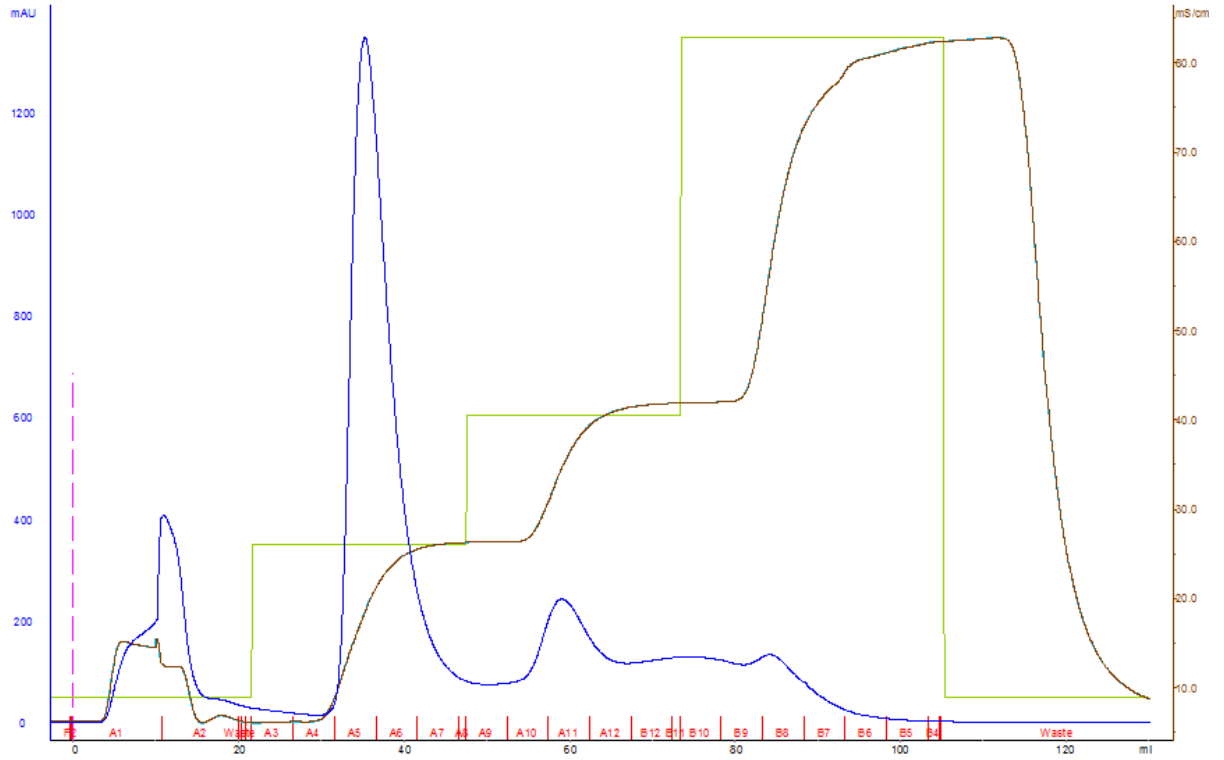
A atividade específica de rFVIII-lab obtida na condição envolvendo o cultivo em suspensão estacionária das células F5 e utilização do meio de cultivo Select CHO foi estimada em 50 ± 10 mUI/mg, sendo a atividade específica mais baixa dentre as condições avaliadas. A atividade específica do rFVIII-lab produzido pelas células H6A na condição envolvendo o cultivo em monocamada aderente e meio α MEM sem suplementação com SFB e suplementado com 1% de HSA e 1x ITS foi estimada em 80 ± 10 mUI/mg. A condição avaliada que apresentou maior atividade específica foi aquela envolvendo o cultivo das células H6A em monocamada aderente e em meio suplementado com 7% de SFBd, sendo estimada em 260 ± 40 mUI/mg. Com base nessas informações e na produtividade volumétrica

do rFVIII-lab em cada uma das condições avaliadas, optou-se pela utilização do meio α MEM suplementado com 7% de SFBd condicionado pelo cultivo do clone H6A em monocamada aderente como material de partida para purificação do rFVIII-lab.

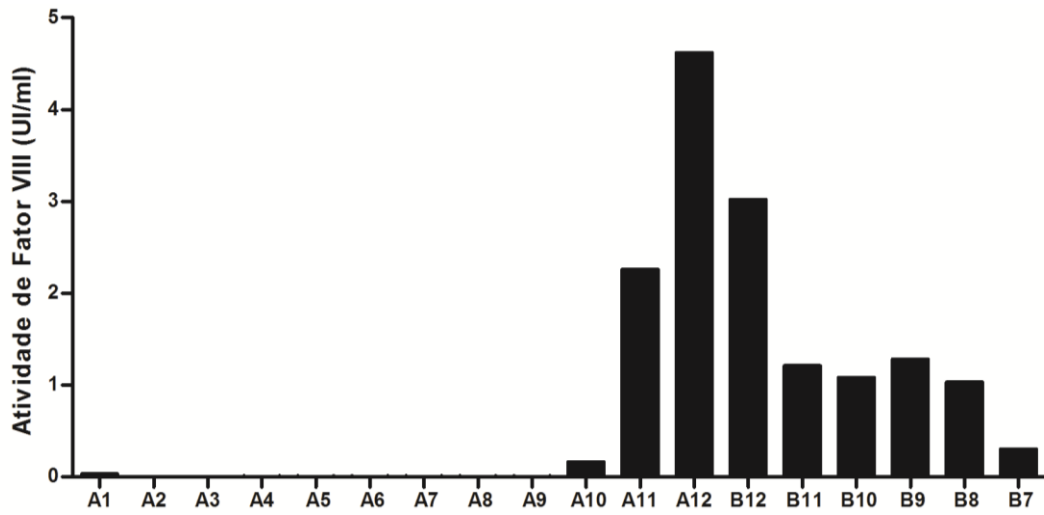
Na sequência, buscou-se estabelecer um protocolo de purificação do rFVIII-lab no laboratório. A estratégia adotada para purificação do rFVIII-lab, a partir de meio α -MEM sem nucleosídeos suplementado com 7% de SFB e condicionado pelo cultivo das células H6A em monocamada aderente, consistiu de três etapas: duas cromatográficas e uma de ultrafiltração. A primeira etapa da estratégia de purificação utilizada consistiu de uma cromatografia de troca aniônica baseada na utilização do grupo funcional trimetilamônio quaternário, um trocador aniônico forte, presente na coluna comercial *Hitrap Q Sepharose fast flow* (GE Healthcare). Esta primeira etapa cromatográfica teve como objetivos principais a redução do volume do meio de cultivo condicionado original, remoção parcial de impurezas e estabilização do dímero que compõe o Fator VIII, sendo escolhida com base em resultados positivos descritos na literatura para purificação de fator VIII diretamente a partir de plasma de porco ou humano e em temperatura ambiente (CHENG et al., 2010; TANAKA et al., 2000). Após alguns ensaios de padronização, estabeleceram-se as melhores condições de ligação, lavagem das impurezas e eluição do rFVIII-lab. A Figura 3 (gráfico A) representa um cromatograma típico obtido através da utilização do protocolo de cromatografia de troca aniônica estabelecido após a padronização, e a Figura 3 (gráfico B) um ensaio de atividade *in vitro* do FVIII típico nas diversas frações obtidas através deste método.

Figura 3 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório rFVIII-lab através de cromatografia de troca aniônica. (A) Cromatograma típico obtido durante o fracionamento do meio de cultivo (α -MEM sem nucleosídeos suplementado com 7% SFB) condicionado pelas células CHO-DG44 H6A, produtoras do rFVIII-lab, realizado através de cromatografia de troca aniônica associada a um regime de eluição em degrau. Estão representadas no cromatograma as curvas de absorção espectrofotométrica em 280nm (azul), indicando os picos de eluição proteica, e a de condutividade (marrom), indicando os valores de condutividade associados às alterações de concentração salina (verde) durante as etapas de eluição. No eixo das abscissas estão representadas as fração de eluição (A1 a B4), correspondentes a um volume de coluna (5 ml), e no eixo das ordenadas estão representadas na esquerda (Y1) a absorbância em 280 nm (miliunidades de absorbância – mAU) e na direita (Y2) a condutividade (mS/cm). A linha tracejada vertical rosa indica o momento de injeção da amostra, realizada em um “loop” de 10 ml, sendo que o restante da amostra (~80 ml) foi injetado através de bomba peristáltica. O pico protéico eluído nas frações A1 e A2 representa a eluição dos últimos 5 ml de proteínas não ligadas à coluna. (B) Concentração da atividade de FVIII em UI/ml nas amostras de permeado à coluna (A1-A2), de lavagem (A3-A4) e de eluição (A5-B7), obtidas durante o procedimento. As frações de eluição A11, A12 e B12, enriquecidas em atividade de FVIII, foram eluídas com valores de condutividade entre 30,7 e 41,9 mS/cm (curva marrom).

(A)



(B)



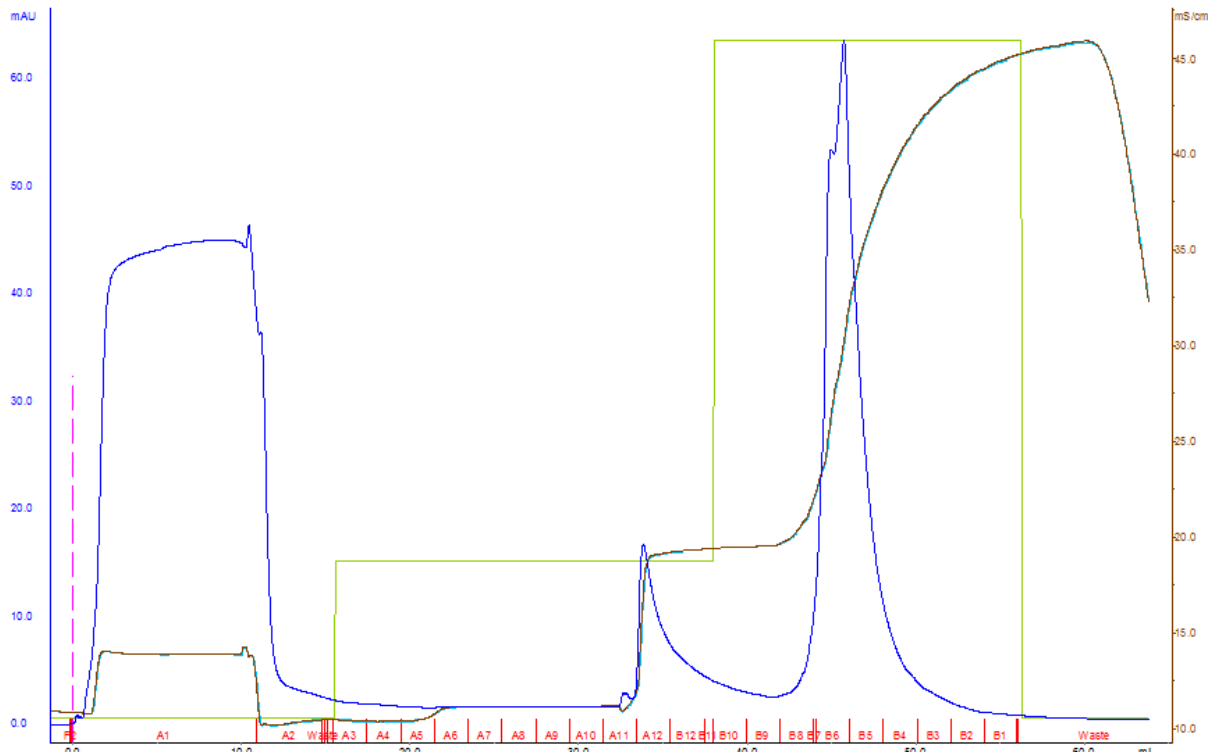
Pode ser observado na curva de absorvância em 280nm da Figura 3 (gráfico A) que parte das proteínas contidas no meio de cultivo condicionado original foram eliminadas durante a cromatografia de troca aniônica nas frações correspondentes a fração não adsorvida ou permeada à coluna (A1-A2), à lavagem (A3-A4) e à eluição com condutividade de até cerca de 30 mS/cm (A5-A7), sendo que, como pode ser observado na figura 3 (gráfico B), não foi detectada atividade de FVIII nestas frações. Chama-se a atenção para o fato das frações não adsorvidas à coluna, representadas no cromatograma da figura 3A como A1 e A2, representarem os últimos 5 ml, de um total de 90ml, do meio condicionado carregado na coluna. Estes dados indicam a adsorção e retenção eficiente do rFVIII-lab à coluna sem a necessidade de diluição do meio de cultivo original. A eluição do rFVIII-lab foi efetuada através do aumento da concentração de NaCl no tampão de eluição, e foi obtida a partir de uma condutividade de cerca de 32 mS/cm (Figura 3A), tendo sido observada atividade de Fator VIII da fração A10 até a fração B7 (Figura 3B), esta última correspondendo a uma condutividade de cerca de 80 mS/cm (Figura 3A). A recuperação de atividade de FVIII foi de cerca de 33% quando comparada à atividade de FVIII quantificada no meio de partida, considerando o conjunto das frações de eluição que apresentaram os maiores valores de atividade de Fator VIII (frações A11, A12 e B12 da figura 3B).. É válido ressaltar que a concentração salina nestas frações de eluição, estimada em aproximadamente 5 mM de CaCl_2 e 892 mM de NaCl, confere estabilidade e manutenção da atividade do FVIII, sendo proposto na literatura o uso de soluções de elevada força iônica, contendo idealmente entre 1M e 1,2M de NaCl, para formulação do FVIII (LEE; HRINDA, 1997).

Em seguida, prosseguiu-se com a padronização da segunda etapa cromatográfica, onde se explorou a afinidade natural do Fator VIII à heparina (SUZUKI; NISHIOKA; HASHIMOTO, 1979) e os resultados positivos descritos na literatura para purificação de fator VIII derivado de plasma (KOSOW; BHATTACHARYA; STERNBURG, 1992). Buscou-se avaliar se esta etapa cromatográfica de afinidade à heparina poderia ser empregada em substituição à etapa de afinidade em geral descrita nos processos de purificação do rFVIII, como as baseadas em imunoafinidade (OH et al., 2002; THIM et al., 2010) ou em ligantes sintéticos (KELLEY; JANKOWSKI; BOOTH, 2010; KNÖR et al., 2008; NORD et al., 2001). Após alguns ensaios de padronização, estabeleceram-se as melhores condições de ligação e eluição do rFVIII-lab e lavagem das impurezas utilizando a coluna *Hitrap Heparin HP* (GE Healthcare). Primeiramente, determinou-se que as frações de eluição A11, A12 e B12, provenientes da cromatografia de troca aniônica, deveriam ser diluídas por um fator de pelo

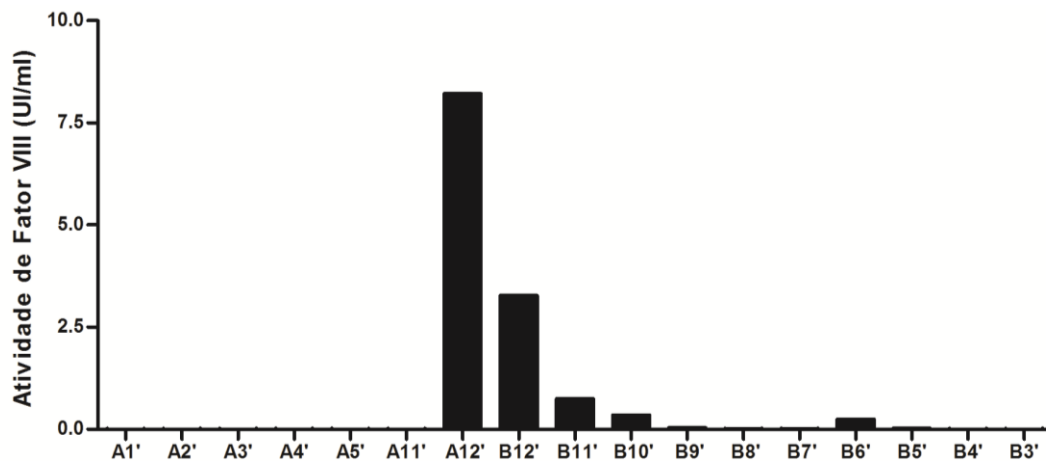
menos três vezes em solução de 5 mM de CaCl_2 de forma que ocorresse a ligação eficiente do rFVIII-lab à coluna, conforme descrito em Métodos. A Figura 4 (gráfico A) representa um cromatograma típico obtido através da utilização do protocolo de cromatografia de afinidade à heparina estabelecido após a padronização, e a Figura 4 (gráfico B) um ensaio de atividade *in vitro* do FVIII típico realizado nas diversas frações obtidas através da cromatografia de afinidade.

Figura 4 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório rFVIII-lab através de cromatografia de afinidade à heparina. (A) Cromatograma típico obtido durante o fracionamento através cromatografia de afinidade à heparina associada a um regime de eluição em degrau das amostras enriquecidas em atividade de FVIII (A11, A12 e B12), obtidas a partir do fracionamento do meio de cultivo condicionado através de cromatografia de troca iônica. Estão representadas no cromatograma as curvas de absorção espectrofotométrica em 280nm (azul), indicando os picos de eluição protéica, e a de condutividade (marrom), indicando os valores de condutividade associados às alterações de concentração salina (verde) durante as etapas de eluição. No eixo das abscissas estão representadas as frações de eluição (A1' a A5' e A11' a B1') correspondentes a um volume de coluna (1 ml) e no eixo das ordenadas estão representadas na esquerda (Y1) a absorbância a 280 nm (mAU) e na direita (Y2) a condutividade (mS/cm). A linha tracejada vertical rosa indica o momento de injeção da amostra, realizada em um “loop” de 10 ml, sendo que o restante da amostra (~35 ml) foi injetado através de bomba peristáltica. O pico protéico eluído na fração A1 representa eluição do último 1 ml de proteínas não ligadas à coluna. (B) Concentração da atividade de FVIII em UI/ml nas amostras de permeado à coluna (A1'), de lavagem (A2'-A5') e de eluição (A11'-B3'), obtidas durante o procedimento. As frações de eluição A12' e B12', enriquecidas em atividade de FVIII, foram eluídas com valores de condutividade real 11,9 e 19,4 mS/cm (curva marrom).

(A)



(B)



Pode se observar na curva de absorvância da figura 4 (gráfico A) que parte das proteínas presentes no meio de partida (frações A11, A12 e B12, obtidas a partir da cromatografia de troca aniônica) foram eliminadas durante a cromatografia de afinidade à heparina nas frações correspondentes ao permeado à coluna (A1'), à lavagem (A2'-A5') e à eluição com condutividade acima de 20 mS/cm (B8'-B1'), sendo que, como pode ser observado na figura 4B, não foi detectada atividade de FVIII nestas frações. Chama-se a atenção para o fato das frações não adsorvidas à coluna, representadas no cromatograma da figura 4A como A1' e A2', representarem os últimos 10 ml, de um total de 45ml, do eluato da troca iônica carregado na coluna. Estes dados indicam a adsorção e retenção eficiente do rFVIII-lab à coluna de heparina na condição de ligação à coluna utilizada. A eluição do rFVIII-lab foi efetuada através do aumento da concentração de CaCl₂ no tampão de eluição, e foi obtida a partir de uma condutividade de cerca de 12 até 20 mS/cm (Figura 4A), tendo sido observada atividade de Fator VIII da fração A12' até a fração B10' (Figura 4B). A recuperação de atividade de FVIII foi cerca de 69% quando comparada à atividade de FVIII quantificada no meio de partida e considerando o conjunto das frações de eluição que apresentaram os maiores valores de atividade de Fator VIII (frações A12' e B12' da figura 4B). É válido ressaltar que a concentração salina nessas frações de eluição, estimada em aproximadamente 150 mM de NaCl e 91 mM de CaCl₂, confere estabilidade e manutenção da atividade de FVIII, sendo descrito na literatura que soluções contendo inclusive concentrações mais elevadas, até 500 mM de CaCl₂, são mais eficientes na recuperação da atividade durante o processo de formulação do FVIII (LEE; HRINDA, 1997).

Por fim, buscando-se a concentração e formulação final do rFVIII-lab obtido após a cromatografia de afinidade à heparina, o conjunto das frações A12' e B12' obtidas durante a segunda etapa cromatográfica foi submetido a terceira etapa do processo de purificação do Fator VIII estabelecido no laboratório, a ultrafiltração. Uma vez que o peso molecular do dímero que compõe o rFVIII-lab estabilizado apresenta pelo menos 170 kDa (FAY, 1988), optou-se pela utilização de membranas de celulose com corte nominal de 100 kDa, e, desta forma, buscou-se eliminar impurezas de peso molecular inferior a esse corte e ao mesmo tempo formular e concentrar o rFVIII-lab purificado. Para formulação do rFVIII-lab foram realizados dois ciclos de ultrafiltração e diluição do produto concentrado em solução de formulação, seguidos de uma etapa final de ultrafiltração para a concentração final do rFVIII-lab. A solução de formulação utilizada é similar àquela descrita pelo fabricante do produto de referência Kogenate FS[®] (BAYER HEALTHCARE LLC, 2009).

Para obtenção do rFVIII-lab destinado aos ensaios funcionais *in vivo* e de imunização, descritos mais adiante, cinco ciclos de purificação independentes foram realizados, cada um composto das três etapas acima descritas. Os cinco rFVIII-lab purificados independentemente foram descongelados, homogeneizados, esterilizados utilizando filtros contendo membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm e concentrados, por um fator de seis vezes, através de ultrafiltração em membranas com corte nominal de 100 kDa. A atividade de Fator VIII obtida nesse produto final formulado e concentrado foi de 100 UI/ml, que é a mesma descrita pelo fabricante após a reconstituição dos produtos de referência Kogenate® (BAYER HEALTHCARE LLC, 2009) e Fanhdi® (INSTITUTO GRIFOLS, 2008). Para avaliação de parâmetros indicativos da eficiência do protocolo de purificação utilizado, como recuperação, enriquecimento e pureza do rFVIII-lab ao longo e ao final do processo de purificação, amostras representativas do meio de partida condicionado pelas células CHO-DG44 H6A, dos eluatos das etapas cromatográficas de troca iônica e afinidade heparina, e dos concentrados parciais e final obtidos após ultrafiltração foram utilizados para a obtenção do balanços de atividade total do Fator VIII e de proteínas totais, estimados a partir da quantificação da atividade de FVIII e de proteínas totais durante o procedimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Purificação do fator VIII recombinante produzido no laboratório.

	Atividade (UI)	Proteína (mg)	Ativ. Específica ^c (UI/mg)	Rendimento ^d (%)	Fator de Purificação ^e
Meio condicionado	111,85	753,06	0,15	100	1
Troca Aniônica ^a	37,00	10,10	3,66	33	25
Afinidade à heparina ^a	25,64	0,17	150,86	23	1.016
Ultrafiltração 100 kDa ^a	8,61	*	*	8	*
rFVIII-lab ^b	54,96	0,42	131,71	-	-

^a Amostras obtidas após as referidas etapas do processo de purificação do rFVIII-lab.

^b rFVIII-lab obtido através da concentração (6X) de cinco processos independentes de purificação do fator VIII

^c Atividade específica calculada em razão da atividade de FVIII por proteína total (UI/mg).

^d Razão da atividade de FVIII após a referida etapa pela atividade de FVIII no meio de partida, multiplicada por 100.

^e Razão da atividade específica na referida etapa pela atividade específica estimada no meio de partida.

* Não realizada

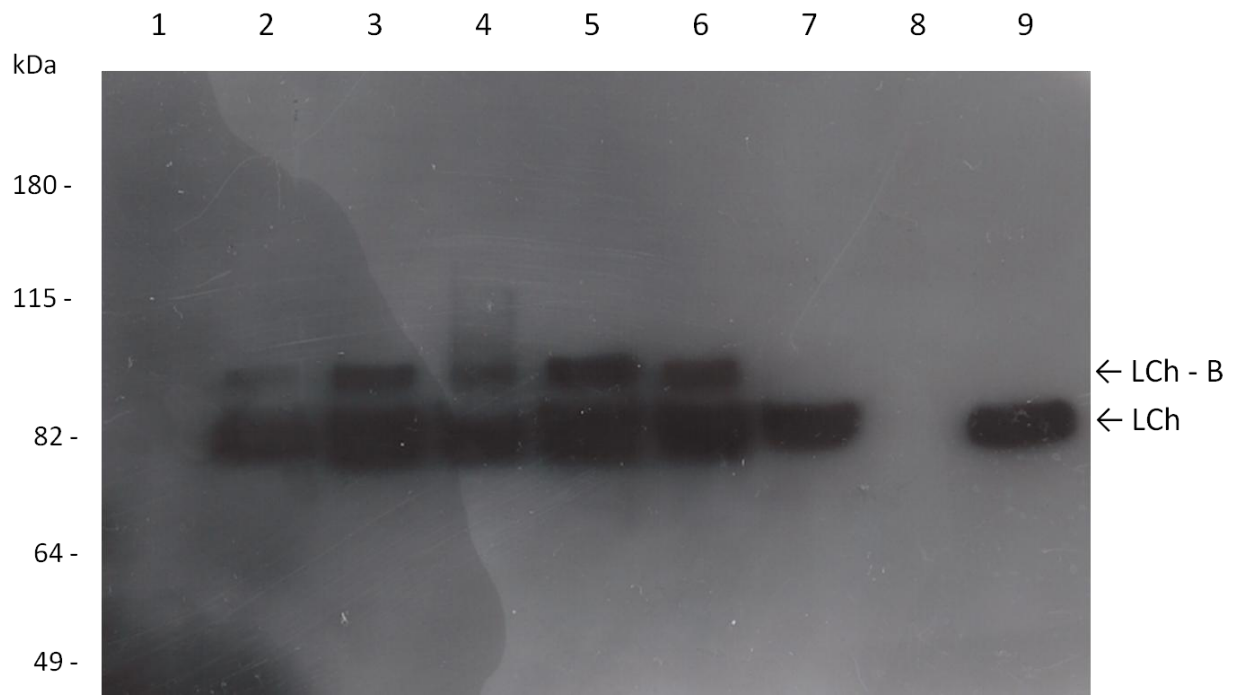
A atividade total de FVIII (UI) quantificada no meio de partida inicial e após cada uma das três etapas de purificação do rFVIII-lab revelou que a etapa de cromatografia de troca aniônica recuperou cerca de 33% da atividade de FVIII quantificada no meio de cultivo condicionado, a etapa de cromatografia de afinidade à heparina recuperou 69% da atividade de FVIII quantificada ao final da etapa anterior, o que corresponde a 23% da atividade de FVIII quantificada no meio de partida inicial, e a etapa de ultrafiltração recuperou 33% da

atividade de FVIII quantificada ao final da etapa anterior, o que corresponde 8% da atividade de FVIII quantificada no meio de partida inicial. A atividade específica de FVIII (UI/mg) estimada durante as etapas do processo de purificação do rFVIII-lab, quando comparada a estimada no meio de partida inicial, revelou que o fator de purificação do rFVIII-lab foi cerca de 25 vezes após a etapa de cromatografia de troca aniônica e cerca de 1.026 vezes após a etapa de cromatografia de afinidade à heparina. Não houve enriquecimento da atividade específica de FVIII após a etapa de ultrafiltração. Ao final do processo de purificação do rFVIII-lab a partir do meio de cultivo condicionado pelas células H6A, cujo fator de purificação foi cerca de 74 vezes, cerca de 8% do rFVIII-lab contido no meio de partida original foi recuperado. Após a concentração por um fator de seis vezes através de ultrafiltração, e formulação de uma mistura do rFVIII-lab purificado a partir de cinco ciclos de purificação realizados independentemente, a atividade específica do rFVIII-lab final obtido foi estimada em cerca de 130 UI/mg, valor este abaixo do mínimo de 2.000 UI/mg de rFVIII recomendado pelas farmacopeias europeia e estadunidense (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005). Em comparação aos produtos de referência, a atividade específica de FVIII foi estimada em 3.333,33 UI/mg na amostra de Kogenate FS[®] e em 10,24 UI/mg na amostra de Fanhdi[®], valores que se aproximaram dos descritos pelos respectivos fabricantes, de 4.000 UI/mg e 10 UI/mg (BAYER HEALTHCARE LLC, 2009; INSTITUTO GRIFOLS, 2008).

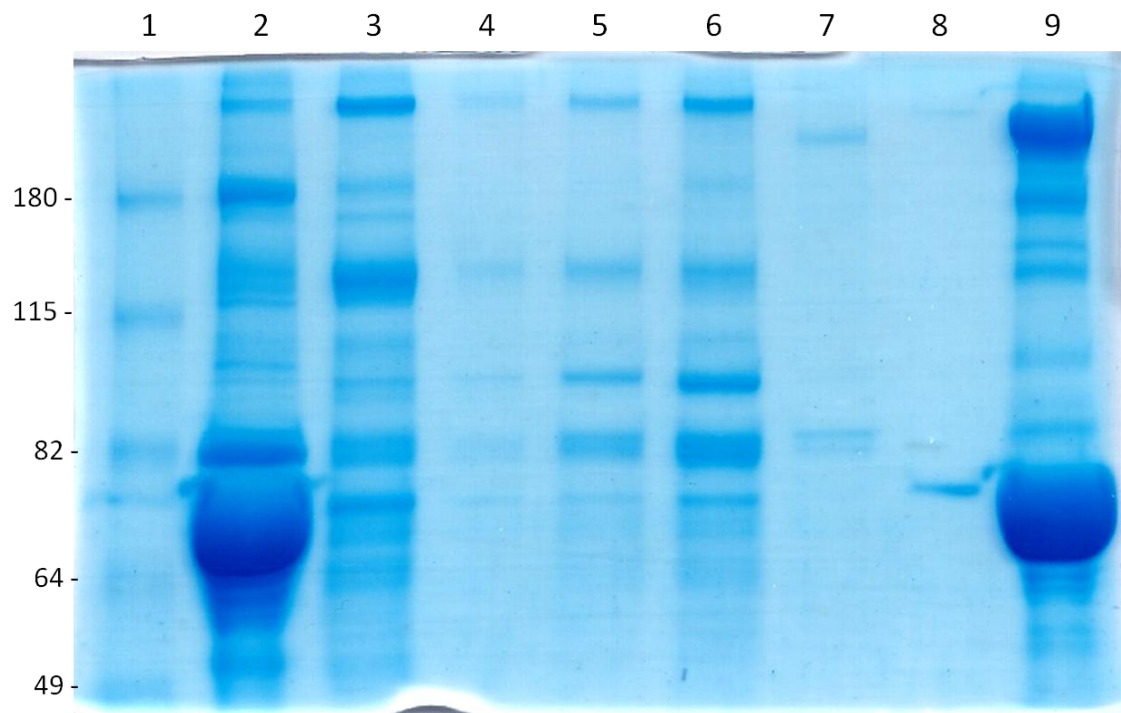
Com os objetivos de: a) avaliar a complexidade da mistura de proteínas ao longo do processo de purificação e, desta forma, determinar, de forma preliminar, os principais contaminantes protéicos presentes na preparação do rFVIII-lab purificado e formulado conforme descrito acima; e b) avaliar a integridade estrutural das cadeias pesada e leve do rFVIII-lab ao longo do processo de purificação, amostras obtidas durante o procedimento foram analisadas através do fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em condições desnaturantes, na presença do detergente SDS (SDS-PAGE). A avaliação da complexidade da mistura de proteínas foi realizada através de uma SDS-PAGE seguida da visualização das proteínas após coloração com *Coomassie Blue* coloidal (Figura 5B). A integridade estrutural das cadeias leve (LCh) e pesada do (HCh) do rFVIII-lab foram avaliadas através de ensaio de *Western blotting* específico para a cadeia leve e SDS-PAGE seguida de coloração com *Coomassie Blue* coloidal, utilizando-se como referência do perfil de migração das cadeias leve e pesada do Fator VIII selvagem recombinante (Kogenate FS[®] - Bayer) e concentrado a partir de plasma de doadores humanos (Fanhdi[®] - Grifols) (Figuras 5A e 5B).

Figura 5 - Avaliação da complexidade da mistura de proteínas e integridade estrutural do rFVIII-lab ao longo do protocolo de purificação. (A) Ensaio de *Western blotting* para avaliação da integridade estrutural da cadeia leve do Fator VIII. Foram avaliadas as seguintes frações obtidas durante o processo de purificação: meio condicionado pelas células CHO-DG44 H6A (canaleta 2) (0,04 UI); eluição referente à cromatografia de troca iônica (frações A11, A12 e B12) (canaleta 3) (0,07 UI); eluição referente à cromatografia de afinidade à heparina (frações A12' e B12') (canaleta 4) (0,13 UI); fração retentada após ultrafiltração com corte 100 kDa (canaleta 5) (0,49 UI); rFVIII-lab purificado e formulado (canaleta 6) (0,5 UI). Como referência estrutural da cadeia leve foi utilizado o rFVIII Kogenate FS[®] (canaleta 7) (0,5 UI) e o pFVIII Fanhdi[®] (canaleta 9) (0,5 UI). Uma amostra de água foi aplicada na canaleta 8. Na canaleta 1 foi aplicado o marcador de peso molecular. (B) Avaliação da complexidade da mistura de proteínas ao longo do protocolo de purificação do rFVIII-lab através do fracionamento das mesmas amostras descritas em (A) através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% desnaturante, seguido de coloração com *coomassie blue* G-250 coloidal, no entanto utilizando-se 2 UI do rFVIII-lab purificado e formulado (canaleta 6); 2 UI de rFVIII Kogenate FS[®] (canaleta 7) e 1 UI pFVIII Fanhdi[®] (canaleta 9).

(A)



(B)



Como pode ser observado no ensaio de *Western blotting* específico para a cadeia leve do Fator VIII (figura 5A), nas amostras referentes ao Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] foi detectada uma banda protéica com massa molecular estimada em aproximadamente 80 kDa, similar à massa molecular predita da LCh (canaletas 7 e 9 da figura 5A, indicada como Lch). Essa banda protéica de massa molecular aproximada de 80 kDa é na verdade uma mistura de quatro bandas protéicas de massas moleculares muito próximas, as quais derivam de diferenças na sequência N-terminal e na composição de carboidratos da cadeia leve (Sandberg et al., 2001). Essa mesma banda protéica foi observada nas amostras referentes ao processo de purificação do rFVIII-lab, incluindo o meio de partida condicionado original (canaleta 2), a mistura dos eluatos provenientes das etapas de cromatografia de troca aniônica (canaleta 3) e de afinidade (canaleta 4), a fração retida após a ultrafiltração (canaleta 5), e o rFVIII-lab produzido a partir da concentração por um fator de seis vezes através de ultrafiltração e obtido ao final de cinco ciclos de purificação independentes (canaleta 6). Nestas mesmas amostras referentes ao processo de purificação do rFVIII-lab (canaletas 2 a 6 da Figura 5A) foi observada uma banda protéica adicional de massa molecular aproximada de 90 kDa, compatível com o perfil eletroforético esperado para o polipeptídeo precursor variante da LCh processado proteoliticamente de forma incompleta.

Com relação ao perfil eletroforético de proteínas totais observado na figura 5 (gráfico B), foram observadas diversas bandas protéicas correspondentes às impurezas a serem removidas do meio de cultivo suplementado com 7% de SFB e condicionado pelo clone H6A (canaleta 2). A proteína mais abundante contida no meio de partida, de peso molecular compatível com o da albumina (66 kDa), foi eliminada após a etapa inicial de cromatografia de troca iônica (canaleta 3), sendo as demais impurezas parcialmente eliminadas durante a etapa seguinte de cromatografia de afinidade à heparina (canaleta 4). A etapa de ultrafiltração utilizada, em membranas com corte molecular nominal de 100 kDa (canaleta 5), concentrou a maior parte das proteínas totais presentes, o que foi verificado no rFVIII-lab final (canaleta 6). Ao final do processo de purificação, o perfil eletroforético referente à amostra do rFVIII-lab apresentou-se diferenciado do observado para os produtos de referência, cuja complexidade pode ser classificada em um estado intermediário entre o perfil protéico observado na amostra de Kogenate[®] e o perfil protéico relativamente mais complexo observado na amostra de Fanhdi[®]. Esse perfil eletroforético protéico comparativo entre o rFVIII-lab parcialmente purificado e os produtos de referência refletiu suas respectivas atividades específicas do FVIII anteriormente estimadas.

4.2 *Caracterização da atividade funcional do Fator VIII in vivo*

Alguns trabalhos sugerem que a resposta imunológica frente ao Fator VIII administrado aos portadores de hemofilia A severa está relacionada à própria atividade ou função do Fator VIII na propagação da cascata da coagulação (SKUPSKY et al., 2009). Desta forma, como primeiro passo para se determinar o perfil de indução da resposta imune frente ao variante do FVIII produzido no laboratório, o rFVIII-lab, buscou-se comparar a atividade funcional *in vivo* do rFVIII-lab parcialmente purificado frente aos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®]. Foi escolhido um ensaio clássico para avaliação da eficácia de terapias anti-hemofílicas em estudos pré-clínicos, baseado na correção de um evento hemorrágico induzido através da transecção da extremidade da cauda de camundongos nocaute para o FVIII, utilizados como modelo animal da hemofilia A (SAINT-REMY; REIPERT; MONROE, 2012).

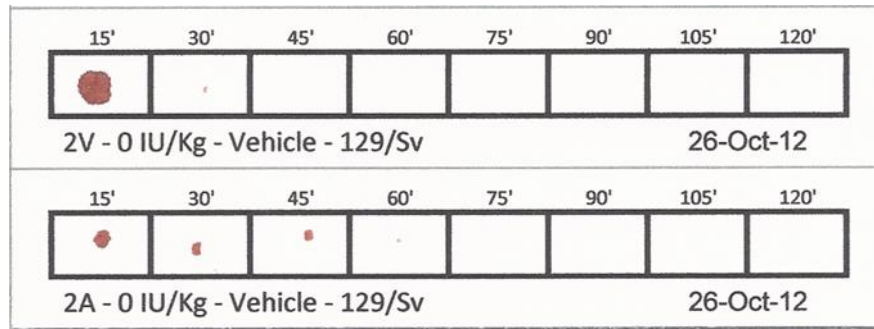
Ao consultarmos a literatura, constatamos que existiam algumas alternativas para o desfecho ou “*endpoint*” deste ensaio de interrupção de evento hemorrágico. Numa configuração do ensaio, conhecido como ensaio de sobrevivência, o desfecho utilizado consiste na capacidade dos animais hemofílicos submetidos à terapia anti-hemofílica apresentarem uma resposta hemostática completa, associado à formação de um coágulo estável e permanente, e, desta forma, evitar que os animais entrem em um estado de choque hemorrágico e morram por exsanguinação (KUMARAN et al., 2005; PAN et al., 2009; PARKER; LOLLAR, 2003; SHI et al., 2006). Entretanto, a adoção de um desfecho experimental envolvendo a possibilidade dos animais hemofílicos atingirem um estado moribundo, associado a um quadro de hemorragia descontrolada, é eticamente questionável (Wallace, 2000), e, desta forma, desfechos experimentais alternativos, envolvendo a adoção de limites experimentais humanamente aceitáveis (*humane endpoints*), foram propostos na literatura. Os mais comuns envolvem estimativas indiretas da perda sanguínea por um período de tempo determinado, geralmente entre 10 e 30 minutos, através, por exemplo, da medida de perda de massa corpórea ou imersão da cauda seccionada em solução salina e medida espectrofotométrica da quantidade de hemoglobina (LIU et al., 2012; MILANOV et al., 2012). Embora exista uma correlação entre essas duas classes de desfechos, a perda de sangue por um período determinado e a sobrevivência ao evento hemorrágico, o primeiro está mais sujeito a ser influenciado por eventos relacionados às fases iniciais da resposta hemostática, como a formação do tampão plaquetário primário, de natureza instável, e a vasoconstrição, o que pode limitar a capacidade do ensaio de avaliar propriedades funcionais importantes de

determinada terapia anti-hemofílica. O ensaio de sobrevivência, por outro lado, está mais relacionado a uma resposta hemostática persistente, a qual é dependente da formação de malha de fibrina e estabilização de um coágulo, processos estes dependentes da atividade dos fatores da coagulação (MONROE; HOFFMAN, 2006). Neste sentido, o ensaio de sobrevivência é mais rigoroso para se avaliar se uma determinada terapia anti-hemofílica é capaz de promover uma resposta hemostática permanente, prevenindo a perda de sangue contínua e eventos de sangramento tardios, os quais são traços característicos da hemofilia severa (SAHU et al., 2011).

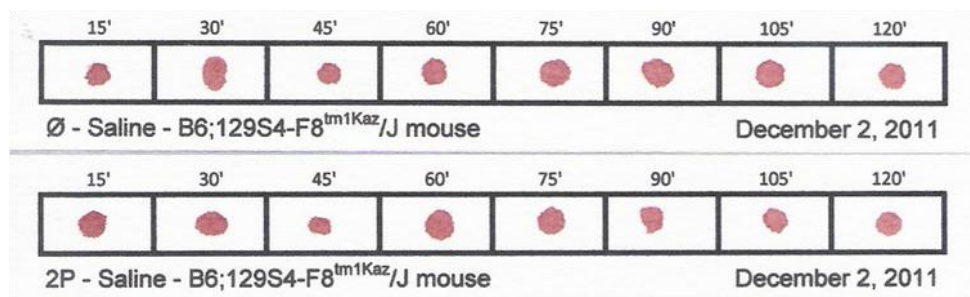
O protocolo do ensaio de sobrevivência descrito por Parker e Lollar propõe a utilização de algumas medidas tendo como objetivo intensificar o desafio ao sistema hemostático dos animais de tal forma que o ensaio se torne mais letal aos animais hemofílicos não tratados, destacando-se: a) a utilização de cetamina e droperidol como agentes anestésicos, os quais estão relacionados com aumento da perda sanguínea (SOUCY et al., 1995); b) imersão da cauda seccionada em solução salina a 37 °C; e c) transecção de 1cm da porção distal da cauda (PARKER; LOLLAR, 2003). Com o intuito de incorporar um desfecho mais humano ao ensaio de sobrevivência, introduzimos as seguintes modificações ao protocolo originalmente proposto por Parker e Lollar: a) o uso do anestésico isoflurano, como originalmente proposto por Dejana e colaboradores (DEJANA; VILLA; DE GAETANO, 1982); b) fixação do diâmetro da secção transversal da cauda em 1mm, o que é equivalente a transecção de 4 mm da porção distal da cauda; c) manutenção da cauda seccionada a temperatura ambiente; d) registro de sangramento em intervalos de 15 minutos de modo a não perturbar a formação do coágulo; e e) fixação do limite de observação experimental em 120 min, sendo que após este período, caso ainda fosse observado sangramento, a cauda do animal era cauterizada.

Inicialmente, foi averiguado se o ensaio alternativo proposto discriminaria o fenótipo selvagem (linhagem 129/Sv) do fenótipo hemofílico (linhagem B6;129S4-F8^{tm1Kaz}/J). Para isso, um evento hemorrágico foi induzido através da transecção da extremidade da cauda de animais selvagens (n = 9) e hemofílicos (n = 9), momento em que foram iniciados a contagem do tempo e o registro do sangramento, realizados por até 120 min (Figura 6).

(A)



(B)



(C)

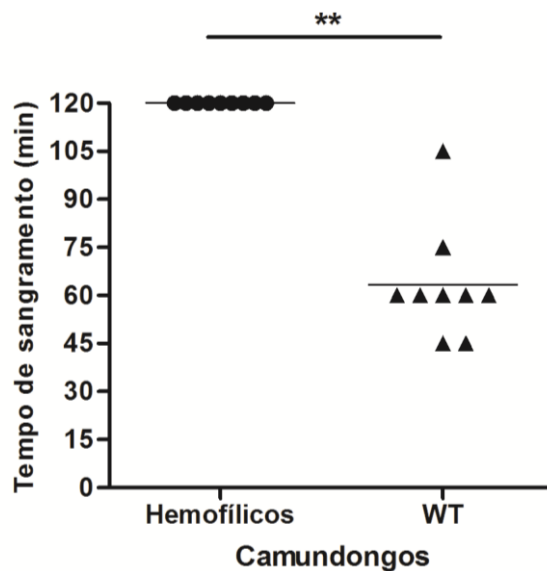


Figura 6 - Avaliação do protocolo alternativo de interrupção de um evento hemorrágico realizado em animais normais e hemofílicos. Registros de sangramento representativos por até 120 min após transecção da extremidade da cauda nos animais (A) selvagens - linhagem 129/Sv e (B) modelo da hemofilia A - linhagem B6;129S4-F8^{tm1Kaz}/J. (C) Gráfico de dispersão com variável categórica (camundongos selvagens ou hemofílicos) do tempo de sangramento (min) observado nos animais hemofílicos e selvagens. A análise de significância estatística foi realizada através de teste estatístico *t*, ** 0.001 < *P* < 0.01.

Pode-se observar na figura 6 que foi possível diferenciar o fenótipo normal do hemofílico utilizando o protocolo alternativo de interrupção de um evento hemorrágico proposto por nosso grupo. Enquanto os animais selvagens (9/9) apresentaram fenótipo esperado de resposta hemostática, com interrupção do sangramento após um intervalo médio de 63 ± 18 min (Figura 6A e 6C), os animais modelo da hemofilia A (9/9) apresentaram sangramento ininterrupto até o final do tempo de observação de 120 min (Figura 6B e 6C), sendo o ferimento desses animais cauterizado ao final do ensaio.

Constatada a capacidade do ensaio proposto para avaliação da atividade funcional *in vivo* do FVIII de diferenciar o fenótipo hemofílico do selvagem, foi averiguado se o mesmo permitiria uma análise quantitativa da eficácia de uma determinada terapia anti-hemofílica. Para avaliar esta possibilidade, nós testamos o efeito de dois produtos de referência para o tratamento de hemofilia A, um recombinante (rFVIII – Kogenate FS[®] - Bayer) e o outro um concentrado comercial de FVIII obtido a partir de plasma de doadores (pFVIII - Fanhdi[®] - Grifols). Inicialmente, buscou-se estimar os seguintes parâmetros quantitativos associados ao tratamento dos animais hemofílicos: a) número de animais tratados que apresentaram interrupção do fenótipo hemofílico; b) dose mínima necessária para observação do evento de interrupção do fenótipo hemorrágico; c) dose necessária para normalização do fenótipo hemofílico (100% de resposta); e d) dose de FVIII (rFVIII ou pFVIII) necessária para que se observe uma resposta de interrupção de sangramento em 50% dos animais (ED₅₀). No caso do último parâmetro quantitativo, como a variável resposta associada ao ensaio de interrupção de um evento hemorrágico é do tipo categórica binária (interrupção ou não do sangramento), optou-se pela análise dos dados e determinação da ED₅₀ através da técnica de regressão logística (FINNEY, 1978). Desta forma, para determinação da ED₅₀ correspondente ao tratamento com rFVIII e pFVIII, animais modelo da hemofilia A foram divididos em grupos experimentais, cada grupo com número de cinco (n=5) e correspondendo a uma dosagem diferente dos produtos de referência Kogenate FS[®] (1,25; 2,5; 5; 10; 25, 50; 75 ou 100 UI/kg) e Fanhdi[®] (5; 10; 25, 50; 75 ou 100 UI/kg), administrados nos animais previamente à indução do evento hemorrágico, conforme descrito em Métodos (Figura 7).

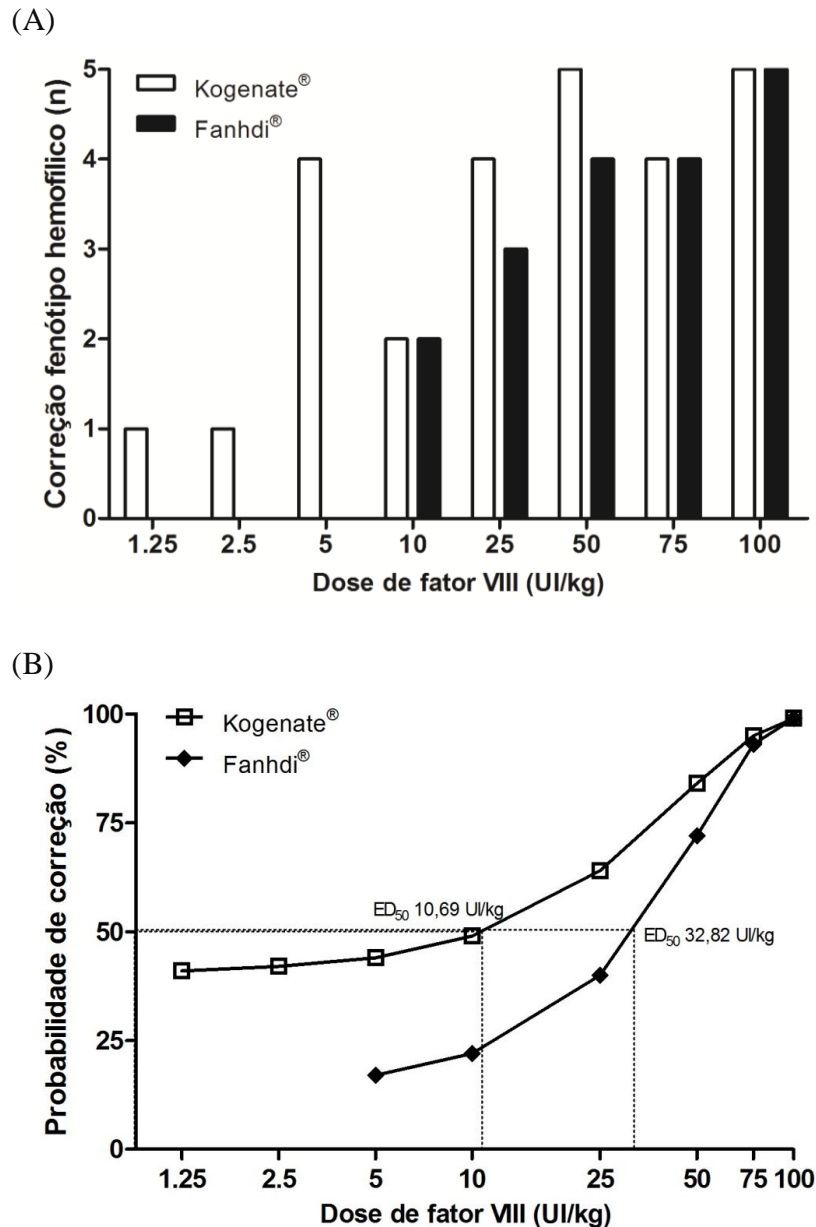


Figura 7 - Análise quantitativa da eficácia do tratamento de animais modelo da hemofilia A com os produtos de referência Kogenate FS® e Fanhdi® através de regressão logística. (A) Gráfico de barras indicando o número de animais que corrigiram o fenótipo hemofílico quando tratados com diferentes doses de Kogenate FS® e Fanhdi®. Os animais modelo da hemofilia A foram tratados com as doses 5, 10, 25, 50, 75 ou 100 UI/kg de Fanhdi® e Kogenate FS®, sendo que para este último foram incluídas as doses de 1,25 e 2,5 UI/kg, e avaliados quanto à interrupção do sangramento em até 120 min após a indução de um evento hemorrágico realizado através da transecção da extremidade da cauda. N=5 para cada dose de fator VIII avaliada. (B) Representação gráfica da regressão logística obtida a partir do percentual de animais que apresentaram interrupção de sangramento em cada dose de FVIII avaliada. A probabilidade de correção do fenótipo hemofílico foi avaliada através de regressão logística das relações obtidas entre o número de animais modelo da hemofilia A que apresentaram interrupção do sangramento em relação ao número total de animais avaliados quando previamente tratados com doses (5, 10, 25, 50, 75 e 100 UI/kg) de Fanhdi® ou Kogenate FS® (este incluindo as doses de 1,25 e 2,5 UI/kg). N=5 para cada dose de fator VIII avaliada. As doses estão representadas em escala logarítmica. As doses ED₅₀ obtidas para o Fanhdi e Kogenate estão indicadas no gráfico.

O número de animais que apresentaram correção do fenótipo hemofílico, observada através da interrupção do sangramento em até 120 min após a transecção da extremidade da cauda, em cada dosagem de Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] avaliada, está representado na Figura 7A. Pode-se observar na figura 7A que foi obtida a correção do fenótipo hemofílico em parte dos animais hemofílicos tratados com FVIII e que a proporção de animais que responderam ao tratamento está positivamente correlacionada com as doses (UI/kg) utilizadas de Kogenate FS[®] e Fanhdi[®], sendo que foi observada a correção do fenótipo hemofílico em 17 dos 40 animais avaliados utilizando doses entre 1,25 e 25 UI/kg de FVIII, e em 27 dos 30 animais avaliados entre as doses de 50 e 100 UI/kg de FVIII. Parte dos animais submetidos ao ensaio de interrupção do fenótipo hemofílico foram monitorados por até 24 horas após o término do ensaio, e não foi observado sangramentos durante este período em nenhum animal avaliado. Foi observado também que o tratamento com Kogenate FS[®] corrigiu o fenótipo hemofílico de um maior número de animais (24 animais) quando comparado às mesmas doses utilizadas para o tratamento com Fanhdi[®] (18 animais). Foi possível observar formação de um coágulo estável e interrupção permanente de sangramento com doses a partir de 1,25 UI/kg no caso do Kogenate FS[®] e 10UI/kg no caso do Fanhdi[®]. A dose necessária para se observar resposta de interrupção de sangramento em 100% dos animais avaliados foi de 100 UI/kg no caso do Fanhdi[®] e entre 50 e 100 UI/kg no caso do Kogenate FS[®].

As probabilidades de correção do fenótipo hemofílico foram estimadas através da regressão logística para determinação das respectivas doses efetivas da resposta (correção do fenótipo hemofílico) em 50% dos animais avaliados (DE₅₀ ou ED₅₀) (Figura 7B). A ED₅₀ referente ao tratamento com Kogenate FS[®] foi estimada em 10,7 UI/Kg (95% intervalo de confiança: -26,4 a 29,6), enquanto a ED₅₀ referente ao tratamento com Fanhdi[®] foi estimada em 32,8 UI/Kg (95% intervalo de confiança: 16,1 a 52,9). O ED₅₀ obtido com o Kogenate FS[®] foi significativamente menor daquele obtido com o Fanhdi[®] (teste de Wald, P<0.001).

Outro parâmetro quantitativo que foi avaliado foi o tempo médio para observação da interrupção de sangramento (tempo de sangramento) associado às diversas doses avaliadas (Figura 8).

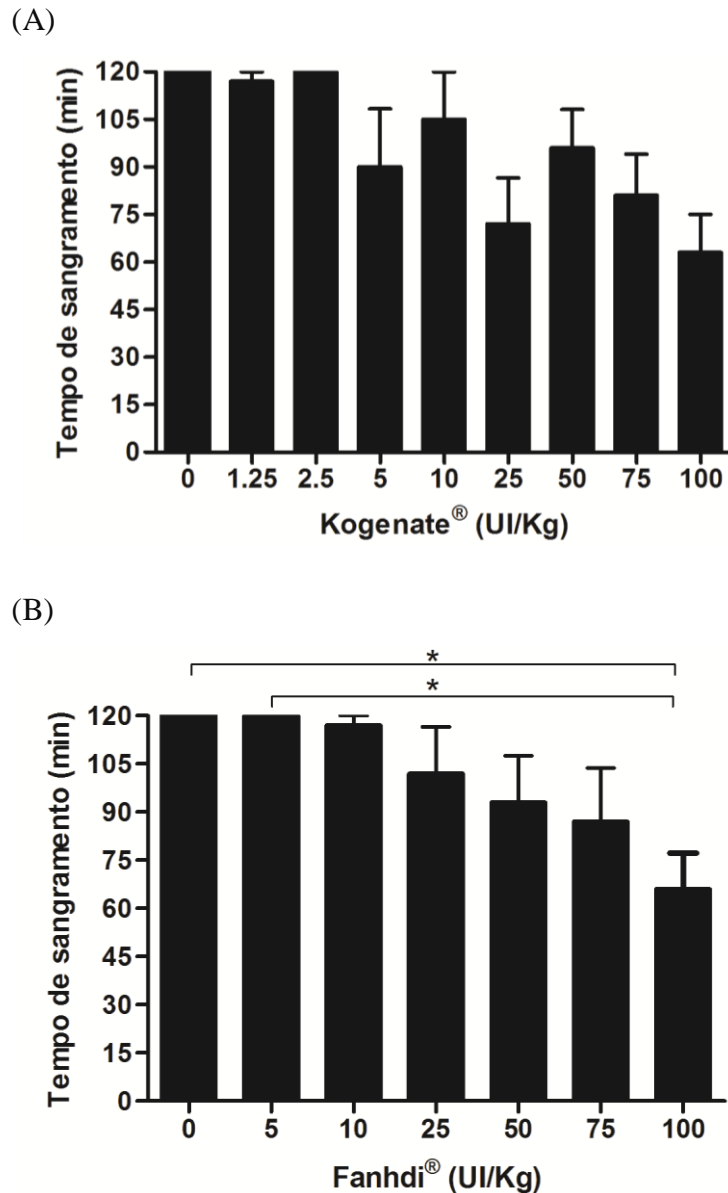


Figura 8 - Tempo de sangramento observado em relação às doses de fator VIII administradas.

Os animais modelo da hemofilia A foram tratados com doses (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 UI/kg) de Fanhdi® e Kogenate FS® (este incluindo as doses de 1,25 e 2,5 UI/kg) e avaliados quanto ao tempo requerido (por no máximo 120 min) para interrupção do sangramento após a indução de um evento hemorrágico realizado através da transecção da extremidade da cauda. N=5 para cada dose de fator VIII avaliada. A interrupção de sangramento foi avaliada em intervalos de 15 min. Estão representados nos gráficos de barra os tempos de sangramento médios +/- o desvio padrão para cada dose avaliada. A análise de significância estatística foi realizada através de teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de teste *post hoc* de múltipla comparação Dunn's, * 0.01 < P < 0.05.

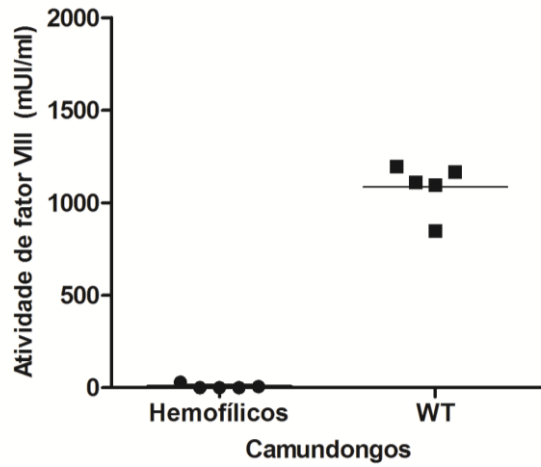
O tempo médio de sangramento global observado nos animais que apresentaram correção do fenótipo hemofílico quando tratados com Kogenate FS® ou Fanhdi® foi de cerca de 96 min. Além disso, foi possível observar uma diminuição do tempo médio de

sangramento conforme se aumenta as dosagens de Kogenate[®] ou Fanhdi[®], sendo detectada correlação estatisticamente significativa entre as doses de FVIII administradas e o tempo para a interrupção do sangramento quando os dados foram avaliados pelo teste estatístico de correlação Spearman (Figura 8). Entretanto, apenas a dose de 100 UI/kg de Fanhdi[®] apresentou um tempo de coagulação significativamente menor quando comparado àquele apresentado pelos animais hemofílicos tratados com veículo e com à dose de 5 UI/kg de Fanhdi[®]. Os tempos médios de sangramento observado tanto com a dose de 100 UI/kg de Kogenate FS[®] (66±25 min) ou Fanhdi (63±27 min) se aproxima muito daquele observado com os animais selvagens (63±18min), indicando que, aparentemente, ocorre a normalização do tempo de coagulação nessa dosagem com ambos os produtos.

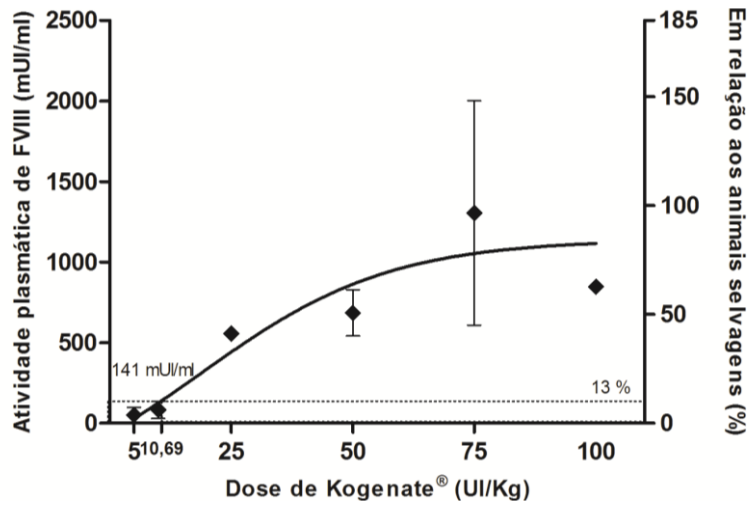
O último parâmetro quantitativo avaliado foi a concentração plasmática de atividade de FVIII nos animais hemofílicos após 10 min da administração de diferentes doses do FVIII. Os animais modelo da hemofilia A foram tratados com as diferentes dosagens dos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] de forma a se determinar: a) a correlação entre a atividade plasmática de FVIII e as diferentes doses avaliadas; b) a relação entre a atividade plasmática de FVIII e a resposta de interrupção de sangramento em 50% dos animais avaliados (EC₅₀). Foi utilizado um novo conjunto de animais que foi dividido em diferentes grupos experimentais, cada grupo com número de cinco (n=5) e correspondendo a dosagem de interesse (0, 5, 10, 25, 50, 75 ou 100 UI/kg) de Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®]. De forma a se determinar atividade plasmática normal de FVIII em murinos, um grupo de animais selvagens (129/Sv) (n=5) foi tratado com veículo (solução salina Ringer-lactato). Após 10 min da administração pela via do plexo venoso retro-orbital da dose de FVIII de interesse (ou veículo) nos animais, amostras de plasma foram coletadas por punção da veia submandibular, e depois quantificadas através do ensaio cromogênico de atividade *in vitro* do FVIII (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da atividade plasmática de fator VIII. A concentração plasmática da atividade de fator VIII (mUI/ml) no plasma dos animais avaliados foi estimada através de ensaio cromogênico *in vitro* de atividade do FVIII. (A) Gráfico de dispersão com variável categórica (camundongos selvagens, indicados como WT, ou hemofílicos) da concentração plasmática de atividade do FVIII (mUI/ml) observado nos animais hemofílicos (n=5) e selvagens (n=5) tratados com veículo. Barra horizontal indica valor médio da concentração plasmática de atividade de FVIII encontrado nos animais selvagens 129/Sv. (B) Relação dose-resposta entre diferentes doses de Kogenate FS[®] e a concentração plasmática de atividade de FVIII. Estão representados os valores médios (símbolos fechados) e de desvio padrão (barras verticais). A curva dose-resposta foi obtida através de regressão sigmoideal a partir dos valores médios de concentração plasmática de atividade do FVIII, representada no eixo esquerdo das ordenadas, para cada dose de Kogenate FS[®] avaliada (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 UI/kg) (n=2 para cada dosagem), representada no eixo das abscissas, e em relação à concentração da atividade média de fator VIII detectada no plasma de animais selvagens, representada no eixo direito das ordenadas. A atividade plasmática de fator VIII associada à respectiva ED50, previamente estimada, foi relacionada à atividade plasmática de fator VIII detectada no plasma de animais selvagens. (C) Relação dose-resposta obtida de maneira idêntica à descrita no item B com diferentes doses de Fanhdi[®] (n=5).

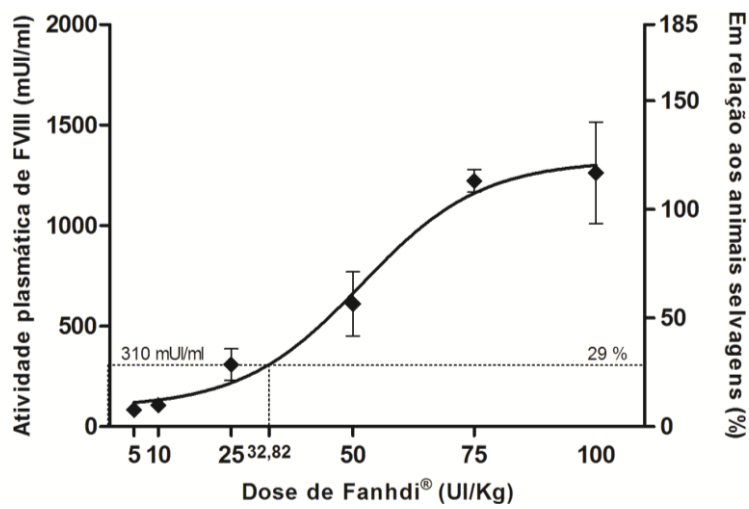
(A)



(B)



(C)



Primeiramente, a concentração da atividade plasmática de FVIII (mUI/ml) foi inferida nos animais hemofílicos e selvagens tratados com veículo (Fig. 9 - gráfico A). Como pode ser observado na Fig. 9 (gráfico A), não foi observada atividade de FVIII nas amostras de plasma dos animais hemofílicos, enquanto que a concentração plasmática média da atividade de FVIII no plasma dos animais selvagens foi quantificada em 1084 ± 138 mUI/ml. Em humanos, o nível de FVIII encontrado no plasma de indivíduos saudáveis pode variar entre 50 e 150% do nível encontrado considerando um conjunto de plasmas de indivíduos saudáveis, o que corresponderia a um valor de 1000 ± 500 mUI/ml (BARROWCLIFFE et al., 2004; MONROE; HOFFMAN, 2006).

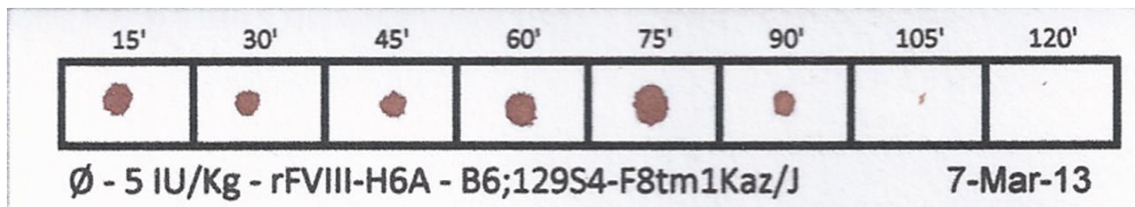
A atividade plasmática de FVIII, quantificada nos animais hemofílicos tratados, foi correlacionada através de curvas dose-resposta sigmoide de inclinação variável ($p < 0.05$) com as diferentes doses (5, 10, 25, 50, 75, 100 UI/kg) avaliadas de Kogenate FS[®] (Fig. 9 – gráfico B) e Fanhdi[®] (Fig. 9 – gráfico C). Pode-se observar nos gráficos B e C da Figura 9 que a relação dose-resposta entre as diferentes doses de Kogenate[®] ou e a concentração plasmática da atividade de FVIII é do tipo graduada, e, apesar do reduzido número amostral avaliado para cada dose de Kogenate FS[®] ($n=2$) quando comparado ao Fanhdi[®] ($n=5$), de forma geral as relações dose-resposta para estes dois produtos anti-hemofílicos são similares.

Por fim, relacionaram-se as respostas do ensaio de interrupção do evento hemorrágico com as concentrações plasmáticas de atividade de FVIII para cada dose avaliada de Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®]. Considerando a relação das atividades plasmáticas obtidas de Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] com suas respectivas probabilidades logit de correção do fenótipo hemofílico, estimou-se que a concentração plasmática de atividade de FVIII após 10 min da administração do produto anti-hemofílico relacionada com a resposta de interrupção de sangramento em 50% dos animais avaliados (EC_{50}) é cerca de 141 mUI/ml para o Kogenate FS[®] e cerca de 310 mUI/ml para o Fanhdi[®]. No entanto, considerando o reduzido número amostral avaliado para cada dose de Kogenate FS[®] ($n=2$) quando comparado ao Fanhdi[®] ($n=5$), a significância estatística entre os respectivos valores de EC_{50} não foi avaliada. Os valores estimados da EC_{50} avaliados para o Kogenate FS[®] e o Fanhdi[®] corresponderam respectivamente à 13% e 29% da atividade de FVIII encontrada no plasma de animais selvagens. Para comparação, tais valores correspondem à atividade de FVIII encontrada no plasma de pacientes portadores da hemofilia A classificada como leve, cuja disponibilidade de FVIII é entre 6 e 35% da atividade encontrada no plasma de indivíduos saudáveis (KONKLE et al., 2000). De forma geral, o conjunto de parâmetros quantitativos utilizados, principalmente o ED_{50} e o EC_{50} , indica que o produto Kogenate FS[®] possui uma atividade *in vivo* superior àquela observada

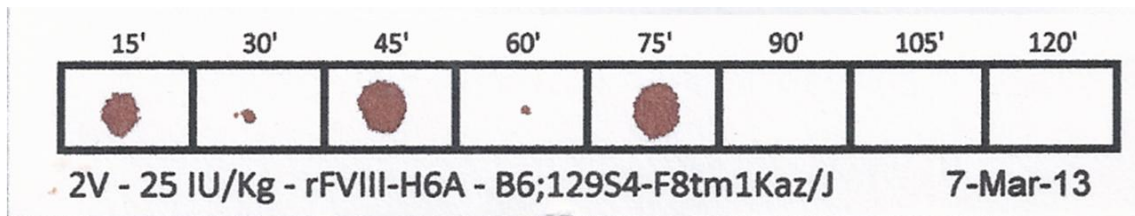
para o produto Fanhdi[®] considerando o modelo de interrupção do fenótipo hemofílico utilizado.

Constatada a capacidade do ensaio alternativo proposto para caracterização da atividade funcional do FVIII e análise de eficácia entre diferentes produtos, o ensaio proposto foi utilizado para caracterização do rFVIII produzido e parcialmente purificado no laboratório, o rFVIII-lab. Até o momento, a análise funcional *in vivo* do rFVIII-lab realizada foi parcial, tendo sido realizado o ensaio de interrupção de um evento hemorrágico em 10 animais. Os animais modelo da hemofilia A foram previamente tratados com as doses de 5 (n= 3), 25 (n= 3) e 50 UI/Kg (n=4) do rFVIII-lab parcialmente purificado e avaliados quanto à correção do fenótipo hemofílico, observada através da interrupção do sangramento em até 120 min após a indução de um evento hemorrágico (Figura 10).

(A)



(B)



(C)

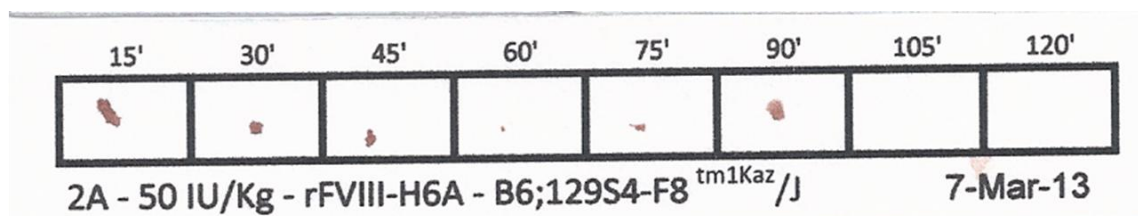


Figura 10 - Atividade funcional do fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório. Registros representativos do sangramento observado por até 120 min após transecção da extremidade da cauda de animais modelo da hemofilia A previamente tratados com as doses de (A) 5 UI/Kg (n=3), (B) 25 UI/kg (n=3) e (C) 50 UI/Kg (n=4) do rFVIII-lab produzido e parcialmente purificado no laboratório.

Entre os animais avaliados, um em três (1/3) dos que receberam 5UI/Kg, três dos três (3/3) que receberam 25 UI/kg e dois dos quatro (2/4) que receberam 50UI/kg apresentaram interrupção do sangramento em até 120 min, corrigindo o fenótipo hemofílico e demonstrando a atividade funcional *in vivo* do rFVIII-lab. No entanto, considerando o número relativamente baixo de animais e doses avaliados, não foi possível obter ainda os valores de doses-respostas quantitativos, necessários para uma adequada avaliação da eficácia do rFVIII-lab quando comparada aos produtos de referência. A atividade plasmática de FVIII disponibilizada no plasma de animais hemofílicos tratados com o rFVIII-lab ainda não foi realizada. No entanto, considerando as evidências de atividade funcional *in vivo* do rFVIII-lab obtidas até o momento, seguiu-se com a caracterização da indução de resposta imunológica frente ao rFVIII-lab e aos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] utilizando o modelo murino de hemofilia A.

4.3 Avaliação da indução de resposta imune ao Fator VIII recombinante

Com o objetivo de se avaliar a indução de resposta imunológica ao rFVIII-lab no modelo murino de hemofilia A, dois ensaios classicamente utilizados para avaliação de imunogenicidade de novas terapias anti-hemofílicas em estudos pré clínicos, baseados na quantificação de anticorpos totais que reconheçam epítomos presentes no FVIII (anticorpos anti-FVIII) e de anticorpos inibitórios da atividade do FVIII (inibidores), foram estabelecidos no laboratório (DELIGNAT et al., 2007; PARKER et al., 2004; QADURA et al., 2009; WROBLEWSKA et al., 2012). O ensaio baseado na quantificação de anticorpos inibitórios da atividade do FVIII é utilizado no diagnóstico e/ou acompanhamento de pacientes hemofílicos com suspeita e/ou histórico de desenvolvimento de inibidores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; VERBRUGGEN et al., 1995). Para caracterização da indução de resposta imunológica do rFVIII-lab frente aos produtos de referência, animais hemofílicos foram divididos em quatro grupos experimentais, cada grupo com número de cinco animais (n=5) e correspondendo ao tratamento com quatro administrações semanais de 50 UI/Kg do rFVIII-lab parcialmente purificado, ou dos produtos de referência Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®], ou de veículo, composto de solução de formulação. A administração de 50 UI/kg foi escolhida por ser a dose esperada para conferir em humanos um nível plasmático de FVIII estimado em 100% do encontrado em indivíduos saudáveis, sendo utilizada no tratamento profilático de pacientes hemofílicos (BAYER HEALTHCARE LLC, 2009), e também em outros ensaios descritos na literatura para imunização de camundongos modelo da hemofilia A (MEEKS et

al., 2012; MESLIER et al., 2010; QIAN et al., 2000; WATERS et al., 2009). A quantificação da indução de resposta imunológica foi realizada nas amostras de plasma coletadas após cinco semanas do início do tratamento dos animais avaliados.

4.3.1 *Quantificação de anticorpos totais anti-Fator VIII*

A quantificação das amostras de plasma coletadas dos animais hemofílicos tratados com veículo, rFVIII-lab, Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®] para formação de anticorpos totais anti-FVIII foi realizada através de ensaio imunoenzimático, conforme descrito em Métodos. Ensaio preliminares nos direcionaram a diluir os plasmas dos animais avaliados serialmente em solução de bloqueio em escalas diferentes para o tratamento com veículo (1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000), Kogenate FS[®] (1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:25.000), Fanhdi[®] (1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:25.000, 1:50.000 e 1:75.000) e rFVIII-lab (1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1.000). Como controle negativo do ensaio foi utilizado solução de bloqueio. O título de anticorpos totais (subclasses IgG1 e IgG2) anti-FVIII foi estimado nas amostras de plasma dos animais através da maior diluição entre as avaliadas que resultou em sinal positivo, cujo valor de absorbância foi maior que a média do valor de absorbância do controle negativo somada ao seu valor de desvio padrão multiplicado três vezes. Os grupos de animais tratados com rFVIII-lab, Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou veículo foram avaliados através de teste estatístico não paramétrico para análise de variância Kruskal-Wallis. Sendo constatada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais avaliados, foi aplicado o teste *post hoc* de múltipla comparação Dunn's (Figura 11).

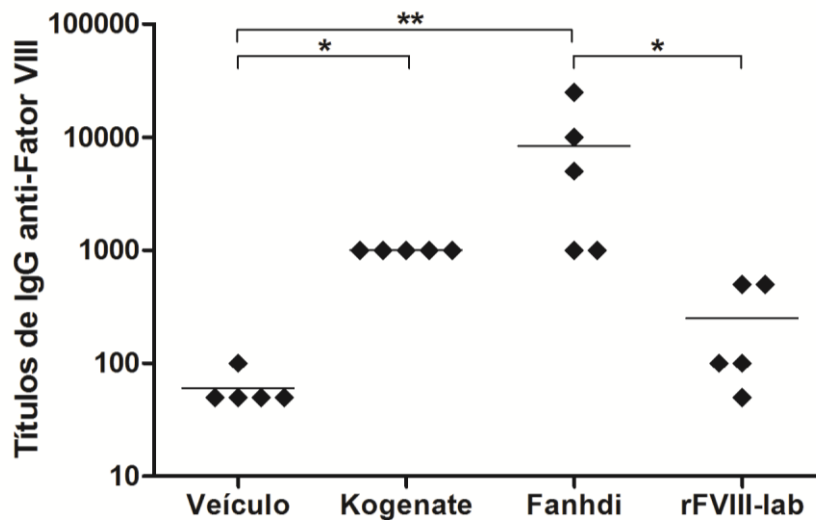


Figura 11 – Quantificação da indução de resposta imunológica (anticorpos totais) ao fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório comparada aos produtos de referência no modelo murino de hemofilia A. Os títulos de imunoglobulina G (subclasses IgG1 e IgG2) para o fator VIII foram quantificados no plasma de animais modelo da hemofilia A tratados com quatro administrações semanais de veículo (solução de formulação) ou de 50 UI/kg de Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou rFVIII-lab. Cinco semanas após o início do protocolo de indução da resposta imune, amostras de plasma foram coletadas e os títulos de anticorpos totais anti-FVIII foram quantificados através de ensaio imunoenzimático, sendo os títulos determinados através das maiores diluições de plasma obtidas com sinal positivo, cujos valores de absorbância foram superiores a média do valor de absorbância do controle negativo somada ao seu valor de desvio padrão multiplicado três vezes. A análise de variância entre os diferentes grupos avaliados foi realizada através de teste estatístico Kruskal-Wallis, ($P < 0,05$) seguido de teste *post hoc* Dunn's, * $0,01 < P < 0,05$, ** $0,001 < P < 0,01$.

O título de anticorpos totais anti-FVIII no plasma dos animais hemofílicos tratados com veículo foi estimado em 60 ± 22 , sendo este, provavelmente, o limiar de detecção específica do método. Esse título basal, e provavelmente inespecífico, encontrado no plasma dos animais hemofílicos tratados com o veículo foi diferenciado estatisticamente quando comparado ao título médio de 1.000 ± 0 referente ao tratamento com Kogenate FS[®] ($0,01 < P < 0,05$), e quando comparado ao título médio de 8.400 ± 9.990 referente ao tratamento com Fanhdi[®] ($0,001 < P < 0,01$), apesar da grande variabilidade de títulos obtida para este último (1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:25.000), indicando que o protocolo de indução da resposta imune frente ao FVIII utilizado em nosso laboratório funcionou de maneira adequada. O título de anticorpos totais anti-FVIII quantificado no plasma dos animais tratados com Kogenate FS[®] (1.000 ± 0) não foi diferenciado estatisticamente daquele detectado no plasma dos animais tratados com Fanhdi[®] (8.400 ± 9.990). Com relação ao título médio quantificado no plasma dos animais tratados com o rFVIII-lab parcialmente purificado,

estimado em 250 ± 229 , não foi possível diferenciá-lo estatisticamente dos títulos quantificados no plasma dos animais tratados com veículo (60 ± 22) ou com Kogenate FS[®] (1.000 ± 0), sendo diferenciado ($0,01 < P < 0,05$) apenas quando comparado ao título quantificado no plasma dos animais tratados com Fanhdi[®] (8.400 ± 9.990). Esses dados sugerem que a resposta imunológica ao rFVIII-lab, avaliada através da quantificação de anticorpos totais anti-FVIII, é menos intensa quando comparada aos produtos de referência. Com o objetivo de complementar esta caracterização, quantificou-se em seguida o título de anticorpos inibitórios da atividade do FVIII nestas mesmas amostras.

4.3.2 *Quantificação de anticorpos inibidores da atividade de Fator VIII*

A quantificação das amostras de plasma coletadas dos animais hemofílicos tratados com veículo, rFVIII-lab, Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®] para formação de inibidores da atividade de FVIII (inibidores) foi realizada através do ensaio Bethesda modificado por Nijmegen, conforme descrito em Métodos. Ensaio preliminar nos direcionaram a diluir as amostras de plasmas dos animais avaliados serialmente em plasma comercial deficiente em FVIII em escalas diferentes para o tratamento com veículo (1:4 e 1:20), Kogenate FS[®] (1:10, 1:15, 1:50 e 1:75), Fanhdi[®] (1:15, 1:20, 1:75 e 1:100) e rFVIII-lab (1:5 e 1:25). Como controle interno do ensaio foi utilizado apenas plasma deficiente em FVIII comercial. A concentração de inibidores nas amostras de plasma dos grupos de animais tratados com rFVIII-lab, Kogenate FS[®] ou Fanhdi[®] foi obtida através da quantificação da atividade restante de FVIII nas amostras de plasma a serem avaliadas, em relação àquela obtida após a incubação destas amostras com uma quantidade conhecida de atividade de FVIII, e transformação dos valores obtidos de atividade restante de FVIII em unidades bethesda (UB)/ml, sendo expressa em relação àquela obtida no plasma do grupo de animais tratados com veículo (solução de formulação). Os grupos de animais tratados com rFVIII-lab, Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou veículo foram avaliados através de teste estatístico não paramétrico para análise de variância Kruskal-Wallis. Sendo constatada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais avaliados, foi aplicado o teste *post hoc* de múltipla comparação Dunn's (Figura 12).

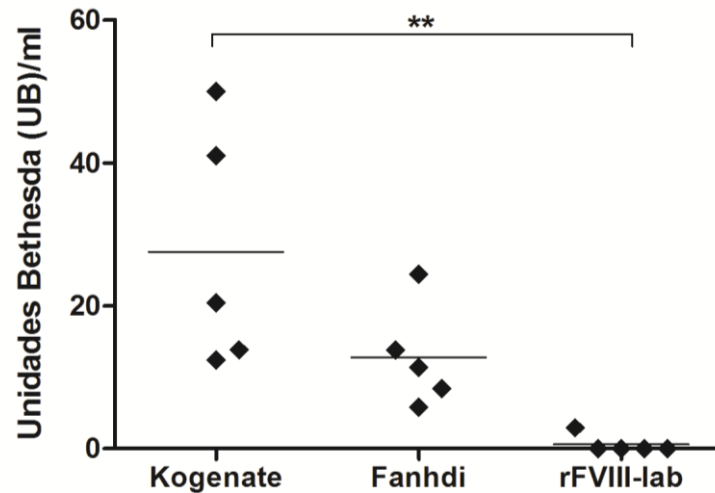


Figura 12 - Quantificação da indução de resposta imunológica (anticorpos inibitórios) ao fator VIII recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório comparada aos produtos de referência no modelo murino de hemofilia A. O título de anticorpos inibitórios, expresso em Unidades Bethesda (UB/ml) foi quantificado no plasma de animais modelo da hemofilia A tratados com quatro administrações semanais de 50 UI/kg de Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou rFVIII-lab. Cinco semanas após o início do protocolo de indução da resposta imune, amostras de plasma foram coletadas e os anticorpos inibidores da atividade de FVIII foram quantificados através de ensaio Bethesda modificado por Nijmegen. As UB/ml determinadas nos plasmas dos animais tratados com Kogenate FS[®], Fanhdi[®] ou rFVIII-lab, em relação à obtida no plasma dos animais tratados com veículo (solução de formulação) foram obtidas após a incubação desses plasmas com um montante conhecido de atividade de FVIII e determinação da atividade restante de FVIII. A análise de variância entre os diferentes grupos avaliados foi realizada através de teste estatístico Kruskal-Wallis, ($P < 0,05$) seguido de teste *post hoc* Dunn's, $** 0,001 < P < 0,01$.

Os inibidores quantificados no plasma dos animais hemofílicos tratados com Kogenate FS[®] foram estimados em 28 ± 17 UB/ml, não sendo diferenciado estatisticamente ($P > 0,05$) quando comparado aos inibidores referente ao tratamento com Fanhdi[®], quantificados em 13 ± 7 UB/ml. A quantificação de inibidores no plasma dos animais hemofílicos tratados com os produtos de referência Kogenate FS[®] e Fanhdi[®] indica que o protocolo de indução da resposta imune frente ao FVIII utilizado funcionou de maneira adequada. Com relação aos animais tratados com o rFVIII-lab parcialmente purificado, não foi detectado título de anticorpos inibidores no plasma de quatro dos cinco animais avaliados. A atividade restante de FVIII no plasma desses animais foram superiores ao intervalo recomendado (entre 25 a 75%) para o cálculo de inibidores, mesmo utilizando um fator de diluição relativamente baixo (1:5). O valor médio de inibidores quantificados no plasma destes animais foram estimados em $0,5 \pm 1,3$ UB/ml, sendo possível diferenciá-lo estatisticamente ($0,01 < P < 0,05$) dos inibidores quantificados no plasma dos animais tratados com Kogenate FS[®] (28 ± 17 UB/ml). No entanto, apesar dos menores níveis de inibidores quantificados no plasma dos animais

tratados com o rFVIII-lab, esses valores não foram diferenciados estatisticamente ($P>0,05$) daqueles quantificados no plasma dos animais tratados com Fanhdi[®] (13 ± 7 UB/ml). Estes dados sugerem que a resposta imunológica ao tratamento dos animais hemofílicos com o rFVIII-lab, avaliada através da quantificação de anticorpos inibidores da atividade do FVIII, é menos intensa quando comparada aos produtos de referência.

5 DISCUSSÃO

O potencial imunogênico de um determinado polipeptídeo terapêutico ou biofármaco é um fator de maior importância, e que pode limitar seu uso, já que uma resposta imunogênica a um determinado biofármaco num paciente pode promover reações alérgicas, induzir a formação de anticorpos neutralizantes da atividade biológica do polipeptídeo terapêutico, ou mesmo ao polipeptídeo endógeno do paciente, interferindo diretamente em sua potência e taxa de depuração (*clearance*) plasmática (BARBOSA, 2011). O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes da atividade do FVIII, conhecidos como inibidores, é atualmente uma das complicações mais sérias associada à terapia de reposição em pacientes hemofílicos. O desenvolvimento de aloanticorpos inibidores ocorre em cerca de 20 a 30% dos pacientes com hemofilia A severa recebendo tanto o pFVIII como o rFVIII, fazendo com que a terapia de reposição se torne inefetiva, e predispondo-os a um alto risco de morbidade (GRINGERI et al., 2003).

A questão de imunogenicidade é ainda mais crítica quando se considera formas modificadas ou bioengenheiradas do fator VIII. O conhecimento acumulado nas últimas três décadas sobre a estrutura, função, via biossintética e imunogenicidade do Fator VIII tem permitido a obtenção de variantes artificiais do rFVIII com o objetivo de contornar algumas dificuldades associadas a sua produção e utilização. Entretanto, a bioengenharia do rFVIII pode resultar em novas estruturas conformacionais da molécula e levar à exposição de neo-epítopos reconhecíveis pelas células T e B, apresentando, desta forma, um potencial imunogênico imprevisível em pacientes hemofílicos. Consequentemente, existe o receio de que o tratamento de pacientes hemofílicos utilizando tais variantes modificados do rFVIII poderia maximizar o desenvolvimento de inibidores, podendo comprometer tanto a sua eficácia e a funcionalidade, como também influenciando na quebra da tolerância imunológica ao FVIII endógeno eventualmente presente nesses pacientes (KOREN et al., 2008).

Idealmente, o potencial imunogênico desses variantes do rFVIII deveria ser antecipado em modelos pré-clínicos previamente à administração nos pacientes hemofílicos. Estudos realizados em modelos animais têm sido úteis na pré-avaliação de imunogenicidade diferencial de moléculas modificadas previamente ao desenvolvimento dos estudos de fase clínica (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008). Para avaliação da imunogenicidade do rFVIII-lab foi utilizada uma linhagem de camundongos nocaute para o *Fviii*, gerada a partir da disrupção do éxon 16, como modelo de hemofilia A (BI et al., 1995). Esse modelo, juntamente com um gerado a partir da disrupção do éxon 17 do loco *Fviii*, recapitula as

principais características encontradas nos pacientes portadores da hemofilia do tipo severa, e tem sido um dos mais utilizados em estudos de mecanismos associados à indução de resposta imunológica ao rFVIII (PENG et al., 2009; QIAN et al., 1999; REIPERT et al., 2001; SKUPSKY et al., 2009; WU et al., 2001), de caracterização da imunogenicidade relativa aos domínios que compõem o Fator VIII (HERCZENIK et al., 2012; MEEKS et al., 2007; PRATT et al., 2004) e do potencial imunogênico de variantes do rFVIII (CERULLO et al., 2007; WROBLEWSKA et al., 2012). O perfil de resposta imunológica frente ao FVIII nos camundongos hemofílicos é semelhante àquele observado em pacientes hemofílicos. Os anticorpos inibidores em pacientes hemofílicos são da subclasse IgG, principalmente os isotipos IgG1 e IgG4, sendo dependentes da estimulação dos linfócitos T auxiliares (*helper*) CD4⁺ (TOWFIGHI et al., 2005). Estudos em camundongos hemofílicos demonstraram que a resposta imunológica ao FVIII humano é composta de anticorpos IgG, principalmente os isotipos IgG1 (equivalente ao subtipo IgG4 humano) e IgG2 a e c (equivalente ao subtipo IgG1 humano), e pode ser detectada após uma ou duas administrações intravenosas, aumentando de intensidade com administrações subsequentes (WU et al., 2001). Uma parcela desses anticorpos detectados é neutralizante da atividade do FVIII, e o título destes anticorpos inibidores está diretamente relacionado com o título de anticorpos totais contra o FVIII (TOWFIGHI et al., 2005). Nos camundongos hemofílicos, o bloqueio de vias co-estimulatórias dependentes da interação do receptor linfocitário T CD28 (*Cluster of differentiation 28*) e de seus ligantes B7 (CD80 e CD86), assim como do receptor de células apresentadoras de antígenos CD40 (CD40L) e seu ligante (CD40L), inibem a formação de anticorpos anti-FVIII, sendo estas as principais evidências do papel dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ no desenvolvimento da resposta imunológica ao FVIII no modelo murino (REIPERT et al., 2001). Além das semelhanças da resposta imunológica frente ao FVIII em relação aos pacientes hemofílicos, o modelo murino da hemofilia A apresenta algumas características importantes para se estudar a resposta imunológica ao FVIII, destacando-se: a) as respostas imunológicas frente ao FVIII podem ser estudadas em uma população geneticamente homogênea; b) a influência de fatores ambientais pode ser melhor controlada; c) a possibilidade de manipulação do sistema imunológico para se avaliar os mecanismos de indução da resposta imunológica.

Entretanto, o modelo murino de hemofilia A utilizado neste estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, esse modelo não reproduz o espectro de mutações e alterações funcionais do FVIII encontrado em pacientes, o que pode ser um determinante importante da indução da resposta imunológica ao FVIII, já que em certos pacientes ocorre a produção de

formas completas da proteína, porém parcialmente ou não funcionais, enquanto outros não produzem FVIII algum (WHITE et al., 2005). No modelo murino utilizado neste estudo, ocorre a produção de uma forma truncada do FVIII não funcional (BI et al., 1995). Em segundo lugar, diferentemente do que ocorre em humanos, onde a resposta imunológica ao FVIII ocorre em cerca de 30% dos pacientes, no modelo murino utilizado esta resposta ocorre em 100% dos indivíduos avaliados (WU et al., 2001). Essa resposta no modelo murino pode ser atribuída ao fato de todos os indivíduos avaliados possuírem a mesma mutação em um contexto gênico muito similar. Além disso, parte dessa resposta também pode ser atribuída à natureza xenogênica do FVIII humano no modelo murino, já que camundongos selvagens da linhagem C57BL6 podem apresentar uma resposta imunológica ao FVIII humano, ainda que menos intensa ou até mesmo indetectável quando comparada àquela observada em animais hemofílicos (REIPERT et al., 2000). Como nos camundongos selvagens os linfócitos T CD4⁺ que apresentam uma resposta ao FVIII são eliminados durante a maturação do sistema imunológico, essa resposta pode ser atribuída às diferenças interespecies na sequência polipeptídica do FVIII, já que as sequências humana e murina exibem cerca de 74% de identidade (ELDER; LAKICH; GITSCHIER, 1993) ou ainda às diferenças nas modificações pós-traducionais, em especial o perfil de glicosilação, entre as moléculas de FVIII humana e murina (BRINKMAN-VAN DER LINDEN et al., 2000). Finalmente, outra limitação do modelo murino de hemofilia é o fato dos peptídeos do FVIII humano serem apresentados pelo complexo de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) murino. Além da possibilidade da natureza da resposta imunológica ser diferente devido a diferenças interespecies no MHC, o repertório limitado de haplótipos de MHC presente na linhagem geneticamente homogênea utilizada neste estudo pode limitar a diversidade da resposta imunológica ao FVIII (SAINT-REMY; REIPERT; MONROE, 2012).

Outros modelos animais têm sido propostos para a avaliação da imunogenicidade do FVIII, buscando contornar as limitações do modelo murino descritas acima, tornando possível a detecção de diferenças mais sutis no potencial imunogênico de formas modificadas do rFVIII. Um desses modelos, gerado a partir de uma linhagem nocaute para o *Fviii* murino, é transgênico para o *FVIII* humano selvagem e, portanto, tolerante a doses terapêuticas desse fator, ao mesmo tempo em que também é imunologicamente responsável quando desafiado com uma molécula modificada que possua propriedades imunogênicas alteradas (VAN HELDEN et al., 2011). Entretanto, uma limitação importante desse modelo é que a expressão do FVIII humano não mimetiza o quadro de hemofilia grave, onde, em muitos casos, não há produção alguma de FVIII, característica que é considerada como um dos principais fatores

de risco para a incidência de inibidores (DASGUPTA et al., 2007). Outro modelo proposto, também gerado a partir de uma linhagem nocaute para o *Fviii* murino, porém transgênico para um mutante do *FVIII* humano sem atividade biológica, que carrega uma mutação semelhante àquela encontrada em parte dos pacientes hemofílicos, mimetiza a tolerância imunológica à molécula de FVIII humano (BRIL et al., 2006), tendo, recentemente, sido disponibilizado comercialmente (THE JACKSON LABORATORY, 2012). Um terceiro modelo proposto, baseado em camundongos nocautes para o *Fviii* e o MHC de classe II murino, é transgênico para um variante HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (*HLA-DRB1*1501*) humano, já associado com um risco elevado de formação de inibidores em pacientes hemofílicos (HAY et al., 1997), mimetizando a indução de resposta imunológica dependente da apresentação de peptídeos imunogênicos no contexto do MHC de classe II humanizado (BAXTER BIOSCIENCE, 2007).

Assim, de maneira geral, apesar do modelo murino de hemofilia A utilizado neste estudo ser bem caracterizado e constituir uma oportunidade de se estudar a resposta imunológica de uma forma que não seria possível em pacientes hemofílicos, a capacidade deste modelo de prever a resposta em humanos ainda tem que ser determinada (NEUGEBAUER et al., 2008; REIPERT et al., 2000). Atualmente, apenas dois produtos gerados a partir da bioengenharia do rFVIII estão licenciados nos Estados Unidos e na Europa, o Refacto[®] (Pfizer) e o Xyntha[®] (ou Refacto AF[®]) (Pfizer) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2009; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010), o que permitiri uma análise do potencial preditivo do modelo murino quanto à resposta imunológica diferencial em humanos frente a formas modificadas do rFVIII (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Para a produção desses dois produtos em células de mamíferos são utilizadas as regiões codificadoras da cadeia pesada, sem o domínio B, e da cadeia leve, interligadas através da utilização de uma sequência interligadora artificial codificando para alguns aminoácidos do domínio B (RECHT et al., 2009). A super-produção desses dois produtos em células de mamíferos está associada ao processamento proteolítico parcial do polipeptídeo precursor, neste caso um variante artificial de 170 kDa, e que está presente na apresentação final do produto (JANKOWSKI et al., 2007; SANDBERG et al., 2001). Além desta diferença estrutural, esse variante do rFVIII possui uma atividade específica de cerca de 13.000 UI/mg, que é aproximadamente três vezes maior que àquela observada para o pFVIII ou rFVIII selvagem, de cerca de 4.500 UI/mg (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000). Devido a essas características, durante a fase de estudos pré-clínicos e clínicos do Refacto[®], existia a preocupação de que estes

produtos poderiam gerar uma resposta imunogênica ou uma atividade *in vivo* diferenciada (BERNTORP, 1997). Esse receio não se confirmou em estudos pré-clínicos nos modelos murino e canino de hemofilia A, já que parâmetros relacionados à farmacocinética, eficácia e segurança do Refacto[®] foram similares àqueles observados para os produtos anti-hemofilia utilizando o rFVIII selvagem (REIPERT et al., 2000). Adicionalmente, a indução da formação de anticorpos inibidores da atividade do FVIII em estudos clínicos de fase II e III com pacientes hemofílicos tratados com Refacto[®] foi observada em 20 a 30% dos pacientes com hemofilia A severa, proporção similar àquela observada com outros produtos anti-hemofilia (LUSHER et al., 2003). Entretanto, um estudo recente baseado na meta-análise de 29 estudos clínicos prospectivos, envolvendo cerca de 3000 hemofílicos A previamente tratados com outro produto anti-hemofília, indicou que a incidência de títulos de anticorpos inibidores da atividade do FVIII maiores que 5 unidades Bethesda é 11 vezes maior em pacientes tratados com Refacto[®] em relação aos pacientes tratados com rFVIII selvagem (ALEDORT; NAVICKIS; WILKES, 2011). Aparentemente, a concordância entre os resultados dos estudos pré-clínicos e clínicos indicam que o modelo murino, pelo menos no caso Refacto[®], apresentou uma capacidade preditiva razoável, embora ainda sejam necessários mais estudos de farmacovigilância para avaliar essa possível imunogenicidade diferencial do variante do rFVIII Refacto[®].

No caso do fator VIII recombinante produzido no laboratório (rFVIII-lab), exploramos uma sequência polipeptídica variante do fator VIII que consiste na interligação N-terminal de uma sequência polipeptídica da porção C-terminal do domínio B do Fator VIII à região codificadora da cadeia leve, e a produção independente, em células CHO, da sequência polipeptídica natural da cadeia pesada sem o domínio B e deste variante artificial da cadeia leve (YONEMURA et al., 1993). Vários estudos têm descrito que variantes artificiais do fator VIII, contendo trechos de extensões variadas do domínio B, proporcionam um aumento na eficiência de síntese e secreção do fator VIII (KOLIND et al., 2010; MIAO et al., 2004). Nessa configuração do fator VIII recombinante utilizada no laboratório, é necessário que ocorra o processamento proteolítico da cadeia leve fusionada ao trecho do domínio B utilizado, de forma que a cadeia leve produzida seja idêntica àquela encontrada naturalmente no plasma humano, sem sequências do domínio B. No entanto, a capacidade limitada de processamento proteolítico pelas células produtoras de quantidades mais elevadas do rFVIII, já observada em outros trabalhos descrevendo a super-produção do rFVIII, inclusive da configuração utilizada no laboratório (JANKOWSKI et al., 2007; YONEMURA et al., 1993), acarreta na produção de parte das moléculas de rFVIII parcialmente processadas e, no caso do

rFVIII-lab, a justaposição de aminoácidos encontrada no variante da cadeia leve parcialmente processado é artificial. Embora o processamento proteolítico completo não seja uma etapa limitante para a atividade dos variantes do rFVIII contendo trechos do domínio B (D'AMICI et al., 2010), não interferindo, desta forma, na etapa de ativação do FVIII, existe a preocupação de que essas moléculas artificiais presentes nas preparações finais do rFVIII-lab poderiam maximizar o desenvolvimento de inibidores durante o tratamento da hemofilia A, como mencionado anteriormente. A avaliação da imunogenicidade ao rFVIII-lab comparada às dos produtos de referência foi realizada em camundongos modelo da hemofilia A severa tratados pelas primeiras vezes, situação em que a indução de resposta imunológica, culminando na formação de inibidores, é mais frequentemente observada, assim como o relatado em humanos (DASGUPTA et al., 2007). Para a avaliação da imunogenicidade ao rFVIII-lab foram estabelecidos no laboratório ensaios para a determinação dos níveis de anticorpos que reconhecem o FVIII, chamados de anticorpos totais, e do subgrupo desses anticorpos capazes de interferir com a atividade pró-coagulante do FVIII, chamados de inibidores. A quantificação dos anticorpos totais, em geral realizada através de ensaio imunoenzimático, assim como no presente trabalho, preferencialmente deve ser associada à quantificação dos anticorpos com atividade inibitória para que a avaliação da imunogenicidade de terapias anti-hemofílicas seja realizada de maneira adequada (KLINGE et al., 2001; MARTIN et al., 1999). A quantificação dos inibidores foi realizada através do método de referência, baseado na incubação de uma fonte exógena de FVIII com o plasma a ser testado, seguida da determinação da diminuição da atividade do FVIII nesse plasma em relação ao controle após um determinado período de tempo. Esse ensaio é recomendado pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia para o diagnóstico/ acompanhamento dos pacientes hemofílicos acometidos pelo desenvolvimento de inibidores (GILES et al., 1998).

Em geral, os ensaios para quantificação de anticorpos totais e inibidores do FVIII no modelo murino de hemofilia A são realizados após a imunização desses animais envolvendo de duas a seis administrações semanais de FVIII, sendo em geral utilizadas quatro administrações semanais de doses profiláticas (50 UI/kg) do FVIII utilizadas em pacientes hemofílicos, e coleta do plasma do animal uma semana depois da última administração (MESLIER Y, ANDRÉ S, TEYSSANDIER M, KAVERI SV, 2010; PENG et al., 2009; PUROHIT et al., 2005; WATERS et al., 2009). A imunização dos animais hemofílicos para a avaliação da imunogenicidade do rFVIII-lab comparada aos produtos de referência foi realizada através de quatro administrações semanais de 50 UI/kg via plexo venoso retro-orbital, sendo o plasma desses animais avaliado após a quinta semana do início das

administrações do FVIII, embora resultados preliminares obtidos no laboratório com o produto de referência Fanhdi[®] tenham indicado a formação de anticorpos totais e inibidores após três administrações semanais do FVIII (dado não mostrado). A indução da resposta imunológica (anticorpos totais e inibidores) foi detectada em 100% dos animais avaliados com os produtos de referência Fahndi[®] e Kogenate FS[®], indicando que o protocolo de indução da resposta imune frente ao FVIII utilizado em nosso laboratório funcionou de maneira adequada.

Ao compararmos os títulos de anticorpos totais anti-FVIII e inibidores quantificados neste trabalho àqueles descritos em ensaios da literatura utilizando modelo murino de hemofilia A semelhante ao utilizado no laboratório, foram encontradas certas discrepâncias, o que pode refletir algumas diferenças importantes entre os diferentes produtos anti-hemofilia avaliados e os protocolos descritos na literatura quando comparados aos utilizados no laboratório, como, por exemplo, diferenças no processo de produção e formulação dos produtos avaliados, nas dosagens utilizadas, no número de administrações, na via de administração e no momento de coleta do plasma. Assim, em uma análise descrita na literatura de quantificação de anticorpos totais anti-FVIII e inibitórios no modelo murino de hemofilia A realizado com Kogenate FS[®], e avaliação da resposta imunológica na quinta semana após quatro administrações intravenosas semanais, o título médio de anticorpos totais foi descrito em 600 e os inibidores foram quantificados em 60 ± 37 UB/ml (WATERS et al., 2009), valores próximos do título de 1.000 ± 0 de anticorpos totais e 28 ± 17 UB/ml de anticorpos inibitórios quantificados neste trabalho para o Kogenate FS[®], produto de segunda geração formulado sem albumina, onde se utilizou como via de administração o plexo venoso retro-orbital e quatro administrações semanais.

Em outra análise descrita utilizando um fator VIII selvagem recombinante comercial de primeira geração (Recombinate[®], Baxter), formulado com HSA, cuja atividade específica é descrita pelo fabricante em 10 UI/mg (BAXTER S.A., 2011), o título de anticorpos totais anti-FVIII, avaliado com apenas duas administrações intravenosas quinzenais foi quantificado em 638 ± 642 (PUROHIT et al., 2005), também similar àquele quantificado no presente trabalho com quatro administrações semanais de Kogenate FS[®] (1.000 ± 0). Entretanto, nesse mesmo trabalho, o título dos inibidores foi quantificado em 690 ± 78 UB/ml, sendo esse valor cerca de 20 vezes maior ao quantificado para o produto Kogenate FS[®] no presente trabalho (28 ± 17 UB/ml). Em outra análise descrita também utilizando o Recombinate[®], o título de anticorpos totais anti-FVIII foi quantificado em 4.915 ± 723 quando avaliado após seis semanas do início do tratamento (PENG et al., 2009), título esse maior ao quantificado para o

Kogenate FS[®] no presente trabalho, e por Purohit e colaboradores utilizando o mesmo produto (Recombinate) (PUROHIT et al., 2005). Por outro lado, nesse mesmo trabalho, realizado por Peng e colaboradores, o título dos inibidores obtido para o Kogenate (587 ± 54 UB/ml) (PENG et al., 2009) foi similar ao valor observado por Purohit e colaboradores com o mesmo produto, como descrito acima, e, desta forma, muito superior ao obtido no laboratório com o Kogenate FS[®]. Em outras duas análises descritas na literatura do perfil de resposta imunológica frente ao um fator VIII selvagem recombinante comercial de terceira geração (Advate[®], Baxter), o título médio de anticorpos totais anti-FVIII foi quantificado em 10.937 e o título dos inibidores foi de 679 UB/ml em um dos trabalhos, sendo que a avaliação foi realizada através da administração via subcutânea de doses contendo o dobro da quantidade de FVIII utilizada em nosso laboratório (PUROHIT; MIDDAUGH; BALASUBRAMANIAN, 2006); e no outro trabalho quantificado em 53.000 ± 23.000 , sendo que a avaliação foi realizada através da administração intraperitoneal de doses contendo cinco vezes mais FVIII que a quantidade usada no laboratório (SKUPSKY et al., 2009).

Em nossa análise da indução da resposta imunológica ao FVIII não foram encontradas diferenças estatísticas dos títulos de anticorpos totais e inibitórios entre o Fahndi[®] e o Kogenate FS[®], embora tenha sido observada uma tendência de títulos de anticorpos totais mais elevados e títulos de anticorpos inibitórios menores no caso do Fahndi[®]. De fato, alguns ensaios realizados para comparar a imunogenicidade entre o pFVIII e o rFVIII no modelo murino de hemofilia A sugerem que o pFVIII induza uma menor formação de inibidores do que o rFVIII, embora os mecanismos e a relevância dessas observações em pacientes hemofílicos ainda não estejam muito claros.

Uma possibilidade para explicar essa diferença de imunogenicidade seria a presença do vWF nos produtos derivados de plasma, baseada em evidências de que as células dendríticas não seriam capazes de realizar a endocitose do FVIII quando este estivesse associado ao vWF, evitando, assim, uma subsequente apresentação dos antígenos derivados do FVIII no processo de ativação de células T e B, e a formação de anticorpos inibitórios (DASGUPTA et al., 2007; DELIGNAT et al., 2007; KAVERI et al., 2007). Além disso, é importante considerar que o tratamento de animais modelo da hemofilia A utilizando preparações de FVIII contendo vWF, assim como outras proteínas de origem humana, poderia suprimir a resposta imunológica específica ao FVIII através de um mecanismo de competição antigênica, em que a apresentação dos antígenos presentes no vWF diminuiriam a apresentação dos antígenos presentes no FVIII. Nesse sentido, a avaliação de imunogenicidade ao FVIII contendo vWF nessas condições poderia não ser confirmada em

estudos clínicos, uma vez que o vWF não apresentaria propriedades xenogênicas quando administrado em pacientes hemofílicos (REIPERT; SCHOPPMANN; SCHWARZ, 2003). Por outro lado, também já foi demonstrado que a adição de vWF ao rFVIII previamente ao tratamento dos animais hemofílicos não foi capaz de diminuir a formação de inibidores do FVIII no plasma desses animais (QADURA et al., 2009). Em humanos, a influência do rFVIII para o tratamento dos pacientes hemofílicos no risco de desenvolvimento de inibidores nesses pacientes permanece controverso (ALEDORT, 2004; LUSHER, 2004). Alguns estudos indicam que há um maior risco para o desenvolvimento de inibidores nos pacientes hemofílicos tratados com o rFVIII quando comparados aos pacientes tratados com o pFVIII (GOUEMAND et al., 2006), porém outros estudos não corroboram tais achados (KREUZ et al., 2003; PEERLINCK; HERMANS, 2006; SCHARRER; BRAY; NEUTZLING, 1999), tendo sido demonstrado que algumas preparações de pFVIII poderiam apresentar menor imunogenicidade independente da quantidade de vWF presente nesses produtos, assim sugerindo que seja improvável que o vWF possa reduzir o risco de desenvolvimento de anticorpos inibidores no tratamento de pacientes hemofílicos (GOUW et al., 2007, 2013).

Com relação ao perfil de imunogenicidade averiguado para o rFVIII-lab, nossos resultados sugerem que a molécula de FVIII artificial do rFVIII-lab apresenta um menor risco no desenvolvimento de inibidores quando comparado aos produtos de referência Fahndi[®] e o Kogenate FS[®], no modelo murino de hemofilia A utilizado. O título médio de anticorpos totais anti-FVIII obtido no plasma dos animais hemofílicos submetidos ao protocolo de imunização com o rFVIII-lab (250 ± 229), apesar de ter sido menor, não foi diferenciado estatisticamente do título encontrado para o Kogenate FS[®] (1.000 ± 0). Interessantemente, o título de anticorpos totais encontrado para o rFVIII-lab também não foi diferenciado estatisticamente do título encontrado para o tratamento realizado com o veículo (60 ± 22), sendo estatisticamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao título encontrado para o Fahndi[®] (8.400 ± 9.990). De forma geral, esses resultados foram confirmados após a determinação dos títulos dos anticorpos inibitórios, sendo que o título médio encontrado para o rFVIII-lab ($0,5 \pm 1,3$ UB/ml) foi menor ($P < 0,05$) que os títulos encontrados para o Kogenate FS[®] (28 ± 17 UB/ml) e para o Fahndi[®] (13 ± 7 UB/ml), embora nesse último caso a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Além disso, o título médio encontrado para o rFVIII-lab ($0,5 \pm 1,3$ UB/ml) novamente não foi estatisticamente diferenciado do veículo, cujo título de anticorpos inibitórios não foi detectado (0 ± 0 UB/ml). Para comparação aos títulos de inibidores encontrados em humanos, os pacientes hemofílicos são diagnosticados com inibidores quando são encontrados títulos $\geq 0,6$ UB/ml e considerados como contendo altos

valores de inibidores quando são encontrados títulos maiores que cinco ou 10 UB/ml, podendo ser encontrado títulos maiores que 200 UB/ml em alguns pacientes (WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2009). A princípio, o perfil de imunogenicidade encontrado para o rFVIII-lab, relativamente baixo quando comparado aos produtos de referência, não era esperado, uma vez que os epítomos mais imunogênicos descritos para a molécula de FVIII estão localizados nas regiões ácidas a1 e nos domínios A2, A3, C1 e C2 (SCANDELLA et al., 2001; WROBLEWSKA et al., 2012), sendo que estes domínios estão presentes tanto nos produtos de referência como também no rFVIII-lab. Considerando que diversos aspectos relacionados à natureza do rFVIII-lab e ao seu processo de obtenção poderiam estar envolvidos com o perfil de imunogenicidade ao rFVIII-lab observada em nosso laboratório, a seguir discutimos alguns destes aspectos em maior detalhe.

Aspectos estruturais do rFVIII

Algumas características estruturais, não avaliadas neste trabalho, e estreitamente relacionadas ao sistema de produção do rFVIII, poderiam ter um impacto no desenvolvimento de inibidores nos pacientes hemofílicos e no modelo murino utilizado, tais como o estado de agregação da molécula e o perfil de glicosilação (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008; SHARMA, 2007).

A alteração da estrutura de proteínas de uso terapêutico devido à formação de agregados pode revelar neo-epítomos e/ou levar a formação de epítomos multivalentes, os quais, em geral, elevam o potencial imunogênico dessas proteínas quando comparadas às suas formas não agregadas (HERMELING et al., 2004; ROSENBERG, 2006). No caso específico do FVIII, a presença de agregados na apresentação final do produto poderia ser um fator relacionado à sua imunogenicidade, já que alguns estudos indicam uma tendência do rFVIII a formar agregados (GRILLO et al., 2001; RAMANI et al., 2005). Aparentemente, o potencial imunogênico de formas agregadas do rFVIII depende da manutenção ou não da conformação nativa do rFVIII que compõe estes agregados. Assim, em um estudo comparativo, realizado *in vivo*, com agregados do rFVIII selvagem (Advate[®] Baxter), gerados através de estresse térmico a 80°C e que, desta forma, não mantém a conformação nativa do rFVIII, foi observado que formas agregadas do rFVIII são menos imunogênicas que a forma nativa do rFVIII, apesar de diferirem em suas propriedades antigênicas quando comparado à forma não agregada (PUROHIT; MIDDGAUGH; BALASUBRAMANIAN, 2006). Por outro lado, formas agregadas do rFVIII (Advate[®] Baxter) que mantém a sua conformação nativa, geradas a partir

da incubação de preparações do rFVIII a 37 °C, se mostram mais imunogênicas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que as formas monoméricas não agregadas do rFVIII (PISAL et al., 2012). Futuramente, quando obtivermos uma preparação do rFVIII-lab com uma atividade específica mais elevada, caracterizaremos as nossas preparações do rFVIII-lab quanto a presença de agregados por cromatografia de gel filtração e SDS-PAGE, conforme descrito por Purohit e colaboradores (Purohit et al., 2006).

Já a influência do perfil de glicosilação na imunogenicidade de um biofármaco pode residir tanto em diferenças no número e posição dos sítios de glicosilação, como também na sequência, tamanho da cadeia, ramificação e até mesmo no próprio tipo de glicano incorporado (BERGER; KAUP; BLANCHARD, 2012; KOSLOSKI; MICLEA; BALU-IYER, 2009). O Fator VIII selvagem possui 25 sítios putativos de glicosilação N-ligada, sendo 19 deles situados no domínio B, três na cadeia pesada (dois no domínio A1 e um no domínio A2) e três na leve (dois no domínio A3 e um no domínio C1 (KAUFMAN; WASLEY; DORNER, 1988). Desses sítios, 21 tem comprovação experimental, sendo que 17 deles estão situados no domínio B, dois no domínio A1 da cadeia pesada e os outros dois na cadeia leve (MEDZIHRADESKY; BESMAN; BURLINGAME, 1997). No caso do rFVIII-lab, espera-se a glicosilação N-ligada dos quatro sítios presentes nas cadeias pesada e leve. Com relação à glicosilação O-ligada, sete sítios já foram relatados no domínio B, não sendo esperada nenhuma glicosilação O-ligada no rFVIII-lab (LENTING et al., 2010). Os resíduos N-glicanos presentes nas cadeias pesada e leve são do tipo complexo, apresentando estruturas bi-antênárias fucosiladas, contendo dois resíduos terminais do ácido N-acetil-neuroamínico (Neu5Ac) (THIM et al., 2010). A presença de sítios deglicosilados N-ligados, apesar de relacionada ao aumento de imunogenicidade em outros biofármacos através da exposição de epítopos presentes nesses sítios, os quais não seriam revelados caso estivessem glicosilados (GRIBBEN et al., 1990), não influenciou na imunogenicidade do rFVIII em um estudo utilizando um variante deglicosilado do rFVIII (KOSLOSKI; MICLEA; BALU-IYER, 2009). Ademais, o perfil de glicosilação N-ligada de proteínas terapêuticas produzidas em células de mamíferos, como as células CHO e BHK, pode diferir do encontrado em humanos, através da incorporação do resíduo N-ligado de ácido siálico N-glicolil-neuroamínico (Neu5Gc), e da presença do resíduo O-ligado de hexoamina alfa (1,3)Gal, ambos glicanos expostos na posição terminal dos sítios de glicosilação e, portanto, de relevante potencial imunogênico (BERGER; KAUP; BLANCHARD, 2012; GHADERI et al., 2012). Em um estudo de expressão do fator VII da coagulação realizado em diferentes linhagens celulares foi relatado que todas as formas do rFVII produzidas apresentavam a incorporação de resíduos terminais

de ácido siálico apenas em parte dos sítios de N-glicosilação, quando comparado ao FVII encontrado no plasma humano. Nesse mesmo trabalho, determinou-se que o fator VII recombinante produzido na linhagem celular CHO, a mesma utilizada na produção do rFVIII-lab, apresentou o perfil de glicosilação mais aproximado do perfil encontrado no FVII plasmático. Já o rFVII produzido na linhagem celular BHK, a mesma utilizada na produção do Kogenate FS[®], utilizado como produto de referência em nosso estudo, apresentou a incorporação do ácido siálico em cerca de apenas 50% dos sítios de N-glicosilação. O rFVII produzido na linhagem celular HEK293 apresentou o perfil de glicosilação mais diferenciado tanto dos rFVIIs produzidos nas linhagens CHO e BHK, como também do FVII encontrado no plasma, o que foi inesperado considerando a origem humana da linhagem HEK293 comparada a origem murina das linhagens CHO e BHK (BÖHM et al., 2011). Nesse sentido, a caracterização do perfil de glicosilação do rFVIII-lab faz-se necessária considerando a sua influência na indução de resposta imunológica, neste trabalho avaliada como relativamente baixa quando comparada aos produtos de referência, cujo perfil de glicosilação já é conhecido (KANNICHT et al., 2013).

Aspectos relacionados à pureza do rFVIII-lab

Além de características relativas à estrutura do FVIII, a presença de impurezas no produto final poderia influenciar na resposta imunológica ao FVIII, e maximizar o desenvolvimento de inibidores nos pacientes hemofílicos. Proteínas, lipídeos e DNA derivados das células produtoras, ou da suplementação do meio de cultivo, quando co-purificadas e administradas com a proteína terapêutica de interesse, podem apresentar o efeito de adjuvante imunológico, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes da atividade da proteína de interesse (BARBOSA, 2011). Ademais, o uso de reposição contínua do FVIII pelos pacientes hemofílicos, aliado ao seu já conhecido caráter imunogênico, contribui para que o grau de pureza do rFVIII, recomendado pelas farmacopeias, seja elevado quando comparado ao de outras proteínas terapêuticas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005). Considerando a influência de tais impurezas no potencial imunogênico do rFVIII-lab a ser avaliado frente aos produtos comerciais utilizados como referência, um dos objetivos específicos desse trabalho consistiu no estabelecimento de uma estratégia de purificação do rFVIII-lab.

O processo de purificação industrial dos produtos de rFVIII comerciais passaram a ser realizados em quatro etapas a partir dos produtos de segunda geração, sendo frequentemente

compostos de duas etapas cromatográficas, uma de troca iônica e outra de afinidade baseada em anticorpo monoclonal, seguida de uma etapa de inativação viral através da técnica solvente/detergente e uma etapa final de ultra ou nanofiltração (BOEDEKER, 2001; LEE; BERNTORP; HOOTS, 2011). Para a purificação do rFVIII-lab foi utilizada uma estratégia parecida, baseada em duas etapas cromatográficas, uma de troca aniônica e outra de afinidade à heparina, seguida de uma etapa de ultrafiltração.

Ao final, a estratégia de purificação utilizada recuperou cerca de 8% de atividade de rFVIII quando comparada à obtida no meio de partida inicial, valor que, apesar de baixo, aproximou-se do encontrado em um trabalho na literatura, onde se descreve uma recuperação de 15%, em um processo de purificação do variante do rFVIII conhecido como N8, de estrutura similar ao Refacto[®], e que consistia de quatro etapas para purificação, incluindo duas cromatografias de troca catiônica, imunoafinidade e gel filtração, resultando em 8800-9800 UI/mg de atividade específica no produto final (THIM et al., 2010). Desconhece-se a atividade específica do variante rFVIII-lab completamente puro, mas a atividade específica do rFVIII-lab obtido após a purificação, estimada em cerca de 130 UI/mg, indica que o produto obtido foi parcialmente purificado. Como referência, a atividade específica do rFVIII selvagem Kogenate FS[®], o qual não possui outras proteínas na formulação final, é de 4.000 UI/mg (BAYER HEALTHCARE LLC, 2009), e do variante do rFVIII sem o domínio B Refacto[®] é de cerca de 14.000 UI/mg (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000). A atividade específica do rFVIII-lab também está abaixo do valor indicado pelas farmacopeias europeia e Americana, de 2.000 UI/mg para o rFVIII (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005). Entretanto, para efeito de comparação, a pureza dos produtos derivados do plasma é classificada como intermediária quando a atividade específica do pFVIII está entre 1 UI/mg e 50 UI/mg, e como alta quando a atividade específica é superior a 100 UI/mg (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). O produto derivado de plasma Fanhdi[®], também utilizado como referência no presente trabalho, possui uma atividade específica descrita pelo fabricante de 10 UI/mg. Esse produto é um concentrado do FVIII de alta pureza obtido a partir de plasma de doadores através de crioprecipitação, cromatografia de afinidade a heparina, seguida de precipitação salina associada à glicina, envolvendo uma etapa final de inativação viral através da utilização do tratamento com solvente/detergente e calor seco (80°C) por 72 horas (GRIFOLS BIOLOGICALS INC., 2007). A atividade específica reduzida em relação ao rFVIII se deve principalmente a co-purificação de outras proteínas plasmáticas. Parte delas estão caracterizadas, como a albumina humana, adicionada ao final do processo de purificação para auxiliar na estabilização do pFVIII, e o vWF, que é

co-purificado durante o processo de obtenção do pFVIII e está presente na quantidade de cerca 0,6 UI para cada 1 UI do pFVIII (PASI et al., 2004). Entretanto, a maior parte das proteínas plasmáticas co-purificadas durante o processo de obtenção do pFVIII, no caso do Fanhdi[®], bem como seu possível papel na imunogenicidade do FVIII, não está caracterizada. Em um estudo destinado a caracterizar, por espectrometria de massas, as proteínas co-purificadas durante a obtenção de outros produtos comerciais do pFVIII, o Emoclot[®] e o Beriat[®], de perfil eletroforético similar ao Fanhdi[®], foram identificadas algumas destas proteínas co-purificadas, como, por exemplo, fibrinogênio, fibronectina, cadeia pesada da imunoglobulina IgM, entre várias outras (TIMPERIO et al., 2010). No caso do rFVIII-lab, a natureza dos contaminantes encontrados na preparação final, bem como o seu possível papel no perfil de resposta imunológica observado para o rFVIII-lab, são desconhecidos.

Diversos fatores podem ter contribuído para a relativamente baixa atividade específica obtida após a purificação do rFVIII-lab. Um deles pode estar relacionada a maior complexidade, quanto a composição proteica, do meio de partida utilizado para a purificação, devido a utilização de meio de cultivo suplementado com SFB durante o cultivo das células produtoras do rFVIII-lab. Essa alternativa foi adotada devido à produtividade volumétrica dos clones celulares adaptados (H6A e F5) para cultivo celular em suspensão e em meio de cultivo de composição definida ser incompatível com a quantidade de rFVIII-lab necessária para a realização dos ensaios *in vivo*. É consenso na literatura que existe uma grande variabilidade, entre diferentes clones celulares produtores de uma determinada proteína terapêutica, quanto à produtividade obtida após a adaptação ao cultivo em suspensão em meio de cultivo de composição definida (PILBROUGH; MUNRO; GRAY, 2009). Muitas vezes, é necessária a varredura de centenas de clones celulares para a obtenção daqueles que mantenham uma produtividade elevada e estável após o processo de adaptação (JUN et al., 2005). No presente trabalho, apenas dois clones celulares produtores do rFVIII-lab (H6A e F5) foram adaptados ao cultivo em suspensão e em meio de cultura de composição definida, totalmente livre de aditivos de origem animal ou humana. Embora tenham sido demonstradas a obtenção do rFVIII-lab ativo, a diminuição da complexidade da mistura de proteínas contidas no meio de partida e o aumento das densidades celulares durante o cultivo em suspensão e em meio de composição definida, a produtividade volumétrica de rFVIII-lab alcançada ao final do período avaliado permaneceu muito baixa quando a comparada à obtida pelas mesmas populações celulares cultivadas em monocamada aderente e meio de cultura suplementado com 1% de HSA ou 7% de SFB. Provavelmente, seria necessária a adaptação

de um número maior de clones produtores do rFVIII-lab para a obtenção de clones com uma produtividade volumétrica mais elevada e estável.

Outros fatores que podem ter contribuído para a baixa produtividade volumétrica obtida após o processo de adaptação estão relacionados às condições de cultivo em suspensão utilizadas e a necessidade de otimização do meio de cultivo de composição definida para estabilização do rFVIII-lab. Para comparação, os produtos de rFVIII comerciais são produzidos através do cultivo celular em suspensão utilizando biorreatores em processo de perfusão, e meio de cultivo definido, sendo utilizado HSA como estabilizante do rFVIII durante o processo de purificação nos produtos de primeira e segunda geração, com exceção do Recombinate[®] (Baxter), de primeira geração, no qual é utilizado BSA (LEE; BERNTORP; HOOTS, 2011). Já nos produtos de rFVIII de terceira geração não são utilizados aditivos de origem animal ou humana durante os processos de produção e purificação (MANNO, 2003). No presente trabalho, foi utilizado o cultivo em suspensão estacionária e em batelada, atingindo-se densidades celulares de cerca de 3×10^6 células/ml, quando, idealmente, este cultivo deveria ser feito sob agitação em biorreatores em processo de perfusão, e com monitoramento de alguns parâmetros indicativos das condições da cultura, como, por exemplo, consumo de oxigênio e glicose, e produção de amônia e lactato (WERNER et al., 1998). Nessas condições, podem-se atingir densidades celulares da ordem de 10^7 a 10^8 células/ml (CLINCKE et al., 2013), as quais, provavelmente, teriam um grande impacto na produtividade volumétrica e específica do rFVIII-lab. Quanto a necessidade de otimização do meio de cultivo de composição definida, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a configuração do rFVIII produzido em nosso sistema é ativo no meio de cultivo de composição definida Select CHO sem suplementação com albumina. Entretanto, a composição do meio de cultivo definido utilizado deverá ser otimizada através da sua suplementação com fatores que aumentem a estabilidade do rFVIII-lab. Como mencionado anteriormente, a albumina sérica humana ou bovina é um dos fatores conhecidos que estabiliza a atividade do Fator VIII (CHAN; HARRIS, 1998). Entretanto, existe uma tendência, relacionada principalmente a biossegurança, de se evitar o uso de proteínas de origem animal durante o processo de obtenção do rFVIII (FARRUGIA et al., 2002). A albumina plasmática possui várias funções, destacando-se: a) carreamento de ácidos graxos, colesterol, vitaminas lipofílicas, hormônios esteróides e fatores de crescimento; b) ação tamponante; c) regulação da pressão osmótica; e d) ação protetiva contra danos celulares causados por estresses mecânico, como, por exemplo, a tensão de cisalhamento. Desconhecem-se os mecanismos pelos quais a albumina possui um efeito estabilizador sobre

a atividade do FVIII. Especula-se que a albumina proteja proteínas lábeis, como o FVIII, da degradação por proteólise, servindo de substrato para proteases. Outra possibilidade seria a presença de certas impurezas nas preparações comerciais de albumina que poderiam contribuir para o seu efeito estabilizador. Neste sentido, observou-se que lipoproteínas podem substituir a albumina para a produção do rFVIII em meio de cultivo livre de suplementação com soro (CHAN; HARRIS, 1998). Outra possibilidade ainda seria a albumina atuar como fonte de íons sabidamente associados à manutenção da estabilidade do FVIII, já que a albumina é um carreador plasmático importante de alguns íons metálicos divalentes (CHIKVAIDZE, 1988). Íons metálicos divalentes são essenciais para a manutenção da integridade estrutural e da funcionalidade como cofator enzimático do FVIII. Várias evidências experimentais suportam o modelo no qual a associação das subunidades do FVIII, as cadeias leve e pesada, é dependente de íons metálicos divalentes. Algumas destas evidências indicam que o complexo protéico do FVIII é estabilizado por íons cálcio divalentes (MIKAELSSON; FORSMAN; OSWALDSSON, 1983), complexo este que pode ser dissociado pela ação quelante do EDTA, e que pode ser reconstituído, pela reassociação das cadeias leve e pesada, na presença dos íons cálcio e manganês divalentes (FAY, 1988). Além disso, outros íons metálicos divalentes estão associados ao complexo protéico do FVIII, como os íons cobre e zinco, podendo ter um papel na estabilização do complexo (MIKAELSSON; FORSMAN; OSWALDSSON, 1983; SUDHAKAR; FAY, 1998). Espera-se que a suplementação do meio de cultivo definido Select CHO com íons divalentes e inibidores de protease, de forma a suprir as funções naturalmente exercidas pela albumina, levem a um aumento de produtividade do rFVIII-lab em meio de cultivo de composição definida.

Outro fator que pode ter sido determinante para a baixa atividade específica do rFVIII-lab obtida está relacionado ao próprio processo de purificação utilizado em nosso laboratório, principalmente ao fato de não termos utilizado uma etapa baseada em imunoafinidade. A etapa de cromatografia de afinidade à heparina, escolhida com base em sua afinidade pelo FVIII e em resultados positivos descritos na literatura também para purificação de FVIII a partir de plasma humano (KOSOW; BHATTACHARYA; STERNBURG, 1992; SUZUKI; NISHIOKA; HASHIMOTO, 1979), foi utilizada em substituição à etapa de cromatografia de imunoafinidade, frequentemente utilizada, diante de seu elevado custo, além da possibilidade de contaminação do rFVIII-lab purificado com anticorpos monoclonais possivelmente co-eluídos da coluna de imunoafinidade, o que poderia interferir com a caracterização de sua imunogenicidade (KHRENOV et al., 2008). Com base nos resultados descritos no presente trabalho, a etapa de cromatografia de afinidade à heparina teve um rendimento satisfatório,

enriquecendo a atividade específica do rFVIII-lab em cerca de 40 vezes e com uma recuperação de cerca de 69% , ambos em relação a fração eluída da etapa de cromatografia de troca iônica, permitindo a obtenção de uma atividade específica de cerca de 150 UI/mg. Entretanto, nossos dados indicam que seria necessário a introdução de uma ou mais etapas cromatográficas adicionais para a obtenção de uma atividade específica superior a 2000 UI/mg. A etapa de cromatografia de troca aniônica realizada através de colunas *Hitrap Q-sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) foi escolhida como etapa de captura inicial do rFVIII-lab e redução do volume de partida com base em sua elevada eficiência na purificação direta do FVIII e em temperatura ambiente a partir do plasma humano (CHENG et al., 2010). No entanto, os resultados descritos para a purificação do rFVIII-lab indicam que, apesar do fator de purificação ter sido de cerca de 25 vezes, com uma redução de volume de cerca de 6 vezes em relação ao volume de partida inicial, a atividade específica obtida (~3,7 UI/mg) foi baixa após a realização dessa etapa. Dados preliminares obtidos em nosso laboratório indicam que a utilização da etapa de cromatografia de afinidade a heparina isoladamente seria suficiente para a obtenção do rFVIII-lab com a mesma atividade específica, cerca de 150 UI/mg, e com o mesmo fator de purificação, cerca de 1.000 vezes, daqueles obtidos quando se associa as etapas de cromatografia de troca iônica e de afinidade a heparina. Além disso, a redução de volume obtida após a cromatografia de troca iônica foi praticamente perdida devido à necessidade de diluição (3X) das frações de eluição da cromatografia de troca iônica previamente ao acoplamento à etapa de cromatografia de afinidade a heparina, apesar da elevada concentração salina nessas frações contribuir para a manutenção da atividade do rFVIII-lab (LEE; HRINDA, 1997). Esses dados indicam que a etapa de cromatografia de troca iônica poderia ser eliminada do processo, utilizando-se a própria etapa de cromatografia de afinidade a heparina como a etapa de captura e redução do volume inicial. Com a eliminação da etapa de cromatografia de troca iônica, poderia se incluir, após a etapa de cromatografia de afinidade a heparina, uma etapa cromatográfica multimodal, que explorasse a capacidade da ligação do rFVIII-lab via outras interações além da iônica, como via pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e/ou tiofílicas, mesmo na presença de elevada concentração salina. Essa modalidade cromatográfica foi proposta na literatura para purificação do rFVIII como alternativa a cromatografia de imunoafinidade, possibilitando a obtenção de uma atividade específica superior a 4.000 UI/mg, partindo-se de preparações com uma pureza intermediária do rFVIII, com atividade específica de cerca de 100 UI/mg (BANG; THIM; KARLSSON, 2010).

Aspectos relacionados à formulação do rFVIII-lab

Além da presença de impurezas no rFVIII-lab purificado, estabilizantes contidos na solução de formulação do rFVIII podem maximizar a resposta imunológica e a formação de inibidores. As novas gerações de produtos biológicos, incluindo o Kogenate FS[®], não apresentam HSA nem outros aditivos de origem animal para estabilização e manutenção da atividade do FVIII na solução de formulação final, sendo utilizados polissorbato 80, glicina e sacarose/ trealose, também utilizados na formulação de outras proteínas terapêuticas (FALCONAR, 2012). No entanto, o polissorbato 80 utilizado, cujo efeito adjuvante é inclusive explorado no desenvolvimento de vacinas, já foi relacionado ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes nos pacientes tratados com eritropoetina recombinante, inclusive neutralizando a eritropoetina endógena desses pacientes (BRINKS et al., 2011; SHARMA, 2007). Considerando o potencial efeito do polissorbato 80 e outros componentes da formulação na indução da resposta imunológica ao rFVIII, a formulação do rFVIII-lab foi realizada em solução semelhante à descrita pelo fabricante do Kogenate FS[®], utilizado como produto de referência nesse trabalho.

Aspectos relacionados à função do rFVIII-lab

Compostos ou mediadores químicos derivados do hospedeiro, e produzidos durante o processo inflamatório induzido por infecção ou lesão tecidual atuam como adjuvantes naturais, produzindo sinais que conferem especificidade à resposta imunológica e previnem a autoimunidade (MEDZHITOV, 2008). A ativação da cascata de coagulação sanguínea, e a consequente produção de trombina, podem criar um contexto pró-inflamatório e, desta forma, gerar os sinais suficientes para estimular uma resposta imunológica (ESMON, 2004). Com base nessas evidências, postulou-se que a imunogenicidade do FVIII poderia estar relacionada, pelo menos em parte, a sua função de potencializar a via intrínseca da cascata da coagulação sanguínea durante uma resposta hemostática, e, assim, gerar o contexto inflamatório necessário para a indução de uma resposta imunológica ao FVIII. Segundo essa hipótese, a combinação da própria presença do FVIII, uma proteína para a qual a tolerância central pode não ter sido completamente induzida em parte dos pacientes portadores da hemofilia severa, e o sinal de co-estimulação desencadeada pela ação da trombina, induziriam a formação de anticorpos inibidores do FVIII (SKUPSKY et al., 2009). Para avaliar essa hipótese Skupsky e colaboradores estudaram a imunogenicidade do FVIII humano

desnaturado por calor em camundongos hemofílicos, e verificaram que a forma desnaturada é menos imunogênica que a forma nativa. Além disso, Skupsky e colaboradores observaram uma diminuição da resposta de linfócitos T e formação de anticorpos contra o FVIII em camundongos hemofílicos tratados com o anticoagulante varfarina ou o inibidor da trombina hirudina 4 (SKUPSKY et al., 2009). Assim, seria possível que a funcionalidade diferencial de um variante do rFVIII maximizasse a formação de inibidores do FVIII. No entanto, em um trabalho mais recente, questionando tais achados, foi demonstrado, através da avaliação da imunogenicidade de variantes inativos do FVIII, que os principais componentes relacionados à imunogenicidade do FVIII seriam fatores intrínsecos de sua estrutura e a sua disponibilidade no plasma associada ao fator de von Willebrand (vWF) (MEEKS et al., 2012). De acordo com esse trabalho, o mecanismo de degradação do FVIII associado ao vWF na circulação sanguínea seria realizado através de macrófagos localizados no baço, prevenindo a captação do FVIII pelas células apresentadoras de antígenos, embora também sejam descritos outros mecanismos de degradação do FVIII independentes de sua associação ao vWF que não envolveriam a apresentação de antígenos (MEEKS et al., 2012). Além desse, outro trabalho também suporta a hipótese de que a associação do FVIII ao vWF seria capaz de prevenir sua captação pelas células apresentadoras de antígenos, sugerindo também que o aumento da meia-vida do FVIII devido à sua associação ao vWF poderia aumentar seu tempo de contato com células B tolerogênicas localizadas na zona marginal do baço (DELIGNAT et al., 2012). Como essa questão da possível relação da atividade do FVIII e sua imunogenicidade permanece em aberto, buscou-se avaliar a atividade *in vivo* e *ex-vivo* do rFVIII-lab em relação a produtos anti-hemofilia de referência. Assim, foram estabelecidos no laboratório ensaios funcionais de atividade *in vivo* e *ex-vivo* do FVIII, utilizando para isso o modelo murino geneticamente modificado de hemofilia A descrito anteriormente (BI et al., 1995). Esse modelo, juntamente com um gerado a partir da disrupção do éxon 17, são amplamente utilizados na avaliação de eficácia de novas terapias de FVIII em estudos pré-clínicos (OVLISEN; KRISTENSEN; TRANHOLM, 2008; SAINT-REMY; REIPERT; MONROE, 2012).

Durante o processo de estabelecimento do ensaio para avaliação da atividade *in vivo* do FVIII associada à reposta hemostática constatamos que diversas configurações de ensaios já haviam sido descritas na literatura utilizando o modelo murino de hemofilia A. Entre eles, um dos mais utilizados baseia-se na indução do evento hemorrágico através da transecção da extremidade da cauda dos animais, podendo a avaliação de hemostasia ser realizada através de diferentes alternativas de desfechos experimentais, como a estimativa do volume perdido

de sangue (MILANOV et al., 2012), tempo de sangramento (CERULLO et al., 2007; DEJANA et al., 1979) e taxa de sobrevivência (PARKER; LOLLAR, 2003; SHI et al., 2006). Dois ensaios alternativos ao modelo envolvendo a transecção da cauda, mas também baseados na transecção de vasos sanguíneos, já foram propostos. O primeiro é baseado na remoção da cutícula do dígito médio da pata do animal hemofílico e avaliação da resposta hemostática através da determinação do tempo médio de sangramento e da taxa de sobrevivência após oito horas da indução do evento hemorrágico, sendo pouco utilizado (YAROVOI et al., 2003). O segundo, recentemente descrito, propõe a realização de incisões na veia safena e determinação da resposta hemostática através da determinação dos eventos de formação de coágulo, e, adicionalmente, determinação dos tempos médio e máximo de sangramento (PASTOFT et al., 2012). Outros ensaios descritos se baseiam em modelos de lesão intravascular, tais como em vasos do músculo cremáster utilizando laser (MILANOV et al., 2012; NEYMAN; GEWIRTZ; PONCZ, 2008) ou na carótida utilizando FeCl_3 (BAUMGARTNER et al., 2010; MØLLER; TRANHOLM, 2010; YAROVOI et al., 2003), ambos originalmente propostos para a avaliação de trombozes vasculares, e eficazmente aplicados no campo da hemofilia.

A diversidade de ensaios propostos para a caracterização *in vivo* de terapias anti-hemofílicas reflete tanto a complexidade de se reproduzir todos os aspectos clínicos da hemofilia no modelo murino, como a incerteza relacionada ao valor preditivo destes ensaios na resposta hemostática em humanos (GREENE et al., 2010; SAINT-REMY; REIPERT; MONROE, 2012).

Algumas razões nos fizeram optar pelo ensaio de transecção da cauda envolvendo a interrupção completa de sangramento como desfecho experimental. Uma delas se deve ao fato desse ensaio de resposta hemostática ser um dos mais utilizados, o que, a princípio, facilitaria a contextualização dos nossos resultados. Além disso, não é necessária a utilização de nenhum equipamento sofisticado para a realização desse ensaio. E por último, o ensaio de transecção da cauda, utilizando como desfecho experimental a interrupção completa do sangramento, é único entre os vários modelos descritos na literatura para avaliação de uma resposta hemostática completa e persistente associada à formação de um coágulo estável. O ensaio de transecção da cauda envolve a transecção da artéria central e duas veias laterais da cauda (Mackman, 2004) e, desta forma, mimetiza uma cirurgia de médio a grande porte, considerando o risco de perda de grande volume sanguíneo. Adicionalmente, esse ensaio pode ser utilizado no monitoramento do sangramento imediato e contínuo, bem como de eventos de sangramento tardio, os quais são características marcantes da hemofilia severa (SAHU et al., 2011). Nesse sentido, a avaliação da resposta hemostática obtida através do ensaio de

transecção da cauda complementa os dados obtidos a partir dos ensaios funcionais *in vivo* de avaliação da resposta hemostática aguda em vasos de grande calibre, como o modelo envolvendo a lesão química com cloreto férrico da artéria carótida, ou na microvasculatura, como o modelo envolvendo a lesão térmica a laser do músculo cremaster, ambos descritos acima.

No entanto, diversas diferenças relativas à realização do ensaio de transecção da cauda resultam em baixa reprodutibilidade interlaboratorial, além da dificuldade de utilizar este método para determinações quantitativas da resposta hemostática, incluindo a obtenção de curvas de dose-resposta comparativas, necessárias para a avaliação de eficácia relativa ou de não inferioridade em estudos utilizando novas terapias de reposição do FVIII (GREENE et al., 2010; OVLISEN; KRISTENSEN; TRANHOLM, 2008; SAINT-REMY; REIPERT; MONROE, 2012). Nesse contexto, Parker e Lollar propuseram modificações ao ensaio baseado na transecção da cauda a fim de agravar o desafio hemostático e torná-lo mais letal aos animais hemofílicos, assim nitidamente diferenciando o fenótipo hemofílico do selvagem e permitindo uma avaliação quantitativa da eficácia de novas terapias de FVIII (PARKER; LOLLAR, 2003). A caracterização quantitativa da resposta hemostática através da determinação da taxa de sobrevivência dos animais hemofílicos utilizando a configuração do ensaio proposta por Parker e Lollar tem sido adotada por outros grupos para a avaliação da eficácia *in vivo* de terapias anti-hemofílicas (PAN et al., 2009; SHI et al., 2006; XU et al., 2009; YADAV et al., 2009, 2010). Entretanto, a utilização dos animais modelo da hemofilia A nesse ensaio, envolvendo a possibilidade de sangramento descontrolado e óbito desses animais por choque hipovolêmico é eticamente questionável (WALLACE, 2000). Desfechos experimentais alternativos, envolvendo a adoção de limites experimentais humanamente aceitáveis (*humane endpoints*), foram propostos na literatura para o ensaio de transecção da cauda. Os mais comuns envolvem estimativas indiretas da perda sanguínea por um período de tempo determinado, geralmente entre 10 e 30 minutos, através, por exemplo, da medida de perda de massa corpórea ou imersão da cauda transectada em solução salina e medida espectrofotométrica da quantidade de hemoglobina (ALJAMALI et al., 2008; DUMONT et al., 2012; KREN et al., 2009; MILANOV et al., 2012). Embora exista uma correlação entre a perda de sangue por um período determinado e a sobrevivência ao evento hemorrágico, a primeira classe de desfecho está mais sujeita a ser influenciada por eventos relacionados às fases iniciais da resposta hemostática, como a formação do tampão plaquetário primário, de natureza instável, e a vasoconstrição, o que pode limitar a capacidade do ensaio de avaliar propriedades funcionais importantes de determinada terapia anti-hemofílica. Já o ensaio de

sobrevivência, por outro lado, está mais relacionado a uma resposta hemostática persistente, a qual é dependente da formação de malha de fibrina e estabilização do coágulo, processos estes dependentes da atividade dos fatores da coagulação (MONROE; HOFFMAN, 2006). Neste sentido, o ensaio de sobrevivência é mais rigoroso para se avaliar se uma determinada terapia anti-hemofílica é capaz de promover uma resposta hemostática permanente, e prevenir a perda de sangue contínua e eventos de sangramento tardios, os quais são traços característicos da hemofilia severa (SAHU et al., 2011).

Com base nessas considerações, o ensaio baseado na indução do evento hemorrágico através da transecção da extremidade da cauda foi adaptado em nosso laboratório utilizando produtos de referência, e buscando uma avaliação quantitativa da hemostasia que envolvesse um desfecho experimental mais humanizado do que a alternativa encontrada por Parker e Lollar. Nesse sentido, basicamente duas modificações principais foram introduzidas no protocolo descrito por Parker e Lollar para que a resposta hemostática fosse avaliada através da formação de um coágulo estável e observação da interrupção do sangramento. A primeira consistiu na amenização do desafio hemostático através de algumas alterações dos procedimentos utilizados no protocolo original para maximizar o desafio hemostático, conforme descrito em Resultados. Após a introdução dessa modificação, foram utilizados, inicialmente, intervalos curtos de experimentação, como 10 min, e depois 30 min, para a avaliação da interrupção do sangramento após a transecção da cauda, sendo que não foi observada a formação de um coágulo estável e interrupção do sangramento, mesmo utilizando-se doses de até 300 UI/kg. Esse intervalo foi ampliado para 180 min de avaliação, sendo ao final padronizado para 120 min (dados não mostrados). A segunda modificação introduzida por nosso grupo incluiu o registro do sangramento em intervalos de 15 min, de maneira a não prejudicar a formação do coágulo. Uma desvantagem relacionada ao registro de sangramento em intervalos de 15 min seria a imprecisão da determinação do tempo de sangramento. No entanto, o tempo de sangramento é um dos parâmetros que apresentam maior variabilidade nos ensaios baseados na transecção da cauda, limitando o seu valor como parâmetro quantitativo da resposta hemostática (Greene et al., 2010).

A introdução de tais modificações no ensaio de transecção da cauda permitiu a diferenciação entre o fenótipo hemofílico e o selvagem por meio de uma alternativa mais humanizada que a descrita por Parker e Lollar, sendo válido ressaltar que o sangramento observado nos animais hemofílicos, tratados com veículo ou com doses insuficientes de FVIII para o restabelecimento da hemostasia, e interrompido aos 120 min, é brando e não compromete o bem-estar ou atividade normal desses animais. Parte dos animais, cauterizados

ou não, foram monitorados por até 24 horas após a experimentação, e não apresentaram indicadores comportamentais de dor, como, por exemplo, diminuição da atividade exploratória, comportamento agressivo ou comportamento excessivo de lambar ou coçar o ferimento. Adicionalmente, não foram observados sangramentos tardios durante esse monitoramento de 24 horas após a experimentação.

Foi possível observar a interrupção do sangramento em até 120 min nos animais hemofílicos tratados com diversas doses dos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fahndi[®], caracterizando a correção do fenótipo hemofílico nesses animais. A concentração plasmática mínima de pFVIII (Fahndi[®]), determinada 10 min após sua administração, associada a dose mínima para observação da interrupção do evento hemorrágico foi de cerca de 10% daquela observada nos animais selvagens. Aparentemente, essa é a concentração plasmática limite do pFVIII para a observação da correção do fenótipo hemofílico com essa configuração de ensaio utilizado, considerando que a meia-vida plasmática do pFVIII é de cerca de 12 horas (TARANTINO et al., 2004), tempo bem superior ao período de observação do nosso ensaio (duas horas). No caso do Kogenate FS[®] não foi possível fazer essa determinação, pois não foi detectada atividade plasmática do rFVIII associada a dose de 1,25 UI/kg, que foi a dose mínima para observação da interrupção do evento hemorrágico. Provavelmente, deve ser um valor inferior a 6% daquela observada nos animais selvagens, já que este valor médio de atividade plasmática foi obtido com a dose de 5UI/kg, sendo esta a dose mínima de FVIII observada nesse trabalho como capaz de disponibilizar atividade plasmática mensurável de FVIII através do ensaio colorimétrico de atividade *in vitro* utilizado, conforme também observado em outro trabalho descrito na literatura (PASTOFT et al., 2012). No geral, o nosso ensaio modificado permitiu a detecção da conversão do fenótipo grave encontrado nos animais hemofílicos, contendo menos de 1% de atividade de FVIII no plasma, ao fenótipo hemofílico moderado, contendo entre 6 e 30% de atividade de FVIII no plasma, e ao fenótipo observado nos animais selvagens, contendo cerca de 100% de atividade de FVIII no plasma. A dose de FVIII estimada para observação da correção do fenótipo hemofílico em 99% dos animais avaliados foi de 100 UI/kg tanto para o Fahndi[®] como para o Kogenate FS[®], o que correspondeu a cerca de 110% da atividade de FVIII encontrada no plasma dos animais selvagens. Para comparação, doses entre 20 e 40 UI/Kg de FVIII são indicadas para o tratamento profilático dos pacientes hemofílicos, sendo a dose de 50 UI/kg, empiricamente estimada para a reposição de cerca de 100% da atividade de FVIII encontrada no plasma de indivíduos saudáveis, indicada em casos de hemorragias severas ou previamente à cirurgias de

grande porte (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2000; GRIFOLS BIOLOGICALS INC., 2007).

De forma geral, os nossos dados indicam que as modificações introduzidas no ensaio de sobrevivência proposto por Parker e Lollar permitiram a utilização de um desfecho experimental envolvendo a interrupção do evento hemorrágico e formação de um coágulo estável em até 120 min após a transecção da cauda, o qual poderia ser utilizado em substituição aos desfechos experimentais baseados na quantificação da perda de sangue ou da taxa de sobrevivência dos animais. Esses dados descrevendo a otimização desse protocolo alternativo serão submetidos à publicação em breve.

Os valores de ED₅₀ obtidos por regressão logística foram de 10,69 UI/Kg (95% intervalo de confiança: -26,44 a 29,583) para o Kogenate FS[®] e de 32,82 UI/Kg (95% intervalo de confiança: 16,090 a 52,954) para o Fanhdi[®]. Ambos os valores de ED₅₀ estimados foram menores do que o valor de ED₅₀ de 58 UI/kg descrito por Parker e Lollar para um variante do rFVIII, contendo a deleção do domínio B, o que pode refletir a menor severidade do desafio hemostático utilizando nosso protocolo modificado. Além disso, o valor de ED₅₀ obtido em nossa análise para o Kogenate FS[®] foi ligeiramente inferior ao ED₅₀ de 21 UI/kg descrito por Pan e colaboradores para o mesmo produto, o qual foi estimado através da transecção da veia caudal lateral e utilizando a sobrevivência ao evento hemorrágico como desfecho experimental (PAN et al., 2009). As curvas de dose-resposta obtidas por regressão logística para os produtos de referência foram comparadas através do teste de Wald. Através dessa análise, o efeito do tratamento com Kogenate FS[®] na correção do fenótipo hemofílico foi estatisticamente diferenciado do efeito do tratamento com Fanhdi[®] (P<0.001).

Desconhecem-se as razões para a detecção dessa diferença e o seu significado quando se considera as características funcionais desses dois produtos em humanos. Não encontramos comparações quantitativas similares entre esses dois produtos no modelo murino descritas na literatura. A única caracterização funcional *in vivo* comparativa que encontramos na literatura entre o pFVIII, nesse caso purificado por imunoafinidade a partir de um concentrado comercial, e o rFVIII selvagem foi realizada no modelo canino de hemofilia (cães hemofílicos da raça mini schnauzer), onde foram avaliados parâmetros farmacocinéticos, e funcionais, através da determinação do tempo de sangramento após indução de uma lesão na cutícula do dígito médio da pata do animal hemofílico para avaliação da resposta hemostática (GILES et al., 1988). Segundo esse estudo, os dois produtos promoveram a correção do tempo de sangramento dos animais avaliados, embora não tenha sido realizada uma análise quantitativa relativa entre os mesmos. Também não foram encontradas diferenças entre os dois produtos

quanto aos parâmetros farmacocinéticos avaliados (GILES et al., 1988). Em estudos clínicos, demonstrou-se que a atividade biológica e eficácia do Kogenate[®], de primeira geração, ou do Kogenate FS[®], de segunda geração, são comparáveis àsquelas do FVIII derivado de plasma (GIANGRANDE, 2002; SEREMETIS et al., 1999). No geral, os parâmetros farmacocinéticos também são similares, a não ser por pequenas diferenças no volume de distribuição em estado de equilíbrio, tempo de meia-vida de eliminação, taxa de depuração e taxa de recuperação incremental *in vivo* após 10 minutos da administração ao pFVIII, onde o desempenho do Kogenate[®] foi levemente superior ao pFVIII (SCHWARTZ et al., 1990). O único parâmetro farmacocinético obtido em nosso estudo, avaliado até o momento de maneira parcial, foi a taxa de recuperação inicial incremental *in vivo* após 10 minutos da administração, sendo que, aparentemente, não há diferenças entre o Kogenate FS[®] e o Fahndi[®]. Como a nossa avaliação funcional quantitativa *in vivo* é realizada em um relativamente curto espaço de tempo (duas horas) é pouco provável que a diferença nos ED₅₀ do Kogenate FS[®] e o Fahndi[®] seja devido a essas diferenças farmacocinéticas entre os dois produtos. Considerando ainda o curto espaço de tempo em que nosso ensaio é realizado, talvez essa diferença detectada nos ED₅₀ reflita alguma diferença nos mecanismos de absorção e distribuição tecidual iniciais desses dois produtos, sendo que, essas possíveis diferenças provavelmente não apresentam implicações importantes nos parâmetros farmacocinéticos clássicos, eficácia biológica e prática clínica no manejo da hemofilia em humanos. Neste sentido, nosso exemplo ilustra a dificuldade de se determinar o valor preditivo de eventuais diferenças funcionais encontradas no modelo murino para a resposta encontrada em pacientes, e ressalta a importância de se realizar a análise funcional *in vivo* utilizando vários modelos complementares.

A atividade funcional *in vivo* do rFVIII-lab produzido e parcialmente purificado no laboratório, foi demonstrada através da correção do fenótipo hemofílico nos animais tratados com doses de 5, 25 e 50 UI/kg, sendo que, até o momento, não foi realizada a análise quantitativa comparativa frente aos produtos de referência Kogenate FS[®] e Fahndi[®], devido ao número de animais e de doses do rFVIII-lab avaliados até o momento serem insuficientes para se realizar a regressão logística. Apesar de preliminares, esses resultados sugerem que o rFVIII-lab apresenta funcionalidade *in vivo* similar aos produtos de referência.

Considerações finais

Os dados obtidos no presente trabalho indicam uma resposta imunológica menos intensa associada ao rFVIII-lab em relação aos produtos de referência avaliados. Seria muito

interessante se essa resposta imunológica diferencial estivesse relacionada a alguma particularidade estrutural desse variante artificial do rFVIII utilizado no laboratório, como, por exemplo, a sua menor heterogeneidade estrutural quando comparada àquela do FVIII selvagem derivado de plasma ou recombinante (JANKOWSKI et al., 2007). Também seria muito estimulante se estes dados pudessem ser reproduzidos em outros modelos animais, como o canino. Entretanto, ainda não podemos descartar a possibilidade de a menor intensidade de indução de resposta imunológica ao rFVIII-lab quando comparada à produtos de referência no modelo murino de hemofilia A ser devido à avaliação ter sido feita com o rFVIII-lab parcialmente purificado. Nesse sentido, seria necessário averiguar o perfil de imunogenicidade ao rFVIII-lab previamente caracterizado quanto a presença de agregados e obtido com grau de pureza próximo à produtos de referência, paralelamente à caracterização do perfil de glicosilação do rFVIII-lab, permitindo, assim, uma avaliação da indução de resposta imunológica ao rFVIII-lab mais adequada, sustentada pela caracterização dos principais fatores relacionados à sua imunogenicidade.

6 CONCLUSÕES

Purificação do fator VIII recombinante

O processo estabelecido no laboratório para a purificação do variante artificial do fator VIII humano recombinante produzido no laboratório foi eficiente na obtenção de fator VIII ativo, embora a purificação do fator VIII tenha sido realizada parcialmente, apresentando atividade específica de 130 unidades internacionais por miligrama de proteína, valor considerado intermediário quando comparado à atividade específica dos produtos comerciais de referência (fator VIII derivado de plasma e fator VIII recombinante);

Caracterização da atividade funcional in vivo do fator VIII recombinante

O ensaio e os parâmetros de análise propostos para a caracterização da atividade funcional *in vivo* do fator VIII no modelo murino de hemofilia A, baseados na interrupção de um evento hemorrágico induzido nesses animais, foram adequados para avaliar quantitativamente a eficácia de produtos anti-hemofílicos comerciais;

A atividade funcional *in vivo* do variante artificial do fator VIII humano recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório, avaliada no modelo murino de hemofilia A, utilizando camundongos nocaute para o gene *Fviii*, foi similar àquela averiguada para os produtos comerciais de referência;

Caracterização da imunogenicidade do fator VIII recombinante

A indução de resposta imunológica ao variante artificial do fator VIII humano recombinante produzido e parcialmente purificado no laboratório, avaliada no modelo murino de hemofilia A, foi menos intensa quando comparada aos produtos comerciais de referência, formando menos anticorpos totais anti-fator VIII assim como anticorpos inibidores da atividade do fator VIII no plasma dos animais previamente submetidos ao regime de imunização.

7 PERSPECTIVAS

As perspectivas futuras do trabalho incluem a caracterização da atividade funcional e de imunogenicidade utilizando o rFVIII-lab com grau de pureza próximo ao recomendado pelas farmacopéias. Além disso, a caracterização de fatores potencialmente relacionados à indução de resposta imunológica ao FVIII e que poderiam influenciar na menor imunogenicidade observada para o rFVIII-lab neste estudo quando comparada aos produtos comerciais de referência, como seu estado de agregação e perfil de glicosilação, idealmente deveria ser realizada. Ademais, buscando fundamentar a produção em plataforma industrial do variante artificial rFVIII-lab, outros ensaios além dos de caracterização preliminar da eficácia e segurança do rFVIII-lab, envolvendo a caracterização farmacocinética e farmacodinâmica do rFVIII-lab, poderiam ser empregados utilizando o modelo murino de hemofilia A previamente à utilização de outros modelos animais nos estudos pré-clínicos e/ou início de estudos clínicos de fase I.

REFERÊNCIAS ³

ABSHIRE, T.; KENET, G. Recombinant factor VIIa: review of efficacy, dosing regimens and safety in patients with congenital and acquired factor VIII or IX inhibitors. **J. Thromb. Haemost.**, v. 2, n. 6, p. 899-909, jun. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 24 fev. 2013.

ALEDORT, L. M. Is the incidence and prevalence of inhibitors greater with recombinant products? Yes. **J. Thromb. Haemost.**, v. 2, n. 6, p. 861-862, jun. 2004.

ALEDORT, L. M.; NAVICKIS, R. J.; WILKES, M. M. Can B-domain deletion alter the immunogenicity of recombinant factor VIII? A meta-analysis of prospective clinical studies. **J. Thromb. Haemost.**, v. 9, n. 11, p. 2180-2192, nov. 2011.

ALJAMALI, M. N. et al. Long-term expression of murine activated factor VII is safe , but elevated levels cause premature mortality. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 5, p. 1825-1834, 2008.

ALLAIN, J. Dose requirement for replacement therapy in hemophilia A. **Thromb. Haemost.**, v. 42, n. 3, p. 825-831, 1979.

ARNOUT, J.; HOYLAERTS, M. F.; LIJNEN, H. R. Haemostasis. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 176, n. 176, p. 1-41, jan. 2006.

ARONOVICH, A. et al. Correction of hemophilia as a proof of concept for treatment of monogenic diseases by fetal spleen transplantation. **Proc. Natl. Acad. Sci . U. S . A.**, v. 103, n. 50, p. 19075-19080, 12 dez. 2006.

BAKER, M. P. et al. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. **Self Nonsself**, v. 1, n. 4, p. 314-322, jan. 2010.

BANG, S.; THIM, L.; KARLSSON, J. **Purification of factor VIII using a mixed-mode or multimodal resin**, 2010.

BARBOSA, M. D. F. S. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. **Drug Discov. Today**, v. 16, n. 7-8, p. 345-353, abr. 2011.

BARROWCLIFFE, T. W. et al. **The certification of a European Reference Plasma for Factor VIII**. Bélgica: [s.n.].

BAUMGARTNER, B. et al. Optimization, refinement and reduction of murine in vivo experiments to assess therapeutic approaches for haemophilia A. **Lab. Anim.**, v. 44, n. 3, p. 211-217, jul. 2010.

³ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAXTER BIOSCIENCE. **Assessment of immunogenicity in preclinical development.** Munich: [s.n.].

BAXTER S.A. Recombinate Antihemophilic factor. **Summary of product characteristics**, p. 1-11, 2011.

BAYER HEALTHCARE LLC. **Kogenate® FS Recombinant Antihemophilic Factor.** Disponível em: <<http://www.drugs.com/pro/kogenate-fs.html>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

BD BIOSCIENCES. **BD Select CD1000 Medium Adaptation Protocol.** Disponível em: <http://www.bdbiosciences.com/documents/select_cd1000_adaptproto.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2013.

BERGER, M.; KAUP, M.; BLANCHARD, V. Protein Glycosylation and Its Impact on Biotechnology. In: **Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture.** Berlin: Springer, 2012. p. 1-21.

BERNTORP, E. Second generation, B-domain deleted recombinant factor VIII. **Thromb. Haemost.**, v. 78, n. 1, p. 256-260, jul. 1997.

BERNTORP, E.; FISCHER, K.; MINERS, A. Models of prophylaxis. **Haemophilia**, v. 18, n. 4, p. 136-140, jul. 2012.

BI, L. et al. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. **Nat. Genet.**, v. 10, n. 1, p. 119-121, maio. 1995.

BOEDEKER, B. G. Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 27, n. 4, p. 385-394, ago. 2001.

BÖHM, E. et al. Expression of recombinant human coagulation factors VII (rFVII) and IX (rFIX) in various cell types, glycosylation analysis, and pharmacokinetic comparison. **BMC. Proc.**, v. 5, n. 8, p. 23, 22 nov. 2011.

BOHNE, J.; CATHOMEN, T. Genotoxicity in gene therapy: an account of vector integration and designer nucleases. **Curr. Opin. Mol. Ther.**, v. 10, n. 3, p. 214-223, jun. 2008.

BOIS-REYMOND, E. DU. The limits of our knowledge of nature. **Popular Science Monthly**, v. 5, p. 17-32, 1874.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 7 maio. 1976.

BRAY GL, KRONER BL, A. S. Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. **Am. J. Hematol.**, v. 42, n. 4, p. 375-379, 1993.

BRIL, W. S. et al. Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. **Thromb. Haemost.**, v. 95, n. 2, p. 341-347, fev. 2006.

BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. et al. Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 12, p. 8633-8640, 24 mar. 2000.

BRINKS, V. et al. Quality of original and biosimilar epoetin products. **Pharm Res.**, v. 28, n. 2, p. 386-393, fev. 2011.

BURNOUF, T. Recombinant plasma proteins. **Vox Sang**, v. 100, n. 1, p. 68-83, jan. 2011.

BURTON, M. et al. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 22, p. 1-6, 1999.

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

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Hemoderivados**. Rio de Janeiro: [s.n.].

CERULLO, V. et al. Correction of murine hemophilia A and immunological differences of factor VIII variants delivered by helper-dependent adenoviral vectors. **Mol. Ther.**, v. 15, n. 12, p. 2080-2087, dez. 2007.

CHAN, S.-Y.; HARRIS, K. **Preparation of recombinant Factor VIII in a protein free medium**, 1998.

CHEN, C. et al. The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines. **Thromb. Res.**, v. 95, n. 2, p. 105-115, jul. 1999.

CHEN, L. et al. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. **Mol. Ther.**, v. 15, n. 10, p. 1856-1862, out. 2007.

CHENG, E. et al. Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. **Biotechnol Lett.**, v. 32, n. 9, p. 1207-1214, set. 2010.

CHIKVAIDZE, E. N. Interaction of divalent metal ions with human serum albumin. **Biofizika**, v. 33, n. 4, p. 723-725, 1988.

CHORBA, T. L. et al. Changes in longevity and causes of death among persons with hemophilia A. **Am. J. Hematol.**, v. 45, n. 2, p. 112-121, fev. 1994.

CHRISTIANSEN, M. L. S. et al. Functional characteristics of N8, a new recombinant FVIII. **Haemophilia**, v. 16, n. 6, p. 878-887, nov. 2010.

CLINCKE, M.-F. et al. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactorTM- Part I. effect of the cell density on the process. **Biotechnol. Prog.**, v. 29, n. 3, p. 754-767, 22 fev. 2013.

COORDENAÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Relatório de Gestão 2008**. Brasília: [s.n.].

D'AMICI, G. M. et al. Recombinant clotting factor VIII concentrates: Heterogeneity and high-purity evaluation. **Electrophoresis**, v. 31, n. 16, p. 2730-2739, ago. 2010.

DASGUPTA, S. et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 610-612, 15 jan. 2007.

DASGUPTA, S. et al. Immune response against therapeutic factor VIII in hemophilia A patients: a survey of probable risk factors. **Immunol. Lett.**, v. 110, n. 1, p. 23-28, 15 maio. 2007.

DEJANA, E. et al. Bleeding time in laboratory animals: a comparison of different assay conditions in rats. **Thromb. Res.**, v. 15, n. 1-2, p. 191-197, jan. 1979.

DEJANA, E.; VILLA, S.; DE GAETANO, G. Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. **Thromb Haemost.**, v. 48, n. 1, p. 108-111, 24 ago. 1982.

DELIGNAT, S. et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. **Haematologica**, v. 92, n. 10, p. 1423-1426, out. 2007.

DELIGNAT, S. et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. **Haemophilia**, v. 18, n. 2, p. 248-254, mar. 2012.

DEROUAZI, M. et al. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 340, n. 4, p. 1069-1077, 24 fev. 2006.

DI MINNO, G. et al. Longer-acting factor VIII to overcome limitations in haemophilia management: the PEGylated liposomes formulation issue. **Haemophilia**, v. 16, n. 1, p. 2-6, jan. 2010.

DUMONT, J. A. 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, 29 mar. 2012.

EBBERS, H. C. et al. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 12, p. 1186-1190, dez. 2012.

EHRENFORTH, S. et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. **Lancet**, v. 339, n. 8793, p. 594-598, mar. 1992.

ELDER, B.; LAKICH, D.; GITSCHIER, J. Sequence of the murine factor VIII cDNA. **Genomics**, v. 16, n. 2, p. 374-379, maio. 1993.

ESMON, C. T. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. **Trends. Immunol.**, v. 25, n. 10, p. 536-542, out. 2004.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Kogenate Bayer**. [s.l: s.n.]. p. 1-226

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins**. Londres: [s.n.].

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the clinical investigation of recombinant and plasma-derived factor VIII products**. London: [s.n.].

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ReFacto AF. **Assessment report**, n. 55167, p. 1-70, 2009.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Human coagulation factor VIII (rDNA)**. Strasbourg: [s.n.].

EVANS, G. D. et al. Development of autoantibodies and factor VIII inhibitor in an HIV-infected haemophiliac following treatment with combination anti-retroviral therapy. **Br. J. Haematol.**, v. 102, n. 5, p. 1382-1383, set. 1998.

EVATT, B. L. The AIDS epidemic in haemophilia patients II: pursuing absolute viral safety of clotting factor concentrates 1985-1988. **Haemophilia**, v. 18, n. 5, p. 649-654, set. 2012.

FALCONAR, R. Therapeutic protein stability and formulation. In: **Biopharmaceutical Production Technology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012. p. 944.

FANG, H.; WANG, L.; WANG, H. The protein structure and effect of factor VIII. **Thromb. Res.**, v. 119, n. 1, p. 1-13, jan. 2007.

FARNDALE, R. W. et al. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 2, n. 4, p. 561-573, abr. 2004.

FARNDALE, R. W. Collagen-induced platelet activation. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, n. 2, p. 162-165, 2006.

FARR, A. D. Treatment of haemophilia by transfusion: the first recorded case. **J. R. Soc. Med.**, v. 74, n. 4, p. 301-305, abr. 1981.

FARRUGIA, A. et al. Evolving perspectives in product safety for haemophilia. **Haemophilia**, v. 8, n. 3, p. 236-243, 2002.

FAY, P. J. Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 262, n. 2, p. 525-531, 1988.

FINNEY, D. J. **Statistical Method in Biological Assay**. London: Griffin & Company LTD, 1978. p. 1-508

FISCHER, K. et al. Models for prediction of factor VIII half-life in severe haemophiliacs: distinct approaches for blood group O and non-O patients. **PLoS One.**, v. 4, n. 8, p. 6745, jan. 2009.

FOLLENZI, A. et al. Role of bone marrow transplantation for correcting hemophilia A in mice. **Blood**, v. 119, n. 23, p. 5532-5542, 7 jun. 2012.

FRAMPTON, J. E.; WAGSTAFF, A. J. Sucrose-Formulated Octocog Alfa: A Review of its Use in Patients with Haemophilia A. **Drugs**, v. 68, n. 6, p. 839-853, 2008.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Recombinant factor VIII concentrates. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 36, n. 5, p. 493-497, jul. 2010.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. **Orphanet. J. Rare. Dis.**, v. 7, p. 24, jan. 2012.

GHADERI, D. et al. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 28, p. 147-175, jan. 2012.

GIANGRANDE, P. L. F. Safety and efficacy of KOGENATE Bayer in previously untreated patients (PUPs) and minimally treated patients (MTPs). **Haemophilia**, v. 8, n. 2, p. 19-22, mar. 2002.

GILES, A. R. et al. In vivo characterization of recombinant factor VIII in a canine model of hemophilia A (factor VIII deficiency). **Blood**, v. 72, n. 1, p. 335-359, jul. 1988.

GILES, A. R. et al. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. **Thromb. Haemost.**, v. 79, n. 4, p. 872-875, abr. 1998.

GITSCHIER, J. et al. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v. 59, n. 92, p. 326-330, 1984.

GOODEVE, A. The genetic basis of von Willebrand disease. **Blood Rev.**, v. 24, n. 3, p. 123-134, 2010.

GOUDEMANT, J. et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 46-51, 1 jan. 2006.

GOUW, S. C. et al. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4693-4697, 1 jun. 2007.

GOUW, S. C. et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, n. 3, p. 231-239, 17 jan. 2013.

GREENE, T. K. et al. Towards a standardization of the murine tail bleeding model. **Thromb Haemost**, v. 8, n. 12, p. 2820-2822, dez. 2010.

GRIBBEN, J. G. et al. Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. **Lancet**, v. 335, n. 8687, p. 434-437, 24 fev. 1990.

GRIFOLS BIOLOGICALS INC. **Alphanate (antihemophilic factor/von willebrand factor complex)**. Los Angeles: [s.n.].

GRILLO, A. O. et al. Conformational origin of the aggregation of recombinant human factor VIII. **Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 5865-95, 16 jan. 2001.

GRINGERI, A. et al. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2358-63, 1 out. 2003.

HAY, C. R. et al. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. **Thromb. Haemost.**, v. 77, n. 2, p. 234-237, fev. 1997.

HEMOBRÁS. **Relatório de atividades 2011**. Brasília, DF: [s.n.].

HEMOBRÁS. **Plano anual de atividades de auditoria interna**. Recife, PE: [s.n.].

HEMOBRÁS. **Pesquisa e Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.hemobras.gov.br/site/conteudo/pesquisa_curso.asp>. Acesso em: 3 jul. 2013.

HERCZENIK, E. et al. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 129, n. 2, p. 501-509, fev. 2012.

HERMELING, S. et al. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. **Pharm. Res.**, v. 21, n. 6, p. 897-903, jun. 2004.

HIGH, K. A. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4482-4487, 29 nov. 2012.

HOCKIN, M. F. et al. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 21, p. 18322-18333, 24 maio. 2002.

HOEBEN, R. C. et al. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. **Blood**, v. 85, n. 9, p. 2447-2454, 1 maio. 1995.

HOFFMAN, M. M.; MONROE, D. M. Rethinking the coagulation cascade. **Curr. Hematol. Rep.**, v. 4, n. 5, p. 391-396, set. 2005.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 85, n. 6, p. 958-965, jun. 2001.

HOSMER, D.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: Wiley, 1989.

IDE, L. M. et al. Functional aspects of factor VIII expression after transplantation of genetically-modified hematopoietic stem cells for hemophilia A. **J Gene Med**, v. 12, p. 333-344, 2010.

INSTITUTO BUTANTAN. **SP entra na reta final para produção nacional de derivados de sangue**. Sao Paulo: [s.n.].

INSTITUTO GRIFOLS. **Fanhdia® Human coagulation Factor VIII/von Willebrand Factor complex**. Parets del Valles, 2008.

IVENS, I. A. et al. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. **Haemophilia**, v. 19, n. 1, p. 11-20, jan. 2013.

JANKOWSKI, M. A. et al. Defining “full-length” recombinant factor VIII: a comparative structural analysis. **Haemophilia**, v. 13, n. 1, p. 30-37, jan. 2007.

JONES, P. K.; RATNOFF, O. D. The changing prognosis of classic hemophilia (factor VIII “deficiency”). **Ann. Intern. Med.**, v. 114, n. 8, p. 641-648, 15 abr. 1991.

JUN, S. C. et al. Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, n. 2, p. 162-169, nov. 2005.

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

KAO, F. TEN; PUCK, T. T. Genetics of somatic mammalian cells: induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 60, n. 4, p. 1275-1281, 1968.

KAUFMAN, R. J. et al. Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. **Blood Coagul Fibrinolysis.**, v. 8, n. 2, p. 13-14, dez. 1997.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DORNER, A. J. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 13, p. 6352-6362, 5 maio. 1988.

KAVERI, S. V et al. Factor VIII inhibitors: role of von Willebrand factor on the uptake of factor VIII by dendritic cells. **Haemophilia**, v. 13, n. 5, p. 61-64, dez. 2007.

KELLEY, B.; JANKOWSKI, M.; BOOTH, J. An improved manufacturing process for Xyntha/ReFacto AF. **Haemophilia**, v. 16, n. 5, p. 717-725, 1 set. 2010.

KEMPTON, C. L. et al. Pharmacokinetics and safety of OBI-1, a recombinant B domain-deleted porcine factor VIII, in subjects with haemophilia A. **Haemophilia**, v. 18, n. 5, p. 798-804, set. 2012.

KHAIR, K. et al. Assessment of treatment practice patterns for severe hemophilia A: a global nurse perspective. **Acta. Haematol.**, v. 119, n. 2, p. 115-123, jan. 2008.

KHRENOV, A. et al. Efficient factor VIII affinity purification using a small synthetic ligand. **Haemostasis**, p. 470-477, 2008.

KITAZAWA, T. et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. **Nature Medicine**, v. 18, n. 10, p. 1570-1574, 2012.

KLINGE, J. et al. Detection of all anti-factor VIII antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda assay and a more sensitive immunoprecipitation assay. **Haemophilia**, v. 7, n. 1, p. 26-32, jan. 2001.

KNÖR, S. et al. Efficient factor VIII affinity purification using a small synthetic ligand. **J. Thromb. Haemost.**, v. 6, n. 3, p. 470-477, mar. 2008.

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

KONKLE, B. et al. **Hemophilia A**. Seattle: University of Washington, 2000. p. Gene Reviews

KOREN, E. et al. Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. **J. Immunol. Methods**, v. 333, n. 1-2, p. 1-9, 20 abr. 2008.

KOSLOSKI, M. P.; MICLEA, R. D.; BALU-IYER, S. V. Role of glycosylation in conformational stability , activity , macromolecular interaction and immunogenicity of recombinant human factor VIII. **AAPS J.**, v. 11, n. 3, p. 424-431, 2009.

KOSOW, D.; BHATTACHARYA, P.; STERNBURG, C. **Factor VIII complex purification using heparin affinity chromatography**. US Patent 5,110,907, 1992.

KREN, B. T. et al. Technical advance Nanocapsule-delivered Sleeping Beauty mediates therapeutic Factor VIII expression in liver sinusoidal endothelial cells of hemophilia A mice. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 7, p. 2086-2099, 2009.

KREUZ, W. et al. Epidemiology of inhibitors and current treatment strategies. **Haematologica**, v. 88, n. 6, p. 4, jun. 2003.

KUHN, T. S. **The structure of scientific revolutions**. Chicago: The Chicago University, 1962. p. 173

KUMARAN, V. et al. Transplantation of endothelial cells corrects the phenotype in hemophilia A mice. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 9, p. 2022-2031, set. 2005.

LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 23-29, fev. 2009.

LARSON, P.; HIGH, K. Biology of inherited coagulopathies: factor IX. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 6, n. 5, p. 999-1009, out. 1992.

LEE, C. A.; BERNTORP, E. E.; HOOTS, W. K. **Textbook of Hemophilia**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. p. 476

LEE, T.; HRINDA, M. **Factor VIII formulations in high ionic strength media** United States Patent Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceuticals Inc., , 1997.

LENTING, P. J. et al. Factor VIII and von Willebrand factor--too sweet for their own good. **Haemophilia**, v. 16, n. 5, p. 194-199, jul. 2010.

LENTING, P. J.; VAN MOURIK, J. A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v. 92, n. 11, p. 3983-3996, dez. 1998.

LEYVA, W. H.; KNUTSEN, A P.; JOIST, J. H. Disappearance of a high response factor VIII inhibitor in a hemophiliac with AIDS. **Eur. J. Pediatr.**, v. 89, n. 3, p. 414-418, mar. 1988.

LUCK, J. V et al. Hemophilic arthropathy. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 12, n. 4, p. 234-245, 2004.

LUSHER, J. M. et al. The safety and efficacy of B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate in patients with severe haemophilia A. **Haemophilia**, v. 9, n. 1, p. 38-49, jan. 2003.

LUSHER, J. M. Is the incidence and prevalence of inhibitors greater with recombinant products? No. **J. Thromb. Haemost.**, v. 2, n. 6, p. 863-865, jun. 2004.

LYNCH, C. M. et al. Sequences in the codin region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production. **Cell**, v. 72, p. 259-272, 1993.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 2 maio. 1964.

MANN, K. G. Blood coagulation. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 23, n. 6, p. 1111-1113, jun. 1999.

MANNO, C. S. The promise of third-generation recombinant therapy and gene therapy. **Semin. Hematol.**, v. 40, n. 3, p. 23-28, jul. 2003.

MANNUCCI. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, n. 7, p. 1349-1355, 2003.

MANNUCCI, P. M. et al. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. **Haemophilia**, v. 14, p. 10-18, 2008.

MANNUCCI, P. M. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. **Haemophilia**, v. 14, n. 3, p. 10-18, jul. 2008.

MARQUETTE, K.; PITTMAN, D.; KAUFMAN, R. A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 17, p. 10297-10303, 1995.

MARSHALL, E. Gene therapy. Panel reviews risks of germ line changes. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2268-2269, 14 dez. 2001.

MARTIN, P. G. et al. Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. **Clin. Lab. Haem.**, v. 21, n. 2, p. 125-128, abr. 1999.

MARTINOWITZ, U. et al. Bioequivalence between two serum-free recombinant factor VIII preparations (N8 and ADVATE®): an open-label, sequential dosing pharmacokinetic study in patients with severe haemophilia A. **Haemophilia**, v. 17, n. 6, p. 854-859, nov. 2011.

MATSUI, H. Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A. **Int. J. Hematol.**, v. 95, n. 2, p. 119-124, fev. 2012.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 24 jul. 2008.

MEDZHITOV, R. Approaching the asymptote: 20 years later. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 766-775, 19 jun. 2009.

MEDZIHRADESKY, K. F.; BESMAN, M. J.; BURLINGAME, A. L. Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 69, n. 19, p. 3986-3994, 1 out. 1997.

MEEKS, S. L. et al. Antihuman factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4234-4242, 15 dez. 2007.

MEEKS, S. L. et al. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2512-2120, 20 set. 2012.

MEEKS, S. L.; JOSEPHSON, C. D. Should hemophilia treaters switch to albumin-free recombinant factor VIII concentrates. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, n. 6, p. 457-461, nov. 2006.

MESLIER Y, ANDRÉ S, TEYSSANDIER M, KAVERI SV, L.-D. S. Maternally transferred anti-factor VIII IgG reduce the anti-factor VIII humoral immune response in factor VIII-deficient mice. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 549-555, 2010.

MESLIER, Y. et al. Maternally transferred anti-factor VIII IgG reduce the anti-factor VIII humoral immune response in factor VIII-deficient mice. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 549-555, dez. 2010.

MEYER, D. et al. von Willebrand factor: structure and function. **Mayo. Clin. Proc.**, v. 66, n. 5, p. 516-523, maio. 1991.

MIAO, H. Z. et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3412-3419, 1 maio. 2004.

MIKAELSSON, M. E.; FORSMAN, N.; OSWALDSSON, U. M. Human factor VIII: a calcium-linked protein complex. **Blood**, v. 62, n. 5, p. 1006-15, nov. 1983.

MILANOV, P. et al. Engineered factor IX variants bypass FVIII and correct hemophilia A phenotype in mice. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 602-611, 12 jan. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dia nacional do hemofílico: tratamentos avançam no SUS.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3886/162/dia-nacional-do-hemofílico:-tratamentos-avancam-no-sus.html>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos.** Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil.** Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento profilático em pacientes com hemofilia grave.** Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hemofílicos terão acesso a novo medicamento de alta tecnologia.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2013/03/08/hemofílicos-terao-acesso-a-novo-medicamento-de-alta-tecnologia/print>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

MØLLER, F.; TRANHOLM, M. A ferric chloride induced arterial injury model used as haemostatic effect model. **Haemophilia**, v. 16, n. 1, p. 216-222, jan. 2010.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 1, p. 41-48, jan. 2006.

NATHWANI, A. C. et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 25, p. 2357-2365, 22 dez. 2011.

NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS. **8th International standard factor VIII concentrate.WHO International Standard.** Hertfordshire: [s.n.].

NEMERSON, Y.; FURIE, B. Zymogens and cofactors of blood coagulation. **Crit. Rev. Biochem.**, v. 9, n. 1, p. 45-85, jan. 1980.

NEUGEBAUER, B. et al. Factor VIII products and inhibitor development: concepts for revision of European regulatory guidelines. **Haemophilia**, v. 14, n. 1, p. 142-144, jan. 2008.

NEYMAN, M.; GEWIRTZ, J.; PONCZ, M. Analysis of the spatial and temporal characteristics of platelet-delivered factor VIII-based clots. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1101-1108, 15 ago. 2008.

NIETZSCHE, F. **Beyond good and evil: on the prejudices of philosophers.** Leipzig: CG Naumann, 1886. p. 4-19

NORD, K. et al. Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 15, p. 4269-4277, ago. 2001.

NOSSEL, H. L. Differential consumption of coagulation factors resulting from activation of the extrinsic (tissue thromboplastin) or the intrinsic (foreign surface contact) pathways. **Blood**, v. 29, n. 3, p. 331-340, mar. 1967.

OCTAPHARMA. **Efficacy and safety study of human-cl rhFVIII in PTPs with severe hemophilia A.** Disponível em: <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT01125813&Search=Search>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

OH, S. H. et al. Expression and characterization of a mutant recombinant blood coagulation factor VIII. **Exp. Mol. Med.**, v. 34, n. 3, p. 233-238, 31 jul. 2002.

OHMORI, T. et al. Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein I α promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy. **FASEB J.**, v. 20, n. 9, p. 1522-1524, jul. 2006.

OLDENBURG, J.; ANANYEVA, N. M.; SAENKO, E. L. Molecular basis of haemophilia A. **Haemophilia**, v. 10, n. 4, p. 133-139, 2004.

OLDENBURG, J.; EL-MAARRI, O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. **Int. J. Hematol.**, v. 83, n. 2, p. 96-102, fev. 2006.

OLDENBURG, J.; EL-MAARRI, O.; SCHWAAB, R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. **Haemophilia**, v. 8, n. 2, p. 23-29, mar. 2002.

OVLISEN, K.; KRISTENSEN, A T.; TRANHOLM, M. In vivo models of haemophilia: status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions. **Haemophilia**, v. 14, n. 2, p. 248-259, mar. 2008.

PAN, J. et al. Enhanced efficacy of recombinant FVIII in noncovalent complex with PEGylated liposome in hemophilia A mice. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2802-2811, 24 set. 2009.

PARKER, E. T. et al. Reduction of the inhibitory antibody response to human factor VIII in hemophilia A mice by mutagenesis of the A2 domain B-cell epitope. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 704-710, 1 ago. 2004.

PARKER, E. T.; LOLLAR, P. A quantitative measure of the efficacy of factor VIII in hemophilia A mice. **Thromb. Haemost.**, v. 89, n. 3, p. 480-485, mar. 2003.

PASI, K. J. et al. Management of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. **Haemophilia**, v. 10, n. 3, p. 218-231, maio. 2004.

PASTOFT, A. E. et al. A sensitive venous bleeding model in haemophilia A mice: effects of two recombinant FVIII products (N8 and Advate®). **Haemophilia**, v. 18, n. 5, p. 782-788, set. 2012.

PEERLINCK, K.; HERMANS, C. Epidemiology of inhibitor formation with recombinant factor VIII replacement therapy. **Haemophilia**, v. 12, n. 6, p. 579-590, nov. 2006.

PENG, A. et al. Effect of Route of Administration of Human Recombinant Factor VIII on Its Immunogenicity in Hemophilia A Mice. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, n. 12, p. 4480-4484, 2009.

PFISTERSHAMMER, K. et al. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. **Thromb. Haemost.**, v. 96, n. 3, p. 309-316, set. 2006.

PILBROUGH, W.; MUNRO, T. P.; GRAY, P. Intraclonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. **PloS One**, v. 4, n. 12, p. e8432, jan. 2009.

PIPE, S. W.; KAUFMAN, R. J. Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIIIa. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 22, p. 11851-11856, 28 out. 1997.

PIPE SW, MORRIS JA, SHAH J, K. R. Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 14, p. 8537-8544, 1998.

PISAL, D. S. et al. Native-like aggregates of factor VIII are immunogenic in von Willebrand factor deficient and hemophilia a mice. **J. Pharm. Sci.**, v. 101, n. 6, p. 2055-2065, jun. 2012.

PITTMAN, D.; TOMKINSON, K.; KAUFMAN, R. Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 25, p. 310-315, 1994.

PRATT, K. P. et al. Immunodominant T-cell epitopes in the factor VIII C2 domain are located within an inhibitory antibody binding site. **Thromb. Haemost.**, v. 65578, n. 3, p. 522-528, 29 jul. 2004.

PUROHIT, V. S. et al. Lower inhibitor development in hemophilia A mice following administration of recombinant factor VIII-O-phospho-L-serine complex. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 18, p. 17593-17600, 6 maio. 2005.

PUROHIT, V. S.; MIDDAUGH, C. R.; BALASUBRAMANIAN, S. V. Influence of aggregation on immunogenicity of recombinant human factor VIII in hemophilia A mice. **J. Pharm. Sci.**, v. 95, n. 2, p. 358-371, 2006.

QADURA, M. et al. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 871-880, 23 jul. 2009.

QIAN, J. et al. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. **Thromb. Haemost.**, v. 81, n. 2, p. 240-244, fev. 1999.

QIAN, J. et al. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. **Hematology**, v. 95, n. 4, p. 1324-1329, 2000.

QIAN, J. et al. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1324-9, 15 fev. 2000.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, 2012.

RAGNI MV, BONTEMPO FA, L. J. Disappearance of inhibitor to factor VIII in HIV-infected hemophiliacs with progression to AIDS or severe ARC. **Transfusion**, v. 29, n. 5, p. 447-449, 1989.

RAMANI, K. et al. Lipid binding region (2303-2332) is involved in aggregation of recombinant human FVIII (rFVIII). **J. Pharm. Sci.**, v. 94, n. 6, p. 1288-1299, jun. 2005.

RAMEZANI, A.; ZWEIER-RENN, L. A.; HAWLEY, R. G. Factor VIII delivered by haematopoietic stem cell-derived B cells corrects the phenotype of haemophilia A mice. **Thromb. Haemost.**, v. 105, n. 4, p. 676-687, abr. 2011.

RECHT, M. et al. Clinical evaluation of moroctocog alfa (AF-CC), a new generation of B-domain deleted recombinant factor VIII (BDDrFVIII) for treatment of haemophilia A: demonstration of safety, efficacy, and pharmacokinetic equivalence to full-length recombinant factor V. **Haemophilia**, v. 15, n. 4, p. 869-80, jul. 2009.

REIPERT, B. M. et al. Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. **Thromb. Haemost.**, v. 84, n. 5, p. 826-832, dez. 2000.

REIPERT, B. M. et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. **Thromb. Haemost.**, v. 86, n. 6, p. 1345-1352, dez. 2001.

REIPERT, B. M. et al. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. **Br. J. Haematol.**, v. 136, n. 1, p. 12-25, jan. 2007.

REIPERT, B. M.; SCHOPPMANN, A.; SCHWARZ, H. P. A caution on the use of murine hemophilia models for comparative immunogenicity studies of FVIII products with different protein compositions. **Thromb. Haemost.**, v. 89, n. 6, p. 1110-1113, jun. 2003.

ROSENBERG, A. S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. **The AAPS journal**, v. 8, n. 3, p. E501-7, jan. 2006.

SAHU, S. et al. Revisiting hemophilia management in acute medicine. **J. Emerg. Trauma Shock**, v. 4, n. 2, p. 292-298, abr. 2011.

SAINT-REMY, J. M.; REIPERT, B. M.; MONROE, D. M. Models for assessing immunogenicity and efficacy of new therapeutics for the treatment of haemophilia. **Haemophilia**, v. 18, n. 4, p. 43-47, jul. 2012.

SANDBERG, H. et al. Structural and functional characterization of B-domain deleted recombinant factor VIII. **Semin. Hematol.**, v. 38, n. 2, p. 4-12, abr. 2001.

SCANDELLA, D. H. et al. In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic. **Thromb. Res.**, v. 101, n. 5, p. 377-385, 1 mar. 2001.

SCHARRER, I.; BRAY, G. L.; NEUTZLING, O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. **Haemophilia**, v. 5, n. 3, p. 145-154, maio. 1999.

SCHELLEKENS, H.; CASADEVALL, N. Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. **J. Neurol.**, v. 251, n. 2, p. 4-9, jun. 2004.

SCHWARTZ, R. S. et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. recombinant Factor VIII Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 26, p. 1800-1805, 27 dez. 1990.

SEREMETIS, S. et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of haemophilia A: conclusions of a 5-year study of home therapy. The KOGENATE Study Group. **Haemophilia**, v. 5, n. 1, p. 9-16, jan. 1999.

SHARMA, B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 1: impact of product handling. **Biotechnol Adv.**, v. 25, n. 3, p. 310-317, 2007.

SHI, Q. et al. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1974-1982, 2006.

SINGH, S. K. et al. Determinants of immunogenic response to protein therapeutics. **Biologicals.**, v. 40, n. 5, p. 364-368, set. 2012.

SKUPSKY, J. et al. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. **Blood**, v. 114, n. 21, p. 4741-4748, 2009.

STONEBRAKER, J. S. et al. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. **Haemophilia**, v. 16, n. 1, p. 20-32, 2010.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr. Protoc. Immunol.**, v. 3, maio. 2001.

SUDHAKAR, K.; FAY, P. J. Effects of copper on the structure and function of factor VIII subunits: evidence for an auxiliary role for copper ions in cofactor activity. **Biochemistry**, v. 37, n. 19, p. 6874-6882, 12 maio. 1998.

SUZUKI, K.; NISHIOKA, J.; HASHIMOTO, S. Inhibition of factor VIII-associated platelet aggregation by heparin and dextran sulfate, and its mechanism. **Biochim Biophys Acta.**, v. 585, n. 3, p. 416-426, jul. 1979.

SWAROOP, M. et al. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 39, p. 24121-24124, set. 1997.

TAGLIAVACCA, L.; WANG, Q.; KAUFMAN, R. J. ATP-dependent dissociation of non-disulfide-linked aggregates of coagulation factor VIII is a rate-limiting step for secretion. **Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1973-1981, 29 fev. 2000.

TANAKA, A. M. et al. Purification of porcine plasma factor VIII using chromatographic methods. **Biotechnol. Lett.**, p. 257-260, 2000.

TARANTINO, M. D. et al. Clinical evaluation of an advanced category antihaemophilic factor prepared using a plasma/albumin-free method: pharmacokinetics, efficacy, and safety in previously treated patients with haemophilia A. **Haemophilia**, v. 10, n. 5, p. 428-437, set. 2004.

THE JACKSON LABORATORY. **F8tm1Kaz Tg(Alb-F8*)T4Mcal/J**. Disponível em: <<http://jaxmice.jax.org/strain/017706.html>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

THIM, L. et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8). **Haemophilia**, v. 16, n. 2, p. 349-359, mar. 2010.

TIMPERIO, A. M. et al. Comparison among plasma-derived clotting factor VIII by using monodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Blood Transfus.**, v. 8, n. 3, p. 98-104, jun. 2010.

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

TORDAI, A. et al. Functional thrombin receptors on human T lymphoblastoid cells. **J. Immunol.**, v. 150, n. 11, p. 4876-4886, 1 jun. 1993.

TOWFIGHI, F. et al. Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. **Acta haematologica**, v. 114, n. 2, p. 84-90, jan. 2005.

URLAUB, G. et al. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. **Cell**, v. 33, n. 2, p. 405-412, jun. 1983.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Refacto summary of basis for approval**. Pennsylvania: [s.n.].

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Antihemophilic factor products**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm127580.htm>>. Acesso em: 4 jun. 2013.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Draft guidances relating to the development of biosimilar products**. [s.l: s.n.].

VALENTINO, L. A. Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy. **J. Thromb. Haemost.**, v. 8, n. 9, p. 1895-1902, set. 2010.

VAN HELDEN, P. M. et al. Maintenance and break of immune tolerance against human factor VIII in a new transgenic hemophilic mouse model. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3698-3707, 29 out. 2011.

VERBRUGGEN, B. et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thromb. Haemost.**, v. 73, n. 2, p. 247-251, fev. 1995.

VERBRUGGEN, B.; VAN HEERDE, W. L.; LAROS-VAN GORKOM, B. A. P. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 35, n. 8, p. 752-759, nov. 2009.

VIRCHOW, R. **Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin**. Frankfurt: Meidinger Sohn & Co, 1856. p. 219-732

WALLACE, J. Humane endpoints and cancer research. **ILAR J.**, v. 41, n. 2, p. 87-93, jan. 2000.

WATERS, B. et al. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+ -dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. **Blood**, v. 113, n. 1, p. 193-203, 2009.

WATERS, E. K. et al. Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5514-5522, 19 maio. 2011.

WERNER, R. G. et al. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. **Arzneimittel-Forschung**, v. 48, n. 8, p. 870-80, ago. 1998.

WHITE, G. C. et al. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? **Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1676-1681, ago. 2005.

WHITE GC, MCMILLAN CW, KINGDON HS, S. C. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 3, p. 166-170, 1989.

WISE, R. J. et al. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 32, p. 21948-21955, 15 nov. 1991.

WOLBERG, A. S.; CAMPBELL, R. A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 15-23, 2009.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. **What are inhibitors?** Quebec: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the preparation , characterization and establishment of international and other biological reference standardsQuality Assurance**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products**, 2009.

WROBLEWSKA, A. et al. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. **Blood**, v. 119, n. 22, p. 5294-5300, 31 maio. 2012.

WU, H. et al. Mechanism of the Immune Response to Human Factor VIII in Murine Hemophilia A. **J. Immunol.**, p. 125-133, 2001.

XU, D. et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, n. 3, p. 808-813, 20 jan. 2009.

YADAV, N. et al. The therapeutic effect of bone marrow-derived liver cells in the phenotypic correction of murine hemophilia A. **Blood**, v. 114, n. 20, p. 4552-4561, 12 nov. 2009.

YADAV, N. et al. Factor VIII can be synthesized in hemophilia A mice liver by bone marrow progenitor cell-derived hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. **Stem Cells Dev.**, v. 21, n. 1, p. 110-120, jan. 2010.

YAKURA, Y. et al. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 431, n. 2, p. 336-341, 8 fev. 2013.

YAROVOI, H. V et al. Factor VIII ectopically expressed in platelets: efficacy in hemophilia A treatment. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4006-4013, 1 dez. 2003.

YONEMURA, H. et al. Efficient production of recombinant human factor VIII by co-expression of the heavy and light chains. **Protein Eng.**, v. 6, n. 6, p. 669-674, ago. 1993.

ZHANG, A. H.; SKUPSKY, J.; SCOTT, D. W. Factor VIII inhibitors: risk factors and methods for prevention and immune modulation. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 37, n. 2, p. 114-124, out. 2009.

APÊNDICE A: Currículo

Erika de Simone Molina

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Erika de Simone Molina
Nome em citações bibliográficas MOLINA, E. S.

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina
 Núcleo de Terapia Celular e Molecular (Nucl)
 Rua Aquianês, nº115
 Cidade Universitária - São Paulo/SP - 05508-000
 Telefone: (11) 3091-9047
 URL da home page: <http://www.usp.br/nucl>

Endereço eletrônico
 E-mail para contato: molina.kk@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2010** Mestrado em Ciências (Biotecnologia).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Avaliação da indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação recombinante no modelo murino de hemofilia A
 Orientador: Marcos Angelo Almeida Demasi
 Co-orientador: Mari Cleide Sogayar
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
 Título: A esterase 6 de *Drosophila melanogaster* é homóloga a esterase 1a de *Apis mellifera*?
 Orientador: Marco Antônio Del Lama
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo

Vínculo institucional

2009 - 2011 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pesquisador DTI3 ,
 Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

01/2010 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química, Núcleo de Terapia Celular e Molecular

Linhas de pesquisa:

Avaliação de indução de resposta imunológica ao Fator VIII da coagulação recombinante, Perfil de expressão do gene remodelador de cromatina CHD7 em modelo de diferenciação osteogênica induzido em CTMs.

04/2009 - 12/2009 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro Incubador de Empresas Tecnológicas, Cell Protect Biotechnology

Linhas de pesquisa:

Desenvolvimento de biomateriais aplicáveis à terapia de reposição celular

2. Secretaria de Estado da Educação

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Professor Eventual , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

09/2008 - 06/2009 Ensino Fundamental

Ciências

09/2008 - 06/2009 Ensino Médio

Biologia

Apoio Curricular na Educação de Jovens e Adultos (EJA)

3. Universidade Federal de São Carlos

Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2004 - 2006 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Extensão, Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

02/2006 - 11/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas

Linhas de pesquisa:

Avaliação da ortologia entre esterases de Apis mellifera e Drosophila melanogaster

07/2005 - 11/2005 Estágio, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas

Estágio:

Clonagem e expressão do gene PGA de B. megaterium em E. coli.

08/2004 - 10/2006 Extensão Universitária, Pró-Reitoria de Graduação e Ministério da Educação

Projetos integrados em ensino, pesquisa e extensão na disseminação do conhecimento na sociedade.

4. Colégio Joana D' Arc

Vínculo institucional

2002 - 2002 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

08/2002 - 11/2002 Ensino Médio

Aulas práticas de Biologia

Linhas de pesquisa

1. Avaliação de indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação recombinante
Objetivos: Avaliar o perfil de indução da resposta imunológica ao fator VIII humano recombinante produzido e purificado em nosso laboratório, comparado a produtos de referência, utilizando um modelo murino da Hemofilia A.
2. Desenvolvimento de biomateriais aplicáveis à terapia de reposição celular
Objetivos: Avaliar novas formulações de biopolímeros contendo fatores citoprotetores para transplante de ilhotas pancreáticas microencapsuladas em modelo murino de diabetes mellitus tipo 1.
3. Perfil de expressão do gene remodelador de cromatina CHD7 em modelo de diferenciação osteogênica induzido em CTMs
Objetivos: Caracterizar o perfil de expressão de isoformas do gene remodelador de cromatina CHD7 em modelo de diferenciação osteogênica induzido em CTMs, derivadas de pele humana.

Áreas de atuação

1. Biotecnologia
2. Experimentação Animal
3. Biologia Celular e Molecular

Idiomas

- | | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| Inglês | Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem |
| Espanhol | Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem |

Produção

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MOLINA, E. S.**, SOGAYAR, M. C., DEMASI, M. A. A. Production and characterization of recombinant clotting factor VIII In: 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2012, Guarujá. **Anais do 4. Congresso de Biotecnologia**, 2012, v.1., p.88.
2. CAMPANHA-RODRIGUES, A. L.; GRAZIOLI, G.; CAMPOS-LISBOA, A. C. V.; MARIANI, D. B.; **MOLINA, E. S.**; MARES-GUIA, T.R; SOGAYAR, M. C. Perfluorocarbon-biodritin microcapsules and their potential for type 1 diabetes mellitus therapy. In: Joint Meeting IPITA-IXA 2009, 2009, Venice. International Xenotransplantation Association, 2009, v. 16, p. 350.

3. NAGAMATI JR., K., FERREIRA, K. M., **MOLINA, E. S.**, DEL LAMA, M. A. Análise de Ligação Genética para Estudos de Homologia de Genes Esterásicos de *Apis mellifera* In: VIII Encontro sobre Abelhas, 2008, Ribeirão Preto. **Anais do VIII Encontro sobre Abelhas**, Funpec, p.24, 2008.

4. LIMA, M. I. S., ALLENSPACH, N., SANTONI, M. M., **MOLINA, E. S.**, HANASHIRO, F. T. T., FARO, A. R., JANKE, H., NASCIMENTO, A. R., PEREZ, C. P., RUAS, C. B. G. O Uso de Animais na Alfabetização e Iniciação no Mundo da Zoologia In: 6ª Jornada Científica da Ufscar, São Carlos. **Anais de Eventos da Ufscar**, 2005, v.1, p.1685.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MOLINA, E. S.**, SOGAYAR, M. C., DEMASI, M. A. A. **Indução de resposta imunológica ao fator VIII da coagulação**, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil. Meio de divulgação: Vários; Cidade: São Paulo; Evento: Seminários Temáticos em Proliferação/Diferenciação Celular e Origem de Neoplasias; Inst.promotora/financiadora: Núcleo de Terapia Celular e Molecular

2. HANASHIRO, F. T. T., **MOLINA, E. S.**, JANKE, H., ANGELIERI, C. C. S., SANTONI, M. M., NASCIMENTO, A. R., LIMA, M. I. S.

Divulgação de Ciência e Tecnologia, 2005. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Praça XV de Novembro; Cidade: São Carlos; Evento: Semana do Ministério da Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Ministério da Ciência e Tecnologia

Demais produções técnicas

1. CARREIRA, A. C. O., MANTOVANI, M., **MOLINA, E. S.**, SILVA, F. H. L.,, KOSSUGUE, P. M., LIMA, M.T., MOURÃO R. F., BELCHIOR, G. G., TERRA, L. F., FORNI M.F.A., SOGAYAR, M. C. **A Caminho da Biotecnologia 3ª edição**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Biotecnologia, Educação, Ensino Fundamental

Referências adicionais: Brasil/ Português. 16 horas.

2. CARREIRA, A. C. O., MANTOVANI, M., **MOLINA, E. S.**, SILVA, F. H. L., MANSANO, R. A. W., KOSSUGUE, P. M., LIMA, M.T., MOURÃO R. F., BELCHIOR, G. G., TERRA, L. F., FORNI M.F.A., SOGAYAR, M. C. **A Caminho da Biotecnologia 2ª edição**, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Biotecnologia, Educação, Ensino Fundamental

Referências adicionais: Brasil/ Português. 16 horas.

3. CARREIRA, A. C. O., DEMASI, M. A. A., SILVA, F. H. L., MANTOVANI, M., KOSSUGUE, P. M., MALDONADO, T., HALCSIK, E., TERRA, L. F., CAMPANHA A. L., FORNI, M. F., LIMA, M. T., , GRAZIOLI, G., BELCHIOR, G. G., **MOLINA, E. S.**, MANSANO, R. A. W., ASTORINO R., SOGAYAR, M. C. **Biologia Molecular da Transformação Maligna**, 2011. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Biologia Celular e Molecular, Educação, Ensino Superior

Referências adicionais : Brasil/Português. 210 horas.

4. CARREIRA, A. C. O., MANTOVANI, M., **MOLINA, E. S.**, SILVA, F. H. L., MANSANO, R. A. W., KOSSUGUE, P. M., LIMA, M.T., MOURÃO R. F., BELCHIOR, G. G., TERRA, L. F., FORNI M.F.A., SOGAYAR, M. C.

A Caminho da Biotecnologia, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Biotecnologia, Educação, Ensino Fundamental

Referências adicionais: Brasil/ Português. 16 horas.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação do pôster "Produção e caracterização funcional do fator VIII da coagulação recombinante" no **II Congresso do Instituto de Química da Universidade de São Paulo**, Guarujá, 2012.
2. Apresentação do pôster "Production and characterization of recombinant clotting factor VIII" no **4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia**, Guarujá, 2012.
3. **Fourth International School on Production of Biologicals using Animal Cell Cultures**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
4. **Workshop Temático CAT/Cepid: "From Omics to System Biology"**, Instituto Butantan, 2011.
5. **Atualização em Bioterismo**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011.
6. **Workshop Temático CAT/Cepid "Perspectives in Systems Biology"**, Instituto Butantan, 2010.
7. **Workshop sobre Patentes: Considerações sobre Documentos**, Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo, 2010.
8. **Fórum de Ética em Experimentação Animal**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009.
9. **Life, an Emergent Property**, Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2009.
10. **52º Congresso Brasileiro de Genética**, Foz do Iguaçu, 2007.
11. **Workshop sobre o conflito entre idéias da biologia evolutiva e do pensamento religioso judaico-cristão**, Sociedade Brasileira de Genética, 2007.
12. Apresentação de pôster na **Semana do Ministério da Ciência e Tecnologia**, São Carlos, 2005.
13. Apresentação do pôster "Uso de animais na alfabetização e iniciação no mundo da zoologia" na **6ª Jornada Científica da Ufscar**, 2005. .
14. **VII Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia**, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

APÊNDICE B - Ficha do Aluno



Universidade de São Paulo
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

87131 - 7403537/1 - Erika de Simone Molina

Email: molina.es@usp.br
Data de Nascimento: 24/03/1985
Cédula de Identidade: RG - 43.710.608-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Carlos - São Paulo - Brasil - 2008
Graduação: Licenciatura em Ciências Biológicas - Universidade Federal de São Carlos - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Mestrado
Programa: Biotecnologia (1)
Data de Matrícula: 23/07/2010
Início da Contagem de Prazo: 23/07/2010
Data Limite: 23/07/2013
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Ana Clara Guerrini Schenberg - 23/07/2010 a 13/01/2011 E.Mail: acgschen@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Clara Guerrini Schenberg - 14/01/2011 a 20/09/2011 E.Mail: acgschen@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Marcos Angelo Almeida Demasi - 21/09/2011 até o presente. E.Mail: marcodms@iq.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 23/07/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/02/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 23/07/2010
 Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 27/06/13 03:21:05



Universidade de São Paulo
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

87131 - 7403537/1 - Erika de Simone Molina

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BTC5743-2/4	Seminários Gerais	04/08/2010	16/11/2010	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5734-5/1	Organização e Fluxo da Informação Genética em Sistemas Complexos	10/08/2010	13/09/2010	75	5	90	B	N	Concluída
BMI5885-1/3	Ativação de Linfócitos T e B (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	18/10/2010	31/10/2010	30	2	100	B	N	Concluída
QBQ5768-4/1	Introdução ao Uso da Estatística para Análise Experimental em Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/10/2010	31/10/2010	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5701-6/2	Metabolismo Microbiano	14/03/2011	24/04/2011	90	6	90	A	N	Concluída
BTC5721-4/1	Tópicos Avançados em Química de Proteínas e Peptídeos para Aplicação Biotecnológica	15/03/2011	18/04/2011	75	5	100	A	N	Concluída
BTC5751-3/3	Seminários em Biotecnologia II	16/03/2011	28/06/2011	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5717-4/1	Biologia Molecular da Transformação Maligna (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	22/07/2011	08/09/2011	210	14	100	A	N	Concluída
BIF5792-1/1	Introdução à Filosofia da Ciência Contemporânea (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	14/09/2011	30/11/2011	60	4	90	A	N	Concluída
BTC5700-8/1	Economia de Projetos Biotecnológicos	05/10/2011	13/12/2011	90	6	100	A	N	Concluída
IBI5030-1/1	Curso Avançado de Sinalização Celular e Redes de Modulação Gênica (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	22/11/2012	12/12/2012	45	3	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	15	29	51
Estágios:			
Total:	15	29	51

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Unidades de Ensino responsáveis pelo programa: Escola Politécnica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Instituto de Pesquisas Tecnológicas - Instituto de Biociências - Instituto de Ciências Biomédicas - Instituto Butantan.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 27/06/13 03:21:05