

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

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.

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 (FARNDALÉ 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 (FARNDALÉ, 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.

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).

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.

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 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.

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.

ARNOU, 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 Nonsell**, 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.
- 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. 272, 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/hemofilicos-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. Intracloal 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 he- mophiliacs 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 antihemophilic 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.