

Juliana Branco Novo

Clonagem e expressão da glucocerebrosidase  
humana em células de ovário de hamster  
chinês (CHO)

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo  
2010

## RESUMO

Novo JB. Clonagem e expressão da glucocerebrosidase humana em células de ovário de hamster chinês (CHO) [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A glucocerebrosidase (GCR) é uma enzima glicoprotéica associada à membrana lisossomal, responsável pela degradação do glicolípídeo glucocerebrosídeo em glicose e ceramida. A atividade deficiente da enzima resulta na doença de Gaucher, a mais comum das desordens de depósito lisossomal, caracterizada pelo acúmulo de glicolípídeos em macrófagos, especialmente os do fígado, baço e medula óssea. Os doentes de Gaucher vêm sendo tratados com a enzima exógena, produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO), revertendo grande parte das manifestações clínicas da doença. Porém, o medicamento atualmente disponível no mercado é extremamente custoso. No Brasil, o tratamento é garantido por lei e os gastos apenas com a importação do medicamento chegam à ordem de 84 milhões de dólares por ano. No entanto, este custo poderia ser consideravelmente reduzido com a produção da enzima no Instituto Butantan, que já dispõe da tecnologia de produção de proteínas recombinantes em células animais. Assim, este projeto propôs a clonagem e a expressão da GCR humana em células CHO, visando a obtenção de clones recombinantes produtores da enzima, para viabilizar, futuramente, a sua produção em larga escala no Instituto Butantan. O cDNA da GCR humana, obtido a partir da purificação do RNA total de células ECV em cultura, seguido de síntese do cDNA por RT-PCR, foi clonado no vetor pAE de expressão em *E. coli* para a geração de anticorpos policlonais anti-GCR humana para caracterização da GCR produzida em células CHO. A GCR foi expressa em células da linhagem *E. coli* BL21 SI, purificada por cromatografia de afinidade a níquel e usada na imunização de camundongos BALB/C, levando à indução de altos títulos de anticorpos específicos anti-GCR, avaliados por ELISA. Para a expressão em células CHO, o cDNA da GCR contendo a sua própria seqüência sinal ou fusionado à seqüência sinal de Ig $\kappa$  foi inserido no vetor dicistrônico pED que proporciona altos níveis de expressão de proteínas heterólogas com base no marcador gênico dhfr. A expressão estável da GCR recombinante foi obtida a partir da transfecção de células CHO-dhfr<sup>-</sup> (mutante DXB11) e etapas de amplificação gênica com MTX. A GCR foi detectada por ensaios de western blotting no extrato celular (~ 64 kDa) e secretada para o sobrenadante (63-69 kDa), condizendo com a literatura. A subclonagem do clone produtor (amplificado até 700 mM MTX) permitiu a identificação de subclones estáveis para a GCR. A GCR secretada foi caracterizada através da digestão com PNGase F, mostrando a perda da glicosilação da proteína, além da qualidade do anticorpo gerado, e apresentou atividade biológica ao degradar o substrato sintético 4-MUG. O nível de expressão da GCR foi estimado em 5,14 pg/célula/dia para o melhor subclone produtor que foi selecionado para etapas subseqüentes. Assim, com a aquisição do clone celular produtor para a GCR, devemos propor a continuação do projeto, quando um processo de purificação da enzima deverá ser desenvolvido, bem como o escalonamento do clone para cultivos em alta densidade, com o objetivo maior de produção da GCR para fins terapêuticos.

**Palavras-chave:** Glucocerebrosidase. Doença de Gaucher. Desordem de depósito lisossomal. Células CHO. DHFR. Expressão dicistrônica.

## ABSTRACT

Novo JB. Cloning and expression of human glucocerebrosidase in Chinese hamster ovary (CHO) cells [Ph.D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Human glucocerebrosidase (GCR) is a membrane-associated lysosomal enzyme that catalyses the hydrolysis of glycolipid glucocerebroside to glucose and ceramide. Deficiency of this enzyme activity leads to Gaucher's disease, the most prevalent human lysosomal storage disorder, characterized by an accumulation of glycolipids in macrophages, mainly in liver, spleen and bone marrow. The most common and safe treatment of Gaucher's disease consists on enzyme replacement therapy in which an active enzyme produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells is given to the patients, stopping and reversing many symptoms of the disorder. However, the medicine currently available in the market is extremely expensive. In Brazil, the treatment is guaranteed by law and expenses related only to the importation of the drug reach the order of U\$ 84 million a year. This cost could be considerably reduced with enzyme production at the Butantan Institute, which already has the technology of production of recombinant proteins in animal cells. Thus, this project proposed the cloning and expression of human GCR in CHO cells, in order to obtain a productive cellular clone for future production of GCR enzyme on large scale at the Butantan Institute. The human GCR cDNA was obtained by purification of the total RNA from ECV cells, followed by the cDNA synthesis through RT-PCR. It was cloned into the pAE *E. coli* expression vector for the generation of anti-human GCR polyclonal antibody to characterize the GCR produced in CHO cells. The GCR was expressed in induced *E. coli* BL21 SI cells, purified by nickel affinity chromatography and used to immunize BALB/C mice, leading to high titers of antibodies, as evaluated by ELISA. For GCR expression in CHO cells, the human GCR cDNA containing its own signal peptide or fused to an Ig kappa chain signal peptide was cloned into the pED mammalian expression vector, which provides high expression levels of heterologous proteins based on selectable dhfr marker. The stable expression of recombinant GCR was obtained after transfection of CHO-dhfr<sup>r</sup> cells (mutant DXB11), followed by steps of gene amplification with MTX. The GCR was detected by western blotting analysis, either as cell-associated (~ 64 kDa) or as secreted forms (63-69 kDa), according to literature. The subcloning of the producer clone (amplified up to 700 mM MTX) allowed the identification of stable subclones for GCR. The secreted GCR was characterized by PNGase digestion, showing the loss of protein glycosylation, as well as the quality of the produced antibody. The enzyme showed biological activity through hydrolysis of synthetic substrate 4-MUG. The expression level of GCR was about 5,14 pg/cell/day for the best producer subclone, which was selected for subsequent steps. Thus, with the achievement of a cell clone producing GCR, the project will be continued, when a process of enzyme purification should be developed and the cells should be grown in high-density to produce GCR enzyme for therapeutic use.

**Keywords:** Glucocerebrosidase. Gaucher's disease. Lysosomal storage disorder. CHO cells. DHFR. Dicistronic expression.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A doença de Gaucher

A doença de Gaucher é uma desordem metabólica herdada, pertencente ao grupo das doenças de depósito lisossômico (DDLs). Mais de 50 DDLs são conhecidas, a maioria relacionada a deficiências em enzimas lisossomais (Aerts *et al.*, 2003), sendo a doença de Gaucher a mais comum (Jmoudiak e Futerman, 2005). A doença é causada por mutações no gene que codifica a glucocerebrosidase (GCR), uma enzima associada à membrana lisossomal (Erickson *et al.*, 1985; Ginns *et al.*, 1985), responsável pela degradação do glicolípido glucocerebrosídeo em glicose e ceramida (Aerts *et al.*, 1985; Beutler, 1992; Brady e Barton, 1996) (Anexo A). Quando há deficiência na atividade da GCR, os glucocerebrosídeos acumulam-se em macrófagos, especialmente os do fígado, baço e medula óssea, mas também podem ser encontrados nos pulmões, intestino, rim, coração e, em casos mais raros, no tecido cerebral (Connok *et al.*, 2006). Esses macrófagos com tamanho aumentado comprometem o funcionamento normal dos órgãos e são conhecidos como “células de Gaucher” (Cox, 2001; Jmoudiak e Futerman, 2005).

A doença de Gaucher é autossômica recessiva, definida pela presença de dois alelos mutantes localizados na região 21q do cromossomo 1 (Ginns *et al.*, 1985; Tsuji *et al.*, 1986; Cox, 2001). Mais de 300 mutações foram identificadas no gene da GCR (Grabowski, 2008; Zimran *et al.*, 2009), reduzindo parcialmente ou totalmente a atividade da enzima, caracterizando uma heterogeneidade de manifestações clínicas. As três maiores variantes da doença de Gaucher são convencionalmente distinguidas com base na ausência (Tipo I) ou presença e gravidade (Tipos II e III) de lesões no sistema nervoso central (Germain, 2004; Grace *et al.*, 1994). O diagnóstico da doença para qualquer das variantes é estabelecido através da avaliação da atividade da enzima GCR em leucócitos ou fibroblastos da pele, com um resultado que geralmente expressa atividade 10% menor que o normal. A análise mutacional (teste de DNA) pode ser usada como alternativa ou complementação ao teste enzimático (Grabowski, 2008), com a vantagem de identificar os indivíduos heterozigotos e, portanto, apresentar valor prognóstico (Rozenberg, 2006).

A doença de Gaucher Tipo I (não-neuropática) é a forma mais comum. Corresponde a aproximadamente 95% dos casos (Grabowski, 2004). Apresenta sinais clínicos bastante variáveis que podem começar na infância, adolescência ou idade adulta. Em geral, há aumento exagerado do fígado e baço, podendo haver lesões ósseas progressivas e variáveis,

anemia, trombocitopenia e fadiga. Não há envolvimento neurológico e os pacientes respondem bem ao padrão de tratamento atual, baseado na reposição da enzima GCR. A doença ocorre com uma frequência de 1 em 40.000-60.000 na população em geral, havendo maior incidência na população de judeus Ashkenazi do leste europeu (1 em 500-1.000) (Futerman *et al.*, 2004).

A doença Tipo II (neuropática aguda) é a variante mais grave. Caracteriza-se por deterioração neurológica progressiva e rápida desde os primeiros meses de vida e morte até os 2 anos de idade (Grabowski, 2004). As manifestações viscerais primárias envolvem o pulmão. A variante Tipo III (neuropática sub-aguda) apresenta um quadro visceral semelhante à doença Tipo I e envolvimento neurológico variável, com pacientes chegando à idade adulta. O tratamento com administração de GCR exógena não impede, porém, a progressão da deterioração neurológica (Germain, 2004; Futerman *et al.*, 2004).

## **1.2 Terapia de reposição enzimática (TRE) para a doença de Gaucher**

Há bastante tempo a doença de Gaucher é considerada alvo ideal para tratamento à base de terapia. A alta incidência da doença, quando comparada a outras desordens geneticamente determinadas, mais a possibilidade de reverter muitas das manifestações clínicas (Beutler e Garber, 1994), fizeram da doença de Gaucher uma das desordens metabólicas herdadas mais conhecidas e protótipo para estudos terapêuticos diversos.

A possibilidade de infusão da enzima GCR exógena foi sugerida pela primeira vez em 1964 (De Duve, 1964). Dez anos depois, a enzima parcialmente purificada foi testada pela primeira vez em pacientes, porém, sem sucesso (Brady *et al.*, 1974). Para o tratamento tornar-se efetivo, muitas descobertas foram necessárias, entre as quais: a importância de direcionar a enzima aos macrófagos (Beutler *et al.*, 1977); o desenvolvimento de um processo efetivo para a purificação da GCR (Furbish *et al.*, 1977); a descoberta de receptores de manose nos macrófagos e a sugestão de direcionamento da GCR através de modificação dos açúcares (Achord *et al.*, 1978); o tratamento da GCR com glicosidades específicas para expor as manoses (Furbish *et al.*, 1981). Em 1991, após um ensaio clínico realizado com apenas 12 pacientes (Barton *et al.*, 1991), a terapia de reposição enzimática (TRE) foi finalmente aprovada para a doença de Gaucher (Barranger e O'Rourke, 2001). Desde então, mais de 4.000 pacientes de Gaucher vem recebendo o medicamento em todo o mundo (Kacher *et al.*, 2008). Antes da TRE tornar-se acessível para os doentes de Gaucher, o tratamento consistia

em analgésicos para alívio das dores ósseas, transfusões sanguíneas e plaquetárias e, nos casos mais graves, esplenectomia e transplante de medula óssea (Friedman e Hayes, 1996).

O tratamento com TRE consiste em infusões intravenosas permanentes da enzima GCR, geralmente durante 1 a 2 horas, a cada 14 dias, em regime ambulatorial e sem necessidade de internação. A extensão da resposta clínica à terapia pode variar de acordo com o regime usado, a gravidade e a taxa de progressão da doença. Por isso, as doses devem ser individualizadas e os doentes necessitam de avaliação periódica (Barranger e O'Rourke, 2001). A maioria dos pacientes inicia o tratamento com doses que variam entre 30 e 60 unidades da enzima por quilograma de massa corpórea (U/kg), por consistir nos valores com mais estudos realizados. Entretanto, existem trabalhos mostrando que doses menores, entre 5 e 30 U/kg, produzem resultados idênticos (Grabowski *et al.*, 1998), não havendo uma relação direta entre o aumento da dose e a sua eficácia para valores entre 5 e 60 U/kg, em infusões quinzenais. Devido ao alto custo do medicamento, a determinação da menor dose efetiva, inicial e de manutenção do tratamento, tornou-se imprescindível, porém, ainda não está completamente elucidada.

Muitos estudos comprovaram a eficácia e a segurança da TRE para tratar a doença de Gaucher Tipo I, através da reversão ou melhora de muitos sinais clínicos e sintomas, entre os quais: hepatoesplenomegalia, infiltração da medula, retardo no crescimento, dores ósseas, trombocitopenia, anemia e fadiga (Grabowski, 2005). Porém, o tratamento não é eficiente na reversão do quadro neurológico, característico das doenças Tipos II e III, quando os glicolipídeos também se encontram no sistema nervoso. Isso porque a enzima infundida, de alta massa molecular (60,43 kDa), é impedida de atravessar a barreira hemato-encefálica. A maioria dos pacientes (cerca de 85%) não apresenta efeitos adversos ao medicamento, como reação alérgica ou imunogênica (Elstein e Zimran, 2009; Starzyk *et al.*, 2007).

A doença de Gaucher foi a primeira desordem do metabolismo a ser tratada com TRE. Muito do que compreendeu ao longo de décadas de estudos para tornar o tratamento acessível pode ser perfeitamente aplicado a outras DDLs. Atualmente, a TRE também é disponível para as doenças de Fabry, Pompe e Mucopolissacaridoses I, II e VI (Beck, 2010).

### 1.3 Outras opções de tratamento

Embora eficaz na reversão das manifestações viscerais, característica principal da doença de Gaucher, a TRE não causa melhora ou estabilidade no quadro neurológico. Além disso, o alto custo do tratamento utilizando o medicamento atualmente disponível, Cerezyme<sup>®</sup> (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA), inviabiliza a sua extensão a todos os doentes, principalmente nos países com recursos limitados (Futerman *et al.*, 2004). Por ser uma desordem genética rara e não letal, a decisão se o paciente deve ou não receber o medicamento acaba sendo baseada, muitas vezes, em aspectos econômicos e não apenas em considerações médicas, gerando um debate ético em torno do tratamento com TRE (Beutler, 1994; Beutler e Garber, 1994; Elstein e Zimran, 2009).

Diante destes fatos, as pesquisas avançaram em busca de tratamentos alternativos para as DDLs, preferencialmente mais efetivos e menos custosos. Uma opção já disponível para a doença de Gaucher é a terapia de redução de substrato (TRS). O tratamento consiste na administração via oral do análogo do açúcar N-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ; miglustat; Zavesca<sup>®</sup>, Actelion Pharmaceuticals), um inibidor da glucosilceramida sintase, também conhecida por glucosiltransferase ceramida-específica, uma enzima que catalisa a transferência de glicose junto à ceramida no primeiro passo da via de biossíntese de glicosíngolipídeos (Aerts *et al.*, 2003; Moyses, 2003) (Anexo B). A estratégia consiste em reduzir a taxa de formação do substrato em função da atividade residual da enzima mutada e, assim, restabelecer o equilíbrio entre a síntese e a degradação do glicolípido. A TRS foi aprovada pelo EMEA (*European Medicines Agency*) em 2002 e pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) em 2003, porém, com restrições em ambos os casos. Podem receber o tratamento somente pacientes de Gaucher Tipo I adultos, com manifestações clínicas leves a moderadas e quando a TRE não é apropriada ou não é uma opção terapêutica (Jmoudiak e Futerman, 2005; Elstein e Zimran, 2009; Beck 2010). A restrição se deve a uma série de efeitos colaterais associados ao uso de miglustat, entre os quais: diarreia, dores abdominais, tórax, parestesia e distúrbios visuais. O tratamento tem aprovação em 37 países, incluindo o Brasil desde 2008. Outros inibidores de substrato vêm sendo identificados, consistindo em substâncias análogas da ceramida ou do açúcar (Platt e Cox, 2007). Além da função de reduzir a síntese dos glicolípídeos, os inibidores de substrato têm potencial para agir como moléculas chaperonas e aumentar a atividade residual da enzima mutada.

O tratamento com chaperonas é uma estratégia terapêutica farmacológica emergente, em estudo clínico para as doenças de Gaucher, Fabry e Pompe (Parenti, 2009). Certas mutações associadas às DDLs resultam em proteínas estruturalmente incorretas que são normalmente retidas e degradadas no retículo endoplasmático. Porém, a intervenção de uma chaperona pode estabelecer a forma cataliticamente ativa da enzima e assegurar a sua estabilidade e direcionamento aos lisossomos (Jmoudiak e Futerman, 2005; Parenti, 2009). As chaperonas farmacológicas consistem em moléculas pequenas e específicas que se ligam de forma reversível à enzima mutada. Entre as moléculas que podem funcionar como chaperonas, estão os análogos do substrato, os inibidores sítio-ativos, cofatores e moléculas efetoras (Desnick e Fan, 2007). A vantagem desta terapia é que envolve o uso de moléculas de baixa massa molecular, administradas por via oral, com ampla distribuição no organismo e potencial para tratar os sintomas neurológicos, assim como a TRS. Além da terapia com chaperonas, a terapia gênica e o transplante de células-tronco consistem em alternativas futuras e promissoras para o tratamento das DDLs (Peters e Krivit, 2007; Beck, 2010).

Apesar dos avanços em busca de novas terapias, a TRE mantém-se como padrão de tratamento para as DDLs, desde a sua aprovação, há mais de 15 anos, para a doença de Gaucher (Grabowski, 2008). Os estudos sugerem que futuramente os protocolos de tratamento para os pacientes com DDLs sejam individualmente estabelecidos e fundamentados na combinação de diferentes terapias, ao invés de serem baseados em apenas uma forma de tratamento (Beck, 2010).

#### **1.4 Produção de proteínas terapêuticas em células animais**

A maioria das proteínas usadas com finalidade terapêutica ou para diagnóstico *in vivo* apresentam estruturas complexas, geralmente associadas a modificações pós-traducionais. Quando produzidos por meios que não a extração direta de fontes biológicas, estas proteínas (ou outras moléculas bioativas) são conhecidas como “biofármacos” (Walsh, 2002). Os biofármacos ao lado das vacinas e das biomoléculas oriundas de fontes naturais são chamados de “produtos biológicos” (Mellado e Castilho, 2007).

Por necessitarem de processamento pós-traducional para a sua formação biológica ativa, a maior parte dos biofármacos já aprovados ou em desenvolvimento são produzidos através do cultivo de células animais. A forma mais comum, porém, complexa de modificação pós-traducional é a glicosilação (Walsh e Jefferis, 2006), um processo enzimático de adição de açúcares que acontece no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Os



oligossacarídeos podem ser adicionados a resíduos de asparagina, formando os N-glicanos, ou a resíduos de treonina ou serina, formando O-glicanos. A N-glicosilação é mais freqüente, caracterizada por um padrão heterogêneo de formas estruturais, agrupadas em três tipos principais: alta manose, complexo e híbrido (Skropeta, 2009). Também constituem modificações pós-traducionais: a desaminação, desamidação, carboxilação, glicação e hidroxilação, entre outras (Butler, 2007).

Quando comparada à cultura de células de bactéria, a cultura de células de mamíferos é tecnicamente complexa, demorada e custosa (Walsh, 2006). O cultivo de células animais *in vitro* é dependente de uma série de fatores, tais como: pH, temperatura, osmolaridade, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, composição do meio de cultura, natureza do suporte e fatores de adesão (para células dependentes de ancoramento), forças de cisalhamento e forma de manipulação (Léo *et al.*, 2007).

Embora muitas linhagens de células animais sejam estudadas, poucas apresentam propriedades favoráveis para serem utilizadas como hospedeiras no processo de produção de biofármacos. A tabela 1 contém exemplos de linhagens celulares bem caracterizadas e freqüentemente usadas para este fim.

**Tabela 1** – Linhagens de células animais comumente empregadas em processos biotecnológicos para a produção de proteínas recombinantes.

| Nome    | Tecido de origem             | morfologia  |
|---------|------------------------------|-------------|
| HEK-293 | rim humano                   | epitelial   |
| CHO     | ovário de hamster chinês     | fibroblasto |
| BHK-21  | rim de hamter sírio          | fibroblasto |
| COS-7   | rim de macaco verde africano | fibroblasto |
| NSO     | mieloma murino               | linfoblasto |
| Sp2/0   | mieloma murino               | linfoblasto |

FONTE: Adaptado de Bollati-Fogolín e Comini, 2007; Léo *et al.*, 2007.

Entre as linhagens apresentadas, a linhagem de células CHO é a mais utilizada; destaca-se por apresentar crescimento rápido, habilidade de adaptação para crescer em suspensão ou aderidas a diferentes substratos, facilidade de manutenção e, principalmente, por conferir às proteínas recombinantes um padrão de glicosilação muito similar ao das proteínas humanas nativas (Mellado e Castilho, 2007). O primeiro biofármaco produzido em célula

CHO foi o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), comercializado pela Genentech em 1986 (tabela 2). Segundo Jayapal *et al.* (2007), aproximadamente 70% de todas as proteínas terapêuticas aprovadas para comercialização são produzidas nesta linhagem celular.

A tabela 2 ilustra a variedade de biofármacos produzidos em células CHO, incluindo anticorpos, enzimas, fatores de coagulação do sangue, hormônios, citocinas e fatores de crescimento hematopoiético.

Considerando o valor total de mercado, os biofármacos produzidos em célula animais ultrapassaram em 1996 àqueles produzidos em *E. coli* ou leveduras, geralmente proteínas ou partículas pseudovirais de menor complexidade em termos de transformações pós-traducionais (Alves *et al.*, 2007). As vendas anuais para biológicos usando somente as células CHO já excederam 30 bilhões de dólares no mundo todo (Jayapal *et al.*, 2007).

A produção crescente de proteínas recombinantes através do cultivo de células animais é resultado de anos de pesquisa para aumentar o conhecimento quanto à expressão gênica, metabolismo, crescimento e atraso na apoptose celular, além de esforços despendidos no aprimoramento de vetores de expressão, engenharia da célula hospedeira, seleção de clones recombinantes, novas formulações de meios de cultura, no desenvolvimento e engenharia de processos (Wurm, 2004). Porém, muitos desafios ainda estão por ser vencidos. Um dos principais obstáculos diz respeito à formulação de medicamentos contendo biofármacos e à forma com que estes alcançam o local de ação no organismo. Muitos apresentam problemas de baixa estabilidade *in vitro* ou *in vivo*, baixa solubilidade e biodisponibilidade (Mellado e Castilho, 2007).

Os biofármacos inicialmente aprovados consistem em proteínas com a seqüência de aminoácidos idêntica à proteína humana nativa. Por isso, são conhecidos como biofármacos de primeira geração. Os biofármacos de segunda geração contêm alguma alteração planejada na seqüência de aminoácidos ou na estrutura glicídica ou, ainda, são conjugados a outra molécula, como o polietilenoglicol (PEG) (Walsh, 2004). Estas alterações, geralmente, têm por objetivo: acelerar ou retardar o pico de atividade biológica do produto, alterar o tempo de meia-vida da proteína ou alterar a imunogenicidade do produto. Um exemplo de biofármaco de segunda geração é o TNKase<sup>TM</sup> (tabela 2), contendo a substituição de três aminoácidos no tPA, gerando uma molécula com maior afinidade por seu receptor, a fibrina, e maior resistência ao seu inibidor natural, o PAI-1 (inibidor-1 do ativador de plasminogênio).

**Tabela 2** – Exemplos de proteínas recombinantes terapêuticas ou de diagnóstico – biofármacos – produzidas em células CHO e aprovadas para comercialização.

| Proteína                                     | Produto       | Indicação                         | Companhia          | Ano da 1ª aprovação |
|--|---------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Enzimas</i>                               |               |                                   |                    |                     |
| $\alpha$ -glucosidase                        | Myozyme®      | doença de Pompe                   | Genzyme            | 2006                |
| $\alpha$ -L-iduronidase                      | Aldurazyme®   | mucopolissacaridose I             | Genzyme            | 2006                |
| N-acetilgalactosamina-4-sulfatase            | Naglazyme®    | mucopolissacaridose VI            | BioMarin           | 2005                |
| $\alpha$ -galactosidase                      | Fabrazyme®    | doença de Fabry                   | Genzyme            | 2001                |
| $\beta$ -glucocerebrosidase                  | Cerezyme®     | doença de Gaucher                 | Genzyme            | 1994                |
| DNAse I                                      | Pulmozyme®    | fibrose cística                   | Genentech          | 1993                |
| tPA  | Activase®     | infarto agudo do miocárdio        | Genentech          | 1986                |
| tPA  | TNKase™       | infarto agudo do miocárdio        | Genentech          | 2000                |
| <i>Fatores de crescimento hematopoiético</i> |               |                                   |                    |                     |
| Eritropoetina                                | Aranesp®      | anemia                            | Amgen              | 2001                |
| G-CSF  | Neutrogin®    | neutropenia                       | Chugai             | 1991                |
| Eritropoetina                                | Epogen®       | anemia                            | Amgen              | 1989                |
| <i>Hormônios</i>                             |               |                                   |                    |                     |
| hormônio luteinizante                        | Luveris®      | infertilidade feminina            | Serono             | 2000                |
| tireotropina- $\alpha$                       | Thyrogen®     | diagnóstico de função da tireóide | Genzyme            | 1998                |
| hormônio folículo-estimulante                | Gonal-F®      | infertilidade feminina            | Serono             | 1995                |
| <i>Fatores de coagulação sanguínea</i>       |               |                                   |                    |                     |
| Fator XIII                                   | Advate®       | hemofilia A                       | Baxter             | 2003                |
| Fator IX                                     | Benefix®      | hemofilia B                       | Genetics Institute | 1997                |
| Fator XIII                                   | Recombinante™ | hemofilia A                       | Baxter             | 1992                |
| <i>Citocinas</i>                             |               |                                   |                    |                     |
| Interferon- $\beta$                          | Rebif®        | esclerose múltipla                | Serono             | 1998                |
| Interferon- $\beta$                          | Avonex®       | esclerose múltipla                | Biogen             | 1996                |
| <i>Anticorpos</i>                            |               |                                   |                    |                     |
| Anti-VEGF                                    | Avastin®      | câncer colorretal                 | Genentech          | 2004                |
| Anti-IgE                                     | Xolair®       | asma                              | Genentech          | 2003                |
| Anti-CD11a                                   | Raptiva®      | psoríase                          | Genentech          | 2003                |
| Anti-TNF $\alpha$                            | Humira®       | artrite reumatóide                | Abbott             | 2002                |
| Anti-CD52                                    | Campath®      | leucemia linfocítica crônica      | Genzyme            | 2001                |
| Anti-HER2                                    | Herceptin®    | câncer de mama                    | Genentech          | 1998                |

FONTE: Adaptado de Jayapal *et al.*, 2007; Mellado e Castilho, 2007.

Dentro da indústria de biofármacos, o sistema de expressão mais utilizado é baseado no processo de amplificação gênica por metotrexato (MTX) em células CHO deficientes em diidrofolato redutase (DHFR) (Kim *et al.*, 2001; Wurm, 2004; Ng *et al.*, 2007). A enzima DHFR catalisa a redução do diidrofolato a tetraidrofolato, uma reação crucial para a síntese *de novo* de nucleotídeos e outros metabólitos essenciais em células eucarióticas (Anexo C). As células CHO com perda na função do gene de dhfr (CHO-dhfr<sup>-</sup>; mutante DXB11) foram isoladas por Urlaub e Chasin em 1980. Quando estas células são estavelmente transfectadas com vetores contendo o gene funcional, este é incorporado ao genoma celular levando à expressão do fenótipo dhfr<sup>+</sup>. Os transfectantes dessa linhagem crescem em meio de cultura sem a adição de nucleosídeos, como é requerido para células CHO-dhfr<sup>-</sup>. Além disso, as células transfectadas têm a habilidade de desenvolver resistência ao MTX, um inibidor competitivo da enzima DHFR, através de um mecanismo de amplificação do gene dhfr como resultado de concentrações crescentes da droga no meio de cultura (Kaufman, 1990). Por esta técnica, o gene da proteína de interesse também pode ser amplificado, inserido ou não no mesmo plasmídeo que contém o gene dhfr. O resultado do processo de amplificação gênica é o aumento na produtividade da proteína recombinante, geralmente com finalidade comercial.

### **1.5 Estrutura e função da GCR humana**

A GCR humana é uma proteína periférica da membrana lisossomal, encontrada em praticamente todos os tipos de células (Cox, 2001; Aerts *et al.*, 2003). Não apresenta segmentos transmembrana ou cauda citoplasmática detectáveis e, em condições naturais, pode ser ou não secretada pelas células em níveis muito baixos. Estudos com células de mamífero indicaram um sistema de endereçamento lisossomal saturável para a GCR que, quando completo, leva à secreção da proteína pela célula (Leonova e Grabowski, 2000). Além disso, os mesmos autores mostraram que o transporte da GCR para os lisossomos é independente da glicosilação. Embora já se tenha conhecimento há bastante tempo que o transporte da GCR não ocorre via interação com receptores de manose-6-fosfato, ao contrário do que acontece com a maioria das proteínas lisossomais, apenas recentemente a proteína integral da membrana lisossomal tipo 2 (LIMP-2) foi identificada como a responsável pela ligação e transporte da GCR para os lisossomos (Reczek *et al.*, 2007).

A secreção da GCR, porém, é um processo dependente de glicosilação, assim como a obtenção da enzima com atividade biológica. Estudos mostraram que a expressão da GCR humana em sistemas onde a glicosilação não ocorre, como sistemas bacterianos ou células de insetos tratadas com tunicamicina, levam à síntese da GCR em conformações cataliticamente inativas (Berg-Fussman *et al.*, 1993; Grace e Grabowski, 1990).

A enzima GCR catalisa a hidrólise do glucocerebrosideo, um glucoesfingolípido intermediário do catabolismo das células brancas e vermelhas do sangue (Cox, 2001) (Anexo A). A natureza hidrofóbica da enzima requer interfaces fosfolipídicas, além de uma proteína ativadora, saposin C, para a hidrólise plena do substrato (Berg-Fussman *et al.*, 1993; Leonova e Grabowski, 2000).

A seqüência nucleotídica completa do cDNA da GCR humana foi descrita por Sorge *et al.* (1985) e Tsuji *et al.* (1986), em trabalhos simultaneamente desenvolvidos. A GCR apresenta dois códons ATG iniciadores de tradução e funcionais (Sorge *et al.*, 1987). De acordo com o códon utilizado, o peptídeo sinalizador pode ser composto por 39 ou 19 aminoácidos. O peptídeo é caracterizado por um núcleo hidrofóbico e clivado durante a passagem da proteína pela membrana do retículo endoplasmático (Pasmanick-Chor *et al.*, 1996). A proteína GCR madura contém 497 aminoácidos e 5 potenciais sítios de N-glicosilação, sendo 4 deles normalmente ocupados (Grace *et al.*, 1994) (Anexo D). A GCR ativa encontra-se na forma monomérica, com massa molecular variando entre 59 e 69 kDa, de acordo com o padrão de glicosilação (Bergmann e Grabowski, 1989). Cadeias de carboidratos do tipo rico em manose são inicialmente adicionadas a resíduos de Asn durante a síntese da proteína no retículo endoplasmático. Estas cadeias são modificadas e unidades oligossacarídicas são constantemente adicionadas e removidas durante o processamento da proteína no complexo de Golgi. Uma vez nos lisossomos, a GCR sofre a ação de exoglicosidases que formam cadeias oligossacarídicas apenas do tipo complexo, não terminadas em manose, resultando na GCR madura de 59 kDa (Fabrega *et al.*, 2000; Jonsson *et al.*, 1987; Van Weely *et al.*, 1990).

## **1.6 GCR comercial**

Até o momento, a Genzyme Corporation é o único fabricante de medicamentos para o tratamento dos doentes de Gaucher através de TRE. O primeiro preparado disponível foi Ceredase<sup>®</sup> (Genzyme Corporation), utilizando GCR placentária, substituído logo em seguida por Cerezyme<sup>®</sup> (Genzyme Corporation), o medicamento de segunda geração que utiliza GCR

recombinante. A expiração da patente referente à fabricação de Cerezyme (Friedman e Hayes, 1996) está prevista para o ano de 2010 (Wadman, 2009).

O medicamento Ceredase<sup>®</sup> (Aglucerase) foi aprovado para comercialização em 1991 pelo FDA e em 1994 pelo EMEA. O produto contém GCR purificada de placenta, com modificações nas cadeias oligossacarídicas para direcionar a enzima aos macrófagos, onde os glucocerebrosídeos acumulam-se. O Cerezyme<sup>®</sup> (Imiglucerase) utiliza uma GCR recombinante produzida em células CHO, também com modificação nos carboidratos. Os açúcares terminais da GCR placentária e da GCR recombinante são removidos através do tratamento seqüencial com 3 glicosidases (neuraminidase,  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase) para expor resíduos de manose. No entanto, as estruturas de carboidrato modificadas da Imiglucerase são um pouco diferentes das ligações existentes na GCR placentária, havendo mais resíduos de fucose e N-acetilglucosamina, permitindo à enzima ser reconhecida especificamente por receptores de carboidrato existentes nos macrófagos (Friedman *et al.*, 1999). Além desta diferença, a GCR recombinante difere da placentária em um aminoácido na posição 495, onde uma arginina foi substituída por uma histidina, para resultar em uma enzima funcional de maior estabilidade. A alteração do aminoácido foi realizada através de mutagênese sítio-dirigida. Como consequência destas diferenças, obteve-se uma enzima recombinante que requer doses menores para proporcionar um efeito terapêutico similar àquele obtido com a administração da GCR derivada de placenta (Friedman e Hayes, 1996). Além disso, a produção da GCR recombinante em células CHO é segura e ilimitada (Hoope, 2000).

Diante do sucesso alcançado pela Genzyme, outras companhias de biotecnologia motivaram-se a investir em preparações enzimáticas próprias. Dois novos produtos, biosimilares da formulação existente, já passaram nos ensaios clínicos e devem entrar no mercado em breve. A empresa Shire Human Genetic Therapies (Cambridge, MA, USA) estuda a GCR gene-ativada (velaglucerase alfa), produzida em fibroblastos humanos (Zimran *et al.*, 2007b; Brumshtein *et al.*, 2010), enquanto a Protalix Biotherapeutics (Carmiel, Israel) trabalha com a GCR produzida em células de planta (taliglucerase alfa) (Shaaltiel *et al.*, 2007; Aviezer *et al.*, 2009). A enzima da Shire tem a vantagem de ser produzida em uma linhagem celular humana, além de manter a seqüência nativa da GCR (não contém alteração no aminoácido 495). Já a enzima da Protalix é fabricada em um sistema facilmente escalonável e livre de qualquer exposição a tecidos de mamíferos (Elstein e Zimran, 2009).

A grande expectativa quanto à entrada destes e outros biossimilares no mercado diz respeito à redução no custo do tratamento, muito alto desde a sua aprovação (Futerman *et al.*, 2004; Elstein e Zimran, 2009). Além disso, as novas formulações enzimáticas representam alternativas terapêuticas para uma minoria de pacientes que não respondem bem ao tratamento com o medicamento comercializado pela Genzyme (Zimran *et al.*, 2007a).

### **1.7 A doença de Gaucher no Brasil**

No Brasil, existem atualmente 610 pacientes de Gaucher sob tratamento de reposição da enzima GCR, sendo 170 apenas do estado de São Paulo (quadro 1). Os pacientes estão cadastrados no Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (antigo Componente de Dispensação Excepcional) e fazem uso do medicamento Cerezyme<sup>®</sup> (Imiglucerase), importado pelo Ministério da Saúde. Por tratar-se de um medicamento considerado essencial à melhoria da qualidade de vida dos portadores sintomáticos, o Cerezyme<sup>®</sup> foi incluído na lista de Medicamentos Excepcionais do SUS. Assim, os pacientes têm direito por lei ao tratamento gratuito. O Ministério da Saúde disponibiliza o medicamento aos estados, por meio de aquisição centralizada, seguindo a Portaria GM nº 2.577/06. A portaria estabelece que uma programação anual e trimestral da necessidade dos estados deve ser enviada ao Ministério e sujeita à aprovação. No ano de 2008, 134.207 frascos foram solicitados pelos estados e 130.389 foram aprovados. Em 2009, dos 146.597 frascos solicitados, 128.419 foram disponibilizados. A última aquisição do medicamento Cerezyme<sup>®</sup> ocorreu em março de 2009, quando 130.000 frascos-ampolas de 200 U foram importados, ao custo unitário de U\$ 555,00, para fornecimento e entrega. Conforme dados fornecidos pelos estados ao Ministério, o consumo médio mensal é de 12.602 frascos, o que representa um gasto de aproximadamente U\$ 84 milhões ao ano apenas com a compra do medicamento.

Quadro 1 – Número de pacientes brasileiros que fazem uso do medicamento Cerezyme<sup>®</sup>, por estado (comunicação pessoal<sup>1</sup>).

| UF                  | Número de pacientes |
|---------------------|---------------------|
| Acre                | 1                   |
| Alagoas             | 11                  |
| Amapá               | 0                   |
| Amazonas            | 8                   |
| Bahia               | 23                  |
| Ceará               | 21                  |
| Distrito Federal    | 14                  |
| Espírito Santo      | 11                  |
| Goiás               | 8                   |
| Maranhão            | 11                  |
| Mato Grosso         | 12                  |
| Mato grosso do Sul  | 9                   |
| Minas Gerais        | 75                  |
| Pará                | 14                  |
| Paraíba             | 7                   |
| Paraná              | 46                  |
| Pernambuco          | 15                  |
| Piauí               | 1                   |
| Rio de Janeiro      | 95                  |
| Rio Grande do Norte | 9                   |
| Rio Grande do Sul   | 27                  |
| Rondônia            | 1                   |
| Roráima             | 0                   |
| Santa Catarina      | 17                  |
| São Paulo           | 170                 |
| Sergipe             | 3                   |
| Tocantins           | 1                   |
| <b>Total</b>        | <b>610</b>          |

---

<sup>1</sup>José Miguel do Nascimento Júnior, diretor do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde, 2010.



Em julho de 2002, o Ministério da Saúde estabeleceu um protocolo para orientação do tratamento dos portadores da doença de Gaucher. O protocolo determina os critérios de inclusão e exclusão, bem como as doses recomendadas da enzima, de acordo com a idade do paciente e a gravidade da doença. De forma geral, foi estabelecido que o tratamento deve ser iniciado com a menor dose eficaz da enzima, 15 U/kg a cada 14 dias, podendo ser substituída, a critério do médico, por 2,5 U/kg 3 vezes por semana. Nos casos mais graves, doses até a ordem de 120 U/kg a cada 14 dias podem ser administradas nos pacientes.

Além do protocolo de orientação, existe um registro brasileiro da doença de Gaucher vinculado ao registro internacional, o *Gaucher Registry*, criado em 1991 e patrocinado pela Genzyme, com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a variabilidade, progressão e história natural da doença de Gaucher, além de elaborar guias e recomendações para otimização e seguimento da TRE, bem como avaliar a eficácia do tratamento a longo prazo.

Apesar da eficiência comprovada no tratamento dos doentes de Gaucher, o alto custo da terapia, que é subsidiada pelo sistema público no Brasil, destaca a importância econômica deste tratamento, ainda que a doença seja de baixa incidência.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) A purificação de RNA total de células humanas endoteliais ECV 304 em cultura, seguido de síntese do cDNA por RT-PCR, foi um método eficiente para a obtenção da cDNA da GCR humana.
- 2) O procedimento de mutagênese sítio-dirigida apresentado nesta tese permitiu alterar o aminoácido 495 (arginina por histidina) com rapidez e eficiência;
- 3) A proteína GCR humana foi expressa em células de *E. coli* BL21 SI induzidas sem necessidade de otimização de códons;
- 4) A GCR em fusão a seis histidinas foi purificada com eficiência em uma única etapa cromatográfica, utilizando uma resina quelante carregada com níquel;
- 5) A GCR não glicosilada, embora inativa, foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos policlonais anti-GCR humana em camundongos imunizados;
- 6) O soro anti-GCR apresentou alta qualidade e especificidade, e foi capaz de reconhecer formas moleculares distintas para a GCR em células COS-7 e CHO, devido a diferenças nos padrões de glicosilação.
- 7) A geração de anticorpos policlonais anti-GCR em camundongos imunizados com a GCR recombinante purificada de *E. coli* mostrou ser um método prático e eficiente, além de permitir a produção ilimitada destes anticorpos;
- 8) A GCR recombinante glicosilada foi corretamente produzida em células COS-7 e CHO, detectada nas formas intracelular (~ 64 kDa) e secretada para o meio de cultura (63-69 kDa);
- 9) A transfecção transiente em células COS-7 foi um método eficiente e rápido para a constatação da funcionalidade de todos os plasmídeos de expressão;

10) A GCR recombinante pôde ser obtida na forma secretada para o meio de cultura de células CHO tanto com o peptídeo sinalizador da própria GCR como fusionada ao peptídeo sinalizador de Igκ;

11) As análises de expressão transiente em células COS-7 e expressão estável em células CHO sugeriram que maiores níveis de GCR podem ser obtidos utilizando a seqüência sinalizadora da GCR, em relação à seqüência sinal de Igκ.

12) O aumento nos níveis de expressão da GCR recombinante ao longo do processo de amplificação gênica sugere o aumento do número de cópias do DNA plasmidial integrado no genoma celular e a correta formação da mensagem dicistrônica para GCR e DHFR;

13) A digestão com PNGase F confirmou a correta geração da proteína glicosilada e secretada, além de ressaltar a qualidade do anticorpo produzido;

14) A subclonagem do clone produtor confirmou a presença de células heterogêneas quanto aos níveis de expressão da GCR e permitiu o isolamento de células estáveis e altamente produtoras da enzima recombinante (em ausência de pressão seletiva);

15) O maior nível de expressão detectado para a GCR (estimado em 5,14 pg/célula/dia) está de acordo com os padrões esperados para proteínas recombinantes secretadas de células CHO.

16) A GCR recombinante secretada de células CHO apresenta atividade biológica, demonstrada por meio da hidrólise do substrato sintético fluorogênico 4-MUG;

17) A obtenção do subclone produtor estável para a GCR possibilitará o prosseguimento do projeto, com o objetivo de produzir a enzima em processos de alta densidade para gerar um produto final com aplicação terapêutica em humanos.

## REFERÊNCIAS\*

- Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell*. 1978;15:269-278.
- Aerts JM, Donker-Koopman WE, Van der Vliet MK, Jonsson LM, Ginns EI, Murray GJ, Barranger JA, Tager JM, Schram AW. The occurrence of two immunologically distinguishable beta-glucocerebrosidases in human spleen. *Eur J Biochem*. 1985;150:565-574.
- Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358:905-914.
- Alves PM, Carrondo MJ, Cruz PE. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo: Roca, 2007. p. 2-14.
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrachi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A, Galun E. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - a preclinical and phase I investigation. *PLoS One*. 2009;4:e4792.
- Barneveld RA, Tegelaers FP, Ginns EI, Visser P, Laanen EA, Brady RO, Galjaard H, Barranger JA, Reuser AJ, Tager JM. Monoclonal antibodies against human beta-glucocerebrosidase. *Eur J Biochem*. 1983;134:585-589.
- Barranger JA, O'Rourke E. Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease. *J Inher Metab Dis*. 2001;24:89-96.
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, *et al*. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*. 1991;324:1464-1470.
- Beck M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*. 2010;62:33-40.
- Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase: N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem*. 1993;268:14861-14866.
- Bergmann JE, Grabowski GA. Posttranslational processing of human lysosomal acid beta-glucosidase: a continuum of defects in Gaucher disease type I and type 2 fibroblasts. *Am J Hum Genet*. 1989;44:741-750.
- Beutler E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*. 1992;256:794-799.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Beutler E. Economic malpractice in the treatment of Gaucher's disease. *Am J Med.* 1994;97:1-2.

Beutler E, Dale GL, Guinto DE, Kuhl W. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: preliminary clinical trial of a new enzyme preparation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:4620-4623.

Beutler E, Garber AM. Alglucerase for Gaucher's disease: dose, costs and benefits. *Pharmacoeconomics.* 1994;5:453-459.

Beutler E, Kuhl W. Glucocerebrosidase processing in normal fibroblasts and in fibroblasts from patients with type I, type II, and type III Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7472-7474.

Beutler E, Kuhl W, Sorge J. Cross-reacting material in Gaucher disease fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:6506-6510.

Bollati-Fogolin M, Comini, MA. Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: Roca, 2007. p. 42-80.

Brady RO, Barton NW. Enzyme replacement and gene therapy for Gaucher's disease. *Lipids.* 1996;31 Suppl:S137-139.

Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 1974;291:989-993.

Brooks SA. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol.* 2004;28:241-255.

Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 2007;25:425-432.

Brumshtein B, Salinas P, Peterson B, Chan V, Silman I, Sussman JL, Savickas PJ, Robinson GS, Futerman AH. Characterization of gene-activated human acid-beta-glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. *Glycobiology.* 2010;20:24-32.

Butler M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: Roca, 2007. p. 122-137.

Chenuet S, D, Besuchet-Schmutz N, Wicht M, Jaccard N, Bon AC, Derouazi M, Hacker DL, Beckmann JS, Wurm FM. Calcium phosphate transfection generates mammalian recombinant cell lines with higher specific productivity than polyfection. *Biotechnol Bioeng.* 2008;101:937-945.

Chura-Chambi RM, Tornieri PH, Spencer PJ, Nascimento PA, Mathor MB, Morganti L. High-level synthesis of recombinant murine endostatin in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif.* 2004;35:11-16.

Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, Toh PC, Asvadi P, Wong NS, Yap MG. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng.* 2009;102:1182-1196.

Connock M, Burls A, Frew E, Fry-Smith A, Juarez-Garcia A, McCabe C, Wailoo A, Abrams K, Cooper N, Sutton A, O'Hagan A, Moore D. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: a systematic review. 2006. *Health Technol Assess.* 2006;10:iii-iv, ix-136.

Cox TM. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24:106-121.

De Duve C. From cytochromes to lysosomes. *Fed Proc.* 1964;23:1045-1049.

Desnick RJ, Fan JQ. Pharmacologic chaperone therapy for lysosomal disease. In: Futerman AH, Zimran A. *Gaucher disease.* New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 377-396.

Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 2003;4:704-709.

Elstein D, Zimran A. Review of the safety and efficacy of imiglucerase treatment of Gaucher disease. *Biologics.* 2009;3:407-417.

Erickson AH, Ginns EI, Barranger JA. Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. *J Biol Chem.* 1985;260:14319-14324.

Fabbro D, Desnick RJ, Grabowski GA. Gaucher disease: genetic heterogeneity within and among the subtypes detected by immunoblotting. *Am J Hum Genet.* 1987;40:15-31.

Fabrega S, Durand P, Codogno P, Bauvy C, Delomenie C, Henrissat B, Martin BM, McKinney C, Ginns EI, Mornon JP, Lehn P. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology.* 2000;10:1217-1224.

Friedman B, Hayes M. Enhance in vivo uptake of glucocerebrosidase. 1996; US Patent 5549892.

Friedman B, Vaddi K, Preston C, Mahon E, Cataldo JR, McPherson JM. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood.* 1999;93:2807-2816.

Furbish FS, Blair HE, Shiloach J, Pentchev PG, Brady RO. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: large-scale purification of glucocerebrosidase suitable for human administration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:3560-3563.

Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1981;673:425-434.

Futerman AH, Sussman JL, Horowitz M, Silman I, Zimran A. New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:147-151.

Germain DP. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. *Clin Genet*. 2004;65:77-86.

Ginns EI, Brady RO, Pirruccello S, Moore C, Sorrell S, Furbish FS, Murray GJ, Tager J, Barranger JA. Mutations of glucocerebrosidase: discrimination of neurologic and non-neurologic phenotypes of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:5607-5610.

Ginns EI, Tegelaers FP, Barneveld R, Galjaard H, Reuser AJ, Brady RO, Tager JM, Barranger JA. Determination of Gaucher's disease phenotypes with monoclonal antibody. *Clin Chim Acta*. 1983;131:283-287.

Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield B, Sawyer J, Hozier J, Barranger JA. Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: implications for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:7101-7105.

Grabowski GA. Gaucher disease: lessons from a decade of therapy. *J Pediatr*. 2004;144:S15-S19.

Grabowski GA. Recent clinical progress in Gaucher disease. *Curr Opin Pediatr*. 2005;17:519-524.

Grabowski GA. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*. 2008;372:1263-1271.

Grabowski GA, Leslie N, Wenstrup R. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Rev*. 1998;12:115-133.

Grace ME, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase: glycosylation is required for catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:771-777.

Grace ME, Newman KM, Scheinker V, Berg-Fussman A, Grabowski GA. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem*. 1994;269:2283-2291.

Graham FL, Van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52:456-467.

Gu MB, Todd P, Kompala DS. Analysis of foreign protein overproduction in recombinant CHO cells: effect of growth kinetics and cell cycle traverse. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;721:194-207.

Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol Adv*. 2009;27:1023-1027.

Hollak CE, vom Dahl S, Aerts JM, Belmatoug N, Bembi B, Cohen Y, Collin-Histed T, Deegan P, van Dussen L, Giraldo P, Mengel E, Michelakakis H, Manuel J, Hrebicek M, Parini R, Reinke J, di Rocco M, Pocovi M, Sa Miranda MC, Tylki-Szymanska A, Zimran A, Cox TM. Force Majeure: therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;44:41-47.

Hoppe H. Cerezyme – recombinant protein treatment for Gaucher’s disease. *J Biotechnol.* 2000;76:259-261.

Hong WW, Wu SC. A novel RNA silencing vector to improve antigen expression and stability in Chinese hamster ovary cells. *Vaccine.* 2007;25:4103-4111.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MG. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem Eng Progr.* 2007;103:40-47.

Jmoudiak M, Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol.* 2005;129:178-188.

Jonsson LM, Murray GJ, Sorrell SH, Strijland A, Aerts JF, Ginns EI, Barranger JA, Tager, J M, Schram AW. Biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. *Eur J Biochem.* 1987;164:171-179.

Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:596-601.

Jun SC, Kim MS, Baik JY, Hwang SO, Lee GM. Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;69:162-169.

Jun SC, Kim MS, Hong HJ, Lee GM. Limitations to the development of humanized antibody producing Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification. *Biotechnol Prog.* 2006;22:770-780.

Kacher Y, Brumshtein B, Boldin-Adamsky S, Toker L, Shainskaya A, Silman I, Sussman JL, Futerman AH. Acid beta-glucosidase: insights from structural analysis and relevance to Gaucher disease therapy. *Biol Chem.* 2008;389:1361-1369.

Kaufman RJ. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 1990;185:537-566.

Kaufman RJ. Amplification and Expression of Transfected Genes in Mammalian cells. In: Hellems RE. (Ed) *Gene amplification in mammalian cells.* New York: Marcel Dekker, 1992. p. 315-343.

Kaufman RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol Biotechnol.* 2000;16:151-160.



Kaufman RJ, Davies MV, Wasley LC, Michnick D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4485-4490.

Kim NS, Byun TH, Lee GM. Key determinants in the occurrence of clonal variation in humanized antibody expression of CHO cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification. *Biotechnol Prog.* 2001;17:69-75.

Kim NS, Kim SJ, Lee GM. Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng.* 1998;60:679-688.

Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 1986;44:283-292.

Léo P, Galesi ALL, Suazo, CAT, Moraes, AM. Células animais: conceitos básicos. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: Roca, 2007. p. 15-41.

Leonova T, Grabowski GA. Fate and sorting of acid beta-glucosidase in transgenic mammalian cells. *Mol Genet Metab.* 2000;70:281-294.

Lucas BK, Giere LM, DeMarco RA, Shen A, Chisholm V, Crowley CW. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:1774-1779.

Makrides SC. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif.* 1999;17:183-202.

Matasci M, Hacker DL, Baldi L, Wurm FM. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today.* 2008;5:e37-e42.

Mellado MC, Castilho LR. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica.* São Paulo: Roca, 2007. p. 384-402.

Moyses C. Substrate reduction therapy: clinical evaluation in type 1 Gaucher disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358:955-960.

Ng SK, Wang DI, Yap MG. Application of destabilizing sequences on selection marker for improved recombinant protein productivity in CHO-DG44. *Metab Eng.* 2007;9:304-316.

Omasa T. Gene amplification and its application in cell and tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2002;94:600-605.

Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med.* 2009;1:268-279.

Pasmanik-Chor M, Elroy-Stein O, Aerts H, Agmon V, Gatt S, Horowitz M. Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochem J.* 1996;317:81-88.

Peroni CN, Soares CR, Gimbo E, Morganti L, Ribela MT, Bartolini P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002;35:19-26.

Peters C, Krivit W. Hematopoietic stem cell transplantation, stem cells, and gene therapy. In: Futerman AH, Zimran A. *Gaucher disease.* New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 423-437.

Platt FM, Cox TM. Substrate reduction therapy. In: Futerman AH, Zimran A. *Gaucher disease.* New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 355-376.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento, AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:1103-1109.

Rasmussen J, Barsomian G, Bergh M. Enzymatically active recombinant glucocerebrosidase. Genzyme Corporation. 1993; US Patente 5236838.

Reczek D, Schwake M, Schroder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 2007;131:770-783.

Ron I, Dagan A, Gatt S, Pasmanik-Chor M, Horowitz M. Use of fluorescent substrates for characterization of Gaucher disease mutations. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35:57-65.

Rozenberg R. Análise molecular das doenças de Gaucher e Tay-Sachs no Brasil. [tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2006.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5463-5467.

Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J.* 2007;5:579-590.

Simonsen CC, Levinson AD. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:2495-2499.

Sinclair G, Pfeifer TA, Grigliatti TA, Choy FY. Secretion of human glucocerebrosidase from stable transformed insect cells using native signal sequences. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:148-156.

Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorg Med Chem.* 2009;17:2645-2653.

Soares CR, Morganti L, Miloux B, Lupker JH, Ferrara P, Bartolini P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000;32:127-135.

Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:7289-7293.

Sorge JA, West C, Kuhl W, Treger L, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet.* 1987;41:1016-1024.

Starzyk K, Richards S, Yee J, Smith, SE, Kingma, W. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2007;90:157-163.

Takasaki S, Murray GJ, Furbish FS, Brady RO, Barranger JA, Kobata A. Structure of the N-asparagine-linked oligosaccharide units of human placental beta-glucocerebrosidase. *J Biol Chem.* 1984;259:10112-10117.

Tsuji S, Choudary PV, Martins BM, Windfield S, Barranger JA, Ginns EI. Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. *J Biol Chem.* 1986;261:50-53.

Urlaub G, Chasin LA. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:4216-4220.

Urlaub G, Kas E, Carothers AM, Chasin LA. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell.* 1983;33:405-412.

Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES: attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* 2001;2:893-898.

Van Weely S, Aerts JM, Van Leeuwen MB, Heikoop, JC, Donker-Koopman WE, Barranger JA, Tager JM, Schram AW. Function of oligosaccharide modification in glucocerebrosidase, a membrane-associated lysosomal hydrolase. *Eur J Biochem.* 1990;191:669-677.

Wadman M. Bills target biosimilar drugs. *Nature.* 2009;458:394-395.

Walsh G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15:135-138.

Walsh G. Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:185-196.

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol.* 2006;24:769-776.

Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol.* 2006;24:1241-1252.

Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22:1393-1398.

Yonamine CM, Prieto-da-Silva AR, Magalhães GS, Rádis-Baptista G, Morganti L, Ambiel FC, Chura-Chambi RM, Yamane T, Camillo MA. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon*. 2009;54:110-120.

Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, Kishimoto M, Suga, K. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol Prog*. 2000;16:710-715.

Zaboikin M, Srinivasakumar N, Schuening F. Gene therapy with drug resistance genes. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:335-345.

Zimran A, Bembi B, Pastores GM. Enzyme replacement therapy for type I Gaucher disease. In: Futerman AH, Zimran A. *Gaucher disease*. New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 341-354a.

Zimran A, Loveday K, Fratazzi C, Elstein D. A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2007;39:115-118b.

Zimran A, Ilan Y, Elstein D. Enzyme replacement therapy for mild patients with Gaucher disease. *Am J Hematol*. 2009;84:202-204.