Vladimir Granovski

**Purificação de fatores de coagulação VIII e VII
recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B
produzidos a partir de células humanas.**

Dissertação apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, programa de
Mestrado profissional em Biotecnologia,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Ribeirão Preto

2018

Vladimir Granovski

**Purificação de fatores de coagulação VIII e VII
recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B
produzidos a partir de células humanas.**

Dissertação apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, programa de
Mestrado profissional em Biotecnologia,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Virgínia Picanço e
Castro

Versão Original

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Granovski, Vladimir

Purificação de fatores de coagulação VIII e VII recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B produzidos a partir de células humanas / Vladimir Granovski, Ribeirão Preto 2018, 82p.

Orientador : Virginia Picanço e Castro

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Hemoterapia e Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação de proteínas.

Versão do título para o inglês: Purification of recombinant coagulation factors VIII and VII obtained from human cells for Hemophilia A and B treatment.

Descritores: 1. Purificação de proteínas de plasma 2. Fator VIII de coagulação 3. Fator VII de coagulação 4. Cromatografia de proteínas 5. Hemofilia 6. Produção de Fator VIII I.Picanço e Castro, Virginia II. Universidade de São Paulo. Hemocentro. Programa de Pos Graduação em Biotecnologia III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Hemoterapia e Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Hemocentro.

Candidato(a): **Vladimir Granovski**

Título da Dissertação: Purificação de fatores de coagulação VIII e VII recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B produzidos a partir de células humanas

Orientador(a): Virginia Picanço e Castro

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

AGRADECIMENTOS

- À **Prof. Dra. Prof. Dra. Virgínia Picanço e Castro**, por toda a orientação, interesse e paciência comigo, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, pela publicação internacional e por toda a dedicação e esforço à pesquisa e ao seu laboratório.
- À **Prof. Dra. Kamilla Swiech Antonietto** pela indicação do curso, aconselhamento e oportunidade de publicação internacional.
- À **Dra. Marcela Cristina Correa de Freitas** por compartilhar conhecimento sobre o fator de coagulação FVII.
- À **Daianne Fantacini** por compartilhar conhecimento sobre o fator de coagulação FVIII.
- Ao **Mario Soares de Abreu Neto**, por apoiar todos os processos, orientar sobre o uso do laboratório e por passar incontáveis horas purificando os fatores de coagulação.

Resumo

Granovski, V. **Purificação de fatores de coagulação VIII e VII recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B produzidos a partir de células humanas.** 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia.

Neste trabalho foram estudados diversos métodos cromatográficos para a purificação de fatores recombinantes de coagulação VII (FVIIr) e VIII (FVIIIr) derivados de linhagens celulares humanas SK-Hep. O FVIIIr é utilizado para o tratamento da Hemofilia A, enquanto o FVIIr é utilizado para o tratamento da Hemofilia B e também a Hemofilia A. Produzir estes fatores em linhagens celulares humanas faz com os padrões de glicosilação, sulfatação e enovelamento destas proteínas sejam extremamente parecidos com os fatores endógenos produzidos no organismo humano. A purificação do FVIIIr através de técnicas de cromatografia multimodais usando a resina CantoMMC, afinidade usando a resina FVIIISelect e troca iônica (SP-Sepharose) permitiu obter um produto bastante homogêneo e com perfil de banda (por SDS-PAGE) bem definido que demonstrou a presença esperada das cadeias leve e pesada (o Western-Blott indicou que os anticorpos comerciais reconheceram a cadeia pesada da molécula estudada). As técnicas permitiram uma alta reprodutibilidade do processo onde sequências de purificação indicaram o mesmo comportamento de perfis cromatográficos e o processo eliminou $99.5\% \pm 0,5\%$ de proteínas inespecíficas, recuperando até 64% de FVIIIr. O FVIIr foi purificado com apenas uma única técnica cromatográfica usando a resina FVIISelect que isolou a proteína de interesse eliminando cerca de 99% de impurezas, recuperando praticamente todo o produto. O eluido da cromatografia de afinidade foi dialisado em membranas de 5 kDa o que resultou no processo de auto ativação da molécula de FVIIr, resultando em um aumento de sinal de até 5x em relação a quantidade inicial. O gel de SDS-PAGE e o Western-Blott comprovaram o processo de auto-ativação no qual uma migração de banda de 50 kDa para 30kDa foi observada e os anticorpos comerciais contra FVII foram capazes de detectá-la. O método de purificação também foi bastante reproduzível e o perfil de banda muito semelhante se comparado ao

produto comercial existente no mercado. Sendo assim, foi possível obter plataformas de purificação para as proteínas FVIIr e FVIIIr.

Palavras Chave: Purificação de fatores de coagulação, fator recombinante VIII, fator recombinante VII, cromatografia de proteínas, Hemofilia.

Abstract

Granovski, V. **Purification of recombinant coagulation factors VIII and VII obtained from human cells for Hemophilia A and B treatment.** 2018. 82p. Master thesis (Masters in biotechnology) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia.

In this work, several chromatographic methods were studied for the purification of recombinant clotting factors VII (FVIIr) and VIII (FVIIIr) derived from human SK-Hep cell lines. The FVIIIr is used for the treatment of Hemophilia A, while the FVIIr is used for the treatment of Hemophilia B and Hemophilia A. Producing these factors in human cell lines results in glycosylation, sulphation and folding patterns similar to the endogenous factors produced in the human organism. Purification of FVIIIr by multimodal chromatography techniques using CaptoMMC resin, affinity using FVIIISelect resin and ion exchange (SP-Sepharose) yielded a fairly homogeneous and well-defined band profile (by SDS-PAGE) which demonstrated the expected presence of the light and heavy chains, Westen-Blott indicated that commercial antibodies recognized the heavy chain of the studied molecule. The techniques allowed a high reproducibility of the process where purification sequences indicated the same behavior of chromatographic profiles and the process eliminated $99.5\% \pm 0.5\%$ nonspecific proteins and recovering up to 64% FVIIIr. FVIIr was purified with only a single chromatographic technique using the FVIISelect resin which isolated the protein by removing about 99% impurities and recovering virtually the entire product. The affinity chromatography eluate was dialyzed on 5 kDa membranes which resulted in the autoactivation process of the FVIIr molecule resulting in a signal increase of up to 5 fold over the initial amount. The SDS-PAGE gel and Westen-Blott demonstrated the auto-activation process where a migration of 50 kDa to 30 kDa band was observed and the commercial antibodies against FVII were able to detect the band. The purification method was also quite reproducible and the band profile very similar compared to the commercial products. Thus, it was possible to obtain purification platforms for the FVIIr and FVIIIr proteins.

Key words: Coagulation factors purification, recombinant factor VIII, recombinant factor VII, protein chromatography, hemophilia.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca do processo de coagulação sanguínea.....	15
Figura 2. A nova hipótese de coagulação sanguínea.....	17
Figura 3. Estrutura da proteína FVIII.....	24
Figura 4. Representação da molécula de FVII (A) e sua clivagem por proximidade com outra molécula FVII (B).	25
Figura 5. Estrutura parcial das resinas VIII e VII Select.	27
Figura 6. Representação esquemática do ligante da resina de cromatografia de multimodal....	28
Figura 7. Fluxograma de experimentos de purificação do FVIIIr.....	31
Figura 8. Fluxograma de experimentos de purificação do FVIIr	31
Figura 9. Perfil Cromatográfico da CaptoMMC utilizando sobrenadante de Sk-Hep-FVIIIr, corrida CaptoMMC #1.	41
Figura 10. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnatante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia multimodal.	42
Figura 11. Perfil Cromatográfico de sobrenadante de Sk-Hep-FVIII em resina de afinidade (FVIIISelect ®), Corrida FVIIISelect #1 ..	44
Figura 12. SDS-PAGE (gradiente de 4 a 20%) desnatante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade, Corrida VIIISelect #2..	46
Figura 13. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnatante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade e eluídas com dois tampões, Corrida VIIISelect #6.....	49
Figura 14. SDS-PAGE desnatante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade e eluídas com propilenoglicol, Corrida VIIISelect #7.....	50
Figura 15. Gels de SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) para as amostras do processo de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#1.....	53
Figura 16. Western Blott das amostras da Figura 15..	54
Figura 17. Perfil cromatográfico da FVIIISelect® com sobrenadante de Sk-Hep-FVIIr (Corrida #5)	60
Figura 18. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnatante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade, Corrida# 5.	61
Figura 19. Western Blot das amostras da Figura 18, Corrida# 5. ..	62
Figura 20. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) dos experimentos de purificação do FVIIr.....	65
Figura 21. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) (A) e Western-Blotting (B) desnatante (d) e nativo (n) (sem desnaturação) corado com nitrato de prata do sobrenadante e produto final de dois experimentos.....	66

Lista de tabelas

Tabela 1. Produtos FVIIIr lançados no mercado americano.	19
Tabela 2. Produtos FVIIr lançados no mercado americano.	20
Tabela 3. Produtos FIXr lançados no mercado americano.	20
Tabela 4. Lista dos produtos comerciais recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B e seus métodos de purificação.	26
Tabela 5. Dados de quantificação de proteína e cromogênico para detecção de FVIIIr nas frações cromatográficas.	43
Tabela 6. Atividade de FVIIIr obtido das frações na etapa cromatográfica com a resina VIIISelect.	44
Tabela 7. Atividade de FVIIIr obtido das frações da cromatografia com VIIISelect, Corrida VIIISelect #2.	45
Tabela 8. Dados do cromogênico das repetições das frações obtidas na etapa cromatográfica.	47
Tabela 9. Dados do cromogênico das repetições das frações obtidas na etapa cromatográfica com carga maior de volume e proteína. Corrida VIIISelect #5.	48
Tabela 10. Quantificação de FVIII durante a purificação com a resina VIIISelect e eleição com propilenoglicol.	50
Tabela 11. Comparação de rendimento de FVIIIr em cromatografia VIIISelect utilizando diferentes agentes de eluição.	51
Tabela 12. Dados da primeira purificação utilizando a sequência de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#1.	55
Tabela 13. Dados da purificação utilizando a sequência de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#2.	56
Tabela 14. Dados da purificação utilizando a sequência de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#3.	57
Tabela 15. Quantificação de FVIIr total das corridas de purificação através do teste de PT.	58
Tabela 16. Dados da cromatografia Q-FF como etapa adicional de purificação do FVIIr.	59
Tabela 17. Análise das amostras (Corrida# 5) por PT.	63
Tabela 18. Corridas de purificação do FVIIr.	64

Sumario

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Tipos de Hemofilias e suas origens	13
1.2. Mecanismos da coagulação sanguínea.	14
1.3. Tratamento das Hemofilias com derivados de plasma.	17
1.4. Tratamento das Hemofilias com produtos recombinantes	19
1.5. Situação do Brasil no panorama das Hemofilias	21
1.6. Produção de Fatores de coagulação no Hemocentro de Ribeirão Preto	21
1.7. Biossíntese e Estrutura das proteínas FVII e FVIII.	23
1.7.1. Proteína FVIII	23
1.7.2. Proteína FVII.	24
1.8. Processo de purificação de fatores FVII e FVIII recombinantes	25
Purificação dos fatores VII e VIII recombinantes por cromatografia.	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Purificação	31
4.1.1. Preparação da amostra (Sobrenadante da cultura celular)	32
4.1.2. Cromatografia Multimodal	32
4.1.3. Cromatografia de afinidade FVIII Select e FVII Select	33
4.1.3.1. FVIIISelect™	33
4.1.3.2. FVIISelect™	34
4.1.4. Cromatografia de Intercâmbio iônico	34
4.1.4.1. IEX para purificar FVIIIr	34
4.1.4.2. IEX para purificar FVIIr	35
4.1.5. Processo de diluição de amostra.	35
4.1.6. Dialise	36
4.2. Ferramentas analíticas	36
4.2.1. SDS-PAGE e Western Blotting (WB)	36
4.2.2. O teste do tempo de protrombina (PT)	38
4.2.3. Método de Bradford	38
4.2.4. Teste Cromogênico para quantificação de FVIII ativo.	38

5. RESULTADOS.....	40
5.1. Purificação FVIIIr.....	40
5.1.1. Cromatografia Multimodal	40
5.1.2. Cromatografia de afinidade FVIIISelect ®.....	43
5.1.3. Cromatografia de afinidade FVIIISelect - eluição com propilenoglicol.....	48
5.1.4. Sequencia cromatográfica de 3 colunas – CaptoMMC, FVIIISelect e SP-FF.	52
5.2. Purificação do FVIIr	58
5.2.1. Purificação do FVIIr usando FVIISelect e dialise.....	59
5.2.2. Ativação do FVIIr	65
6. Discussão	68
6.1. FVIIIr	68
6.2. FVIIr.....	71
7. Conclusão	74
8. Referencias	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tipos de Hemofilias e suas origens

A Hemofilia A é um distúrbio causado pela deficiência do fator de coagulação FVIII que afeta, principalmente, homens em uma relação de 1 caso para cada 5,000 – 10,000 nascimentos. É uma doença genética ligada ao cromossomo X, à predominância nos homens se dá pelo fato das mulheres possuírem dois cromossomos X, fazendo com que a frequência no sexo feminino seja rara, onde para isso, duas mutações deveriam estar presentes (BOLTON-MAGGS e PASI, 2003).

A região que codifica o gene FVIII esta localizada próxima ao final do braço longo do cromossomo X, mais precisamente na região Xq28 (THOMPSON, 2003). Esse gene codifica uma grande glicoproteína em forma de heterodímero seguida de pelo menos duas clivagens intracelulares. Na circulação se associa com o fator von Willebrand formando um complexo não covalente, uma unidade mais estável e com meia vida mais longa. Durante a coagulação, o FVIII se desassocia do fator von Willebrand formando um complexo com o fator IX ativando o fator X (TOOLE *et al.*, 1984; TRUETT *et al.*, 1985)

Muito próxima a região que codifica o gene FVIII esta localizado o gene do fator IX (FIX) de coagulação, nas posições Xq27.1 e Xq27.2. Esse gene codifica um fator de coagulação dependente de vitamina K que circula no plasma como uma proteína inativa, sendo ativada pelo fator XIa. A forma ativada do fator FIX tem a função de ativar o fator X (LI *et al.*, 2014). Uma deficiência nesse gene causa um segundo tipo de Hemofilia, tipo B.

Dentre os quatro possíveis distúrbios de coagulação a Hemofilia A e a B são as mais comuns, sendo a Hemofilia A responsável por 80% dos casos e a B por 20% (KONKLE *et al.*, 2017). Os outros dois tipos de hemofilias são a C e a deficiência em fator von Willebrand, porém há pouco estudo a respeito dos dois.

Sendo assim, a hemofilia A é causada pela deficiência na qualidade e/ou quantidade de fator FVIII e a Hemofilia B pela deficiência do fator FIX.

1.2. Mecanismos da coagulação sanguínea.

A coagulação é o sistema de defesa do organismo que mantém a integridade do sistema circulatório nos mamíferos. A cascata de coagulação é composta por sequência complexa de reações químicas que resultam na formação de um coágulo de fibrina (DAHLBACK, 2000).

O processo de coagulação pode ser induzido pela via intrínseca ou extrínseca (devido a um dano tecidual), no qual proteínas plasmáticas (pro-enzimas) serão convertidas em suas formas enzimáticas. Essas enzimas envolvidas na coagulação são glicoproteínas, incluindo os fatores VII, XII, XI, X e protrombina que serão sequencialmente ativadas de zimogênios para serina-proteases (SPRONK *et al.*, 2003). Boa parte dessas enzimas só são efetivas quando formam complexos com cofatores, tais como os cofatores V e VIII (FAY, 2004; CRAMER *et al.*, 2010).

O mecanismo principal da coagulação sanguínea é a ativação do fator de coagulação X (FX) em FXa. O FXa forma um complexo FXa-FV (complexo ativador da protrombina) que converte Protrombina (FII) em Trombina (FIIa). A FIIa, na presença de cálcio, converte fibrinogênio em fibrina, levando formação do coágulo de polímeros de fibrina (**Figura 1**). Existem dois mecanismos que levam a conversão do FX em FXa, a cascata de coagulação intrínseca e a cascata de coagulação extrínseca.

Figura 1. Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca do processo de coagulação sanguínea.

A cascata de coagulação extrínseca se baseia no conceito de que alguns componentes necessários para a coagulação não estão presentes no sangue, e que algum componente deve surgir externamente (DAVIE, 2003). No caso, o fator III, também chamado de tromboplastina tecidual ou fator tecidual (FT). Este fator é expresso na superfície de uma variedade de células (células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e plaquetas) em caso de dano ou estímulo extracelular (HATHAWAY *et al.*, 1965).

O FT, na presença de cálcio, forma um complexo com o fator VII (FVII), onde o cálcio funciona como a ponte de ligação entre o complexo FT-FVII, este complexo é então ativado na presença de proteases de serina e posteriormente sofrendo auto-ativação, o complexo passa para sua forma ativa FT-VIIa. Novamente na presença de cálcio, o FT-VIIa converte o fator X (FX) na sua forma ativa (FXa).

A cascata de coagulação é chamada de intrínseca devido ao fato de que todos os componentes necessários para a coagulação já estão presentes no sangue e não exige componentes externos (DAVIE e RATNOFF, 1964). O fator XII é um zimogênio, que ao ser ativado se converte em uma serina protease (FXIIa) através do contato com

colágeno, ácidos nucleicos, agregados proteicos e plaquetas resultantes de um trauma das células sanguíneas. Estas células sanguíneas são incapazes de expressar o fator tecidual, por esse motivo esta cascata difere da extrínseca (MACFARLANE, 1964).

O FXIIa ativa o fator XI (FXI) em FXIa, que por sua vez converte o fator IX (FIX) em FIXa que ativa o fator VIII (FVIII) em FVIIIa que converte o FX em FXa. São quatro momentos de conversão que originam o FXa necessário para o restante da coagulação,

Nova hipótese de coagulação sanguínea

Posteriormente, se observou que a cascata de coagulação chamada previamente de intrínseca, que é dependente de FXII acontecia de forma normal em indivíduos deficientes em FXII ou com plasma esgotado de FXII (STAVROU e SCHMAIER, 2010). Em função disso, começou a se formar uma nova teoria para explicar este novo modelo de coagulação.

O mecanismo inicial desse modelo continua exatamente igual ao modelo da coagulação extrínseco, porém a liberação da trombina somente por essa via não é suficiente para a evolução da coagulação, no entanto, é suficiente para estimular a expressão de uma série de fatores na superfície das plaquetas necessários para uma expansão de trombina em quantidades suficientes para a formação do coagulo. Por essa razão, este novo conceito, é chamado de mecanismo celular de coagulação (MCMICHAEL, 2012).

A trombina originada pela conversão do FX em FXa através do complexo FT-FVIIa é residual, e tem somente a concentração necessária para poder promover um segundo momento da cascata convertendo o FXI em FXa, estimulando a expressão do fator FIX, FVIII e FV como mostra a Figura 2.

Figura 2. A nova hipótese de coagulação sanguínea onde a trombina originada por um trauma tecidual estimula diversos fatores para produzir mais trombina. Figura adaptada a partir do texto (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Logo após a trombina residual desencadear a expressão, ativação e produção de fatores e cofatores adicionais, ocorre uma maior taxa de ativação do fator X levando a uma expansão de trombina suficientemente alta para que ocorra a coagulação (VERSTEEG *et al.*, 2013).

1.3. Tratamento das Hemofilias com derivados de plasma.

Em 1940 Edwin J. Cohn foi o pioneiro do fracionamento do plasma, uma destas frações era chamada de fração “I”. Esta fração continha fibrinogênio, fator VIII e fator von Willebrand, porém naquela época isso ainda não era conhecido (MORRISON *et al.*, 2002). A função desta fração somente foi demonstrada e utilizada nas décadas de 50s e 60s no tratamento de pacientes com hemofilia (MCMILLAN *et al.*, 2010). Este tratamento não era 100% eficiente, pois as concentrações de fatores de coagulação no plasma doado não eram suficientes para estancar hemorragias causadas por acidentes ou

cirurgias; pacientes poderiam vir a óbito devido a uma simples extração dental (MCINTYRE *et al.*, 1959).

Ainda em 1960, Judith Pool, uma pesquisadora da universidade de Stanford, juntamente com seu colega Jean Robinson estudavam o processo de coagulação usando “pools” de plasma. Estes “pools” ficavam guardados em grandes contêineres, eram descongelados muito lentamente, pois o material descongelado degradava o fator de coagulação FVIII. Ao descongelar o plasma, as análises não mostravam presença de fator VIII, então Judith Pool testou um precipitado pastoso não descongelado que havia no recipiente e descobriu grandes quantidades de FVIII. Assim sendo, Judith Pool descobriu o crio-precipitado de plasma que tinha FVIII muito mais concentrado do que o plasma comum. Bolsas com diversos crio-precipitados podiam ser administrados ao mesmo tempo (KASPER e USA, 2017). Pela primeira vez, quantidades suficientes de FVIII poderiam ser administradas para controlar sangramentos durante cirurgias.

Apesar de todas as tentativas de conseguir um tratamento eficiente para as hemofilias terem sido relativamente bem sucedidas, o tratamento moderno da hemofilia começou somente em 1970 com os liofilizados concentrados de plasma. As técnicas de liofilização evoluíram e a técnica desenvolvida na Suécia foi espalhada para o mundo todo virando um tratamento eficiente que prevenia sangramentos e a artropatia (FRANCHINI e MANNUCCI, 2012).

Em 1977 se descobre a droga chamada Desmopressina (DDAVP), uma droga sintética que aumenta os níveis de fator VIII e von Willebrand e pode minimizar o uso de derivados de plasma cujo custo era alto, além da grande possibilidade de transmissão de doenças. No entanto, os efeitos colaterais e o custo acabaram por desencorajar o uso em tratamentos contínuo (MANNUCCI, 1997).

O plasma humano, em termos absolutos, é uma fonte pobre em fatores da coagulação para fins industriais. Cerca de 90% do plasma é composto por água, as proteínas representam apenas 7% e, deste total, menos de 1% é constituído por todos os fatores da coagulação. Além da quantidade baixa de fatores de coagulação presentes no plasma humano, FVIII derivado do mesmo possui um maior risco de contaminações. Nos anos 80s, 60-70% dos pacientes em tratamento para hemofilia estavam infectados com HIV (EVATT, 2006) e quase todos os pacientes tinham co-infecção com HCV (ORMAN *et al.*, 2017). Isso forçou as entidades mundiais de saúde a reforçar e melhorar as técnicas

de detecção de vírus em doadores de sangue bem como protocolos reforçados de inativação viral nos liofilizados.

1.4. Tratamento das Hemofilias com produtos recombinantes

A década de 80 foi uma década onde muitos produtos de DNA recombinantes começaram a ser conceitualizados. O gene do fator FIX foi clonado em 1982 (CHOO *et al.*, 1982), seguido do gene FVIII em 1984 (WOOD *et al.*, 1984) e FVII também em 1984 (HAGEN *et al.*, 1986). Após um período de testes clínicos e a liberação destes produtos pelos órgãos como a FDA, eles foram sendo lançados no mercado mundial como mostram as Tabelas 1, 2 e 3.

As tecnologias de DNA recombinante possuem uma serie de vantagens sobre produtos derivados do plasma sendo elas; 1) possibilidade de produção praticamente ilimitada – os derivados de plasma dependem dos estoques, enquanto que os recombinantes podem ser produzidos de forma continua; 2) Segurança – por não serem derivados de plasma humano possuem uma segurança superior, eliminando os riscos de contágio por vírus transmitidos pelo sangue e príons (FRANCHINI, 2010); 3) as moléculas dos fatores podem ser manipuladas, eliminando componentes desnecessários ou até mesmo adicionando compostos para elevar a farmacocinética e farmacodinâmica (LIU *et al.*, 2013; HIGEL *et al.*, 2016).

Tabela 1. Produtos FVIIIr lançados no mercado americano.

Ano	Produto	Empresa	Geração	Linhagem	Tipo de proteína	Meio de Cultivo	Estabilizante
1993	Recombinante	Baxter	1 ^a	CHO	Completo	Soro Bovino	Sim
1994	Helixate	Bayer	2 ^a	BHK	Completo	Plasma Humano	Não
1999	ReFacto	Wyeth	2 ^a	CHO	B-Deletado	Plasma Humano	Não
2000	Kognate	Bayer	2 ^a	BHK	Completo	Plasma Humano	Não
2004	Advate	Baxter	3 ^a	CHO	Completo	Quim. Definido	Não
2009	Xyntha	Pfizer	3 ^a	CHO	B-Deletado	Quim. Definido	Não
2015	Novo Eight	Novo Nordisk	3 ^a	CHO	B-Deletado	Quim. Definido	Não
2015	Nuwiq	Octapharma	4 ^a	HEK	B-Deletado	Quim. Definido	Não

Os fatores FVIIIr foram desenvolvidos para melhorar a segurança no tratamento de pacientes com derivados de plasma. Quatro gerações estão disponíveis atualmente, sendo a primeira, que utilizava derivados de animais no cultivo celular como a albumina

sérica humana para estabilizar a molécula, ou seja, uma molécula recombinante cuja produção e estabilidade se assemelham bastante as moléculas derivada do plasma. Na segunda geração de FVIIIr as células eram cultivadas na presença de plasma humano, porém não mais estabilizadas com compostos derivados de mamíferos (SANTAGOSTINO, 2014a). A terceira geração de produtos eliminou por completo a presença de derivados animais e a quarta geração introduziu pela primeira vez células humanas para expressar a molécula alvo, em vez de células de linhagem de hamster (CHO ou BHK) (SANTAGOSTINO *et al.*, 2015; WINGE *et al.*, 2015).

Tabela 2. Produtos FVIIr lançados no mercado americano.

Ano	Produto	Empresa	Geração	Linhagem	Tipo de proteínas	Meio de Cultivo	Estabilizante
1996	Novo Seven	Novo Nordisk	-	BHK	Completo	Quim. Definido	Não
2016	Aryo Seven	Aryo Gen	-	BHK	Completo	Quim. Definido	Não

Desde a sua concepção em 1984, o produto Novo Seven é o único mundialmente comercializado contendo o FVIIr que é adequado para o tratamento das hemofilias A e B (HEDNER e LEE, 2011). Outro produto semelhante foi desenvolvido com o nome Aryo Seven (TOOGHE *et al.*, 2016), que apesar de demonstrar eficácia clínica em comparação com o Novo Seven, não há dados referentes ao seu desenvolvimento (FARANOUSH *et al.*, 2016).

Tabela 3. Produtos FIXr lançados no mercado americano.

Ano	Produto	Empresa	Geração	Linhagem	Tipo de proteína	Meio de Cultivo	Estabilizante
1997	BeneFIX	Pfizer	-	CHO	Completo	Quim. Definido	Não
2013	RIXUBIS	Baxter	-	CHO	Completo	Quim. Definido	Não

Da mesma forma que o Novo Seven, o BeneFIX da Pfizer dominou o mercado internacional para o FIXr por muitos anos (ele foi o primeiro produto comercializado), somente em 2013 chegou um análogo da Baxter (FRANCHINI *et al.*, 2013; WINDYGA *et al.*, 2014).

1.5. Situação do Brasil no panorama das Hemofilias

A Organização Mundial de Saúde estima a existência de 400.000 hemofílicos no mundo (80% hemofilia A e 20% hemofilia B) (MANNUCCI e FRANCHINI, 2013). A Federação Mundial de Hemofilia, no seu mais recente levantamento de 2010, registrou a existência de 162.781 hemofílicos (125.049 A e 25.160 B) em 106 países. No Brasil, um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2015 indicava a existência de 10.000 hemofílicos A e 2.000 hemofílicos B. No entanto, o maior número de pacientes é especificamente da hemofilia A. No mesmo ano, o Ministério da Saúde pretendia investir mais de R\$ 880 milhões no setor. Ainda em 2015 o Brasil atingiu a meta estabelecida pela OMS de 3,0 UI para consumo de hemoderivados per capita. O investimento foi praticamente triplicado se comparado ao investimento de 2008 que foi de R\$ 234 milhões. Consequentemente o consumo de medicamentos subiu, seguindo o mesmo padrão entre 2008 - 2014 onde em 2008, foram consumidos 203,9 milhões de UI, enquanto em 2014 foram utilizadas 562,3 milhões de unidades entre as formas plasmática e recombinante.

1.6. Produção de Fatores de coagulação no Hemocentro de Ribeirão Preto

O uso de FVIII recombinante é de alto custo (estimado em até U\$100.000/ano/paciente) e para no futuro disponibilizar um tratamento mais acessível aos pacientes, o Hemocentro de Ribeirão Preto desenvolveu uma plataforma de produção de fatores de coagulação recombinantes (FVII, FVIII e FIX). O nosso grupo de pesquisa está focado na produção de fatores de coagulação recombinantes em células humanas (DE CASTILHO FERNANDES *et al.*, 2011; SWIECH *et al.*, 2012; DE SOUSA BOMFIM *et al.*, 2016). Partimos da hipótese de que as proteínas produzidas em células humanas são menos imunogênicas do que as produzidas em células de hamster. Estas células possuem um padrão de glicosilação diferente das células humanas. Para o FVIII a glicosilação e a sulfatação são vitais para sua funcionalidade e ligação ao von Willebrand. A produção em células humanas evita a inserção de moléculas (carboidratos) modificadas, que são altamente imunogênicas em seres humanos (SWIECH *et al.*, 2012).

Em nosso grupo de pesquisa, desenvolveram-se vetores lentivirais contendo o gene do FVIII com o domínio B parcialmente deletado. Esse tipo de vetor tem a capacidade de transduzir de forma estável diversas linhagens celulares, incluindo células de origem hepática. Este vetor viral com promotor CMV resultou em alta produção de VIII em todas as linhagens testadas, tendo destaque na produção em linhagem SK-Hep (rendimento de 5 UI/ mL de FVIIIr) (PICANCO *et al.*, 2007).

O FVIIIr desenvolvido no Hemocentro de Ribeirão Preto apresenta maior estabilidade *in vitro* quando comparado ao FVIII comercial derivado do plasma. A funcionalidade *in vivo* foi demonstrada pela sua atividade biológica e pelo desafio do corte da cauda de camundongos hemofílicos A (DA ROSA *et al.*, 2012). As células SK-HEP produtoras de FVIIIr crescem de forma adequada em um sistema escalável (garrafas *spinner* e biorreatores de 2L), produzem FVIII ativo, indicando que esta plataforma de produção pode ser otimizada para atender às necessidades da escala de produção comercial (DA ROSA *et al.*, 2012).

Este mesmo vetor foi escolhido para clonagem do FVII e novamente as células Sk-HEP-FVII atingiram a maior produção. Essas células provaram ser eficazes na produção de FVIIr, que é uma proteína muito instável e qualquer tentativa de produção em larga escala em quantidades significativas é desafiadora. Vários grupos têm tentado produzir grandes quantidades de FVII recombinante. Na célula CHO a produção varia de 300 a 500 ng/ mL (HALABIAN *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2013). Em 2008, Wajih e colaboradores mostraram produção de 273 ng /mL de FVII em células humanas HEK293 (WAJIH *et al.*, 2008). No nosso sistema de produção, observou-se que as células humanas utilizadas foram capazes de produzir até três vezes mais FVIIr do que os trabalhos anteriores (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2017).

Existe uma necessidade constante de melhorar os sistemas de expressão existentes e também desenvolver novas abordagens para enfrentar as demandas de proteínas terapêuticas. As linhagens celulares humanas surgiram como uma alternativa nova e poderosa para a produção de proteínas terapêuticas humanas, porque este sistema de expressão deverá produzir proteínas recombinantes com modificações pós-traducionais mais semelhantes às suas contrapartes naturais e reduzir as possíveis reações

imunogênicas contra epítomos não humanos. Atualmente, pouca informação está disponível sobre o cultivo de células humanas para a produção de produtos biofarmacêuticos. Estas células mostraram produção eficiente em escala de laboratório e representam uma ferramenta importante para a indústria farmacêutica.

O sistema de produção desenvolvido no Hemocentro de Ribeirão Preto aponta as células humanas como uma alternativa promissora, podendo no futuro substituir a principal plataforma de produção atual que é baseada em células CHO. Apesar da grande promessa, vale ressaltar que não existe uma plataforma de produção universal. Um sistema de expressão ótimo deve ser selecionado para cada proteína recombinante, levando em consideração suas características, a linhagem celular e as propriedades dos vetores de expressão, bem como as questões regulatórias e o custo da produção.

1.7. Biossíntese e Estrutura das proteínas FVII e FVIII

Como mencionado anteriormente, a deficiência na qualidade ou quantidade de FVIII causam distúrbios de coagulação levando o paciente a uma condição chamada de hemofilia A. O tratamento da Hemofilia A pode ser realizado aplicando FVIII diretamente no paciente após acidentes ou procedimentos cirúrgicos. Alternativamente, o FVII também pode ser utilizado para os mesmos fins, porém essa proteína pode ter uma segunda função e ser eficiente para o tratamento da Hemofilia B. Sendo assim, para poder desenvolver estes produtos é necessário entender a sua estrutura e funcionamento.

1.7.1. Proteína FVIII

O fator de coagulação VIII é uma molécula altamente complexa com diversos sítios de modificações pos-traducionais, possui um tamanho de 270kDa e é formada por duas cadeias; leve 80kDa e pesada 90kDa, unidas por uma ponte de íon metálico (SANDBERG et al., 2001; KOSLOSKI et al., 2009). A cadeia pesada possui dois domínios (A1 e A2) e a cadeia leve possui três domínios (A3, C1 e C2) como mostra a Figura 3. Ambas as cadeias são necessárias para ação biológica do FVIII. Vinte anos de experimentação demonstraram que a deleção parcial do domínio B incrementa a secreção, quando produzida de forma recombinante (SANDBERG et al., 2001). O que fez com que algumas empresas passassem a produzir o FVIIIr com o domínio B

deletado (tabela 1). A molécula também possui um sítio de ligação com fator von Willebrand, fator que confere a estabilidade a molécula FVIII (JOHNSTONE et al., 1991).

Figura 3. Estrutura da proteína FVIII.

A molécula é expressa como um heterodímero, o qual sofre ao menos duas clivagens intracelulares no domínio B. A cadeia leve é formada pelos domínios A3, C1 e C2 e a cadeia pesada pelos domínios A1, A2 e B. Ao ser secretada, a molécula se associa com o fator von Willebrand o que lhe confere aproximadamente 10h de meia vida.

1.7.2. Proteína FVII

O fator de coagulação VII é uma proteína glicosilada que circula no plasma como um zimogênio (pró-enzima) de 50 kDa (BHARADWAJ *et al.*, 1996). Quando ativada a molécula é parcialmente clivada e forma duas cadeias de 20 e 30 kDa, que permanecem unidas por uma ponte dissulfeto. A cadeia de 20 kDa consiste um domínio GLA, e dois domínios EGF ligada por ligação peptídica a cadeia de 30 kDa que é uma protease de serina (necessária para clivar outra molécula FVII). Na forma ativada a molécula aciona outras moléculas de fator VII (auto-ativação), esta proteína ativada possui uma meia vida de aproximadamente 3 horas (TIEDE, 2015). A ativação *in vitro* da molécula ocorre por proximidade (PEDERSEN *et al.*, 2002).

Figura 4. Representação da molécula de FVII (A) e sua clivagem por proximidade com outra molécula FVII (B).

1.8. Processo de purificação de fatores FVII e FVIII recombinantes

Os processos de purificação dos fatores de coagulação envolvem poucas etapas, porém estas são muito sensíveis e muitas vezes custosas. Devido ao fato da molécula ser extremamente lábil e ter meia vida relativamente baixa, o processo de purificação deve ser extremamente rápido e de forma eficiente. Para que a alta eficiência seja alcançada, resinas cromatográficas de afinidade ou imunoafinidade devem ser empregadas para isolar o produto da maioria das impurezas. Etapas adicionais devem ser adaptadas para remover o DNA residual, que normalmente é co-purificado com moléculas alvo, sendo assim, quase sempre é necessário o uso de resinas com cargas, como por exemplo, de intercambio iônico. Além disso, existem técnicas de dialise que podem ser utilizadas para trocar tampões, concentrar a proteína alvo e até mesmo promover a ativação da mesma. A Tabela 4 mostra as diversas técnicas empregadas para purificar cada produto lançado comercialmente no mercado.

Tabela 4. Lista dos produtos comerciais recombinantes para o tratamento das hemofilias A e B e seus métodos de purificação.

Fator	Produto	Empresa	Processo de purificação
FVIIIr	Recombinate	Baxter	CIA/CII
FVIIIr	Helixate	Bayer	CIA/CII/SD/UF
FVIIIr	ReFacto	Wyeth	CII/SD/CII/CIH/EM
FVIIIr	Kognate	Bayer	CIA/CII/SD/UF
FVIIIr	Advate	Baxter	CIA/CII/SD
FVIIIr	Xyntha	Pfizer	CIA/CII/SD/NF
FVIIIr	Novo Eight	Novo Nordisk	CIA/CII/SD/NF/EM
FVIIIr	Nuwiq	Octapharma	CMM/CII/UF/SD/CA/ NF/CII/EM
FVIIr	Novo Seven	Novo Nordisk	CA/CII/SD/UF
FVIIr	Aryo Seven	Aryo Gen	?
FIXr	BeneFIX	Pfizer	CII/CA/CA/CA
FIXr	RIXSUBIS	Baxter	CII/SD/UF/NF

Legendas: **CIA** - cromatografia de imunoafinidade, **CII** - cromatografia de interação iônica, **SD** – tratamento solvente/detergente, **CIH** – cromatografia de interação hidrofóbica **UF** – Ultra filtração, **NF** – Nano filtração, **EM** – Exclusão molecular, **CA** – cromatografia de afinidade, **CMM** - Cromatografia MultiModal.

Purificação dos fatores VII e VIII recombinantes por cromatografia.

A opção de purificar a proteína FVIIr exclusivamente por técnicas cromatográficas é uma estratégia na qual a proteína de interesse sofre a menor quantidade de stress possível pois não há cisalhamento, variações bruscas de pH e a temperatura pode ser facilmente controlada, além de reduzir os volumes iniciais várias centenas de vezes. Como pode ser observado na Tabela 4, todas as versões de FVIIrI são purificadas através de técnicas cromatográficas.

A cromatografia de imunoafinidade, apesar de eficiente, apresenta a desvantagem de ser cara e pode apresentar instabilidade dos anticorpos ligantes. Recentemente, foram desenvolvidos ligantes peptídicos para purificação do FVIII (VIIISelect) e FVII (VIISelect) que são mais estáveis. Estas resinas possuem um grupo funcional ancorado ao qual o fator se liga por afinidade (pontes hidrofóbicas e carga específica) e para desfazer esta ligação é necessária uma alta concentração de sal e solvente orgânico (MCCUE *et al.*, 2009; MCCUE *et al.*, 2015). Trata-se de uma matriz porosa de agarose com um ligante específico aderido (Figura 5), sendo para a resina FVIII Select um

ligante específico de 13kDa e para a FVII Select um de 14kDa, ambos produzidos de forma recombinante a partir de leveduras metilotróficas.

Figura 5. Estrutura parcial das resinas VIII e VII Select.

Adicionalmente, a purificação direta do FVIII a partir do meio de cultura celular pode ser realizada utilizando-se resinas mistas, mais conhecidas como multimodais. Neste caso, a interação ocorre por diversas ligações (hidrofóbicas, iônicas e pontes de hidrogênio) isolando a molécula alvo (CASADEMUNT *et al.*, 2012; WINGE *et al.*, 2015). Na cromatografia de multimodal os ligantes interagem com a molécula alvo por dois ou mais modos de ação, podendo ser operados de forma separada ou concomitante. As forças eletrostáticas são as mais comuns, porém pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem ocorrer. Estas interações são induzidas por configurações tridimensionais dos ligantes que podem agir em diferentes frentes de interações adicionais.

No caso da cromatografia utilizada: Capto MMC (General Electric), o ligante é um braço estendido de um trocador catiônico fraco ligado a uma matriz de agarose, Figura 9.

Figura 6. Representação esquemática do ligante da resina de cromatografia de multimodal.

Finalmente, uma cromatografia adicional pode ser empregada para interagir com o FVIIIr somente por carga, facilitando assim a separação de DNA, se presente na amostra (WINDYGA *et al.*, 2014; SANTAGOSTINO *et al.*, 2015; WINGE *et al.*, 2015). Essa técnica é a cromatografia de intercambio iônico e são técnicas bastante estudadas e usadas há décadas para separar proteínas. O princípio de separação é o eletrostático, ou seja, as propriedades de separação se baseiam em cargas, ou das proteínas de interesse ou das impurezas. É de conhecimento geral que as moléculas podem ter carga, positiva ou negativa, ou não ter carga nenhuma. No entanto, essas cargas podem ser manipuladas, deixando a molécula mais fortemente carregada ou até mesmo inverter a carga. Estas manipulações se dão através da flutuação do pH, baseado no ponto isoelétrico da proteína em questão.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a extrema importância e a crescente demanda dos fatores de coagulação, há necessidade de produção de moléculas menos imunogênicas, como os fatores produzidos em linhagens celulares humanas. O desenvolvimento de um processo de purificação, assim como a formação de recursos humanos nesta área são de extrema importância para implementar a produção de fatores de coagulação em nosso país. Neste contexto, purificação dos fatores recombinantes VII e VIII, que são proteínas complexas e lábeis, constitui-se um importante desafio.

A purificação destes fatores produzidos no Hemocentro de Ribeirão Preto é de extrema importância para um correto estudo de suas propriedades, características e estudo de estabilidade. O desenvolvimento desta plataforma de purificação é essencial para a realização de trabalhos futuros com estas proteínas em sua forma mais pura e para uma futura aplicação pré-clínica e clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de plataformas de purificação de FVIIr e FVIIIr de coagulação produzidos em células Sk-Hep.

3.2. Objetivos específicos

FVIII

- Purificar a proteína FVIIIr usando diversas técnicas disponíveis de cromatografia;
- Avaliar a efetividade e desempenho da coluna multimodal Capto MMC como uma das etapas de purificação;
- Avaliar a efetividade e desempenho da coluna de afinidade VIII Select® como uma das etapas de purificação do FVIIIr;
- Avaliar a efetividade e desempenho das colunas de troca iônica como etapas de purificação do FVIIIr;
- Quantificar proteína total;
- Quantificar FVIII purificado por teste cromogênico;
- Analisar as frações proteicas por Western blot..

FVII

- Purificar a proteína FVIIr utilizando técnicas cromatográficas;
- Avaliar a efetividade e desempenho da coluna de afinidade VII Select® como uma das etapas de purificação do FVIIr;
- Avaliar a efetividade e desempenho das colunas de troca iônica como etapas de purificação do FVIIr e atividade de FVII;
- Quantificar proteína total;
- Quantificar FVIIr purificado por PT;
- Analisar as frações proteicas por Western blot.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Purificação

As ferramentas de purificação envolveram a utilização de cromatografias de interação multimodal, afinidade e intercambio iônico. Adicionalmente fez-se o uso de métodos de filtração para purificação e trocas de tampão, métodos estes utilizados para ambas as proteínas.

As principais estratégias de purificação para cada uma das proteínas recombinantes pode ser observada no fluxograma da Figura 7 para o FVIIIr e Figura 8 para o FVIIr.

Figura 7. Fluxograma de experimentos de purificação do FVIIIr

Figura 8. Fluxograma de experimentos de purificação do FVIIr

As metodologias mostradas nos fluxogramas serão detalhadas abaixo.

4.1.1. Preparação da amostra (Sobrenadante da cultura celular)

Um criotubo contendo a linhagem SK-Hep-FVIIIr ou Sk-Hep FVIIIr armazenado em nitrogênio líquido foi descongelado. O conteúdo do criotubo contendo 1,0 mL de solução de congelamento (10% DMSO + 90% soro fetal bovino (SFB) e $5 \cdot 10^6$ células) foi lavado com 10 mL de DMEM 10% SFB e centrifugado a $315 \times g$ por 5 minutos. Posteriormente, uma lavagem com PBS foi realizada. As células foram plaqueadas em 15 mL de DMEM 10% SFB em frasco T de 75 cm^2 tratado para adesão celular. Para o cultivo da linhagem SK-Hep-FVIIIr foi adicionado $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de vitamina K ao meio de cultivo. As células foram mantidas em incubadora a 37°C , 80% de umidade e 5% de CO_2 até atingirem confluência de 95%. Para repicar as células foi utilizado 5,0 mL de solução Tryple (para separação da monocamada do frasco) e se incubou por 5 min a 37°C . Então, as células foram coletadas e transferidas para um tubo Falcon estéril de 50mL. Foi adicionado mais 10 mL de DMEM 10% SFB para inativação da enzima e centrifugado a $315 \times g$ por 5 minutos. Uma amostra foi retirada para contagem utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan e, então, $1 \cdot 10^6$ células foram plaqueadas em frasco T de 75 cm^2 . As mesmas, então, foram cultivadas por 72 horas até que atingissem 80% de confluência. Nesse momento, o meio metabolizado foi retirado e descartado. As células aderidas na garrafa foram lavadas com 15 mL de PBS. Então, 10 mL de DMEM sem soro, suplementado com ou sem vitamina K ($5 \text{ }\mu\text{g/mL}$) foi adicionado ao cultivo. Passadas 48 horas, o sobrenadante contendo fator recombinante VII ou VIII foi coletado, centrifugado a $315 \times g$ por 5 minutos, filtrado em $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ e armazenado a -80°C para posterior processamento.

Antes do início do processo de purificação, o sobrenadante foi descongelado, filtrado em $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ e condicionado para o processo cromatográfico.

4.1.2. Cromatografia Multimodal

A coluna pré-empacotada HiTrap de 5,0 mL foi equilibrada com tampão de corrida MMC (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, pH 7,5). O sobrenadante, condicionado também em mesmo tampão foi injetado na coluna usando o sistema Akta Pure (General Electric) a um fluxo linear de $5,0 \text{ mL/min}$. Ao fim da injeção, a coluna foi re-equilibrada com o tampão de corrida e a amostra foi eluída usando o tampão de eluição (Tris-HCl 50mM,

NaCl 1500mM, 50% Etilenoglicol, Arginina 700mM, pH 7,5). O volume de eluição correspondeu a 2 ou 3 volumes de coluna (CV).

Após eluição a amostra foi armazenada em +4°C e uma alíquota foi tomada para posterior análise. A coluna foi lavada com água MilliQ até que a condutividade fosse inferior a 2 mS/cm. Posteriormente a coluna foi lavada com 10 CV de NaOH 0.5M e logo lavada com 30 CV de água MilliQ. Finalmente, a coluna foi armazenada em etanol 20% e guardada em +4°C.

O processo de purificação usando a cromatografia multimodal MMC foi utilizado somente para a proteína FVIIIr.

4.1.3. Cromatografia de afinidade FVIII Select e FVII Select

As resinas FVIISelect e FVIIISelect foram empacotadas em colunas Tricorn 5/50 (ambas General Electric) injetando a resina dentro da coluna previamente lavada com água MilliQ até atingir o topo e empurrada com ajuda de um pipetador (empurrando ar) até a compactação da resina. Esse processo é repetido por tantas vezes quanto necessário até preencher completamente o cilindro da coluna. O êmbolo é colocado (com fluxo) e rosqueado na parte superior da coluna. O sistema foi verificado visualmente quanto à integridade da resina e se a mesma estava hidratada.

4.1.3.1. FVIIISelect™

Ao sobrenadante contendo FVIII foi adicionado Tris-HCl 50mM, o pH ajustado para 7,5 e filtrado por 0,22µm. A resina foi pré-equilibrada com tampão de corrida (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 30mM, Tween 80 0.02%, pH 7,5). O sobrenadante foi injetado a um fluxo linear de 2,0 mL/min. Ao fim de injeção, a coluna foi re-equilibrada com tampão de corrida, lavada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão de lavagem (50mM Tris-HCl, 20mM Histidina, 20mM cloreto de cálcio, 1000mM cloreto de sódio, 0.02% Tween 80 pH 7,5).

Posteriormente a coluna foi lavada com dois tampões de lavagem, Tampão A (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 300mM, Tween 80 0.02%, pH 7,5) e Tampão B (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 1000mM, Tween 80 0.02%, pH 7,5)

Após as lavagens a amostra foi eluída ou com tampão de eluição com base em Etileno glicol (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 1500mM, etileno glicol 50%, Tween 80 0.02%, pH 7,5) ou com base de propilenoglicol (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 1500mM, propilenoglicol 50%, Tween 80 0.02%, pH 7,5) O volume das eluições correspondeu a aproximadamente 20 VC.

Após a eluição a amostra foi guardada e uma alíquota foi tomada para posterior análise. A coluna foi lavada com água MilliQ ate que a condutividade fosse inferior a 2 mS/cm. Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 VC de 0.1M de acido cítrico e logo lavada com 30 VC de água MilliQ. Finalmente a coluna foi armazenada em etanol 20% e guardada em +4°C.

4.1.3.2. FVIISelect™

Ao sobrenadante contendo FVII foi adicionado Tris-HCl 50mM, o pH ajustado para 7,5 e filtrado por 0,22µm. A resina foi pré-equilibrada com tampão de corrida (Tris-HCl 50mM, pH 7,5). O sobrenadante foi injetado a um fluxo linear de 2,0 mL/min. Ao fim de injeção, a coluna foi re-equilibrada com tampão de corrida, lavada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão de lavagem (50mM Tris-HCl, cloreto de sódio 300mM pH 7,5).

Após as lavagens a amostra foi eluída ou com tampão de eluição com base em propilenoglicol (Tris-HCl 50mM, Histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 1500mM, etileno glicol 50%, Tween 80 0.02%, pH 7,5).

O processo de limpeza e armazenamento da coluna contendo a resina FVIISelect™ foi o mesmo do ponto 4.1.3.1.

4.1.4. Cromatografia de Intercâmbio iônico

4.1.4.1. IEX para purificar FVIIIr

Uma etapa da purificação, usando uma resina SP sepharose FastFlow (General Electric) foi utilizada como um passo adicional de purificação para o FVIIIr. Um coluna Hitrap de 1,0 mL foi pré-equilibrada com tampão de corrida (50mM Tris-HCl, 20mM Histidina, 20mM cloreto de cálcio, 0,02% Tween 80 pH 7,5). A amostra eluída da

coluna FVIIISelect foi condicionada (diluída) e injetada a um fluxo linear de 1,0 mL/min. Ao fim da injeção a coluna foi re-equilibrada com o tampão de corrida e a amostra foi eluída usando tampão de eluição Tris-HCl 50mM, histidina 20mM, cloreto de cálcio 20mM, cloreto de sódio 2M, 0,02% Tween pH 7,5. O volume de eluição correspondeu a 5 VC.

Após a eluição a amostra foi armazenada em -20°C e uma alíquota foi tomada para posterior análise. A coluna foi lavada com água MilliQ até que a condutividade fosse inferior a 2 mS/cm. Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 VC de 0,5M NaOH e logo lavada com 30 VC de água MilliQ. Finalmente, foi armazenada em etanol 20% e guardada em 4°C.

4.1.4.2. IEX para purificar FVIIr

Uma etapa da purificação, usando uma resina Q FastFlow (General Electric) foi utilizada como um passo de purificação para o FVIIr. Um coluna Hitrap de 1,0 mL foi pré-equilibrada com tampão de corrida (50mM Tris-HCl, pH 7,5). A amostra eluída da coluna FVIIISelect foi condicionada em mesmo tampão e injetada a um fluxo linear de 1,0 mL/min. Ao fim da injeção a coluna foi re-equilibrada com o tampão de corrida e a amostra foi eluída usando tampão de eluição (50mM, 1,5M de cloreto de sódio, pH 7,5). O volume de eluição correspondeu a 5 VC.

Após a eluição, a amostra foi guardada e uma alíquota foi tomada para posterior análise. A coluna foi lavada e acondicionada igualmente como a citada acima.

4.1.5. Processo de diluição de amostra

Durante o processo de purificação da FVIIIr, quando empregadas diversas colunas, é necessário diluir a amostra entre etapas cromatográficas, devido ao fato de que tampões de eluição contêm solventes e sais que são usados como agentes de eluição de outras etapas cromatográficas. Sendo assim, é crucial abaixar a concentração desses compostos e condicionar a amostra para a próxima etapa de purificação. Para isso foi utilizado tampão de diluição (50mM Tris-HCl, 20mM Histidina, 20mM cloreto de cálcio, 0,02% tween 80 pH 7.5) para diluir a amostra 50 vezes.

4.1.6. Dialise

Durante os testes de purificação de FVIIIr foi utilizado o processo de dialise usando tubos Vivaspin de 30kDa. Aplicando a amostra nos tubos, diluindo com tampão 50mM Tris-HCl, 20mM Histidina, 20mM cloreto de cálcio, 0,02% Tween 80 pH 7.5 e centrifugando a 4000 rpm. O processo era monitorado usando formula $C1V1=C2V2$ até que os níveis de solvente fossem reduzidos a 0,1%.

Em se tratando do FVIIr, o processo de diálise é uma etapa crucial para a ativação do produto. Sendo assim o eluido de VIISelect era dialisado usando tubos Vivaspin de 5kDa contra tampão de liofilização (292 mg NaCl, 147 mg Cloreto de Cálcio, 132 mg de glicilglicina, 7.0 g de Tween 20, 3.0 g de manitol, pH 7,5). O processo era monitorado por fórmula $C1V1=C2V2$ até que os níveis de solvente fossem reduzidos a 0,1% e o tampão trocado totalmente.

4.2. Ferramentas analíticas

4.2.1. SDS-PAGE e Western Blotting (WB)

A técnicas de eletroforese e WB permitem avaliar a pureza das amostras contendo produtos FVIIr e FVIIIr. Além da pureza, observar a integridade da molécula em forma nativa e desnaturalizada. Adicionalmente avaliar a ativação das moléculas, especificidade de bandas, além de degradações.

Os géis de eletroforese de poliacrilamida usando Dodecil Sodio sulfato (SDS-PAGE) foram obtidos comercialmente usando o Mini-protean TGX de gradiente 4 a 20%. O tampão 5X de desnaturalização (SB5X) foi preparado misturando 4,0 mL de Tris-HCl-HCl 1.5M pH 6.8, 10mL de glicerol, 5mL de β -mercaptoetanol, 2,0 g de SDS e 1 mL de azul de bromofenol 1%. As injeções do gel foram preparadas incubando 80 μ L de amostra a ser analisada com 20 μ L de SB5X por 15min a 90°C. Dessa solução, 20 a 25 μ L foram injetadas nos poços do gel.

O SDS-PAGE foi realizado usando uma câmara de eletroforese Mini-Protean Tetra Cell systems e a fonte de poder Power Pac (ambos Bio-Rad). O Marcador de peso molecular utilizado nos géis de SDS-PAGE deste trabalho foi o Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad).

Terminada a corrida, o gel foi corado usando a técnica de nitrato de prata que consistiu em incubar 30s em micro-ondas e 5min a temperatura o gel com solução fixadora (50% metanol, 12% ácido acético e 38% H₂O), seguida de uma incubação com os mesmos tempos em etanol 30%. O gel posteriormente foi lavado com H₂O três vezes usando a incubação de 30 seg em micro-ondas potência alta e 2 min a temperatura ambiente cada. Em seguida, foi incubado por 30 seg em micro-ondas e 2 min a temperatura ambiente com solução de Tiossulfato de sódio 0,2mg/ml. O gel foi novamente lavado 5 vezes incubando 30 seg em micro-ondas potência alta e 2 min a temperatura ambiente. Seguido de incubação por 30 seg no micro-ondas e 5 min a temperatura ambiente em solução de nitrato de prata (2 mg/mL), posteriormente lavado por 60 seg a temperatura ambiente com H₂O e revelado com solução reveladora (0,06g/mL de Carbonato de sódio + 0,4mg de tiossulfato). A revelação foi realizada empiricamente observando o desenvolvimento da cor, quando a cor está no ponto considerado visível a reação foi parada com a solução fixadora descrita acima.

A captura de imagem, detecção de bandas e estimativa de quantidade de proteínas foi realizada no equipamento foto documentador BioRad.

O WB foi realizado transferindo um gel de SDS-PAGE para uma membrana de polivinidileno de fluoreto (PVDF), durante 1 hora e 35 volts. Após a transferência a membrana foi incubada em Tris-HCl 20mM, NaCl 385mM, Tween 20 0,05% (TBS-T), 5% de leite em pó desnatado por 12 horas a +4°C. Após a incubação, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T e posteriormente incubada com anticorpo primário diluído em TBS-T + 5% leite em pó desnatado a 4°C por 16 horas. Em seguida, a membrana foi novamente lavada, assim como no passo anterior, e incubada com anticorpo secundário diluído em TBS-T + 5% leite em pó desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período a membrana foi exposta ao reagente ECL Prime (General Electric) seguindo as instruções do fabricante e revelada no foto documentador BioRad.

Para FVIIr foi utilizado anticorpo primário anti-FVII humano (Abcam) em uma diluição de 1:500, o anticorpo secundário utilizado foi anti-habbit em diluição 1:5000.

Para o FVIIIr foi utilizado anticorpo primário Santa Cruz Sc-73597 diluído 1:200 e o anticorpo secundário BD Bioscience 610979 em diluição 1:2000.

4.2.2. O teste do tempo de protrombina (PT)

O PT funciona adicionando-se a amostra em soro humano esgotado de fator de coagulação VII. Constrói-se uma curva de calibração com soro normal e se adiciona um controle positivo ao equipamento coagulometro. O ultimo componente adicionado é o fator tecidual que irá catalisar a reação de coagulação nas amostras analisadas. Quanto maior é o tempo de reação menor é a quantidade de FVIIr presente nas amostras analisadas. Os testes foram realizados com Coagulometro ACL-7000 que foi calibrado com plasma calibrador HemosIL – 0020003700, usando-se de controle positivo HemosIL 0020003110 e plasma deficiente de FVII HemosIL 0020011700. Adicionalmente se colocou fator tecidual recombinante RecombiPastin 2G – 0020003050 (todas da Werfen). Amostras intermediárias do processo de purificação e amostras finais foram analisadas por esse método.

4.2.3. Método de Bradford

O método de Bradford é um método colorimétrico usado para quantificar proteínas em uma solução. O reagente químico interage com as proteínas aderindo-se as suas porções hidrofóbicas, esta reação por sua vez, sofre catalise e libera um corante azulado que pode ser detectado em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595nm. O método de Bradford foi realizado fazendo-se uma curva de BSA de 10, 5, 2.5, 1.25 e 0.65 ug. A curva e as amostras foram adicionadas em duplicata em uma placa de 96 poços (Cellstar) em um volume de 20 µL. Em seguida, adicionou-se 200uL de solução pronta Quick SatrtTM Bradford 1X Dye reagente (Biorad). Após incubação de 15 min a temperatura ambiente, a placa foi colocada no leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) e a leitura ocorreu a um comprimento de onda de 595 nm.

4.2.4. Teste Cromogênico para quantificação de FVIII ativo

O fator X é ativado pelo fator IXa. Essa ativação é estimulada pelo fator FVIII que age como cofator nessa reação. O kit comercial Chromogenix (Diapharma) funciona desta maneira: através das quantidades ótimas de Ca^{2+} e fator IXa, e um excesso de fator X, a ativação do fator X é linearmente relacionada a quantidade de fator VIII. Quando é formado o fator Xa, ele hidrolisa o substrato presente no teste do cromogênico liberando cor. Essa coloração pode ser medida em um espectrofotômetro em um comprimento de

onda de 405 nm. Sendo assim, esse método pode quantificar a quantidade de FVIII presente na amostra a ser analisada.

As amostras foram diluídas em tampão de diluição do kit e a curva de calibração preparada de acordo com as instruções do fabricante. As amostras e a curva foram transferidas para uma placa de 96 poços (Cellstar) em um volume de 50 μ L. a placa foi colocada no leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) e a leitura ocorreu a um comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram plotados em uma planilha excel e os valores de concentração dos fatores presentes na amostra calculados por fórmulas proporcionadas pelo provedor.

5. RESULTADOS

São descritos, a seguir, o resultados de duas partes experimentais distintas: purificação de fator recombinante VIII (FVIIIr) e purificação de fator recombinante VII (FVIIr) através de diferentes técnicas cromatográficas, análise de frações, determinação de rendimentos e avaliação de proteína final.

5.1. Purificação FVIIIr

O processo básico de purificação de FVIIIr a partir do sobrenadante de cultura neste trabalho está esquematizado na Figura 8 (material em métodos pagina 29). O processo completo consiste em etapas de cromatografia de multimodal, afinidade e troca iônica.

As cromatografias foram avaliadas medindo-se o conteúdo total de proteínas e a atividade de FVIII nas frações coletadas, calculando-se a recuperação e a atividade específica.

Inicialmente, as resinas foram testadas e avaliadas individualmente, os resultados estão mostrados a seguir:

5.1.1. Cromatografia Multimodal

A cromatografia multimodal CaptoMMC foi realizada com o intuito de verificar se a resina interage com o FVIIIr ou com impurezas. Para determinar essa interação o sobrenadante, previamente acondicionado e filtrado, foi injetado na coluna gerando um cromatograma (Figura 9).

Figura 9. Perfil Cromatográfico da CaptoMMC utilizando sobrenadante de Sk-Hep-FVIIIr, corrida CaptoMMC #1. Eixo 1 : Miliunidades de absorbância, Eixo 2: Condutividade medida em mS/cm. A linha azul do gráfico representa a UV enquanto a marrom representa a condutividade.

Nota: Todos os perfis cromatográficos foram idênticos para todos os testes, por essa razão somente um cromatograma será exibido.

Como pode ser observado na Figura 9, há uma grande quantidade de proteínas saindo no “flow-through”, a leitura na UV chega próximo a 350mAU. Ao final da injeção a coluna foi lavada e nesse momento foi observado o decréscimo da UV até a linha base. Posteriormente, o tampão de eluição foi aplicado e ocorreu a eluição acompanhada de um pico na UV e um pico na condutividade. O pico de condutividade é correspondente ao tampão de eluição e o pico de UV corresponde a proteínas sendo eluídas com esse tampão (na Figura 9 indicado pela seta verde).

A fração de flow-through e a fração de eluição foram analisadas por SDS-PAGE para verificar os perfis de proteínas contidas em cada fração (Figura 10).

Figura 10. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnaturante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia multimodal. Linha 1 – Sobrenadante, Linha 2 – Flow-through, Linha 3 – Eluido, Linha 4 – Marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad)).

De forma geral é possível observar que houve uma grande retirada de material inespecífico utilizando a cromatografia CaptoMMC. O material eluido não tem um perfil claro no gel, no qual a proteína que deveria estar na posição 90 e 80 kDa não é claramente visível (seta verde) sendo assim necessárias mais etapas de purificação.

No total, realizou-se três corridas de purificação com a resina CaptoMMC, das quais fez-se testes de quantificação de proteínas das frações e o teste cromogênico, para determinar em qual fração estava a proteína de interesse (FVIIIr) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de quantificação de proteína e cromogênico para detecção de FVIIIr nas frações cromatográficas.

Corridas	Volume sobrenadante	Concentração de proteína total no sobrenadante (mg)	Atividade de FVIII (UI total)	Volume de Flow-Through (mL)	Atividade de FVIII do flow-through (UI total)	Volume da fração Eluída (mL)	Atividade de FVIII da Fração Eluída (UI Totais)	Concentração de proteína total no Eluído (mg)	Concentração de proteína total no flow-through (mg)
Capto MMC #1	270	19,9	2321,91	270	77,7	15	930,84	2,1	17,8
Capto MMC #2	300	21,4	1987,1	300	51,2	15	1110,8	1,8	20,1
Capto MMC #3	150	11,5	874,5	150	12,3	15	784,5	1,1	8,5

Como se observa na Tabela 5, a grande maioria das moléculas de FVIII interagem com a resina e são eluídas com o tampão de eluição (Corrida Capto MMC #1: 930,84 UI; Corrida #2: 1110,8UI; Corrida #3: 784,5). Apenas uma baixa quantidade de proteína FVIIIr não interage com a resina cromatográfica e é eliminada no flow-through (Corrida #1: 77,7 UI), Corrida#2: 51,2 e Corrida #3: 12,3). É possível notar que grande quantidade de impurezas é eliminada com cromatografia (Corrida #1: 17,8 mg, Corrida #2: 20,1 mg e Corrida#3: 8,5 mg).

Nos três experimentos realizados, os perfis cromatográficos e os perfis das bandas nos géis foram exatamente iguais para três corridas de purificação.

5.1.2. Cromatografia de afinidade FVIIISelect ®

Para verificar o funcionamento da resina cromatográfica FVIIISelect foi realizado um teste com 375mL de sobrenadante de SK-Hep-FVIII para determinar se há interação entre a resina e a proteína alvo (FVIIIr). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com dois tampões e houve uma eluição com tampão de eluição (descritos na metodologia, item 4.1.3), o perfil cromatográfico observado está mostrado na Figura 11. Uma única fração de 80mL da eluição foi coletada e analisada por teste do cromogênico (Tabela 6).

Figura 11. Perfil Cromatográfico de sobrenadante de Sk-Hep-FVIII em resina de afinidade (FVIIISelect[®]), Corrida FVIIISelect #1 . Eixo 1 : MiliUnidades de absorvância, Eixo 2: Condutividade medida em mS/cm. A linha azul do gráfico representa a UV enquanto a marrom representa a condutividade. **Nota:** Todos os perfis cromatográficos foram idênticos para todos os testes, por essa razão somente um cromatograma será exibido.

Tabela 6. Atividade de FVIIIr obtido das frações na etapa cromatográfica com a resina VIIISelect.

Amostra	Atividade UI/mL	UI totais
Entrada	2,55	958
Flow-through	0,02	7,5
Tampão A	-0,12	0,0
Tampão B	-0,09	0,0
Fração de eluição (80 mL)	7,525	602
Recuperação	-	62,8%

É possível observar que não houve perda de FVIIIr no flow-through, indicando que a proteína de interesse interagiu com a coluna. Os tampões de lavagem também não apontaram a presença de FVIIIr nas etapas de lavagem (A e B).

Observou-se que na cromatografia mostrada houve boa recuperação de proteína de interesse, apresentando uma perda de apenas 37,2%.

Com o intuito de recuperar o FVIIIr eluído da FVIIISelect mais concentrado, foram realizadas coletas em frações menores. Uma nova cromatografia de afinidade com 125 mL de sobrenadante de Sk-Hep-FVIII foi realizada (Corrida VIIISelect #2), porém na eluição sete amostras de 10 mL foram coletadas e analisadas para a presença da proteína de interesse em cada uma (Tabela 7) e um gel de SDS-PAGE foi realizado para verificar o conteúdo destas frações (Figura 12).

Tabela 7. Atividade de FVIIIr obtido das frações da cromatografia com FVIIISelect, Corrida VIIISelect #2.

Amostras	Atividade UI/mL	UI totais
Entrada	3,57	447,49
Flow-through	0,087	10,875
F1	13,42	134,21
F2	9,62	96,27
F3	7,29	72,9
F4	3,56	35,63
F5	1,32	13,26
F6	1,07	10,78
F7	0,226	2,26
total:	-	365,31

Nota: Os tampões de lavagem A e B não foram mais analisados.

Figura 12. SDS-PAGE (gradiente de 4 a 20%) desnaturante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade, Corrida VIIISelect #2. Linha 1 Marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad))- Linha 2 – Sobrenadante, Linha 3 – Flow-through, Linha 4 – Fração de eluição 1, Linha 5 – Fração de eluição 2, Linha 6 – Fração de eluição 3, Linha 7 – Fração de eluição 4, Linha 8 – Fração de eluição 5, Linha 9 – Fração de eluição 6. Linha 10 – Fração de eluição 7.

Como pode ser observado na Tabela 6, houve presença de proteína de interesse em todas as frações analisadas, porém em quantidades decrescentes, sendo que a maior parte do FVIIIr encontra-se presente nas primeiras frações. Em função disso, resolveu-se repetir o experimento mais duas vezes para verificar se o comportamento se repetia.

Duas novas cromatografias foram realizadas e analisadas fração por fração, ambas com 150 mL de amostra inicial (tabela 8). Géis de SDS-PAGE foram realizados, porém mostraram os mesmos perfis da Figura 12 e não serão mostrados.

Tabela 8. Dados do cromogênico das repetições das frações obtidas na etapa cromatográfica.

Corrida VIIISelect #3			Corrida VIIISelect #4		
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Amostras	Atividade UI/mL	UI totais
Entrada	3,30	494,93	Entrada	3,43	515
FT	0,048	0,051	FT	0,048	0,051
F1	27,114	271,14	F1	32,5	325
F2	10,464	104,64	F2	15	150
F3	2,047	20,47	F3	3,4	34
F4	0	0	F4	1	10
F5	0	0	F5	0	0
F6	0	0	F6	0	0
F7	0	0	F7	0	0
total:	-	375,78	total:	-	475
Recuperação	-	75.9%	Recuperação	-	92,2%

Nestes dois últimos experimentos conseguiu-se detectar FVIIIr ativo nas frações F1 a F3, diferentemente da Corrida VIIISelect #2 (Tabela 7) no qual o FVIIIr ativo foi detectado até a F7. Uma hipótese foi levantada em relação ao possível arraste de FVIIIr nas frações eluídas que seria devido a quantidade inicial de proteínas de interesse injetada na coluna. Um volume grande de sobrenadante (maior concentração de FVIIIr carregado na coluna) poderia acarretar o arraste, enquanto um volume menor de sobrenadante (menor quantidade de FVIIIr carregado na coluna) poderia resultar em menor arraste. Sendo assim, mais uma cromatografia foi realizada com uma carga maior de FVIIIr (250 mL) (Corrida VIIISelect #5) e as frações foram analisadas novamente (Tabela 9).

Tabela 9. Dados do cromogênico das repetições das frações obtidas na etapa cromatográfica com carga maior de volume e proteína. Corrida VIIISelect #5.

Amostras	Atividade UI/mL	UI totais
Entrada	5,82	873
FT	0,048	0
E1	43,3	433
E2	27,3	273
E3	8,65	86,5
E4	5,605	56,05
E5	3,06	30,6
E6	1,36	13,6
E7	0,89	8,9
total:	-	706
Recuperação	-	80,8%

Conforme a tabela, se a quantidade de FVIIIr aumenta na entrada, o arraste pode ser observado novamente, apesar da maior parte do FVIIIr estar nas primeiras 3 frações. Com as sete frações é possível recuperar 80%.

5.1.3. Cromatografia de afinidade FVIIISelect - eluição com propilenoglicol.

Durante os processos de purificação com a coluna FVIIISelect, na qual utilizamos o tampão de eluição com 50% de etilenoglicol, se decidiu testar um tampão de eluição com propilenoglicol (50%) para verificar se seria possível recuperar o FVIIIr em um menor volume e consequentemente, reduzindo o perfil de arraste observado anteriormente. A cromatografia foi realizada da mesma forma como demonstrado na Figura 11, com uma pequena variação na eluição da última fração (oitava fração), sendo ela eluída com 50% propilenoglicol (Corrida VIIISelect #6). As oito frações foram analisadas por SDS-PAGE, as sete primeiras frações foram eluídas com etilenoglicol e a oitava e nona fração com propilenoglicol (Figura 13). É possível observar que a eluição com propilenoglicol permite melhor eluição das proteínas da resina (Figura 13, linha 8).

Figura 13. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnaturante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade e eluidas com dois tampões, Corrida VIIISelect #6. Linha 1 – Fração 1, Linha 2 – Fração 2, Linha 3 – Fração 3, Linha 4 – Fração 4, Linha 5 – Fração 5, Linha 6 – Fração 6, Linha 7 – Fração 7, Linha 8 – Fração 8 (propilenoglicol), Linha 9 - Fração 9 (propilenoglicol), Linha 10 – Marcador de peso molecular(Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad)).

É importante notar que o perfil de bandas no gel do FVIIIr é uma banda dupla entre os marcadores 78kDa e 132kDa que representam as cadeias leve e pesada da proteína (Cadeia leve 80 kDa e cadeia pesada 90 kDa sem o domínio B).

Como pode ser observado na Figura 13, as frações eluidas com etilenoglicol tem uma diminuição da intensidade das bandas (bandas indicadas com a seta vermelha), porém quando o propilenoglicol é usado no final das frações a banda se intensifica, indicando uma capacidade superior de eluição do FVIII com esse tampão.

Em função deste resultado, se propôs realizar uma cromatografia FVIIISelect e eluir a proteína de interesse somente com tampão propilenoglicol, fracionar a eluição e analisar as frações por cromogênico. Duas corridas cromatográficas foram realizadas com 125 mL (Corrida VIIISelect #7) e 150 mL (Corrida VIIISelect #8), os dados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Quantificação de FVIII durante a purificação com a resina VIIISelect e eleição com propilenoglicol.

Corrida VIIISelect #7			Corrida VIIISelect #8		
Amostras	FVIII UI/mL	UI totais	Amostras	FVIII UI/mL	UI totais
Entrada	3,70	462,3	Entrada	3,46	519,4
FT	0,014	0,014	FT	0,048	0,014
F1	37,066	185,33	F1	32,993	329,93
F2	5,35	26,75	F2	0,0	0,0
F3	0,204	1,02	F3	0,0	0,0
F4	0,0	0,0	F4	0,0	0,0
F5	0,0	0,0	F5	0,0	0,0
F6	0,0	0,0	F6	0,0	0,0
F7	0,0	0,0	F7	0,0	0,0
total:	-	213,01	total:	-	329,93

Nota: O volume das frações coletadas foi de 5mL.

Géis de SDS-PAGE foram realizados para ambas as corridas para análise das frações obtidas durante o processo de purificação, o perfil proteico das frações dos dois experimentos são muito semelhantes, na Figura 14 temos o perfil da corrida VIIISelect #7.

Figura 14. SDS-PAGE desnaturante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade e eluidas com propilenoglicol, Corrida VIIISelect #7. Linha 1 – Entrada, Linha 2 – Flow-through, Linha 3 – Fração 1, Linha 4 – Fração 2, Linha 5 –

Fração 3, Linha 6 – Fração 4, Linha 7 – Fração 5, Linha 8 – Fração 6, Linha 9 - Fração 7, Linha 10 – Marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad)).

Como pode ser observado na Tabela 9 e na Figura 14, somente a primeira fração eluída com propilenoglicol (5 mL) continha a maior parte da proteína de interesse. No entanto, como pode ser observado na Tabela 10, a recuperação final da proteína nessas condições de eluição é menor do que quando empregado o etilenoglicol. Isso pode estar ocorrendo devido ao fato do etilenoglicol ter maior capacidade de preservar a molécula de FVIIIr do que o propilenoglicol.

Após a realização dos experimentos de eluição com propilenoglicol, os rendimentos (recuperação de FVIIIr final) foram comparados aos dados da eluição com etilenoglicol (tabela 11).

Tabela 11. Comparação de rendimento de FVIIIr em cromatografia FVIIISelect utilizando diferentes agentes de eluição.

Tampão de eluição	Corridas	Vol. Sobrenadante (mL)	Volume Eluído (mL)	Rendimento FVIIIr
Etilenoglicol	VIIISelect #1	375	80	62,0%
	VIIISelect #2	125	20	81,6%
	VIIISelect #3	150	20	75%
	VIIISelect #4	150	20	92%
	VIIISelect #5	250	20	81%
	VIIISelect #6	250	Não medido	Não Analisado
Propilenoglicol	VIIISelect #7	125	10	46%
	VIIISelect #8	150	10	64%

Nota: Não foram analisados os dados da corrida#6, pois ela somente serviu como verificação da necessidade de mudança de tampão de eluição.

Como pode ser observado na Tabela 11, a porcentagem de recuperação de FVIIIr, quando utilizado o etilenoglicol como agente eluidor, é maior quando comparada ao propilenoglicol. Sendo assim, os experimentos posteriores foram realizados com Etilenoglicol.

Vale a pena ressaltar que o Etilenoglicol é um agente tóxico e deve ser completamente removido do produto final. Sendo assim, uma futura troca de eluidores não pode ser descartada.

5.1.4. Sequencia cromatográfica de 3 colunas – CaptoMMC, FVIIISelect e SP-FF.

Após testar as colunas individualmente com o sobrenadante, se propôs realizar uma sequencia de purificação usando as três colunas na ordem: multimodal, afinidade e intercambio iônico, para obtenção de um FVIIIr com maior grau de pureza. A escolha do uso das três colunas vem de um entendimento que não se devem utilizar colunas de afinidade com produtos brutos contendo altos índices de impurezas (sobrenadante). Esta sobrecarga pode danificar as proteínas recombinantes expostas na resina para a interação com o FVIIIr (uma vez que a resina apresenta um alto custo), sendo assim necessária uma pré-purificação com uma resina de custo mais reduzido e que se utilize de interações mais simples. Desta forma, foi escolhida a CaptoMMC para processar o sobrenadante inicialmente, seguido de FVIIISelect e finalizando com SP-FF para concentrar o produto no final. É importante ressaltar que o eluido de CaptoMMC sofre eluição com os mesmos eluentes que são utilizados na FVIIISelect, sendo necessária uma diluição de 50x em tampão de corrida (descrito no ponto 4.1.6 da metodologia) entre todas as cromatografias.

Em todas as corridas de purificação usando as três colunas o volume inicial do sobrenadante foi mantido igual (300 mL), assim como os volumes de eluição e de diluição de amostra para tentar reduzir ao máximo a variabilidade.

Amostras foram retiradas durante as etapas de purificação para análise de SDS-PAGE (Figura 15) e o Westen-Blott das frações (Figura 16), cromogênico e quantificação por Bradford para a purificação (Tabela 12).

Figura 15. Gels de SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) para as amostras do processo de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#1. Linha 1 – Entrada: Sobrenadante de Sk-Hep-FVIII, Linha 2 – Flow-through de CaptoMMC, Linha 3 – Eluido de CaptoMMC, Linha 4 – Eluido de FVIIISelect, Linha 5 – Flow-through de FVIIISelect, Linha 6 – Eluido de SP-FF, Linha 7 – Flow-through de SP-FF, Linha 8 –Controle comercial Advate (3 µl) Linha 9 -.Marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad))

No gel é possível observar que a capto MMC remove uma grande quantidade de impurezas (os dados de Bradford mostram uma remoção de 80 a 90% de proteínas inespecíficas), porém é possível observar que ainda há impurezas (linha3 da Figura 15), sendo necessárias etapas adicionais de purificação para isolar o FVIIIr. Após a cromatografia de afinidade o perfil das impurezas é reduzido, porém as evidencias no gel não são claramente visíveis (linhas 4 e 5). Somente após o uso da cromatografia de troca iônica que tende a concentrar o FVIIIr que é visível um perfil claro no gel, mostrando a presença da dupla banda pertencente ao FVIIIr (linha 6) correspondente a pesos moleculares de aproximadamente 80 e 90kDa.

Figura 16. Western Blott das amostras da Figura 15. Linha 1 – Marcador de peso molecular, Linha 2 – Entrada, Linha 3 – Eluido de CaptoMMC, , Linha 4 – Eluido de FVIIISelect, Linha 5 – Eluido de SP-FF, Linha 6 - Flow-through de CaptoMMC, Linha 7 – Flow-through de FVIIISelect, Linha 8 – Flow-through de SP-FF, Linha 9 - Controle comercial Advate. Anticorpo primário Santa Cruz Sc-73597 diluído 1:200 e o anticorpo secundário BD Bioscience 610979 em diluição 1:2000.

O Westen-Blott foi específico para a banda de 90kDa da proteína FVIIIr (a banda de 80kDa não é detectável pelo anticorpo monoclonal) mostrando que existe uma pureza avançada do produto final.

As amostras das etapas de purificação foram quantificadas por método de Bradford e analisadas pelo teste do cromogênico (Tabela 10).

Tabela 12. Dados da primeira purificação utilizando a sequência de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#1.

Corrida Capto_Select_SP#1			
CaptoMMC			
Volume inicial: 300 mL de sobrenadante			
Amostras	FVIII UI/mL	UI totais	Bradford Proteína total (mg)
Entrada	3,07	923	18,4
FT	-0,61	0	16,6
Eluição	10,3	123,62	0,562
Volume eluição: 12 mL			
FVIIISelect			
Volume inicial: 600 mL (Eluido MMC diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	10,3	123,62	0,562
FT	0,045	0,045	0,021
Eluição	19,3	387,7	0,182
Volume final: 20 mL			
Sepharose			
Volume inicial: 720 mL (Eluido Select diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	19,3	387,7	0,182
FT	0	0	
E1	118,3	594,3	0,054
Volume final: 5 mL			

O processo de purificação utilizando três colunas cromatográficas mostrou-se bastante eficiente. A concentração de proteína total foi reduzida em 99,7% enquanto que a recuperação do produto FVIIIr final foi de 64,4%. Sendo assim, a cromatografia CaptoMMC é adequada para processar o sobrenadante diretamente, seguida de FVIIISelect para refinar a proteína alvo, terminando em SP-FF que adiciona mais homogeneidade ao produto e o concentra ao mesmo tempo.

Para comprovar a reprodutibilidade do processo de purificação foram realizadas mais duas corridas completas empregando as três colunas (Corrida Capto_Select_SP#2 e Corrida Capto_Select_SP#3). Os dados de Bradford e cromogênico são mostrados na tabela 13 e 14 (os perfis cromatográficos, géis e Westen-Blott foram os mesmos da corrida 1, sendo assim, não mostrados novamente)

Tabela 13. Dados da purificação utilizando a sequencia de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#2

Corrida Capto_Select_SP#2			
CaptoMMC			
Volume inicial: 300 mL			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	3,07	1475,62	14,5
FT	0,04	12,13	12,86
Eluição	57,76	693,16	0,61
Volume eluição: 12 mL			
FVIIISelect			
Volume inicial: 600 mL (diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	57,76	693,16	0,61
FT	0,045	-20,19	0,23
Eluição	41,41	621,08	0,17
Volume final: 20 mL			
Sepharose			
Volume inicial: 720 mL (diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	41,41	621,08	0,17
FT	-0,04	-20	0,041
E1	81,78	408,86	0,043
Volume final: 5 mL			

Tabela 14. Dados da purificação utilizando a sequencia de três colunas, Corrida Capto_Select_SP#3.

Corrida Capto_Select_SP#3			
CaptoMMC			
Volume inicial: 300 mL			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	5,92	1478,87	14,27
FT	-0,08	-20,19	14,29
Eluição	61,68	740,2	0,71
Volume eluição: 12 mL			
FVIIISelect			
Volume inicial: 600 mL (diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	61,68	740,2	0,71
FT	-0,08	-27,91	0,17
Eluição	38,67	580	0,19
Volume final: 20 mL			
Sepharose			
Volume inicial: 720 mL (diluído)			
Amostras	Atividade UI/mL	UI totais	Bradford proteína total (mg)
Entrada	38,67	580	0,19
FT	-0,06	-21	0,04
E1	119,26	596,28	0,05
Volume final: 5 mL			

Os processos de purificação se mostraram reproduzíveis mostrando índices de pureza semelhantes, comportamento de perfis cromatográficos idênticos. A remoção de impurezas foi de $99.5\% \pm 0,5\%$ em média, variando apenas na recuperação de produto final: purificação 1 recuperou 64,4% de produto, purificação 2 recuperou 40,34% de produto e a purificação 3 recuperou 27,71% do produto. Esta variação pode ser decorrente do teste cromogênico que pode não ser muito sensível.

Sendo assim, a cromatografia CaptoMMC é adequada para processar o sobrenadante diretamente, seguida de FVIIISelect para refinar a proteína alvo, terminando em SP-FF que adiciona mais homogeneidade ao produto e o concentra ao mesmo tempo.

5.2. Purificação do FVIIr

O processo básico de purificação de FVIIr a partir do sobrenadante de cultura neste trabalho está esquematizado na Figura 8 (material em métodos pagina 29). O processo de purificação do FVIIr foi realizado de duas formas; 1 – Usando a cromatografia de afinidade FVIISelect®, seguida de uma troca iônica Q-FF e 2 - afinidade FVIISelect®, seguida de uma dialise em membrana de 5kDa.

Ambos os métodos testados foram analisados inicialmente pelo teste do PT para quantificação de FVII ativo e a eficiência das duas purificações foi comparada (Tabela 15).

Tabela 15. Quantificação de FVIIr total das corridas de purificação através do teste de PT.

Etapas de Purificação	PT – UI totais obtidos
Corrida# 1	
Sobrenadante Inicial (260mL)	487,0
Eluido de FVIISelect (12 mL)	535,0
Após Dialise (5mL)	205
Corrida# 2	
Sobrenadante Inicial (260mL)	487,0
Eluido de FVIISelect (12mL)	564.1
Eluido de QFF (5 mL)	28

Conforme mostra a tabela, é possível observar que a recuperação de FVIIr da etapa da cromatografia de afinidade é bastante alta, se comparada com o sobrenadante inicial.

A recuperação de produto foi mais eficiente quando utilizada a técnica da dialise, enquanto que, usando a cromatografia de troca iônica resultou em baixa eficiência.

Duas corridas adicionais foram realizadas utilizando a resina Q-FF para purificar o FVIIr eluido da FVIISelect® e os dados podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16. Dados da cromatografia Q-FF como etapa adicional de purificação do FVIIr.

Corrida #3	
Etapa de Purificação	PT – UI totais obtidos
Sobrenadante Inicial (200 mL)	432,8
Eluido de FVIISelect (12 mL)	451,2
Eluido de QFF (5 mL)	21,4
Corrida #4	
Etapa de Purificação	PT – UI totais obtidos
Sobrenadante Inicial (200 mL)	548,1
Eluido de FVIISelect (12 mL)	584,2
Eluido de QFF (5mL)	41,1

Como pode ser observado, o emprego da Q-FF durante o processo não mostrou rendimento adequado, sendo assim, esse processo foi removido da estratégia de purificação. Vale a pena mencionar que ocorre uma diluição entre os processos cromatográficos, para que haja compatibilidade de tampões. Isso poderia estar prejudicando o processo de troca iônica.

5.2.1. Purificação do FVIIr usando FVIISelect e dialise.

O processo inicial envolveu a injeção da amostra na cromatografia de afinidade FVIISelect®. O perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 17, na qual 260 ml de sobrenadante foi aplicado e 12 mL de eluido foi obtido no final do processo.

Figura 17. Perfil cromatográfico da FVIISelect® com sobrenadante de Sk-Hep-FVIIr (Corrida #5)

Como pode ser observado na Figura 17, há uma grande quantidade de proteínas saindo no “flow-through”, a leitura na UV chega próximo a 350mAU. Ao final da injeção, a coluna é lavada e nesse momento é observado o decréscimo da UV ate a linha base. Posteriormente, ocorre a eluição acompanhada de um pico na UV e na condutividade. O pico de condutividade é correspondente ao tampão de eluição e o pico de UV corresponde a proteínas sendo eluidas com esse tampão (na Figura 17 indicado pela seta verde).

O volume de eluição correspondeu a 12 mL e foi fracionado em alíquotas de 2 mL que foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 18) e este gel posteriormente transferido para membrana de PVDF e Westen-Blot foi realizado (Figura 19)

Figura 18. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) desnaturante corado com nitrato de prata das frações obtidas da cromatografia de afinidade, Corrida# 5. Linha 1 – marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad)), Linha 2 – Sobrenadante, Linha 3 – Flow-through, Linha 4 – Fração 1, Linha 5 – Fração 2, Linha 6 – Fração 3, Linha 7 – Fração 4, Linha 8 – Fração 5, Linha 9 - Fração 6, Linha 10 – Controle comercial NovoSeven (3 μ L).

Figura 19. Western Blot das amostras da Figura 18, Corrida# 5. . Linha 1 – marcador de peso molecular, Linha 2 – Sobrenadante, Linha 3 – Flow-through, Linha 4 – Fração 1, Linha 5 – Fração 2, Linha 6 – Fração 3, Linha 7 – Fração 4, Linha 8 – Fração 5, Linha 9 - Fração 6, Linha 10 – Controle comercial NovoSeven (3 μ L). Anticorpo primário anti-FVII humano (Abcam) em uma diluição de 1:500, o anticorpo secundário utilizado foi anti-habbit em diluição 1:5000.

Analisando as Figuras 18 e 19 é possível observar que o FVIIr é isolado das demais proteínas somente com uma etapa cromatográfica. Adicionalmente, é possível notar que a maior parte do FVIIr está concentrado nos primeiros 10mL de eluição, sendo assim, o volume de eluição é bastante reduzido. A seta azul corresponde ao FVIIr não ativado que tem um peso molecular de aproximadamente 50 kDa, a seta verde corresponde ao FVIIr ativado, pois esta clivado e prevalece a banda de 30 kDa. Grande parte do FVII purificado da produção das células Sk-Hep-FVII encontra-se na forma não ativa (50 kDa).

Posteriormente a cromatografia de afinidade foi realizado um processo de dialise, no qual o tampão foi trocado por um tampão próprio de liofilização (há uma necessidade de eliminar o solvente orgânico utilizado na eluição para o processo de liofilização e

também pode ser necessária uma redução de volume). A amostra então foi liofilizada e armazenada em -20 °C. Uma alíquota deste material foi reconstituída e analisada, junto com as demais amostras intermediárias por PT para verificar a presença de FVII ativo (tabela 17).

Tabela 17. Análise das amostras (Corrida# 5) por PT

Etapas de Purificação	PT – FVII UI totais obtidos
Sobrenadante Inicial (250 mL)	1020,2
Flow-through (250 mL)	0,01
Eluido de FVIISelect (12mL)	1050,0
Dialise (5 mL)	9000,0
Produto final reconstituído (5 mL)	2680,0
Controle positivo NovoSeven 50KUI Totais	50223,0

Como é possível observar na Tabela 17 a cromatografia de afinidade reteve praticamente todo o FVIIr não deixando nada passar pelo *flow-through*. A amostra eluída teve mais atividade que o sobrenadante, provavelmente devido ao fato do FVIIr começar a se ativar durante a purificação. O processo de dialise, além de remover as impurezas incrementou a atividade da amostra a 9,000 UI. Porém, após o processo de liofilização / reconstituição a atividade da proteína caiu quase três vezes. Esse fato se deu provavelmente devido ao curto período de meia vida da proteína ou devido ao fato de que o tempo e tempo de liofilização devem ser melhor estudados.

A quantificação total de proteínas foi realizada com o método de Bradford com o sobrenadante e o produto final após a diálise. O sobrenadante continha 22648,0 µg de proteína total, enquanto, que o FVIIr final tinha 152,2 µg de proteína total. Isso corresponde a uma eliminação de 99,31% de proteínas (impurezas).

Após determinar que a sequência de purificação envolvendo cromatografia de afinidade seguida de dialise seria o processo determinado para purificar o FVIIr, uma série de purificações foram realizadas para determinar a reprodutibilidade do método. Os dados são mostrados na tabela 18.

Tabela 18. Corridas de purificação do FVIIr.

Corridas	Vol. Sobrenadante (mL)	Entrada (UI totais)	Saída (UI totais)	Bradford sobrenadante (ug totais)	Bradford (ug totais)	Pureza relativa	Rendimento (ug/mL)
# 6	195	2379	5500	9874	156,2	98,42	1,24
#7*	340	1258	1260	14231	119	99,16	0,35
#8	340	1020	3015	12466	333,2	97,33	0,98
#9	500	350	2080	18457	308,8	98,33	0,62
#10	217	2582,3	2475	11354	161,92	98,57	0,75
#11**	217	2582,9	1650	11354	73,44	99,35	0,34
#12	230	1955	1155	13489	217	98,39	0,94

* Células utilizadas para a expressão estavam com tempo avançado de uso (aproximadamente 3 meses em cultivo e apresentaram baixa produtividade de FVII)

** Amostra aguardou muito tempo descongelada para ser utilizada (4 horas).

Observando a Tabela 18 é possível observar houve um padrão de pureza bastante constante e o rendimento consideravelmente alto. No entanto há duas corridas que tiveram rendimentos baixos, isso pode ser devido ao fato de que um dos sobrenadantes foi obtido de células consideradas muito tempo em cultura, enquanto que a outra amostra de baixo rendimento aguardou muito tempo descongelada para ser processada. Estes dados mostram que o sobrenadante a ser processado deve ser recém descongelado e que a células utilizadas para cultivo devem ser monitoradas quanto a produtividade.

As corridas de purificação também foram analisadas por SDS-PAGE, onde as corridas #6 e #7 foram analisadas passo por passo (para comprovar a reprodutibilidade) e as posteriores somente o produto final (liofilizado reconstituído) Figura 20.

Figura 20. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) dos experimentos de purificação do FVIIr.

Poços A10, B5 e C1 continham marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad), o controle positivo NovoSeven foi adicionado aos poços A5, B4 e C4 em um volume de 3 µl)

Como pode ser observado na Figura 20 – A, as corridas#6 e #7 foram bastante semelhantes e reproduzíveis. O perfil de bandas para ambas as corridas foi o mesmo, onde, no sobrenadante a visualização da banda de FVIIr não é possível, enquanto que é possível observar o FVIIr na eluição da FVIISelect™ ocupando a posição de 50 kDa e posteriormente a posição de 30 kDa após a dialise e depois de reconstituir o liofilizado. Esta migração de banda ocorre devido a ativação do FVIIr e a consequente clivagem do mesmo. Como o perfil de purificação das corridas #6 e #7 foi bastante semelhante, as posteriores análises foram feitas somente com o produto final reconstituído após liofilização.

5.2.2. Ativação do FVIIr

A ativação do FVIIr é um processo extremamente importante, pois um produto contendo proteína em estado inativo não é ideal. Durante o processo de dialise, se notou que havia uma conversão muito grande de FVIIr não ativo em ativo. No gel SDS desnaturante era observado, uma banda de aproximadamente 30kDa (setas azul e verde das Figuras 18 e 19) no lugar da banda de 50 kDa (FVII inativo).

Com a finalidade de verificar a ocorrência da auto-ativação realizamos géis de SDS-PAGE desnaturante e Western-blot, utilizando-se das alíquotas das Corridas #6 e #7 (Figura 21).

Figura 21. SDS-PAGE (gradiente 4 a 20%) (A) e Western-Blotting (B) desnaturante (d) e nativo (n) (sem desnaturação) corado com nitrato de prata do sobrenadante e produto final de dois experimentos.

Linha 1 – marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained protein marker #161-0395 (BioRad), Linha 2 – Sobrenadante [C#6] (n), Linha 3 – Sobrenadante [C#6] (d), Linha 4 – Dialisado [C#6] (n), Linha 5 – Dialisado [C#6] (d), Linha 6 – Sobrenadante [C#7] (n), Linha 7 – Sobrenadante [C#7] (d), Linha 8 – Dialisado [C#7] (n), Linha 9 – Dialisado [C#7] (d), Linha 10 – Controle comercial NovoSeven (3 μ L).

A proteína FVIIr em seu estado não ativado mantém as cadeias leve e pesada unidas por duas ligações, peptídica e dissulfeto. No momento em que a proteína é ativada, a ligação peptídica é desfeita, restando apenas a dissulfeto. Esta última ligação, é desfeita com a ação desnaturante do tampão do gel de SDS-PAGE. Sendo assim, o sobrenadante contendo em sua maioria FVIIr em forma inativa mantém um padrão de banda de 50kDa com e sem tratamento desnaturante, porém, a proteína dialisada, que se encontra na forma ativa, mantém a posição 50 kDa na forma nativa, mas quando desnaturada, migra para banda de 30 kDa. Esse efeito foi observado nas corridas #6 e #7 levando assim a uma possível conclusão de que houve ativação de grande parte da proteína FVIIr. Este efeito está visível de maneira clara na Figura 20B na seta azul representando proteína íntegra (não ativada) e seta verde a proteína clivada (ativada).

6. Discussão

Todas as proteínas recombinantes passam por algum tipo de purificação para poderem ser estudadas, caracterizadas, utilizadas em testes clínicos e finalmente comercializadas. Por serem recombinantes, elas derivam de algum organismo que as produz. Independentemente da origem (células procariontes ou eucariontes) as proteínas alvo são co-expressas com outras proteínas que precisam ser removidas isolando apenas a molécula de interesse. Adicionalmente, a WHO (World Health Organization) tem estabelecido níveis de pureza para diferentes produtos injetáveis, com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais e problemas para a saúde [WHO Technical Report Series, No. 814].

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo, há mais de 10 anos, estudos relacionados à produção de fatores coagulação utilizando linhagens de células humanas (PICANCO *et al.*, 2007; PICANCO-CASTRO *et al.*, 2008; RUSSO-CARBOLANTE *et al.*, 2011; SWIECH *et al.*, 2011; DA ROSA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013; CORREA DE FREITAS *et al.*, 2014).

Dentro desse contexto, este projeto desenvolveu uma plataforma de purificação dos fatores de coagulação recombinantes (FVIIr e FVIIIr).

6.1. FVIIIr

O uso de cromatografias de intercambio iônico, afinidade e multimodal já havia sido descrito previamente (CASADEMUNT *et al.*, 2012; WINGE *et al.*, 2015) para purificação de FVIIIr derivado de células humanas (HEK293), com base nessas informações este projeto desenvolveu uma plataforma inicial de purificação de FVIIIr produzido na linhagem Sk-Hep-FVIII.

Inicialmente, as resinas cromatográficas foram testadas independentemente, sendo a primeira a CaptoMMC, esta etapa é conhecida como etapa de captura, onde a molécula de FVIIIr é capturada na resina enquanto diversas impurezas são removidas. O papel da CaptoMMC é capturar a molécula de interesse e concentrar a mesma, reduzindo assim os volumes iniciais que podem chegar a diversos litros (WINGE *et al.*, 2015). Sendo assim, todos os testes realizados com esta resina mostraram que existe uma interação entre o FVIIIr produzido por nosso grupo e a resina cromatográfica, não sendo

detectada presença significativa (apenas residual) de FVIIIr no flow-through, além disso, houve uma redução de volume entre 10 e 20 vezes. Os resultados, ainda, mostraram que existe uma grande quantidade de proteínas inespecíficas sendo eliminadas no flow-through, uma média de $93,26\% \pm 3,91$ (medido por Bradford) dados muito semelhantes aos encontrados previamente onde 97% de proteínas foram eliminadas (AHMADIAN *et al.*, 2016).

Em seguida, foi testada a cromatografia de afinidade FVIIISelect que tem capacidade de purificar moléculas de FVIII com domínios B deletados, completos ou FVIII fusionados (CASADEMUNT *et al.*, 2012; MCCUE *et al.*, 2015; AHMADIAN *et al.*, 2016), na qual o sobrenadante foi injetado diretamente, sem prévia etapa de purificação. Isso foi realizado com o intuito de verificar se havia interação do FVIIIr com a resina. Não é comum a utilização de uma resina de afinidade com aplicação direta do sobrenadante devido ao fato de que estas resinas possuem um custo elevado e a quantidade de impurezas no material inicial pode reduzir a meia vida da mesma. Diversas injeções foram realizadas avaliando o flow-through, etapas de lavagens e eluição para detectar o FVIIIr. Em todos os casos a proteína interagiu com a resina enquanto que não houve detecção do FVIIIr em frações de flow-through e lavados. O perfil cromatográfico foi bastante semelhante ao esperado, no qual a UV do flow-through saturava e apresentava perfil elevado, em seguida entrava em linha base e finalmente havia um pico único durante a eluição, perfil semelhante ao observado em outro grupo (MCCUE *et al.*, 2009). O perfil da proteína no gel ficou nítido mostrando presença predominante do FVIIIr enquanto que o flow-through e lavados mostraram presença de proteínas inespecíficas.

Dois tampões de eluição foram testados para cromatografia de afinidade, sendo um contendo 50% de Etilenoglicol e outro 50% de Propilenoglicol. O uso de etilenoglicol como agente eluidor em cromatografias de afinidade é reportado desde a década 80 (BESSOS *et al.*, 1988) quando usado na imunoafinidade desligava FVIII de anticorpos imobilizados na resina. Este produto é ainda utilizado atualmente, porém com resinas mais modernas que dispensam o uso de anticorpos (MEI *et al.*, 2010; WINGE *et al.*, 2015) como é o caso da FVIIISelect. O uso do propilenoglicol para eluir FVIIIr foi também reportado (MCCUE *et al.*, 2009) no qual o FVIIIr é eluído com sucesso, sendo assim, este composto também foi testado para eluir a proteína de interesse.

Os resultados das corridas cromatográficas usando a FVIIISelect com tampão de eluição contendo 50% de etilenoglicol mostraram que existe uma excelente interação de FVIIIr com a resina, sendo que os valores de FVIIIr no flow-through são praticamente desprezíveis e que a proteína alvo interage quase que em totalidade com a resina. Os perfis dos géis de SDS-PAGE desmonstraram que a proteína encontra-se praticamente isolada somente com essa etapa cromatográfica. De seis repetições de corridas, cinco foram analisadas quanto a porcentagem de recuperação de FVIIIr usando o método do cromogênico, mostrando um rendimento médio de 78% (medido em UI). O Bradford não foi utilizado uma vez que a fração eluída da cromatografia não era detectável pelo método.

Duas corridas cromatográficas foram realizadas usando o tampão de eluição 50% de propilenoglicol. Observou-se uma redução no volume de eluição que correspondia à metade do volume obtido com eluição usando etilenoglicol. Fator que pode ser importante quando considerado o escalonamento das técnicas de purificação. No entanto, o rendimento total do FVIIIr foi menor, sendo recuperado 55%. É importante mencionar que o etilenoglicol é tóxico (PORTER *et al.*, 2001) e deve ser eliminado totalmente da amostra, enquanto que o propilenoglicol é praticamente inerte sendo utilizado como solvente para injeções no uso humano (LIM *et al.*, 2014). Para o restante do processo de purificação foi decidido continuar com o uso do etilenoglicol para eluir a proteína de interesse, pois é possível adicionar uma terceira etapa cromatográfica para dar polimento ao FVIIIr e potencialmente eliminar o etilenoglicol da amostra final.

Finalmente, três etapas cromatográficas foram combinadas para obter o FVIIIr com maior grau de pureza. O processo consistiu de uma cromatografia multimodal (CaptoMMC), afinidade (FVIIISelect) e IEX (SP-sepharose FF), sendo a IEX utilizada como etapa de polimento e concentração de FVIIIr no final do processo (CASADEMUNT *et al.*, 2012; WINGE *et al.*, 2015).

Os resultados das purificações com três colunas mostraram que a proteína tinha um perfil bem definido no gel, com bandas predominantemente nas posições de 80 e 90 kDa, o que corresponde a cadeias pesada e leve da proteínas FVIIIr. O Western-blot resultou numa banda de 90 kDa referente a cadeia pesada da proteína. O índice relativo de pureza (observado por Bradford) foi de $99.5\% \pm 0,5\%$ em média. Os rendimentos de FVIIIr obtidos de purificações usando três técnicas cromatográficas (tabelas 12, 13 e

14) mostram uma variação muito grande; 64,4% de produto, 40,34% de produto e 27,71% de FVIIIr (corridas 1, 2 e 3 respectivamente), com 49,3% em média com um coeficiente de variação de $\pm 50,08\%$.

Esta variação pode ser decorrente do fato de que os valores do teste cromogênico são obtidos das moléculas FVIIIr ativas e integras, caso haja deterioração da molécula (seja por efeito de temperatura, ação de tampões ou curto tempo de meia vida) a quantidade de produto final pode ser variável. Há poucas informações sobre as condições de temperatura durante as purificações disponíveis na literatura, porém alguns grupos não parecem se preocupar já que utilizam técnicas que submetem o FVIIIr a temperaturas acima de 20°C durante as purificações (WINGE *et al.*, 2015), enquanto que outros grupos afirmam que as moléculas de FVIIIr podem sofrer agregação dependente de temperatura (FENG *et al.*, 2014; SANTAGOSTINO, 2014b).

6.2. FVIIr

Atualmente há somente um produto recombinante de fator VII disponível no mercado, que é o NovoSeven da Nova Nordisk. Esta empresa monopoliza o mercado não tendo concorrentes de peso até o momento. Isso impede com que seja possível obter informações que direcionem estratégias de purificação. Porém patentes pertencentes à Nova Nordisk estão disponíveis para consulta. Estas patentes concentram o sobrenadante através de membranas de filtração e em seguida injetam a amostra em resinas de afinidade FVIISelect, por fim o eluido destas resinas são dialisadas e uma cromatografia de troca iônica é utilizada para dar polimento e concentrar a proteína final (JØRGENSEN, 1994; CHARLTON, 2011). Em base a estas limitadas informações se desenvolveu uma técnica de purificação para o FVIIr produzido no Hemocentro.

Inicialmente, o sobrenadante foi purificado usando duas técnicas cromatográficas em sequencia; afinidade (FVIISelect) seguida de IEX (Q-FF). A amostra era diluída entre as etapas devido ao fato do agente eluidor (50% propilenoglicol) interferir na troca iônica da Q-FF. A cromatografia de afinidade funcionava, interagindo com a proteína FVIIr e eliminando a maioria das impurezas no flow-through. Porém após a diluição e a cromatografia e troca iônica, a proteína perdia a sua atividade quase na totalidade. Três experimentos foram realizados, e não houve recuperação significativa de proteína, sendo assim, a Q-FF foi eliminada do processo.

Não há uma hipótese clara que possa explicar a perda de produto durante a cromatografia de troca iônica, pois não era possível observar a proteína em nenhuma fração da cromatografia, apenas era notado o fraco sinal usando técnicas de detecção.

O processo de purificação se reduziu a apenas uma cromatografia de afinidade FVIISelect, na qual o sobranante era injetado diretamente, sem previa purificação, somente uma etapa de clarificação por centrifugação e filtração em 0.22 μm . A amostra era eluída com tampão 50% propilenoglicol.

O FVIIr obtido somente da etapa de cromatografia de afinidade apresentava um perfil de banda no GEL de SDS-PAGE na posição de 50 kDa e com uma homogeneidade bastante alta. Porém, quando comparadas, as bandas no gel, com o controle comercial NovoSeven (banda de 30 kDa no gel), a banda da proteína de interesse estava deslocada para cima e apenas uma pequena porção estava na posição de 30 kDa. Isso indicava que a proteína estava relativamente homogênea, porém não ativada, já que a ativação cliva a molécula e a desloca de 50 para 30 kDa no gel.

A informação no gel, dados de Bradford e do PT, mostravam que havia uma alta homogeneidade, alta porcentagem de recuperação de produto final (entre 90 e 100%), grande redução de proteínas inespecíficas (acima de 97%), sendo assim, se optou por utilizar somente esta técnica cromatográfica como processo de purificação inicial.

Logo, propilenoglicol usado para eluir o FVIIr da FVIISelect deveria ser eliminado, como a técnica de cromatografia de troca iônica não era mais considerada, foi decidido utilizar uma técnica de dialise usando tubos VivaSpin com poros de 5 kDa para dialisar a amostra e substituir o tampão de eluição por tampão de liofilização.

Após a dialise, a proteína foi analisada novamente por SDS-PAGE. Neste caso, foi observado que o perfil da proteína no gel tinha mudado e a banda que predominante estava localizada na posição de 50 kDa migrou, quase em sua totalidade, para a posição de 30 kDa, ficando semelhante ao controle comercial NovoSeven. Esta migração de banda significava que a proteína havia se ativado, sofrido clivagem e se separado em duas cadeias de 30 e 20 kDa. No organismo humano saudável, os níveis de FVII ativado correspondem a apenas 1% de da totalidade do FVII, o restante (não ativado) está íntegro, não clivado (BALANDINA *et al.*, 2011). Quando ocorre uma injúria, as moléculas migram para o local e se ativam por proximidade sofrendo auto-ativação.

Sendo assim, para que ocorra a auto-ativação há necessidade de presença de moléculas em estado ativado. A auto-ativação ocorre quando o terminal de serina protease de uma molécula de FVIIr encontra o sítio de clivagem do FVIIr adjacente. Após a clivagem a molécula ativada entrará em contato com a próxima desencadeando a sequência de ativações. Este tipo de ativação já havia sido descrito previamente, onde o FVIIr havia sendo ativado por proximidade dentro de colunas de cromatografia e em tubos de ensaio na presença de cálcio (PEDERSEN *et al.*, 2002). O tampão de dialise apresentava cálcio, e devido a isso a proteína sofreu a auto-ativação.

Analises com SDS-PAGE, Western-Blott e PT comprovaram o efeito de migração de banda e a consequente auto ativação do FVIIr. Os dados de PT mostraram que a quantidade de FVIIr detectável na amostra final era superior ou igual as unidades internacionais do sobrenadante.

Porém é importante ressaltar que a atividade do FVIIr caiu drasticamente após o processo de liofilização. A liofilização é relativamente demorada podendo fazer com que o tempo de meia vida de molécula se esgote durante o processo, sendo assim necessário estudar possibilidades de reduzir seus tempos.. Adicionalmente, produtos comerciais como o Hemosil (que compreende liofilizado de FVII derivado de plasma para o teste de PT) contem estabilizantes (não citados) que podem conferir estabilidade à molécula durante o processo de liofilização e que podem ser estudados.

7. Conclusão

De forma geral o processo de purificação do FVIIIr foi bastante reproduzível mostrando um produto final específico, homogêneo. O comportamento da proteína foi semelhante durante as repetições de purificação tendo uma variabilidade no rendimento final. No entanto, a pureza do material chegou aproximadamente 99%, enquanto que o rendimento proteico chegou a 0,15 mg de proteína específica por litro de sobrenadante.

Igualmente que com o FVIIIr, o FVIIr se comportou de forma bastante reproduzível, tendo um rendimento proteico de 0,89 mg de proteína por litro de sobrenadante e uma pureza relativa acima dos 97%. Esta pureza é suficiente para fazer os estudos necessários como os padrões de glicosilação, caracterização e testes em animais.

Por fim, com este trabalho foi possível montar duas plataformas de purificação para os fatores recombinantes VIII e VII produzidos na linhagem Sk-Hep.

8. Referencias

AHMADIAN, H. et al. Molecular design and downstream processing of turoctocog alfa (NovoEight), a B-domain truncated factor VIII molecule. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 27, n. 5, p. 568-75, Jul 2016. ISSN 0957-5235. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/mbc.0000000000000477> >.

BALANDINA, A. et al. Positive Feedback Loops for Factor V and Factor VII Activation Supply Sensitivity to Local Surface Tissue Factor Density During Blood Coagulation. In: (Ed.). **Biophys J**, v.101, 2011. p.1816-24. ISBN 0006-3495 (Print)1542-0086 (Electronic).

BESSOS, H.; PROWSE, C. V.; JAMES, K. Human coagulation factor IX: direct depletion and recovery from plasma, using immobilised monoclonal antibody. **Med Lab Sci**, v. 45, n. 3, p. 261-5, Jul 1988. ISSN 0308-3616 (Print)0308-3616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BHARADWAJ, D. et al. Factor VII central. A novel mutation in the catalytic domain that reduces tissue factor binding, impairs activation by factor Xa, and abolishes amidolytic and coagulant activity. **J Biol Chem**, v. 271, n. 48, p. 30685-91, Nov 29 1996. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOLTON-MAGGS, P. H.; PASI, K. J. Haemophilias A and B. **Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1801-9, May 24 2003. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13405-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13405-8) >.

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. 165-76, Aug 2012. ISSN 0902-4441 (Print)1600-0609 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01804.x> >.

CHARLTON, A. N., M. Smrdelj, P. Stowers, A. Pirzas, V. SCHRÖDER, M. Method of purifying polypeptides. n. Google Patents, 2011. Disponível em: < <https://www.google.com/patents/WO2011073235A1?cl=en> >.

CHOO, K. H. et al. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 178-80, Sep 09 1982. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CORREA DE FREITAS, M. C. et al. Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 3, p. 213-8, May-Jun 2014. ISSN 1516-8484 (Print)1516-8484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.002> >.

CRAMER, T. J.; GRIFFIN, J. H.; GALE, A. J. Factor V Is an Anticoagulant Cofactor for Activated Protein C during Inactivation of Factor Va. In: (Ed.). **Pathophysiol Haemost Thromb**, v.37, 2010. p.17-23. ISBN 1424-8832 (Print)1424-8840 (Electronic).

DA ROSA, N. G. et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 8, p. 1435-43, Aug 2012. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0925-4> >.

DAHLBACK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v. 355, n. 9215, p. 1627-32, May 06 2000. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02225-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02225-x) >.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 51, p. 50819-32, Dec 19 2003. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.X300009200> >.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-2, Sep 18 1964. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE CASTILHO FERNANDES, A. et al. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 58, n. 4, p. 243-9, Jul-Aug 2011. ISSN 0885-4513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bab.32> >.

DE SOUSA BOMFIM, A. et al. Human cell lines: A promising alternative for recombinant FIX production. **Protein Expr Purif**, v. 121, p. 149-56, May 2016. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.11.023> >.

EVATT, B. L. The tragic history of AIDS in the hemophilia population, 1982-1984. **J Thromb Haemost**, v. 4, n. 11, p. 2295-301, Nov 2006. ISSN 1538-7933 (Print)1538-7836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02213.x> >.

FARANOUSH, M. et al. A Comparison of Efficacy Between Recombinant Activated Factor VII (Aryoseven) and Novoseven in Patients With Hereditary FVIII Deficiency With Inhibitor. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 22, n. 2, p. 184-90, Mar 2016. ISSN 1076-0296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1076029614555902> >.

FAY, P. J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. **Blood Rev**, v. 18, n. 1, p. 1-15, Mar 2004. ISSN 0268-960X (Print)0268-960x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FENG, L. et al. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. In: (Ed.). **Sci Rep**, v.4, 2014. ISBN 2045-2322 (Electronic).

FRANCHINI, M. Plasma-derived versus recombinant Factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better. In: (Ed.). **Blood Transfus**, v.8, 2010. p.292-6. ISBN 1723-2007 (Print).

FRANCHINI, M. et al. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. In: (Ed.). **Biologics**, v.7, 2013. p.33-8. ISBN 1177-5475 (Print)1177-5491 (Electronic).

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. **Orphanet J Rare Dis**, v. 7, p. 24, May 02 2012. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-7-24> >.

HAGEN, F. S. et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 8, p. 2412-6, Apr 1986. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HALABIAN, R. et al. Establishment of a cell line expressing recombinant factor VII and its subsequent conversion to active form FVIIa through hepsin by genetic engineering method. **Vox Sang**, v. 96, n. 4, p. 309-15, May 2009. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01158.x> >.

HATHAWAY, W. E.; BELHASSEN, L. P.; HATHAWAY, H. S. Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I. Case report, coagulation studies and physicochemical properties. **Blood**, v. 26, n. 5, p. 521-32, Nov 1965. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HEDNER, U.; LEE, C. A. First 20 years with recombinant FVIIa (NovoSeven). **Haemophilia**, v. 17, n. 1, p. e172-82, Jan 2011. ISSN 1351-8216. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02352.x> >.

HIGEL, F. et al. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 100, p. 94-100, Mar 2016. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005> >.

JOHNSTONE, I. B. et al. Stability of factor VIII and von Willebrand factor in canine blood samples during storage. **Can Vet J**, v. 32, n. 3, p. 173-5, Mar 1991. ISSN 0008-5286 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JØRGENSEN, T. P., A.H. Purification of factor vii. n. Google Patents, 1994. Disponível em: < <https://www.google.com/patents/WO1994022905A1?cl=en> >. Acesso em: 25/10/2017.

KASPER, C. K.; USA, H. T. C. L. A. O. H. K. S. o. M. U. o. S. C. L. A. C. Judith Graham Pool and the discovery of cryoprecipitate. **Haemophilia**, v. 18, n. 6, p. 833-835, 2017. ISSN 1365-2516. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hae.12042/abstract> >.

KONKLE, B. A.; HUSTON, H.; FLETCHER, S. N. Hemophilia A. 2017/06/22 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

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. 424-31, Sep 2009. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-009-9119-y> >.

LI, T. et al. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. **Am J Hematol**, v. 89, n. 4, p. 375-9, Apr 2014. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23645> >.

LIM, T. Y.; POOLE, R. L.; PAGELER, N. M. Propylene Glycol Toxicity in Children. **J Pediatr Pharmacol Ther**, v. 19, n. 4, p. 277-82, Oct-Dec 2014. ISSN 1551-6776 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5863/1551-6776-19.4.277> >.

LIU, L. et al. The impact of glycosylation on the pharmacokinetics of a TNFR2:Fc fusion protein expressed in Glycoengineered Pichia Pastoris. **Pharm Res**, v. 30, n. 3, p. 803-12, Mar 2013. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-012-0921-3> >.

MACFARLANE, R. G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. **Nature**, v. 202, p. 498-9, May 02 1964. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MANNUCCI, P. M. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2515-21, Oct 01 1997. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MANNUCCI, P. M.; FRANCHINI, M. Present and future challenges in the treatment of haemophilia: a clinician's perspective. In: (Ed.). **Blood Transfus**, v.11, 2013. p.577-81. ISBN 1723-2007 (Print).

MCCUE, J. et al. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. **Biologicals**, v. 43, n. 4, p. 213-9, Jul 2015. ISSN 1045-1056. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.012> >.

MCCUE, J. T.; SELVITELLI, K.; WALKER, J. Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant factor VIII compounds. **J Chromatogr A**, v. 1216, n. 45, p. 7824-30, Nov 06 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.045> >.

MCINTYRE, H. et al. DENTAL EXTRACTIONS IN PATIENTS WITH HÆMOPHILIA AND CHRISTMAS DISEASE. **The Lancet**, v. 274, n. 7104, p. 642-646, 1959/10/24 1959. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.thelancet.com/article/S0140673659914114/abstract>

<http://www.thelancet.com/article/S0140673659914114/pdf> >.

MCMICHAEL, M. New models of hemostasis. **Top Companion Anim Med**, v. 27, n. 2, p. 40-5, May 2012. ISSN 1946-9837. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2012.07.005> >.

MCMILLAN, C. W.; DIAMOND, L. K.; SURGENOR, D. M. Treatment of Classic Hemophilia: The Use of Fibrinogen Rich in Factor VIII for Hemorrhage and for Surgery. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196108102650605>, 2010-01-13 2010. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM196108102650605> >.

MEI, B. et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. **Blood**, v. 116, n. 2, p. 270-9, Jul 15 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-11-254755> >.

MORRISON, P. R.; EDSALL, J. T.; MILLER, S. G. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XVIII. The Separation of Purified Fibrinogen from Fraction I of Human Plasma., May 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01189a080> >.

ORMAN, E. S. et al. Hepatitis C viral infection in patients with hemophilia and hemolytic disorders. **Clinical Liver Disease**, v. 1, n. 3, p. 95-97, 2017. ISSN 2046-2484. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cld.42/abstract>

PEDERSEN, A. H. et al. Autoactivation of human recombinant coagulation factor VII. May 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00450a013> >.

PICANCO-CASTRO, V. et al. An enhancer/promoter combination strengthens the expression of blood-coagulation factor VIII in non-viral expression vectors. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 2, p. 314-25, Apr 08 2008. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PICANCO, V. et al. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, n. 8, p. 785-94, 2007. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/14653240701656053> >.

PORTER, D. W. H. et al. Ethylene Glycol Toxicity: The Role of Serum Glycolic Acid In Hemodialysis. <http://dx.doi.org/10.1081/CLT-100108493>, 31 Oct 2001 2001. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/CLT-100108493> >.

RODRIGUES, E. S. et al. Quantitative correlation between transcriptional levels of ER chaperone, peroximal protein and FVIII productivity in human Hek-293 cell line. In: (Ed.). **Springerplus**, v.2, 2013. ISBN 2193-1801 (Electronic).

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. et al. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-Hep and 293T cells. **Biotechnol Lett**, v. 33, n. 1, p. 23-31, Jan 2011. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0387-5> >.

SANDBERG, H. et al. Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, r-VIII SQ. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 1, p. 93-100, Jan 2001. ISSN 0340-6245 (Print)0340-6245. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANTAGOSTINO, E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 2507-15, 2014a. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s73241> >.

_____. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. In: (Ed.). **Drug Des Devel Ther**, v.8, 2014b. p.2507-15. ISBN 1177-8881 (Electronic).

SANTAGOSTINO, E. et al. Safety and efficacy of turoctocog alfa (NovoEight(R)) during surgery in patients with haemophilia A: results from the multinational guardian clinical trials. **Haemophilia**, v. 21, n. 1, p. 34-40, Jan 2015. ISSN 1351-8216. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/hae.12518> >.

SPRONK, H. M.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W.; TEN CATE, H. The blood coagulation system as a molecular machine. **Bioessays**, v. 25, n. 12, p. 1220-8, Dec 2003. ISSN 0265-9247 (Print)0265-9247. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10360> >.

STAVROU, E.; SCHMAIER, A. H. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. **Thromb Res**, v. 125, n. 3, p. 210-5, Mar 2010. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2009.11.028> >.

SWIECH, K. et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. In: (Ed.). **BMC Biotechnol**, v.11, 2011. p.114. ISBN 1472-6750 (Electronic).

SWIECH, K.; PICANCO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expr Purif**, v. 84, n. 1, p. 147-53, Jul 2012. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.023> >.

THOMPSON, A. R. Structure and function of the factor VIII gene and protein. **Semin Thromb Hemost**, v. 29, n. 1, p. 11-22, Feb 2003. ISSN 0094-6176 (Print)0094-6176. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-37935> >.

TIEDE, A. Half-life extended factor VIII for the treatment of hemophilia A. **J Thromb Haemost**, v. 13 Suppl 1, p. S176-9, Jun 2015. ISSN 1538-7836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12929> >.

TOOGHEH, G. et al. Evaluation of Aryoseven Safety (Recombinant Activated Factor VII) in Patients with Bleeding Disorders (An Observational Post-Marketing Surveillance Study). **Iran J Pathol**, v. 11, n. 3, p. 204-209, Summer 2016. ISSN 1735-5303 (Print)1735-5303. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TOOLE, J. J. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 342-7, Nov 22-28 1984. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TRUETT, M. A. et al. Characterization of the polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA. **Dna**, v. 4, n. 5, p. 333-49, Oct 1985. ISSN 0198-0238 (Print)0198-0238. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/dna.1985.4.333> >.

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 327-58, Jan 2013. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00016.2011> >.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection. **Thromb Res**, v. 122, n. 3, p. 405-10, 2008. ISSN 0049-3848 (Print)0049-3848. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2007.11.002> >.

WINDYGA, J.; SOLANO TRUJILLO, M. H.; HAFEMAN, A. E. BAX326 (RIXUBIS): a novel recombinant factor IX for the control and prevention of bleeding episodes in adults and children with hemophilia B. In: (Ed.). **Ther Adv Hematol**, v.5, 2014. p.168-80. ISBN 2040-6207 (Print)2040-6215 (Electronic).

WINGE, S. et al. Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq(R)), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line. **Protein Expr Purif**, v. 115, p. 165-75, Nov 2015. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.023> >.

WOJCIECHOWSKI, P.; SZEREDA-PRZESTASZEWSKA, M.; LIPKOWSKI, A. W. Cardiorespiratory action of opioid/tachykinin agonist peptide hybrid in anaesthetized rats: Transduction pathways. **Eur J Pharmacol**, v. 810, p. 9-14, Sep 05 2017. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.012> >.

WOOD, W. I. et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 330-7, Nov 22-28 1984. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

XIAO, W. et al. Expression and fast preparation of biologically active recombinant human coagulation factor VII in CHO-K1 cells. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 6813-24, Dec 16 2013. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4238/2013.December.16.7> >.