



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1105317-8 A2



(22) Data de Depósito: 24/01/2011
(43) Data da Publicação: 30/04/2013
(RPI 2208)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/071

(54) Título: PRODUÇÃO ESTÁVEL E EM LARGA ESCALA DE FVIII HUMANO EM LINHAGEM CELULAR HUMANA SK-HEP-1

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): DIMAS TADEU COVAS, ELISA MARIA DE SOUZA RUSSO CARBOLANTE, KAMILLA SWIECH, VIRGÍNIA PICANÇO E CASTRO

(57) Resumo: PRODUÇÃO ESTÁVEL E EM LARGA ESCALA DE FVIII HUMANO EM LINHAGEM CELULAR HUMANA SK-HEP-1. O presente invento refere-se: 1) ao método de produção de FVIII recombinante em célula humana Sk-Hep-1, compreendendo o fator de von Willebrand (vWF) e 2) à população de células humanas transduzidas com um vetor que codifica a proteína de coagulação (FVIII). A técnica, objeto deste pedido de patente, destina-se ao cultivo das células humanas em suspensão e em aderência e o isolamento do meio de cultura contendo a proteína desejada. O objetivo da invenção é obter um produto mais seguro (isento de possíveis vírus humanos), mais barato, mais estável e através de processo que obtenha quantidades suficientes e em escala industrial para suprir a demanda nacional.

PRODUÇÃO ESTÁVEL E EM LARGA ESCALA DE FVIII HUMANO EM LINHAGEM CELULAR HUMANA SK-HEP-1.

Objeto da patente

O presente invento refere-se ao método de produção de FVIII recombinante em célula humana Sk-Hep-1, compreendendo o fator de von Willebrand (vWF).

A técnica, objeto deste pedido de patente, destina-se ao cultivo das células humanas em suspensão e em aderência e o isolamento do meio de cultura contendo a proteína desejada. A invenção ainda refere-se à população de células humanas transduzidas com um vetor que codifica a proteína de coagulação (FVIII). Estas células podem ser utilizadas no método de produção da proteína.

A presente invenção está ligada, portanto, à indústria farmacêutica.

15

Estado da Técnica

Os pacientes hemofílicos A são tratados por meio de infusão intravenosa de FVIII derivado do plasma ou recombinante (Mannucci e Giangrande, 2000).

Atualmente, no Brasil, devido ao alto custo do recombinante, o tratamento destinado aos hemofílicos é realizado com fatores VIII purificados a partir do plasma de indivíduos normais, estratégia que apresenta desvantagens como risco de infecções virais e alta demanda de plasma de doadores normais. Apesar de ser um tratamento de certa forma eficaz para os pacientes hemofílicos, ainda não é o tratamento ideal.

25

A produção de fator VIII recombinante (FVIIIr) em células de mamíferos representa uma alternativa segura e mais eficiente para o tratamento de indivíduos portadores de Hemofilia A.

No mercado brasileiro, cada unidade internacional (UI) de fator VIII derivado do plasma é comercializada ao preço médio de US\$ 0,80. A utilização anual média por hemofílico é de 30.000 UI, o que representa US\$ 17.000,00/paciente/ano. Estima-se com estes números que o país gaste cerca de US\$ 140.000.000,00 por ano no tratamento destes pacientes. Trata-se de

um tratamento extremamente caro e os pacientes não recebem o tratamento profilático adequado, devido à escassez do produto no mercado e os riscos de contaminação. A ausência de profilaxia diminui a qualidade e a expectativa de vida destes pacientes.

5 Todos os FVIII recombinantes presentes no mercado são produzidos transitoriamente, ou seja, por vetores plasmidiais que não se integram no genoma das células e utilizam células murinas para a produção.

 O uso de linhagens de células não-humanas na produção de fator VIII recombinante apresenta certas desvantagens. A principal limitação na
10 produção de FVIII recombinante que se encontra atualmente é o baixo rendimento de FVIII, que é de duas ordens de magnitude menor do que a de outras proteínas.

 No momento, os únicos FVIII recombinantes disponíveis no
15 mercado estão sob a liderança de três empresas (Bayer, Baxter, Wyeth). São eles o KOGENATE e o KOGENATE FS produzidos pela Bayer, RECOMBINATE pela Baxter e REFACTO pela Wyeth/Genetics Institut. A proteína recombinante é produzida em células CHO (Chinese Hamster Ovary) ou em BHK (Baby Hamster Kidney), que são transfectadas com o FVIII
20 completo ou sem o domínio B. Todos esses recombinantes possuem atividade biológica semelhante ao FVIII derivado do plasma. Ao longo dos anos, formulações mais seguras vêm sendo desenvolvidas, mas estas indústrias utilizam vetores plasmidiais convencionais que geram uma baixa expressão e a proteína recombinante é produzida em linhagens celulares murinas CHO e
25 BHK que apresentam padrões diferentes de glicosilação o que gera um produto com maior probabilidade de causar reação imunológica nos pacientes.

 A patente US 5362641 (Heparanase derived from human Sk-Hep-1 cell line) utiliza a linhagem Sk-Hep-1 (célula humana hepática de origem
30 endotelial) para produzir Heparanase recombinante.

A patente (WO/2004/092355) EXPRESSION OF PROTEINS IN CORD BLOOD-DERIVED ENDOTHELIAL CELLS e a US patent 2002/0042130 A1 and Lin et al. (2002) descrevem a produção de FVIII em células humanas endoteliais que podem ser utilizadas em protocolos de terapia gênica.

As patentes US 6,228, 620, US 5,789, 203 e US 5,693, 499 descrevem a co-expressão do DNA codificador das cadeias leve e pesada do FVIII. Estas incorporações também podem ser utilizadas em acordo com esta invenção.

A proteína terapêutica utilizada nesta invenção possui parte do domínio B deletado (ou retirado), o qual não participa da atividade coagulante do FVIII. A retirada de parte do domínio B do FVIII é um processo conhecido, as patentes US 6, 346,513, WO 86/06101, WO 92/16557, e EP 0 123 945 descrevem deleções nas sequências que codificam o domínio B do FVIII. Neste processo, exposto neste pedido de patente, é utilizado o vetor cPPT-C (FVIIIIDB), obtido conforme descrito na patente IGWS (WO/2004/092355).

20 As patentes EP 1 233 064, US 2002/0165177 e US 6,271, 025 descrevem a inserção de íntrons no cDNA codificador do Fator VIII. A patente US 5,422, 260 descreve mutações pontuais na sequência do DNA codificador do FVIII.

25 O Fator VIIIr (recombinante) tem pelo menos uma das seguintes mutações (EP 1 136 553 A1): - valina na posição 162 é substituído por outro resíduo aminoácido neutro; - serina na posição 2011, é substituído por outro aminoácido hidrofílico; - valina na posição 2223 é substituído por um aminoácido ácido. No domínio B entre as posições arginina 740 e ácido glutâmico 1640 há a substituição por um oligopeptídeo "ligador" rico em arginina que contém 10 a 25 aminoácidos, de preferência 14-20 aminoácidos. Estas posições referem-se à sequência de aminoácidos do fator VIII humano

maduro (Toole et al. 1984,312 Nature (5992): 342-7; Wood et al. 1984,312 Nature (5992): 330-7; Gitschier et al. 1984,312 Nature (5992): 326-30).

O DNA que codifica o FVIII_{DB} (cDNA do FVIII com parte do domínio B retirado) é parte do vetor que é utilizado para transduzir as células humanas.

Objetivos da Invenção e solução proposta para os problemas apontados

O invento que ora se apresenta utiliza-se de uma linhagem celular humana que pode ser cultivada em monocamadas e/ou em suspensão.

10 O objetivo da invenção é obter um produto mais seguro (isento de possíveis vírus humanos), mais barato, mais estável por meio de processo que obtenha quantidades suficientes e em escala industrial para suprir a demanda nacional.

15 O avanço técnico que se observa nesta invenção, em relação ao que existe é a possibilidade de se obter o FVIII mais seguro, uma vez que provém de células humanas, menos suscetíveis de desencadear reações imunológicas, e em alta escala, devido à produção em suspensão. As técnicas existentes até hoje não preveem a forma de obtenção do FVIII_r produzido
20estavelmente em células humanas e em suspensão.

Em condições fisiológicas, a síntese de FVIII ocorre principalmente nos hepatócitos e nas células endoteliais sinusoidais do fígado (Wion et al., 1985; Zelechowska et al., 1985; Do et al., 1999; Hollestelle et al., 2001). Com base nesta informação, utiliza-se para esta invenção uma célula
25humana hepática de origem endotelial (Sk-Hep-1) para produzir o FVIII recombinante.

A célula Sk-Hep-1 usada nesta invenção é caracterizada quanto à expressão de Fator de von Willebrand (FvW), o qual é secretado no
30meio de cultura (Heffelfinger SC et al., 1992). Quando as células expressam o FVIII, a razão molar de FvW:FVIII no sobrenadante pode variar de 1:1 e 100:1.

O FvW estabiliza o FVIII. Assim, a produção de FVIII recombinante é realizada em linhagem celular humana, Sk-Hep-1.

A proteína recombinante do FVIII da coagulação sanguínea da presente invenção possui parte do domínio B deletado (FVIII_{DB}), é produzida em níveis elevados nas formas de cultivo em aderência (monocamadas) e em suspensão, apresenta boa estabilidade, sendo apropriada para a utilização no tratamento da Hemofilia A.

Definições

FVIII recombinante – é uma forma artificial de proteína, no caso do FVIII de coagulação, que é criado pela combinação de duas ou mais sequências. O FVIII recombinante é criado através da introdução de parte do cDNA do FVIII humano em um DNA viral, no caso um lentivirus.

Domínio B – parte da estrutura da molécula de fator VIII que não é essencial para a atividade de coagulação da mesma.

cDNA – DNA complementar. Molécula sintetizada por técnicas de biologia molecular tendo como molde uma molécula de RNA extraída do organismo produtor original. A molécula é complementar ao RNA.

GFP – Green fluorescent protein. Proteína fluorescente verde que tem seu gene introduzido na célula juntamente com o gene codificador do FVIII. Quando produzida pelas células serve de indicador da produção da molécula de interesse (FVIII) e auxilia na seleção destas células produtoras devido a produção de cor verde.

Sk-Hep-1 – linhagem celular humana imortalizada de origem endotelial.

FVIII_{DB} – molécula recombinante de FVIII sem parte do domínio B. **Vetor** - uma molécula de DNA em que um outro fragmento de DNA pode ser ligado a ele. Um vetor pode, por exemplo, carregar consigo um gene resistente a antibióticos, replicar-se com autonomia, e possuir uma sequência conhecida por enzimas que cortam esta molécula (endonuclease).

Envelope viral – capa de origem proteica que reveste e envolve todo o material formador do vírus. Cada tipo de vírus tem diferentes proteínas formadoras deste envelope dando características únicas a cada vírus.

Plasmídeo - plasmídeos são moléculas circulares de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico.

DNA plasmidial – mesma definição anterior

Sk-Hep-FVIII DB – célula Sk-Hep-1 modificada pela transdução viral e que passa a produzir a molecular de Fator VIII.

pVSV-G – um dos tipos de envelope viral. Derivado do vírus da estomatite vesicular. Usado com envelope para o lentivirus empregado nesta patente. Deste modo o material genético do vírus que é de origem do HIV fica circundado por um envelope de outro vírus e é chamado pseudotipado (envelope de outro vírus). Este processo aumenta a segurança para evitar a montagem de um vírus HIV.

15

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting. Processo de seleção das células de acordo com sua fluorescência.

Cytodex 3 – esferas de matriz biologicamente inerte usadas como microcarregadores para cultivo de células em suspensão. Consiste de uma camada fina de colágeno quimicamente acoplada a uma matriz de dextrana.

Cultispher G – esferas macroporosas de gelatina usadas como microcarregadores para cultivo de células que ficam ancoradas na sua superfície.

Transdução – o mesmo que infecção viral. Processo pelo qual os vírus produzidos são colocados junto às células em cultura. Devido às características intrínsecas dos lentivírus o material genético do vírus funde-se ou integra-se ao material genômico da célula modificando o seu DNA e levando a célula a se transformar numa produtora de FVIII.

PBS – Phosphate buffered solution. Solução aquosa de salina a 0,9% de NaCl tamponada com fosfato a pH 7,4.

Descrição da Invenção - Processo

O método de obtenção de FVIII recombinante sem parte do domínio B compreende as seguintes etapas:

- 5 1- Produção de partículas virais contendo FVIIIIDB
- 2- Utilização das partículas virais para a infecção da linhagem Sk-Hep-1
- 3- Seleção das células positivas para GFP (Green Fluorescent protein – proteína verde fluorescente utilizada para selecionar as células produtoras)
- 10 4- Cultivo em suspensão
- 5- Recuperação do FVIIIr produzido pelas células Sk-Hep-1

Etapas 1 do processo: Produção de partículas virais contendo

FVIIIIDB

- 15 A etapa 1 consiste na produção de partículas virais contendo o FVIIIIDB e é realizada pelo método de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Gibco).

Por meio da lipofectamina obtém-se partículas virais que possuem o cDNA do FVIII com o domínio B parcialmente deletado (FVIIIIDB) e a proteína GFP. As partículas virais são utilizadas para inserir o gene de interesse (neste caso o FVIIIIDB-GFP) nas células Sk-Hep-1.

São utilizados três vetores plasmídeos : o vetor lentiviral contendo o gene de interesse, o plasmídeo responsável pela geração do capsídeo viral (**p8.91**) e um plasmídeo para a formação do envelope viral (**pVSV-G**).

O vetor contendo o gene de interesse em questão inclui um promotor operavelmente ligado a uma sequência de DNA que codifica o fator de coagulação FVIII. O vetor é viral, pode ser um vetor retroviral, mais preferivelmente um vetor lentiviral. O vetor lentiviral é um vetor derivado do

HIV-1. Além do HIV-1, vetores lentivirais HIV-2, vírus da imunodeficiência simia do vírus da anemia infecciosa equina, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) podem ser utilizados. A representação esquemática do vetor está mostrado na sequência 1A.

5

Os vírus ou partículas virais são produzidos em uma linhagem celular de mamífero (HEK-293) com o uso dos 3 DNAs plasmideais citados acima, método já descrito pela patente US 5994136. As células produzem os vírus que são secretados para o meio de cultura que é recolhido, filtrado e armazenado a -80°C até o momento do uso.

Os vírus produzidos por estas células são chamados de vetores lentivirais ou partículas virais e são coletados e utilizados na etapa 2.

Etapa 2 do processo: Utilização das partículas virais para a
15 infecção da linhagem Sk-Hep-1

Em seguida (Etapa 2), a célula humana SK-Hep-1 é transduzida com as partículas virais contendo o FVIII^{DB}.

Os vírus produzidos na etapa anterior (vetores lentivirais) são utilizados no processo de transdução, ao levar o material genético de interesse (cDNA do FVIII^h humano) para o genoma da célula hospedeira, resultando na integração estável no genoma da célula. Após a integração do material genômico do vírus com o DNA da célula inicia-se a transcrição do transgene e consequentemente a síntese da proteína recombinante. Geralmente, a proteína recombinante pode ser detectada em algumas horas após a transdução.

Etapa 3: Seleção das células positivas para GFP

A construção lentiviral utilizada nesta patente possui o cDNA para GFP, de modo que a eficiência de transdução é medida por citometria de fluxo (FACS). As células que estiverem fluorescentes e forem detectadas pelo

citômetro de fluxo indicam que houve a infecção e integração e que como estão expressando GFP também expressam o FVIII.

Após a seleção por FACS, a avaliação do nível de produção da proteína recombinante é feita por RT-PCR convencional e por teste de atividade, teste cromogênico.

Etapa 4: Cultivo em Suspensão

A expansão da célula Sk-Hep-FVIIIIDB pode ser realizada em 10 garrafas tipo spinner com microcarreadores.

A linhagem celular gerada nesta invenção deve ser previamente expandida em garrafas até a concentração de 1×10^5 células/mL e adicionada aos microcarreadores previamente hidratados, esterilizados e equilibrados em meio de cultivo com soro à 37° C.

15

Etapa 5: Recuperação do FVIII recombinante produzido pelas células Sk-Hep-FVIIIIDB.

Nesta etapa isola-se o FVIII recombinante das células Sk-20Hep-FVIIIIDB. A quantidade de proteína purificada durante e após o processo de purificação pode ser monitorada (ou mensurada) por ELISA e pelos testes de coagulação.

A composição obtida por este método de produção de FVIII é submetida a um tratamento de inativação viral e purificação para remover as 25 substâncias químicas.

Exemplo de obtenção

A invenção pode ser obtida de acordo com as etapas anteriormente citadas e explicadas abaixo:

Etapa 1 do processo: Produção de partículas virais contendo 30 FVIIIIDB

A etapa 1 consiste na produção de partículas virais contendo o FVIIIIDB e é realizada pelo método de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Gibco).

A produção de partículas virais pelo usando lipofectamina é um processo no qual se usa 3 DNAs sendo 10 ug do vetor lentiviral, 6,5 ug do vetor 8.91 (capsídeo) e 3,5 ug do vetor VSVG (envelope). Antes de iniciar a colocação dos DNAs, o meio de cultura das células HEK-293 é trocado. Coloca-se 7 ml de DMEM contendo 10% de soro bovino fetal (SFB).

Em um tubo de 15 ml, pipetar os DNAs 8.91 e VSVG em 1,5 ml de meio DMEM sem soro. Em outro tubo, misturar 1,5 ml de meio DMEM sem soro com 60 ul de Lipofectamina. Deixar ambos os tubos 5 minutos em temperatura ambiente.

10 Em seguida, misturar os 2 tubos e deixar mais 20 minutos incubando a temperatura ambiente. Colocar os 3 ml resultantes na placa com as células e incubar a 37°C 5% CO₂. Após 6 horas, trocar o meio das placas (7 ml de meio DMEM 10% SFB) e incubar por no mínimo 48 horas a 37 °C 5% CO₂. Após as 48 horas o sobrenadante da cultura contendo os vírus produzidos pelas células é coletado, filtrado e fracionado em alíquotas de 1ml.

Etapa 2 do processo: Utilização das partículas virais para a infecção da linhagem Sk-Hep-1

A transdução pode ser realizada em células aderentes, assim como em culturas em suspensão. Diversas técnicas de transdução com vetores virais e não virais tem sido otimizadas para cultura de células em suspensão.

As transduções são realizadas em placas de 24 poços. Vinte e quatro horas antes da transdução são plaqueadas de 2 a 5x10⁴ células Sk-Hep-1 em meio DMEM com 10% SFB, para que a transdução ocorra na fase exponencial de crescimento celular. Em cada poço é adicionado o vírus produzido e coletado anteriormente sem diluição. As células são centrifugadas (90 minutos, 1250 x g, 32°C), incubadas por 15-18 horas na estufa úmida de CO₂, lavadas com PBS e expandidas com meio apropriado.

30 Etapa 3: Seleção das células positivas para GFP

A eficiência de transdução é medida por citometria de fluxo (FACS).

Para o procedimento de FACS, as células são tripsinizadas com Tripsina/EDTA, lavadas com tampão apropriado (1% soro bovino fetal/ 50,1% Azida de Sódio em PBS) e é adicionado 1% de formaldeído em PBS. Células não transduzidas, que não expressam GFP, são usadas como controle negativo, ou seja, as células Sk-Hep-1 que não receberam vírus são também passadas no citometro de fluxo para avaliar a fluorescência basal das células. A fluorescência basal é comparada com aquela das células transduzidas

10 A identificação e purificação da população de células que possuem o vetor lentiviral contendo FVIIIDB estão demonstradas nos gráficos 1B.

As células positivas para GFP selecionadas por citometria de fluxo podem ser re-cultivadas em meio DMEM com 10% de SBF à temperatura 15 de 37°C e 5% de CO₂.

Após a seleção por FACS, a avaliação do nível de produção da proteína recombinante é feita por RT-PCR convencional e por teste de atividade, teste cromogênico. O teste cromogênico é feito pela metodologia de 20 ELISA ou por luminescência. O teste cromogênico utilizado foi o Immuno Chrom (Immuno GmbH, Alemanha).

Etapas 4: Cultivo em Suspensão

A expansão da célula Sk-Hep-FVIIIDB pode ser realizada em 25 garrafas spinner com microcarreadores. A cultura em microcarregadores permite o cultivo de linhagens celulares dependentes de ancoramento em escala industrial de produção para atender a demanda comercial. Neste tipo de cultura, a célula cresce aderida na superfície de pequenas esferas ou no interior dos poros de partículas macroporosas que encontram-se suspensas 30 no meio de cultura. O sistema permite o controle dos parâmetros de cultivo (pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, dentre outros), reduz a

necessidade de grandes quantidades de meio de cultura, reduz o trabalho e os riscos de contaminação.

As células podem ser cultivadas em garrafas spinner flasks em incubadoras a 37 °C e 5% de CO₂. Os microcarreadores são *Cytodex 3* (GE Healthcare) e *Cultispher G* (Percell Biolytica). A linhagem celular gerada nesta invenção deve ser previamente expandida em garrafas até a concentração de 1x10⁵ células/mL e adicionada aos microcarreadores previamente hidratados, esterilizados e equilibrados em meio de cultivo com soro à 37° C. Para a inoculação da garrafa spinner com *Cytodex 3* e *Cultispher-G*, as células são mantidas em rotação intermitente (2 minutos de rotação à 30–40 rpm seguido de 30 minutos sem agitação) por 3 horas. Em seguida, o meio de cultura DMEM com 10% SBF é adicionado para completar o volume final e a velocidade de agitação é ajustada para 40 rpm. Em ambos os casos a troca de metade do volume total do meio é realizada a cada 1-2 dias. A remoção do meio de cultura é realizada depois da sedimentação dos microcarregadores contendo as células.

Os resultados do escalonamento da produção estão mostrados nos gráficos 2.

Etapa 5: Recuperação do FVIII recombinante produzido pelas Sk-Hep-FVIII DB

Nesta etapa isola-se o FVIII recombinante das células –Hep-FVIII B. Métodos de purificação adequadas incluem, mas não estão limitadas a, cromatografia de imunoafinidade, cromatografia de troca iônica, etc, e suas combinações. Protocolos de purificação de execução para os fatores de coagulação humanos estão presentes nas patentes: WO 93/15105, EP 0 813 597, WO 96/40883, 96/15140/50 e US 7,247,707 B2. Eles podem ser adaptados às exigências necessárias para isolar os fatores recombinantes VIII e IX.

A quantidade de proteína purificada durante e após o processo de purificação pode ser monitorada (ou mensurada) por ELISA e pelos testes de coagulação.

A composição obtida por este método de produção de FVIII é submetida a um tratamento de inativação viral que inclui o tratamento de calor (seco ou no estado líquido, com ou sem a adição de substâncias químicas, incluindo inibidores de protease). Após a inativação do vírus mais um passo de purificação para remover as substâncias químicas pode ser necessário. A patente WO 93/15105 descreve técnica de isolamento de fator VIII do plasma sanguíneo por cromatografia de troca iônica, com alto índice de pureza.

Seleção por citometria de fluxo

10 A construção lentiviral utilizada nessa invenção possui o cDNA para GFP, de modo que a eficiência de transdução foi medida por citometria de fluxo (FACS). Para o procedimento de FACS, as células foram tripsinizadas com Tripsina/EDTA, foram lavadas com tampão FACS (1% FBS / 0,1% Azide de Sódio em PBS) e foi adicionado 1% de formaldeído em PBS. A medição e
15 seleção foi realizada em aparelho FACScan, com software CellQuest da Becton Dickinson. Células não transduzidas, que não expressam GFP.

A avaliação por citometria de fluxo revelou uma população antes da seleção com 8,4% de células GFP positivas e após a seleção a população obtida foi de 73% de GFP positiva (Esquema 1A).

20 RT-Convencional

Moléculas de cDNA foram sintetizadas a partir de 4 µg de RNA total pela incubação de 50 ng/µL de oligo FVIII ou β-actina, 10 mM dNTPs, em um volume de 10 µL a 65°C por 5 minutos, seguido resfriamento em gelo por 2
25 minutos. Subseqüentemente, uma mistura de 2µL RT-Buffer 10X, 4 µL de MgCl 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de ribonuclease foram adicionadas à mistura, obtendo um volume final de 19 µL. A reação foi incubada a 25°C por 2 minutos, foi adicionado 1µL de SuperScript II RT (50
30 unidades) a cada amostra seguindo a 25°C por 10 minutos. A reação foi então incubada a 42°C por 50 minutos. e desnaturada a 70°C por 15 minutos e colocada em gelo, com adição de 1µL de RNase H e incubação a 37°C por 20 minutos. Amostras incubadas na ausência da enzima transcriptase reversa

foram preparadas como controle. Após a transcrição reversa, 1 μ L de cDNA foi utilizado para amplificação por PCR com oligos específicos para FVIII e β -actina.

5 A amplificação de regiões do FVIII recombinante está demonstrado no gráfico 1B.

Quantificação da atividade de FVIII pelo Teste Cromogênico

10 O Teste Cromogênico mede a atividade do FVIII não pelo tempo de coagulação como no teste TTPA, mas pela produção de fator Xa. Às amostras foram adicionados dois reagentes (A: fosfolipídeos e albumina; B: FIX, FX, Ca²⁺, albumina e trombina). O fator VIII contido nas amostras funciona como um co-fator, juntamente com FIX, Ca²⁺ e fosfolipídeos, para 15 transformar FX em FXa. O FXa degrada o substrato p-nitroanilina, resultando na coloração amarela, cuja concentração é medida a 405 nm. O teste cromogênico utilizado foi o Immuno Chrom (Immuno GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços. Para cada microplaca foi aplicada uma curva-padrão de diluições 20 definidas de plasma humano. O nível mínimo de detecção deste teste é para amostras que apresentam $\geq 1\%$ de atividade.

A atividade de FVIII recombinante obtida é de 4 UI/mL/10E6 células. Isso pode ser comprovado pela RT-PCR (reverse transcription 25 polymerase chain reaction – reação da transcriptase reversa, seguida em cadeia da polimerase) utilizada para detectar a expressão das cadeias leve e pesada do FVIIIr expresso pela a população SK-Hep-FVIIIIDB.(Resultado - 1C). Observa-se que a linhagem celular obtida nesta invenção produz 4 vezes mais FVIII do que a quantidade de FVIII no plasma humano.

30 **Teste em modelo animal – Funcionalidade da proteína recombinante**

Para testar a funcionalidade *in vivo* da proteína recombinante obtida por esta invenção foi realizado o teste abaixo descrito.

A funcionalidade da proteína recombinante foi testada em 5 camundongos Hemofílicos A e comparada com a eficiência do FVIII_{dp} (derivado do plasma). Cinco camundongos receberam 1 UI de FVIII recombinante ou FVIII_{dp} e a atividade biológica foi acompanhada 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 6 horas após a infusão do FVIII. Os resultados estão mostrados no gráfico 2A.

Os camundongos hemofílicos A foram anestesiados e receberam 50 UI de FVIII_{DB}/Kg, em seguida, foi provocado um sangramento cortando 3mm da cauda. A curva de sobrevivência está mostrada nos gráficos 2B. Todos os animais que receberam FVIII_{DB} sobreviveram, mostrando a eficácia do FVIII_{DB} gerado por esta invenção em corrigir a hemofilia A.

Descrição dos gráficos, tabelas e esquemas citados

A descrição que se segue abaixo possibilitará um entendimento global e de cada detalhe do invento.

O esquema 1A é a **representação** esquemática do vetor lentiviral de expressão.

Os gráficos **1B** exibem a Citometria de Fluxo, células GFP positivas selecionadas e expandidas.

25

Resultado 1C - utilização de RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction - reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase) para detectar a expressão das cadeias leve e pesada do FVIII_r expresso pela a população SK-Hep-FVIII_{DB}.

30

Tabela 1D - demonstra a atividade biológica do FVIII recombinante.

Gráficos 2 A e B – apresentam o teste de avaliação da eficácia do FVIII recombinante em camundongos hemofílicos A.

2A) Comparação do perfil da atividade do FVIIIr e do FVIII_{dp} ao longo do tempo. O FVIIIr apresenta níveis mais altos de atividade biológica e é mais estável do que o FVIII_{dp}.

B) Curva de sobrevivência após o sangramento induzido nos camundongos que receberam FVIIIr (todos sobreviveram), FVIII_{dp} (todos sobreviveram, e camundongos controle (não receberam FVIII e morreram até 30 horas após o início do sangramento)

O **gráfico 3** ilustra o escalonamento da linhagem gerada Sk-Hep-FVIII_{BD} e análise da produção do FVIII recombinante em suspensão. A utilização dos dois microcarreadores mostra-se ser eficiente para cultivar a Sk-Hep-FVIII_{DB}, a qual chega a produzir de 1,2 a 1,4 unidades de FVIIIr/mL.

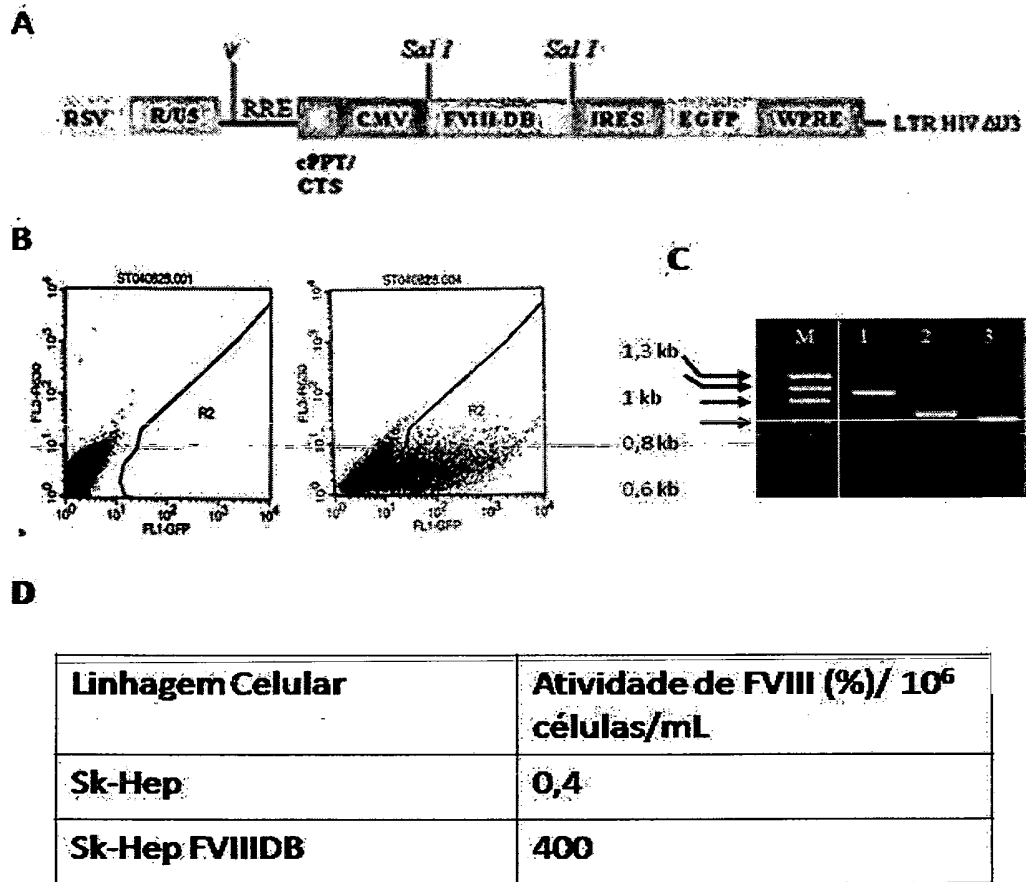
REIVINDICAÇÕES

1. Processo de expressão de FVIII em células humanas hepáticas/
endoteliais (SK- Hep 1), caracterizadas por expressarem Fator de Von
Willebrand.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso de
um vetor letiviral que possui o cDNA de proteína, para a transdução de
células.
3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato
da proteína ser um fator de coagulação do sangue.
4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fator de
coagulação do sangue ser o fator humano VIII .
5. População de células- Sk- Hep1- FVIII DB caracterizadas por serem
obtidas por processos descritos nas reivindicações 1 a 4.
6. População de células humanas Sk –Hep, de acordo com a reivindicação
5, caracterizada pelo fator humano VIII ter o domínio B deletado.
7. População de células humanas, de acordo com qualquer uma das
reivindicações de 5 e 6 , caracterizada por pelo menos 45 % das células
expressar endogenamente o fator vWF .
8. Linhagem celular imortalizada caracterizada por ser obtida a partir de
uma população de células humanas Sk- Hep-1 de acordo com qualquer
uma das reivindicações de 5, 6 ou 7.
9. Processo para a produção do fator de coagulação do sangue,
caracterizado por ser - em - cultura em suspensão utilizando
microcarregadores.
10. Processo para a produção de fator de coagulação do sangue, que
compreende a cultura de uma população de células Sk-Hep-1, de
acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 8 ou uma linhagem
celular de acordo com a reivindicação 9 em condições adequadas, e o
isolamento da proteína - o fator de coagulação do sangue - a partir do
meio de cultura celular.
11. Processo de acordo com as reivindicações 9 e 10 , caracterizado pela
proteína ser o fator de coagulação do sangue VIII e a etapa de

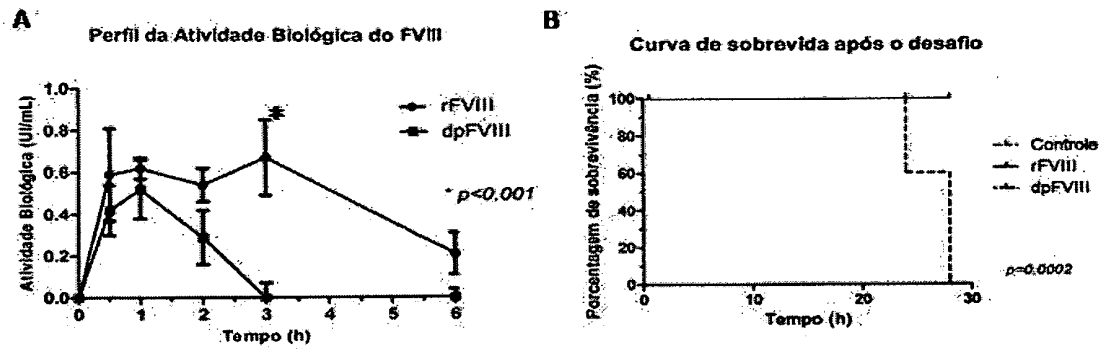
purificação incluir isolamento do fator de coagulação do sangue VIII na presença do fator de von Willebrand.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela proteína, preferencialmente um fator de coagulação do sangue, ser submetida a um tratamento de inativação viral.

FIGURAS 1 A, B , C , D



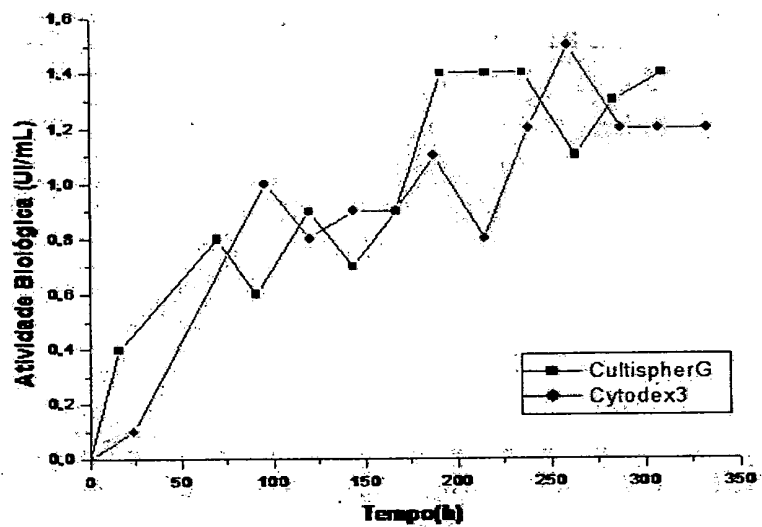
Gráficos 2A e B



5

10

Gráfico 3



15

RESUMO**PRODUÇÃO ESTÁVEL E EM LARGA ESCALA DE FVIII HUMANO EM
LINHAGEM CELULAR HUMANA SK-HEP-1.**

5 O presente invento refere-se: 1) ao método de produção de FVIII recombinante em célula humana Sk-Hep-1, compreendendo o fator de von Willebrand (vWF) e 2) à população de células humanas transduzidas com um vetor que codifica a proteína de coagulação (FVIII). A técnica, objeto deste pedido de patente, destina-se ao cultivo das células humanas em
10 suspensão e em aderência e o isolamento do meio de cultura contendo a proteína desejada.

O objetivo da invenção é obter um produto mais seguro (isento de possíveis vírus humanos), mais barato, mais estável e através de processo que obtenha quantidades suficientes e em escala industrial para
15 suprir a demanda nacional.