

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DO
FATOR RECOMBINANTE VIII DE COAGULAÇÃO (rFVIII) NO
TRATAMENTO DE HEMOFILIA A**

Isabela Andreotti

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Gisele Monteiro

São Paulo

2021

ISABELA ANDREOTTI

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DO
FATOR RECOMBINANTE VIII DE COAGULAÇÃO (rFVIII) NO
TRATAMENTO DE HEMOFILIA A**

Data de Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Gisele Monteiro
Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – FCF-USP

Prof.^a Dr.^a Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica – FCF-USP

Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron
Departamento de Imunologia – ICB-USP

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| FIGURA 1 - Padrão de hereditariedade de Hemofilia | 2 |
| FIGURA 2 - Cascata de coagulação | 4 |
| FIGURA 3 - Ativação de linfócitos e liberação de anticorpos anti-FVIII | 10 |
| FIGURA 4 - Organização dos domínios na estrutura primária do FVIII | 12 |
| FIGURA 5 - Estrutura do FVIIIa em relação a membrana de plaqueta ativada | 17 |
| FIGURA 6 - Estrutura do complexo tenase e sua conformação sobre a membrana de uma plaqueta ativada | 18 |
| FIGURA 7 - Sequência peptídica de FVIII com as PTM identificadas | 20 |
| FIGURA 8 - Porção terminal de dois tipos de estrutura de ácido siálico, presentes nos glicanos complexos | 21 |
| FIGURA 9 - Visão geral da resposta imune anti-FVIII conforme o perfil de citocinas liberadas, e sua relação com o mecanismo de tolerância | 24 |
| FIGURA 10 - <i>Heatmap</i> obtido por SNAP2 indicando o grau de impacto de cada substituição de aminoácido no epítipo Ile291-Gln305 sobre a atividade da proteína | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|--|------|
| TABELA 1 - Produtos FVIII disponíveis no mercado | 13 |
| TABELA 2 - Linhagens celulares empregadas | 14 |
| TABELA 3 - <i>N</i> -glicosilação em FVIII | 20 |
| TABELA 4 - Comparação entre pdFVIII e cinco rFVIII quanto ao perfil de <i>N</i> -glicosilação | 22 |
| TABELA 5 - Análise dos epítomos imunogênicos de FVIIIa e seu impacto na atividade | 24 |
| TABELA 6 - Epítomos de FVIIIa que se ligam fortemente aos alelos HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*1101 e HLA-DRB1*1501 no MHC-II | 25 |
| TABELA 7 - Quantificação da potência imunogênica de epítomos do FVIIIa a partir dos scores de imunogenicidade e de afinidade ao MHC-II | 27 |
| TABELA 8 - Possíveis substituições na sequência de rFVIII e seu impacto sobre a atividade da molécula | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ADA | <i>Antidrug antibody</i> |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| APC | <i>Antigen-presenting cell</i> |
| aPCC | Concentrado de complexo de protrombina ativada |
| BDD | <i>B-domain-deleted</i> |
| BHK | Células de rim de hamster bebê |
| CD40L | CD40-ligante |
| CHO | Células de ovário de hamster chinês |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| dsDNA | <i>Double-stranded DNA</i> |
| EHL | <i>Extended half-life</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| F8 | Gene que codifica o Fator VIII |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FT | Fator tecidual |
| FVIII | Fator VIII |
| FvW | Fator von Willebrand |
| HC | <i>Heavy chain</i> |
| HEK | Células embrionárias de rim humano |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| HSA | <i>Human serum albumine</i> |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória a 50% |

| | |
|---------------------|---|
| IFN- γ | Interferon <i>gamma</i> |
| ITI | Indução de imunotolerância |
| LC | <i>Light chain</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MCB | <i>Master Cell Bank</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| Neu ₅ Ac | Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico |
| Neu ₅ Gc | Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| pdFVIII | Fator VIII derivado de plasma |
| PTM | <i>Post-translational modification</i> |
| rFVIII | Fator VIII recombinante |
| SDM | <i>Site-directed mutagenesis</i> |
| SNP | <i>Single nucleotide polymorphism</i> |
| TCR | <i>T-Cell Receptor</i> |
| T _h | Linfócito T <i>helper</i> ou auxiliar |
| T _{reg} | Linfócito T regulatório |
| UB | Unidades Bethesda |
| WCB | <i>Working Cell Bank</i> |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | |
| LISTA DE TABELAS | |
| LISTA DE ABREVIATURAS | |
| RESUMO | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 Hemofilia | 2 |
| 1.2 Coagulação e Fisiopatologia da doença | 3 |
| 1.3 Tratamento | 5 |
| 1.4 Imunogenicidade | 6 |
| 1.5 Hemofilia com inibidores | 7 |
| 1.6 Fator VIII (FVIII) e Fator VIII recombinante (rFVIII) | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Revisão bibliográfica | 16 |
| 3.1.1 Critérios de inclusão | 16 |
| 3.1.2 Critérios de exclusão | 16 |
| 3.2 Estratégias para redução da imunogenicidade do rFVIIIa | 16 |
| 4. RESULTADOS | 17 |
| 4.1 Estrutura molecular do FVIII | 17 |
| 4.1.1 Estrutura peptídica: cadeias e domínios | 17 |
| 4.1.2 Modificações pós-traducionais (PTM) | 18 |
| 4.1.2.1 Glicosilação | 19 |
| 4.1.2.2 Sulfatação de tirosinas | 23 |
| 4.2 Epítomos imunogênicos e componentes do sistema imune | 23 |
| 4.3 Proposta envolvendo aspectos biotecnológicos na produção do rFVIII ... | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 31 |
| 6. CONCLUSÃO | 33 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 34 |
| 8. ANEXOS | 38 |
| 8.1 Aspectos Éticos | 38 |

RESUMO

ANDREOTTI, I. **ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DO FATOR RECOMBINANTE VIII DE COAGULAÇÃO (rFVIII) NO TRATAMENTO DE HEMOFILIA A**. 2021. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: Hemofilia A, Fator VIII recombinante, Imunogenicidade

INTRODUÇÃO: A hemofilia A é uma condição genética ou adquirida que consiste na deficiência do fator VIII de coagulação no organismo, levando a episódios hemorrágicos frequentes. O tratamento é contínuo e consiste principalmente na reposição do fator VIII como derivado de plasma (pdFVIII) ou como biofármaco produzido por tecnologia do DNA recombinante (rFVIII). Em aproximadamente 25-30% dos casos, o sistema imune do paciente passa a gerar anticorpos contra o medicamento, prejudicando ou até inviabilizando o tratamento. Essa situação é chamada de hemofilia com inibidores, sendo os inibidores os anticorpos que neutralizam o fator VIII de reposição. **OBJETIVO:** A proposta deste trabalho é identificar os mecanismos envolvidos na imunogenicidade do fator VIII e propor formas de minimizá-los por modificações na estrutura proteica. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Por meio de revisão sistemática da literatura, foram coletadas informações a respeito da molécula, da sua atividade e de como os componentes do sistema imune interagem com ela. Além disso, foram empregados *softwares* públicos e bases de dados para análise aprofundada da sequência proteica e de suas modificações pós-traducionais, identificação de epítomos de caráter imunogênico e previsão de mutações pontuais que não impactassem na atividade do fator. **RESULTADOS:** Os epítomos 482-508, 587-608, 1811-1818, 2173-2327 e 2253-2270 da molécula de rFVIII foram identificados como imunogênicos. Asn41, Asn239, Asn1810 e Asn2118 são os resíduos glicosilados, e Tyr1680 é um resíduo sulfatado de alta importância. Foram selecionados oito opções de resíduos para substituição: Leu299Ile, Arg484Lys, Tyr487His, Arg489Ser, Pro492Asn, Arg593Lys, His2315Asn e Glu2327Asp, e destaca-se Arg593Lys como mais promissor. Além disso, propõe-se inserção de uma porção do domínio de interface a3, o qual contém Tyr1680, na sequência proteica final para aumento da afinidade por Fator von Willebrand (FvW). **CONCLUSÃO:** Apresenta-se uma proposta de *Biobetter* de rFVIII produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO), com o potencial de ser menos imunogênica e, portanto, proporcionar aos pacientes vivendo com hemofilia A uma melhor qualidade de vida por meio de um tratamento mais seguro e confiável.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemofilia

Hemofilia é uma doença hemorrágica causada pela deficiência de fatores de coagulação, que leva a sangramentos espontâneos ou induzidos por traumas. A hemofilia pode ser classificada como A ou B, sendo caracterizada pela deficiência do fator VIII ou IX de coagulação, respectivamente. A hemofilia A equivale a aproximadamente 80 a 85% dos casos, logo o presente trabalho concentra-se nesse tipo (SRIVASTAVA et al., 2020).

A doença também pode ser classificada pela causa como genética ou adquirida. A forma genética, a mais prevalente, é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, isto é, no gene codificador do fator de coagulação deficiente (F8 na hemofilia A, ou F9 na hemofilia B), há uma mutação que provoca a doença em todos os homens portadores (X^HY). No caso das mulheres, se a mutação acomete apenas um dos seus cromossomos X (X^HX , heterozigose), elas são portadoras da mutação e podem transmiti-la à prole, porém não manifestam a doença; se a mutação ocorre em ambos os cromossomos (X^HX^H , homozigose), situação bastante rara, elas manifestam a doença (Figura 1). Já na forma adquirida, não há mutação nos fatores VIII ou IX, porém formam-se autoanticorpos contra um desses fatores por meio de doenças autoimunes, câncer ou origem idiopática (SRIVASTAVA et al., 2020).

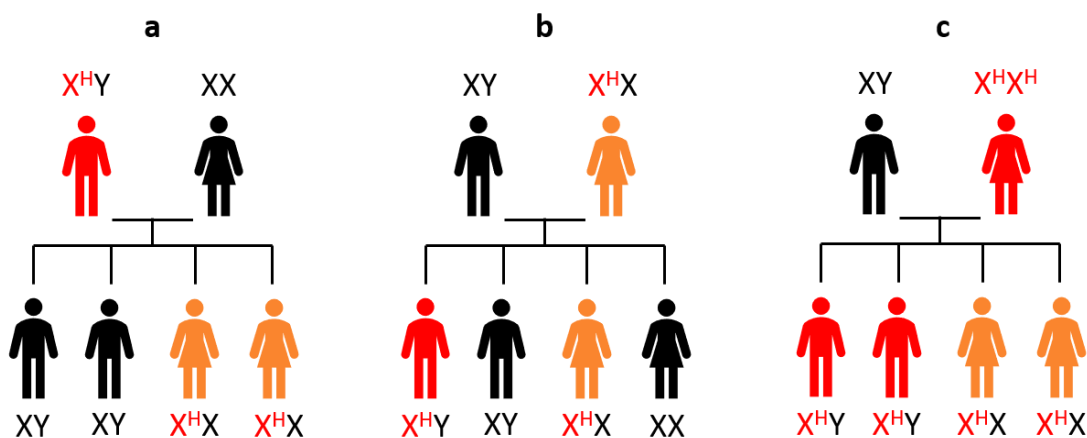


Figura 1: Padrão de hereditariedade de Hemofilia, em que vermelho indica indivíduos que manifestam a doença e laranja indica indivíduos portadores da mutação. **(1a)** Na prole de um homem com hemofilia (X^HY) com uma mulher normal (XX), 100% dos filhos homens seriam normais (XY) e 100% das filhas mulheres seriam portadoras da mutação (X^HX). **(1b)** Na prole de um homem normal (XY) com uma mulher portadora da mutação (X^HX), há 50% de chances de filhos homens apresentarem a doença (X^HY), e 50% de chances de filhas mulheres portarem a mutação (X^HX). **(1c)**

Na prole de um homem normal (XY) com uma mulher com hemofilia ($X^H X^H$), 100% dos filhos homens apresentariam a doença ($X^H Y$), e 100% das filhas mulheres seriam portadoras da mutação ($X^H X$).

Na hemofilia A, o quadro clínico se caracteriza por hemorragias recorrentes e duradouras, principalmente em articulações (hemartroses) e músculos, e que variam em frequência e gravidade. Sangramentos em órgãos vitais podem ocorrer, porém são menos comuns. O grau da doença pode ser classificado em leve, moderado ou grave de acordo com o nível residual de fator VIII no plasma e a sua atividade funcional (PIO; OLIVEIRA; REZENDE, 2009). Aproximadamente 50-60% das pessoas com hemofilia A têm a forma grave da doença, sofrendo episódios de sangramento frequentes e que podem promover condições de dor, deformidade, redução da mobilidade e dano articular a longo prazo, além de haver maiores riscos de hemorragias nos órgãos vitais (SRIVASTAVA et al., 2020; Young, 2012).

1.2 Coagulação e Fisiopatologia da doença

Quando ocorre lesão de um vaso sanguíneo, as plaquetas em conjunto com o endotélio, o tecido conjuntivo do vaso e fatores circulantes e de membrana são responsáveis por realizar o processo de coagulação, resultando no fechamento da lesão e na parada do sangramento. Uma das etapas desse processo é a Cascata de Coagulação (Figura 2), uma série de reações enzimáticas envolvendo os fatores de coagulação que resultam na deposição de fibrina insolúvel para estabilização do tampão plaquetário.

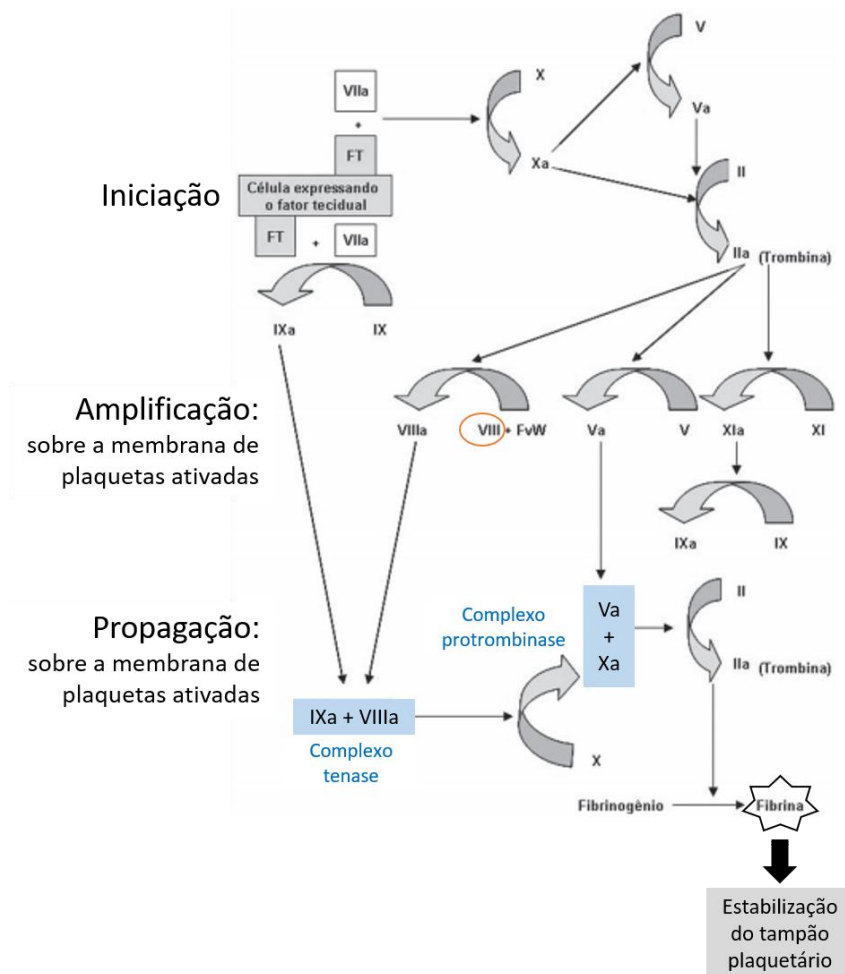


Figura 2: Cascata de coagulação, indicando o funcionamento dos fatores de coagulação na superfície das plaquetas até ativação da fibrina, responsável por estabilizar o tampão plaquetário. Figura adaptada de Ferreira et al. (2010).

Na fase de iniciação da cascata, células endoteliais que expressam o fator tecidual (FT) em suas membranas entram em contato com componentes do sangue, incluindo fatores de coagulação e mediadores inflamatórios. O FT liga-se ao fator VII circulante, ativando-o a FVIIa e formando com ele o complexo FVIIa/FT, que ativa pequenas quantidades de FIX e FX para FIXa e FXa, respectivamente. O FXa ativa o FVa, o qual atua como cofator no complexo protrombinase FXa/FVa para conversão da protrombina (FII) à trombina (IIa). Nesse momento, a quantidade de trombina formada não é suficiente para provocar a estabilização do agregado plaquetário, porém realiza papel essencial na ativação do FVIII e na formação de maiores quantidades de FVa por feedback positivo, que constituem a fase de amplificação da cascata. Na fase de propagação, os fatores VIIIa e IXa formam o

complexo tenase, que ativa mais FXa para formar maior quantidade do complexo protrombinase, que por sua vez é capaz de formar trombina suficiente para conversão de fibrinogênio a fibrina, a qual forma polímeros que estabilizam o tampão plaquetário (FERREIRA et al., 2010).

Destacando o fator VIII, em situações normais ele está inativo em complexo com o fator von Willebrand (FVIII-FvW) na circulação. Durante a cascata de coagulação, o complexo se dissocia na superfície das plaquetas pela ação da trombina, resultando na ativação dos dois fatores. O FVIIIa volta a ser inativado pela ação da proteína C com o cofator proteína S, como parte do processo anticoagulante que mantém o equilíbrio hemostático, evitando oclusão trombótica do vaso (FERREIRA et al., 2010). A deficiência desse fator, na hemofilia A, representa uma falha na cascata, que assim não é capaz de gerar fibrina suficiente para estabilizar o tampão plaquetário, resultando em longo tempo de coagulação e em hemorragias.

1.3 Tratamento

A terapia de indivíduos com hemofilia consiste principalmente na reposição do fator deficiente por via intravenosa. Atualmente, existem FVIII comerciais derivados de plasma, que são obtidos por fracionamento do plasma humano com inativação viral, e recombinantes, isto é, a proteína de origem humana é produzida por células em biorreator a partir de técnicas de engenharia genética (tecnologia do DNA recombinante). Vale mencionar que também estão em desenvolvimento terapias gênicas para o tratamento da hemofilia, no entanto elas não são tema deste trabalho (BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2015).

O tratamento pode ser profilático, episódico ou perioperatório. A modalidade profilática é indicada para os casos graves da doença e é contínua, com intervalos de 2 a 3 dias entre infusões a depender do paciente, a fim de evitar sangramentos espontâneos frequentes e potencialmente severos. A modalidade episódica visa a controlar casos pontuais de sangramento, espontâneos ou causados por trauma, e consiste em 1 a 2 infusões por dia por aproximadamente 3 dias após o episódio, variando de acordo com a demanda do paciente. Existe também a modalidade

perioperatória, para pessoas com coagulopatias que passarão por procedimentos cirúrgicos e precisam garantir o controle da sua hemostase (BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2015; NOVO NORDISK A/S, 2018).

1.4 Imunogenicidade

Imunogenicidade é a capacidade de uma molécula exógena induzir resposta imune do organismo contra si própria. Essa ocorrência é influenciada por fatores relacionados à molécula e ao indivíduo, além de fatores ambientais e nutricionais (KESSLER; GOLDSMITH; SCHELLEKENS, 2006).

Mesmo moléculas que podem ser benéficas ao organismo, como biofármacos, podem provocar resposta imune, gerando anticorpos anti-fármaco (ADAs) e resultando em rejeição do tratamento. Nesses casos, a imunogenicidade não só impacta na eficácia do medicamento, como pode também provocar reações alérgicas, choque anafilático e até doenças autoimunes (KESSLER; GOLDSMITH; SCHELLEKENS, 2006).

A imunogenicidade de proteínas terapêuticas pode ser influenciada por diversos fatores, e merecem destaque aqueles que são relacionados ao produto e ao indivíduo. Em relação ao produto, podem-se citar espécie de origem, sequência primária de aminoácidos, estrutura da molécula, e processo de fabricação, incluindo a espécie da linhagem celular empregada e as operações de purificação (KESSLER; GOLDSMITH; SCHELLEKENS, 2006).

No caso de biofármacos produzidos por DNA recombinante, como o fator VIII recombinante (rFVIII), quanto maior sua homologia à molécula endógena, menor tende a ser o grau de imunogenicidade. Produtos de diferentes laboratórios podem apresentar diferenças na molécula e na formulação capazes de expor epítomos imunogênicos na sequência primária, assim favorecendo a indução de resposta imune. Quanto à estrutura da molécula, proteínas de alta massa molecular ou com alto potencial de agregação tendem a apresentar maior imunogenicidade, pois linfócitos B podem reconhecê-las como estruturas virais (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2014). Quanto ao processo de fabricação, a espécie da linhagem celular produtora

da proteína influencia no perfil das modificações pós-traducionais (PTM), como a glicosilação. O perfil e a composição dos açúcares indicam a origem da molécula e, em casos em que a linhagem celular não é de mamífero (como *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizadas na produção de biofármacos), o organismo pode reconhecer a molécula como patogênica e iniciar resposta imune. Além disso, se houver presença de moléculas provenientes da linhagem celular no produto, por erros de purificação, a resposta imune também é disparada. Vale lembrar que as operações de purificação são uma questão séria de segurança, considerando que moléculas fortemente patogênicas poderiam contaminar o produto terapêutico, como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) no caso de *E. coli* (KESSLER; GOLDSMITH; SCHELLEKENS, 2006).

Já no que se refere ao indivíduo, grande exposição ao produto por meio de alta dose ou alta frequência de administração favorece a ativação de resposta imune, como ocorre em casos graves de hemofilia. A via de administração também é um fator importante, sendo a via intravenosa a que menos favorece imunogenicidade. Além disso, alguns grupos de pacientes podem ser mais susceptíveis do que outros: (i) em indivíduos com haplótipos de HLA distintos, existe uma predisposição genética maior a desenvolver resposta imune contra o produto, como será explicado adiante; (ii) em pacientes com depleção do gene F8 que, portanto, não possuem o FVIII endógeno, o exógeno é reconhecido como estranho ao organismo; (iii) em pacientes com mutações na proteína, quanto maior a diferença entre seu FVIII endógeno e o exógeno, menor será a homologia e maior será a probabilidade de respostas imunogênicas. Ainda, condições concomitantes como doenças renais, hepáticas e autoimunes também podem ter impacto na probabilidade de o rFVIII provocar resposta imune (KESSLER; GOLDSMITH; SCHELLEKENS, 2006; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2014).

1.5 Hemofilia com inibidores

Um dos maiores desafios do tratamento de hemofilia é a imunogenicidade do medicamento, ou seja, o desenvolvimento de anticorpos que inativam o fator de

reposição, chamados inibidores. Os inibidores são anticorpos policlonais neutralizantes, ou seja, ligam-se a porções funcionais do FVIII, bloqueando sua atividade (HELDEN et al., 2008). Isso ocorre em 20 a 30% dos casos de hemofilia A (BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2015), e com maior frequência (MOISE et al., 2012) nos quadros graves, os quais realizam tratamento contínuo de reposição. Com a infusão constante de fator VIII exógeno, o sistema imune passa a produzir aloanticorpos policlonais IgG que o inativam.

A resposta imune contra o FVIII é T-dependente (REIPERT et al., 2001). Ao reconhecer este antígeno peptídico, células apresentadoras de antígeno (APCs) apresentam-no a linfócitos T CD4⁺, também conhecidos como linfócitos T auxiliares ou T_h, por meio da molécula de membrana MHC II. As moléculas de MHC têm afinidade específica pelo antígeno, pois seu gene codificador, especificamente os *loci* pertencentes ao sistema HLA, é uma das sequências genéticas com maior ocorrência de polimorfismos nos mamíferos, permitindo altíssima variabilidade e especificidade a diversos antígenos. A região do sistema HLA codifica seis porções distintas: no MHC I, estão presentes as porções HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto no MHC II estão HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Dessa forma, a afinidade do MHC por antígenos depende principalmente do sistema HLA com seus diferentes haplótipos (SHANKARKUMAR, 2004).

A apresentação de antígenos é uma etapa essencial da seleção tímica, processo de maturação de linfócitos T que resulta na formação de linfócitos T efetores contra antígenos externos e elimina linfócitos T reativos contra antígenos próprios, além de gerar linfócitos T regulatórios (T_{regs}), os quais evitam que ações do sistema imune prejudiquem o organismo ao promover ação anti-inflamatória. Durante o processo de seleção, células do timo apresentam antígenos próprios, por meio de MHC, aos precursores de linfócitos, e aqueles que tiverem afinidade por esses antígenos serão eliminados para que o organismo não tenha doenças autoimunes. Se determinadas moléculas de MHC não se ligam bem a certo antígeno próprio, em decorrência de mutações no sistema HLA, por exemplo, a apresentação desse antígeno no timo não será tão eficaz, e alguns linfócitos T reativos a ele podem passar pela seleção (ABBAS; LICHTMAN, 2005). No caso da

imunogenicidade do fator VIII, esse fenômeno caracteriza a predisposição genética maior a desenvolver imunidade contra o produto farmacêutico a ser repostado.

Na formação de resposta imune contra FVIII, linfócitos B interagem com epítopos do FVIII por meio do MHC II. Assim, efetuam seu papel de APCs ao interagir com linfócito T CD4⁺ pelo receptor de células T (TCR). Essa interação consiste em uma ativação bidirecional: o linfócito B modula a ativação do linfócito T contra o antígeno por meio da apresentação, e o linfócito T por sua vez é capaz de modular a ativação e diferenciação do linfócito B, que a partir disso passará a produzir anticorpos anti-FVIII (Figura 3). A partir da formação do complexo MHC-antígeno-TCR, co-estimulada pela interação entre B7 do linfócito B e CD28 do T, o linfócito T se torna ativo e passa a expressar CD40 ligante (CD40L) em sua membrana, o qual interage com CD40 do linfócito B. Com isso, o linfócito T libera citocinas que ativam o linfócito B, promovendo sua proliferação e diferenciação para síntese de anticorpos IgG anti-FVIII (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

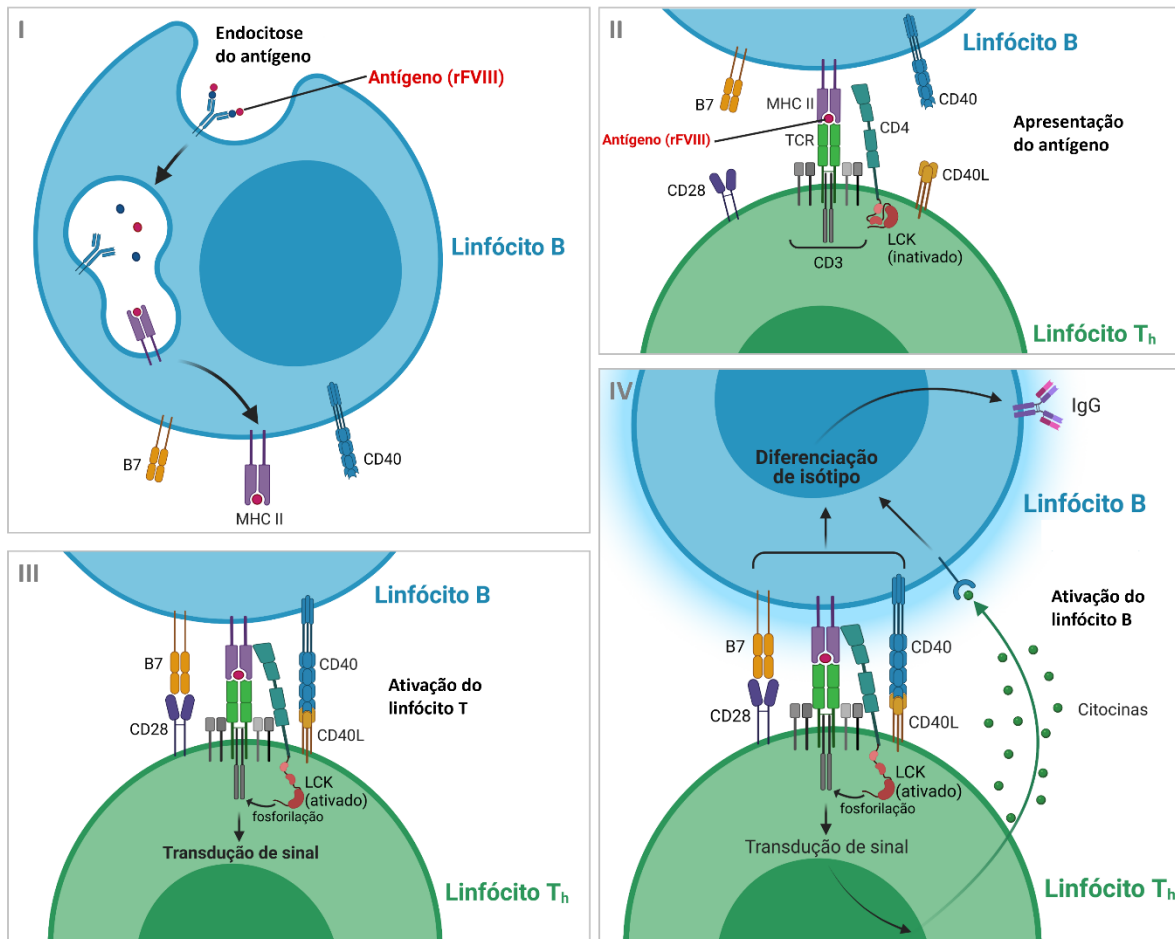


Figura 3: Ativação de linfócitos e liberação de anticorpos anti-FVIII. **I)** O antígeno FVIII é reconhecido pelo linfócito B, que realiza endocitose do peptídeo e passa a apresentá-lo em sua membrana em complexo com MHC-II. **II)** O linfócito B apresenta o antígeno ao linfócito T com a interação entre o MHC-II e o TCR. **III)** Com a interação das moléculas co-estimulatórias B7-CD28 e CD40-CD40L, o linfócito T se ativa e se iniciam as cascatas intracelulares de transdução de sinal. **IV)** A transdução de sinal em T resulta na formação de citocinas que são liberadas e recebidas pelo linfócito B, que assim se torna ativado e se diferencia para síntese e liberação de anticorpos IgG anti-FVIII. TCR: receptor de linfócitos T. Figura criada com biorender.com (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Como consequência, o paciente não responde ao tratamento habitual e pode sofrer aumento na frequência e/ou gravidade dos sangramentos. A conduta a ser tomada a partir disso depende da quantificação e qualificação dos inibidores presentes, cujos dados permitem identificar as melhores alternativas para controle do quadro.

Realiza-se a titulação dos inibidores, mensurados em unidades Bethesda (UB), que correspondem à quantidade de anticorpos circulantes capazes de inativar 50% do fator VIII presente em 1 mL de plasma. A partir disso, é necessário identificar

o nível de resposta antigênica inibitória desses anticorpos, determinando sua potência (BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2015).

Algumas formas de controle da hemofilia com inibidores incluem: (i) aumento da dose e/ou frequência de reposição do fator deficiente; (ii) erradicação dos inibidores por indução de imunotolerância (ITI), que consiste na administração de doses muito altas do fator por períodos prolongados para que o sistema imune do paciente passe a tolerar a molécula; e caso o paciente não responda à técnica de ITI, pode-se ainda realizar (iii) uso de agentes de *bypass*, que atingem a hemostase por vias alternativas independentes do fator deficiente. Entre eles, podem-se citar o *fator VIIa*, que, em conjunto com FT, ativa os fatores Xa e IXa; e o *concentrado de complexo de protrombina ativada (aPCC)*, que contém protrombina (FII), FIX, FX e FVIIa (SRIVASTAVA, 2020).

1.6 Fator VIII (FVIII) e Fator VIII recombinante (rFVIII)

O fator VIII é uma grande glicoproteína plasmática cuja sequência de aminoácidos pode ser organizada em seis domínios: A1-A2-B-A3-C1-C2. Sua estrutura é composta de duas cadeias que se mantêm unidas por uma ponte de cátions divalentes: a cadeia leve (LC) composta dos domínios A3-C1-C2 e com massa molecular de aproximadamente 80 kDa, sendo em C2 o principal sítio de ligação à membrana da plaqueta ativada; e a cadeia pesada (HC), de 90 a 210 kDa (BOEDEKER, 2001) e composta dos domínios A1-A2 e de uma porção de comprimento variável do domínio B. O domínio B é uma porção não essencial da molécula e sofre clivagens parciais por parte da trombina. A partir da iniciação da coagulação, a trombina o cliva completamente, além de clivar a ligação covalente entre A1 e A2. Assim, o FVIIIa é um trímero composto de A1, A2 e LC, com sítio ativo localizado em A2 (Figura 3) (STOILOVA-MCPHIE, 2013).

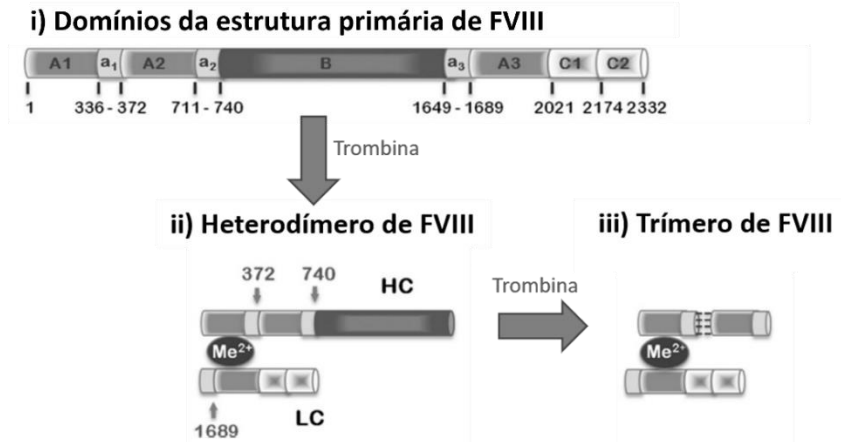


Figura 4: Organização dos domínios na estrutura primária do FVIII. **i)** Distribuição dos domínios na sequência de aminoácidos, 1 a 2332. **ii)** Pela ação da trombina em circunstâncias normais, o domínio B é clivado parcialmente, gerando o heterodímero FVIII, com as cadeias leve e pesada. **iii)** Com a iniciação da coagulação, a trombina cliva completamente o domínio B e a ligação entre os domínios A1 e A2, resultando no FVIIIa. Adaptado de Stoilova-McPhie et al. (2013).

A função do FVIIIa é interagir com FIXa formando o complexo tenase, o qual é responsável pela ativação do FXa. Isso depende de uma organização estrutural complexa com duas interfaces bem definidas: a ligação membrana-LC, e a ligação LC-HC. Além da relação estrutura-atividade da molécula, é importante considerar sua estabilidade, que se relaciona com seu perfil de glicosilação e sua afinidade pelo fator von Willebrand. A glicosilação, além de auxiliar o dobramento correto da proteína, reduz ações proteolíticas e o reconhecimento do sistema imune contra ela, prolongando sua meia-vida. A ligação ao FwV estabiliza o FVIII inativo e também reduz seu reconhecimento pelo sistema imune, por impedir que as células dendríticas façam endocitose do fator (LIEUW, 2017).

Com a clonagem do gene F8 em 1984, preparados de FVIII recombinante (rFVIII) começaram a surgir no mercado nos anos 1990. Os produtos de primeira geração traziam a sequência completa da proteína, contendo proteínas humanas e animais tais como a albumina como estabilizantes. Na segunda geração, foi identificado que deletar grande parte do domínio B da proteína, gerando-se compostos com domínio B deletado (do inglês *B-Domain Deleted*, ou BDD), era uma vantagem na produção e não afetava sua atividade. A terceira geração foi composta de produtos sem proteínas humanas ou animais na formulação, devido ao risco de contaminação por patógenos. Finalmente, o produto simoctocog alda (Nuwiq®) iniciou a quarta geração como rFVIII BDD produzido em células HEK, tendo assim

perfil de glicosilação humano e visando ter menor ocorrência de imunogenicidade (LIEUW, 2017; LISSITCHKOV et al., 2019).

A meia-vida dos produtos recombinantes varia entre 8 e 12 horas, podendo atingir 20 horas no caso dos produtos com meia-vida prolongada (EHL) (Tabela 1) (LISSITCHKOV et al., 2019).

Tabela 1

Produtos FVIII disponíveis no mercado

| Origem | Produto | Cadeia FVIII | Tecnologia | Meia-vida (horas) |
|------------------------------|---|-------------------------------------|--|-------------------|
| Derivado de plasma | Fator anti-hemofílico (Hemofil M®, Koate-DVI®, Monarc-M®, Monoclate-P®) | Cadeia completa | Plasma humano | 14,8 - 17,5 |
| Derivado de plasma | Complexo fator anti-hemofílico/FvW (Alphanate®, Humanate-P®, Wilate®) | Cadeia completa em complexo com FvW | Plasma humano | 12,2 - 17,9 |
| Recombinante, 1ª geração | Fator anti-hemofílico recombinante (Recombinate®) | Cadeia completa | BSA no meio de cultura, HSA como estabilizante na formulação | 14,6 ± 4,9 |
| Recombinante, 2ª geração | rFVIII-Fs (Helixate®, Kogenate®) | Cadeia completa | Solução de proteínas plasmáticas humanas no meio de cultura | 13,7 |
| Recombinante, 3ª geração | Fator anti-hemofílico recombinante (Advate®, Kovaltry®) | Cadeia completa | Sem adição de proteínas humanas ou animais à formulação | 12,0 - 14,2 |
| Recombinante, 2ª geração | Moroctocog alfa (ReFacto®) | BDD | Solução de proteínas plasmáticas humanas no meio de cultura | 14,5 ± 5,3 |
| Recombinante, 3ª geração | Moroctocog alfa (Xyntha®), Turoctocog alfa (NovoEight®) | BDD | Sem adição de proteínas humanas ou animais à formulação | 10,8 - 12,0 |
| Recombinante, 4ª geração | Simoctocog alfa (Nuwiq®) | BDD | Células HEK para perfil de glicosilação humano | 17,1 ± 11,2 |
| Recombinante, 3ª geração EHL | Octocog alfa pegol (Adynovate®) | BDD-PEGuilado | IFA de Advate® PEGuilado | 14,7 ± 3,8 |
| Recombinante, 4ª geração EHL | rFVIII-Fc (Eloctate®) | BDD-Fc | Células HEK para perfil de glicosilação humano, fusão a Fc-IgG | 19,7 ± 2,3 |
| Recombinante, 3ª geração EHL | rFVIII-SC (Afsyla®) | Cadeia única | Sem adição de proteínas humanas ou animais à formulação | 14,2 |

Tabela 1: Produtos de Fator VIII disponíveis no mercado para tratamento de hemofilia A. FVIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand; BSA: albumina de soro bovino; rFVIII: Fator VIII recombinante; FS:

Formulação com sacarose; BDD: Domínio B deletado; HEK: Células embrionárias de rim humano; EHL: Meia-vida prolongada; PED: Polietilenoglicol; IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo; Fc: fusão à fração constante de imunoglobulina; SC: Cadeia única. Adaptado de LIEUW (2017).

Devido ao tamanho do gene F8 e da glicoproteína FVIII, assim como seu alto grau de glicosilação, a produção do rFVIII deve ser realizada em linhagens celulares de mamíferos (BOEDEKER, 2001). Como descrito na Tabela 2, alguns exemplos empregados industrialmente são CHO, BHK e HEK (CANIS et al., 2018).

Tabela 2

Linhagens celulares empregadas

| Origem | Fonte celular | Proteína | Cadeia FVIII |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------|--|
| Derivado de plasma | Células de endotélio humano | Fator VIII humano | Cadeia completa FVIII |
| Recombinante, 3ª geração | BHK | Octocog alfa | Cadeia completa FVIII |
| Recombinante, 3ª geração | CHO | Octocog alfa | Cadeia completa FVIII |
| Recombinante, 3ª geração | CHO | Turoctocog alfa | Domínio B parcial |
| Recombinante, 3ª geração | CHO | Moroctocog alfa | Domínio B deletado |
| Recombinante, 4ª geração | HEK | Simoctocog alfa | Domínio B deletado |
| Recombinante, 4ª geração EHL | HEK | Efmoroctocog alfa | Domínio B deletado em fusão com Fc-IgG |

Tabela 2: Linhagens celulares empregadas na produção de alguns dos produtos rFVIII disponíveis no mercado. Adaptado de Canis et al. (2018).

O desenvolvimento do produto se inicia na clonagem do gene F8 e sua inserção na célula hospedeira. É feita então uma otimização do sistema de expressão para que se realize uma produção com estabilidade e alto rendimento. A linhagem resultante é chamada de banco mestre de células (MCB), que é preservado em nitrogênio líquido como cultura homogênea, a qual é minuciosamente caracterizada quanto ao seu perfil genético e ausência de contaminantes patogênicos. Dessa cultura é então retirado o banco de células de trabalho (WCB), que realizam os ciclos de produção (BOEDEKER, 2001).

É necessário preparar um meio de cultura que permita crescimento e produção celular e que mantenha a estabilidade do produto (BOEDEKER, 2001). A

seleção do sistema de reação deve ser adequada às características da cultura, que nesse caso envolvem células frágeis dada a ausência de parede celular. Assim, podem ser empregados fermentadores com cultura em suspensão. Após rendimento de produto, são realizadas as etapas de purificação, que em geral consistem em várias colunas de cromatografia para que se alcance um preparado de alta pureza, sem impurezas derivadas das células ou do processo, e de segurança, sem presença de vírus ativos ou outros patógenos (BOEDEKER, 2001). Por fim, é preparada a formulação final com a inclusão de adjuvantes como estabilizantes, por exemplo solução de sacarose (BOEDEKER, 2001).

Produtos de rFVIII são de alto custo, devido à elevada complexidade de preparação. Considerando a alta ocorrência de hemofilia A com inibidores, os custos envolvidos no controle da doença e a má qualidade de vida dos pacientes com essa condição, além do risco de complicações graves e morte, é imprescindível que mais estudos sejam realizados neste tema.

2. OBJETIVO(S)

Este trabalho visa estudar a estrutura molecular do rFVIII e compreender seus mecanismos de imunogenicidade durante o tratamento de reposição da hemofilia A. A finalidade é que se proponha estratégias para produção de um biofármaco que minimizem esse efeito adverso. Além da análise da estrutura e funcionalidade da proteína, também serão analisadas suas modificações pós-traducionais e avaliados seus parâmetros de produção, mediante a literatura e as informações patentárias disponíveis.

Ao final, o objetivo é ter dados para propor modificações no perfil molecular da proteína a fim de melhorar sua eficácia e segurança, resultando em uma nova molécula com o potencial de aprimorar o tratamento vigente e aumentar a qualidade de vida dos pacientes que vivem com hemofilia A.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Revisão bibliográfica*

Foi realizada revisão sistemática da literatura dos últimos 20 anos em bibliotecas como Elsevier, PubMed e repositórios de universidades como Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Universidade de Tecnologia de Viena (TU Wien). Os estudos foram auxiliados pelas ferramentas Google Acadêmico, Sci-Hub e LibGen para acesso a determinadas bibliografias, além de livros didáticos e bases de dados públicas como UniProt e *Protein Database* (PDB). Palavras-chave como “hemofilia”, “hemofilia com inibidores”, “coagulação”, “fator VIII”, “fator VIII recombinante”, “imunogenicidade”, “resposta T-dependente” e “sistema HLA” foram empregadas na busca.

A formatação do trabalho conforme as normas ABNT foi auxiliada pelas ferramentas Mendeley e FastFormat.

3.1.1 *Crítérios de inclusão*

Foram incluídas publicações de veículos reconhecidos pela comunidade científica, em língua portuguesa ou inglesa, que abordam temas relacionados a Hematologia e coagulação, Imunologia e imunogenicidade, Biotecnologia e produção de biofármacos, e subtemas correspondentes. Informações de bula, normas técnicas e informativos retirados da biblioteca de agências regulatórias como ANVISA, FDA e EMA também foram considerados.

3.1.2 *Crítérios de Exclusão*

Não foi considerado conteúdo em outras línguas, de período anterior ao ano 1994 ou de origem duvidosa.

3.2 *Estratégias para redução da imunogenicidade do rFVIIIa*

A base de dados PDB e o programa PyMol foram empregados para análise estrutural do modelo cristalográfico (PDB ID: 3CDZ). Após identificação de epítomos imunogênicos reportados na literatura, o *software* SNAP2 *Predicting functional effects of sequence variants* (RostLab, TUM) foi utilizado a fim de se testar o impacto de mutações a esses sítios. Para uma análise mais abrangente de potenciais epítomos e sua afinidade ao MHC-II, foram empregados os *softwares* públicos

NetMHCII (DTU Health Tech) e *MHC-II Binding Predictions* (IEDB Resource). Quanto aos alelos específicos de HLA no MHC-II, seria impossível listar todos devido à enorme variabilidade do sistema na população. Portanto, foram considerados apenas alelos que foram mencionados em múltiplos estudos sobre a imunogenicidade do rFVIII e que estão presentes em parcela significativa da população global: HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*11:01 e HLA-DRB1*15:01 (JAMES et al., 2011; KESSEL et al., 2008).

4. RESULTADOS

4.1 Estrutura molecular do FVIII

4.1.1 Estrutura peptídica: cadeias e domínios

O fator VIII é uma glicoproteína plasmática cuja estrutura se organiza em seis domínios: A1, A2, A3, B, C1 e C2, sendo aqueles identificados pela mesma letra homólogos entre si. O domínio B é clivado pela ação da trombina durante a ativação do fator, portanto a molécula ativa se estrutura em duas cadeias distintas, que se mantêm estáveis pela presença dos cátions Cu^{2+} e Ca^{2+} . Ao final da ativação do fator, a cadeia chamada pesada (HC) é composta de A1 e A2, e a cadeia leve (LC) de A3, C1 e C2 (Figura 5) (STOILOVA-MCPHIE et al., 2013).

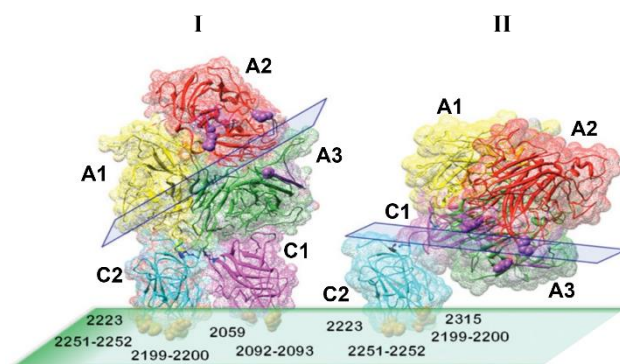


Figura 5: Estrutura do FVIIIa sobre a membrana de plaqueta ativada. O plano verde, na parte inferior da imagem, ilustra a interface do fator com a membrana, sendo salientados os resíduos da proteína que entram em contato com a estrutura. Os dois planos azuis indicam a interface entre as cadeias HC e LC. (I) Modelo 3D do FVIIIa (PDB ID: 3CDZ) calculado em difração de raio X. (II) Modelo 2D do FVIIIa calculado por microscopia crio-eletrônica. Adaptado de Stoilova-McPhie et al. (2013).

Em termos de atividade, os domínios A2 e A3 contêm os principais pontos de interação com o Fator IX ativado (FIXa) no complexo tenase. Os resíduos 1811-1818 de A3 compõem um sítio de ligação de alta afinidade com o fator IXa ($K_d \sim 2,5$

nM) (BAJAJ et al., 2001), e os sítios 558-565 e 707-712 de A2 também fazem parte da interação (FAY et al., 1994; LENTING et al., 1996; JENKINS et al., 2004).

Já os domínios C1 e C2 são responsáveis pela interação do complexo com a membrana da plaqueta ativada. A cadeia pesada auxilia na conformação estrutural do FVIIIa, garantindo o posicionamento adequado de C2 sobre a membrana. Os resíduos Arg2215 e Lys2249, de C2, são pontos essenciais de ancoragem do FVIIIa à membrana, e os *loops* de C1 que abrangem Arg2090, Lys2092 e Arg2159 também têm sua importância. Ainda, A3 contém um *loop*, 1899-1903, que se projeta em direção à membrana promovendo uma interação eletrostática entre Arg1900 e as cabeças ácidas dos fosfolipídios, estabelecendo mais um ponto de conexão (Figura 6) (NGO et al., 2008).

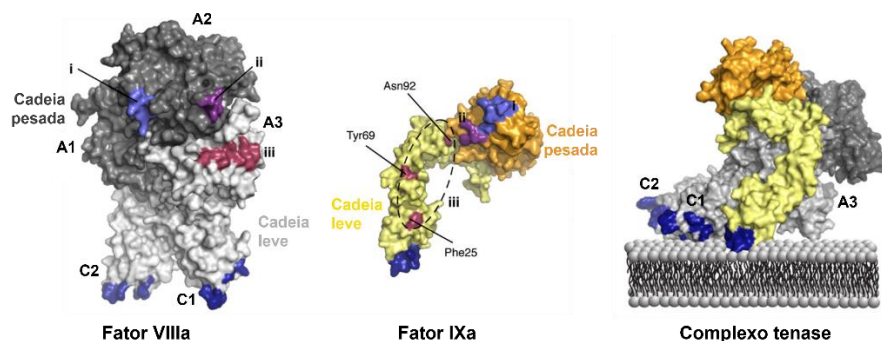


Figura 6: Estrutura do complexo tenase e sua conformação sobre a membrana de uma plaqueta ativada. As regiões i (558-565 no FVIIIa; 330-339 no FIXa), ii (707-712 no FVIIIa; 301-303 no FIXa) e iii (1811-1818 no FVIIIa; Phe25, Tyr69 e Asn92 no FIXa) são os sítios de interação entre os fatores, e as regiões em azul escuro na parte inferior da imagem representam os pontos de ancoragem sobre a membrana em C1 e C2 no FVIIIa, e no FIXa. É possível observar o *loop* de A3 (1899-1903) que se projeta para a membrana. Adaptado de Ngo et al. (2008).

Além das interações essenciais para atividade, a interação com FvW é de grande relevância. Como já citado, o complexo FVIII-FvW proporciona estabilidade ao FVIII por reduzir o acesso de proteases e componentes do sistema imune, como APCs, ao fator (DELIGNAT et al., 2007). Por isso, é preciso destacar o resíduo Pro1809, que confere afinidade do FVIII pelo FvW (YADA, 2015).

4.1.2 Modificações pós-traducionais (PTM)

Muitas proteínas, durante sua tradução, passam por etapas de processamento que as conferem características como enovelamento,

endereçamento e funcionalidade. Em diferentes compartimentos da célula, a sequência peptídica pode receber grupos químicos em reações como acetilação, fosforilação e glicosilação. Como glicoproteína, o fator VIII passa por glicosilação, além de sulfatação de tirosinas (UniProt ID: P00451; KANNICHT et al., 2013).

4.1.2.1 Glicosilação

O processo de glicosilação tem início no retículo endoplasmático (EFFER et al., 2020). Oligossacarídeos precursores se ligam a resíduos de Asn pelo grupo funcional amina, no caso de *N*-glicosilação, ou a resíduos de Ser ou Thr pelo grupo hidroxila, no caso de *O*-glicosilação (REILY et al., 2019). Cada precursor então passa por maturação, isto é, é clivado por glicosidases e/ou modificado por glicosil-transferases durante a via secretora pelo complexo de Golgi (CANIS et al., 2018).

O perfil de glicosilação de proteínas é único conforme a espécie, linhagem celular e tecido ou tipo celular, devido à disponibilidade de oligossacarídeos precursores e enzimas, não só no organismo como também no meio de cultura, se for o caso. Dessa forma, é um tópico de grande importância a se considerar no desenvolvimento de biofármacos, pois a estrutura da molécula pode variar em decorrência do glicoma observado, podendo comprometer a eficácia do produto, tanto em termos farmacodinâmicos como farmacocinéticos, e ainda sua segurança (CANIS et al., 2018). Além disso, a glicosilação exerce funções cruciais como sinalização da proteína para secreção e endereçamento celular, proteção contra proteólise e reconhecimento imune, e garantia de enovelamento adequado da sequência peptídica, promovendo uma molécula funcional e estável (KANNICHT et al., 2013). No caso do FVIII, foi observado que a glicosilação também exerce papel significativo na afinidade ao FvW (DELIGNAT et al., 2007).

Sabe-se que o FVIII humano sofre *N*- e *O*-glicosilações complexas, isto é, os glicanos passam por múltiplas etapas de processamento. Foram reportados quatro principais sítios de *N*-glicosilação no pdFVIII, nos domínios A1 (Asn41 e Asn239), A3 (Asn1810) e C1 (Asn2118) (Figura 7) (KANNICHT et al., 2013; CANIS et al., 2018). As características dos glicanos podem ser observadas na Tabela 3. Os *O*-glicanos, assim como outros *N*-glicanos, estão contidos em B, no entanto este domínio não será analisado no presente trabalho.

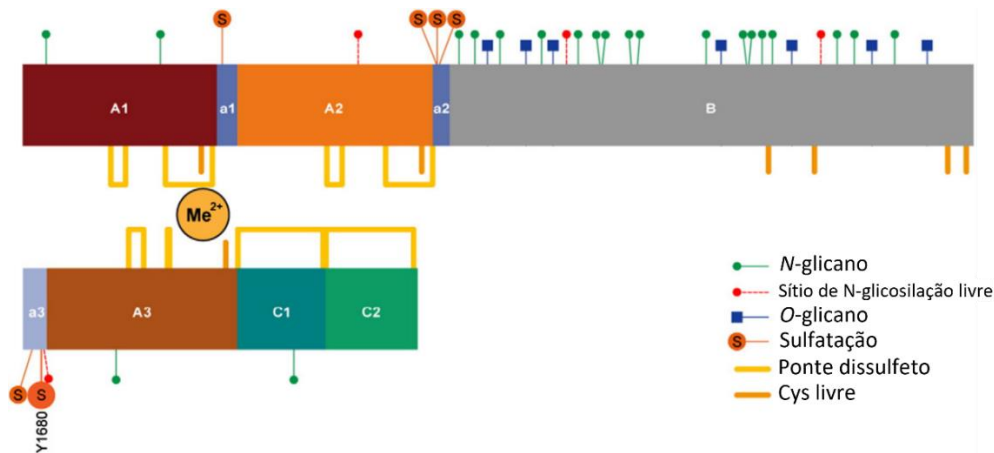


Figura 7: Sequência peptídica de FVIII com as PTM identificadas. Os marcadores redondos verdes indicam os resíduos de Asn *N*-glicosilados, e os vermelhos indicam resíduos de Asn que poderiam ser *N*-glicosilados, mas não apresentam tal substituição; os quadrados azuis indicam resíduos *O*-glicosilados; os redondos laranjas marcados com S, os resíduos sulfatados (destacando-se o resíduo Tyr1680, importante para a afinidade entre FVIII e FvW); as pontes amarelas representam as pontes dissulfeto dentro da sequência, e os traços laranjas indicam os resíduos livres de Cys. Também estão representados os cátions metálicos (Me^{2+}) que mantêm a estabilidade das cadeias. Adaptado de Kannicht et al. (2013).

Tabela 3

N-glicosilação em FVIII

| aa | Domínio | Estrutura | Exemplo de glicano |
|---------|---------|--|---|
| Asn41 | A1 | Estruturas complexas de duas antenas com <i>core</i> fucosilado, sialiladas | Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc ₃ |
| Asn239 | A1 | Estruturas complexas, híbridas e ricas em manose, sem <i>core</i> fucosilado | Hex ₅ HexNAc ₂ |
| Asn1810 | A3 | Estruturas complexas de duas antenas com <i>core</i> fucosilado, sialiladas. Alto número de epítopos ABO | Hex ₄ HexNAc ₅ Fuc ₂ NeuAc |
| Asn2118 | C1 | Estruturas ricas em manose, sem <i>core</i> fucosilado | Hex ₈ HexNAc ₂ |

Legenda dos glicanos:

- Manose
- N-acetilglucosamina
- Ácido siálico
- Galactose
- N-acetilgalactosamina
- Fucose

Tabela 3: Sítios de *N*-glicosilação no FVIII e detalhes sobre a estrutura dos glicanos (KANNICHT et al, 2013; CANIS et al, 2018; GlyGen ID: P00451).

Em geral, o FVIII humano apresenta um predomínio de oligossacarídeos complexos de *core* fucosilado e sialilados, ou seja, com ácido siálico

(majoritariamente Neu₅AcGal) em sua região terminal. Destes, cerca de 1/3 apresenta o padrão de ligação α 2,3 (Neu₅Ac α 2,3Gal), enquanto os 2/3 restantes apresentam o padrão α 2,6 (Neu₅Ac α 2,6Gal) (Figura 8) (CANIS et al., 2018). Foram identificados também glicanos complexos de *core* fucosilado com epítomos ABO sanguíneos em seus terminais; glicanos ricos em manose; e pouca ocorrência de glicanos híbridos, isto é, pouco processados. Entende-se que os substituintes de Asn239 e Asn2118 são pouco processados por se localizarem em bolsões no interior da molécula, sem que enzimas possam acessar, em contraste com Asn41 e Asn1810 que provavelmente se encontram na superfície e, conseqüentemente, sofrem várias reações de processamento (UniProt ID: P00451).

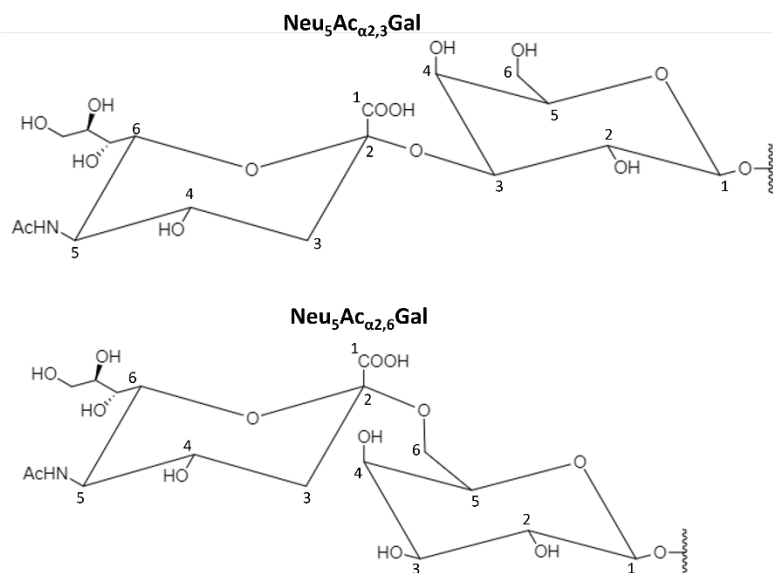


Figura 8: Porção terminal de dois tipos de estrutura de ácido siálico, presentes nos glicanos complexos. Estão representados o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu₅Ac) em ligação com o monossacarídeo de galactose (Gal). Acima, é possível observar o padrão de ligação α 2,3; abaixo, o padrão α 2,6. Figura criada com ChemDraw v19.0.0 (2019).

CANIS et al. (2018) realizaram uma comparação entre os perfis de *N*-glicosilação de pdFVIII e de diferentes formulações de rFVIII, a fim de analisar o impacto do tamanho do peptídeo (com ou sem o domínio B) e da linhagem celular empregada sobre esse processo. A Tabela 4 descreve os resultados.

Tabela 4Comparação entre pdFVIII e cinco rFVIII quanto ao perfil de *N*-glicosilação

| Tipo de FVIII | pdFVIII | rFVIII | | | | |
|--|--|--|---|-----------|--|-----|
| Linhagem empregada | n.a. | BHK | CHO | CHO | CHO | HEK |
| Sequência peptídica FVIII | Completa | Completa | Completa | B parcial | BDD | BDD |
| Características gerais dos glicanos | Estruturas grandes | Estruturas menores | | | | |
| <i>N</i> -glicanos predominantes | Complexos de <i>core</i> fucosilado e com duas antenas; Ricos em manose | | | | | |
| Antenas | LacNAc | Estruturas menores | Tipo 2 LacNAc, em número próximo ao perfil humano | | LacNAc, com 5-10% de LacdiNAc fucosilado; em número menor do que pdFVIII | |
| Grupos terminais | Sialilação Neu ₅ Ac com padrão de ligação α2,6 e α2,3; 1,3% Neu ₅ Gc; Epítomos ABO | Sialilação Neu ₅ Ac com padrão de ligação majoritariamente α2,3; 1,6-4,8% proporção Neu ₅ Gc | | | Nível menor de sialilação do que pdFVIII; Neu ₅ Ac com padrão de ligação α2,6 e α2,3; não foi detectado Neu ₅ Gc | |
| Epítomos Lewis ^X e Lewis ^Y | Geralmente ausentes em glicoproteínas plasmáticas | Níveis baixos de Lewis ^X , sem detecção de Lewis ^Y | | | Lewis ^X em abundância e níveis detectáveis de Lewis ^Y | |
| epítomos ABH | Sim | Não | | | | |

Tabela 4: Características dos *N*-glicanos observados em pdFVIII e em diferentes produtos de rFVIII. n.a.: não aplicável; BHK: células de rim de hamster bebê; CHO: células de ovário de hamster chinês; HEK: células embrionárias de rim humano; BDD: B-domain-deleted; LacNAc: *N*-acetil-lactosamina; LacdiNAc: *N*-acetil-dilactosamina; Neu₅Ac: ácido *N*-acetilneuramínico; Neu₅Gc: ácido *N*-glicolilneuramínico (CANIS et al., 2018; UniProt ID: P00451).

Como esperado, o perfil de glicosilação dos rFVIII varia em relação ao do pdFVIII. Com a variação na atividade de transferases, as estruturas de oligossacarídeos formadas nos fatores recombinantes são menores do que no organismo humano. As antenas, cadeias laterais dos glicanos, são semelhantes entre todos os produtos. Quanto aos grupos terminais, houve certa variação em relação ao ácido siálico, sendo válido ressaltar que Neu₅Gc, presente no pdFVIII, é antigênico: apenas o HEK-rFVIII não apresentou esse epítopo (KANNICHT et al., 2013; CANIS et al., 2018). Epítomos de Lewis (Lewis^X e Lewis^Y) são estruturas encontradas em mamíferos, inclusive humanos, porém não em glicoproteínas

plasmáticas, e foram detectados (em quantidades diferentes) em todos os produtos rFVIII. Em contrapartida, epítomos ABO exclusivos do tecido sanguíneo e presentes em pdFVIII não fazem parte do rFVIII (CANIS et al., 2018).

4.1.2.2 Sulfatação de tirosinas

De forma semelhante à *N*-glicosilação, a sulfatação de tirosinas do FVIII se mostrou crucial na afinidade ao FvW e, logo, na estabilidade do FVIII. A proteína humana nativa apresenta seis resíduos de tirosina sulfatados, todos nas regiões de interface entre domínios (Tyr346 em a1; Tyr718, 719 e 720 em a2; Tyr1664 e 1680 em a3)* (Figura 7), porém apenas Tyr1680 participa da afinidade ao FvW (KANNICHT et al., 2013).

*Os domínios são denominados pelas letras maiúsculas “A”, “B” e “C”, enquanto as regiões entre domínios são denominadas pela letra “a” minúscula

4.2 Epítomos imunogênicos e componentes do sistema imune

A resposta imune anti-FVIII é dependente de linfócitos T CD4⁺ e de co-estimulação B7-CD28 e CD40-CD40L (Figura 3) (WATERS et al., 2009; SASGARY, 2003). O perfil de citocinas resultante abrange tanto T_h1, com liberação de TNF- α e IFN- γ ; como T_h2, com liberação de IL-4. No entanto, a resposta é polarizada para T_h2 quando o título de inibidores é alto. Em situações de tolerância, por outro lado, existe clara polarização para T_h1. De maneira paralela, em quadros de títulos altos de inibidores existe uma diferenciação maior de isótipos IgG₄, enquanto quadros de tolerância ou de títulos baixos se caracterizam por inibidores majoritariamente IgG₁ (Figura 9) (WATERS et al., 2009).

IL-4 inibe a *upregulation* FoxP3, o qual é responsável por induzir a expressão de CD25⁺ durante a ativação de linfócitos T_{reg}. Em presença de IL-4 na resposta T_h2, essa ativação fica suprimida e a resposta T CD4⁺ para síntese de anticorpos se estabelece (Figura 9). Assim, os títulos de inibidores são mais altos e são maiores os níveis de IgG₄ do que de IgG₁. Essa relação foi constatada como estatisticamente significativa por Helden et al. (2008): o coeficiente de correlação entre o título de inibidores e o nível de IgG₁ foi $r=0,89$ ($p<0,05$), e $r=0,93$ ($p<0,05$) para IgG₄. A diferenciação de isótipos também envolve outros fatores, porém não são bem elucidados.

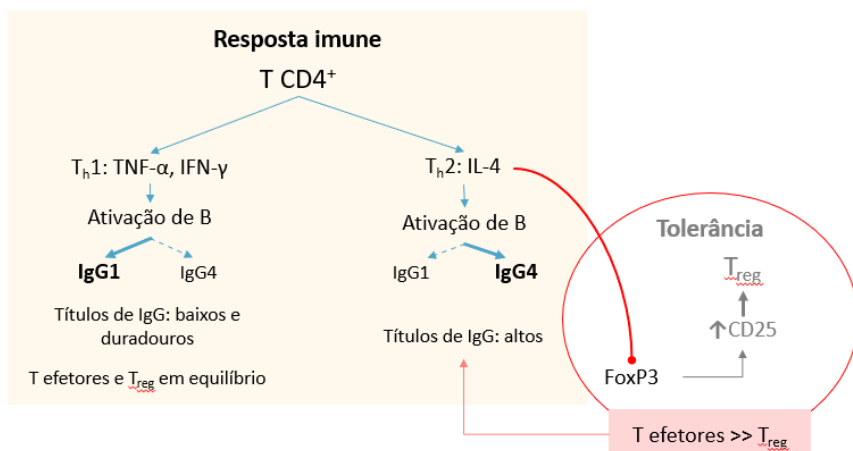


Figura 9: Visão geral da resposta imune anti-FVIII conforme o perfil de citocinas liberadas, e sua relação com o mecanismo de tolerância. T: linfócito T; B: linfócito B; T_{reg}: linfócito T regulatório (WATERS et al., 2009; HELDEN et al., 2008).

Reporta-se que as regiões da molécula bloqueadas pelos inibidores estão contidas principalmente nos domínios A2 e C2, havendo também um sítio menos frequente em A3 (SCANDELLA, 2002; SASGARY, 2003; KESSEL et al., 2008; JAMES et al., 2011).

Com a ligação de inibidores aos sítios de A2 e A3, a interação do FVIIIa com FIXa é bloqueada e a formação do complexo tenase não ocorre. Especificamente no sítio 587-608, o resíduo Arg593 é essencial para o reconhecimento de células imunes (JAMES et al., 2011). No caso da ligação de inibidores a qualquer sítio de C2, o impacto é sobre a interação com a membrana da plaqueta ativada e sobre a afinidade ao FvW. Especificamente na região 2253-2270 de C2, bloqueia-se a interação com o FXa, alvo da atividade do complexo tenase (SCANDELLA, 2002). Mais detalhes podem ser consultados na Tabela 5.

Tabela 5

Análise dos epítomos imunogênicos de FVIIIa e seu impacto na atividade

| Peptídeo | Domínio | Função bloqueada | Detalhes |
|-----------|---------|---|--|
| 482-508 | A2 | Interação com FIXa | Substituir Arg484, Tyr487, Arg489 ou Pro492 por Ala reduz a afinidade pelo inibidor |
| 587-608 | A2 | Interação com FIXa | Arg593 é essencial para o reconhecimento por APCs. Bloqueado por IgG4. |
| 1811-1818 | A3 | Interação com FIXa | |
| 2173-2327 | C2 | Ancoragem na membrana e afinidade a FvW | His2315 e Glu2327 são essenciais para reconhecimento, e substituí-los por Cys impede o reconhecimento por APCs |

Tabela 5: Epítomos imunogênicos de FVIII de acordo com a literatura (LUBIN et al., 1997; SCANDELLA, 2002; SASGARY, 2003; KESSEL et al., 2008; JAMES et al., 2011).

Quanto à afinidade dos epítomos ao MHC-II para formação dos inibidores, a Tabela 6 lista os peptídeos que se ligam fortemente aos alelos considerados, de acordo com análise *in silico* baseada no parâmetro IC₅₀, sendo valores inferiores a 50 nM considerados ligações fortes. Estes valores foram então transformados em score de afinidade para que as ligações mais fortes sejam expressas pelos maiores valores (JENSEN et al., 2018).

Tabela 6

Epítomos de FVIIIa que se ligam fortemente aos alelos HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*1101 e HLA-DRB1*1501 no MHC-II

| Alelo | Posição | Domínio | Peptídeo | Peptídeo core | Score | Afinid |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|--------|--------|
| DRB1*0101 | 64 | A1 | PRPPWMGLLGPTIQA | WMGLLGPTI | 0.8053 | 1.80 |
| | 65 | | RPPWMGLLGPTIQAE | WMGLLGPTI | 0.8108 | 1.70 |
| | 84 | | VVITLKNMASHPVSL | LKNMASHPV | 0.8326 | 1.00 |
| | 85 | | VITLKNMASHPVSLH | LKNMASHPV | 0.8434 | 0.80 |
| | 86 | | ITLKNMASHPVSLHA | LKNMASHPV | 0.8348 | 1.00 |
| | 87 | | TLKNMASHPVSLHAV | LKNMASHPV | 0.8110 | 1.60 |
| | 287 | | EISPITFLTAQTLLM | ITFLTAQTL | 0.8481 | 0.70 |
| | 288 | | ISPITFLTAQTLLMD | FLTAQTLLM | 0.8663 | 0.40 |
| | 289 | | SPITFLTAQTLLMDL | FLTAQTLLM | 0.8740 | 0.30 |
| | 290 | | PITFLTAQTLLMDLG | FLTAQTLLM | 0.8675 | 0.40 |
| | 291 | ITFLTAQTLLMDLGQ | FLTAQTLLM | 0.8425 | 0.80 | |
| | 633 | A2 | EVAYWYILSIGAQTD | YILSIGAQT | 0.8197 | 1.40 |
| | 634 | | VAYWYILSIGAQTDF | YILSIGAQT | 0.8384 | 0.90 |
| | 635 | | AYWYILSIGAQTDFL | YILSIGAQT | 0.8493 | 0.60 |
| | 636 | | YWYILSIGAQTDFLS | YILSIGAQT | 0.8366 | 0.90 |
| | 674 | | SGETVFMSMENPGLW | FMSMENPGL | 0.8100 | 1.70 |
| | 675 | | GETVFMSMENPGLWI | FMSMENPGL | 0.8475 | 0.70 |
| | 676 | | ETVFMSMENPGLWIL | FMSMENPGL | 0.8691 | 0.40 |
| | 677 | | TVFMSMENPGLWILG | FMSMENPGL | 0.8667 | 0.40 |
| | 678 | | VFMSMENPGLWILGC | FMSMENPGL | 0.8438 | 0.80 |
| 726 | ISAYLLSKNNAIEPR | | YLLSKNNAI | 0.8040 | 1.90 | |
| 2097 | C1 | YISQFIIMYSLDGKK | FIIMYSLDG | 0.8192 | 1.40 | |
| 2098 | | ISQFIIMYSLDGKKW | FIIMYSLDG | 0.8330 | 1.00 | |
| 2099 | | SQFIIMYSLDGKKWQ | FIIMYSLDG | 0.8338 | 1.00 | |
| 2100 | | QFIIMYSLDGKKWQT | FIIMYSLDG | 0.8128 | 1.60 | |
| DRB1*0401 | 287 | A1 | EISPITFLTAQTLLM | FLTAQTLLM | 0.6857 | 1.00 |
| | 288 | | ISPITFLTAQTLLMD | FLTAQTLLM | 0.7312 | 0.40 |
| | 289 | | SPITFLTAQTLLMDL | FLTAQTLLM | 0.7468 | 0.30 |
| | 290 | | PITFLTAQTLLMDLG | FLTAQTLLM | 0.7464 | 0.30 |

| | | | | | |
|------|----|-----------------|------------|--------|------|
| 291 | | ITFLTAQTLLMDLGQ | FLTAQTLLM | 0.7330 | 0.40 |
| 292 | | TFLTAQTLLMDLGQF | FLTAQTLLM | 0.7040 | 0.70 |
| 425 | | KVRFMAYTDETFKTR | FMAYTDETF | 0.6666 | 1.40 |
| 426 | | VRFMAYTDETFKTR | FMAYTDETF | 0.6509 | 1.80 |
| 458 | | GDTLLIIFKNQASRP | LIIFKNQAS | 0.6622 | 1.50 |
| 459 | | DTLLIIFKNQASRPY | LIIFKNQAS | 0.6960 | 0.80 |
| 460 | | TLLIIFKNQASRPYN | LIIFKNQAS | 0.7036 | 0.70 |
| 461 | | LLIIFKNQASRPYNI | FKNQASRPY | 0.6809 | 1.10 |
| 528 | | CLTRYSSFVNMERD | YYSSFVNME | 0.6502 | 1.80 |
| 529 | | LTRYSSFVNMERDL | YYSSFVNME | 0.6614 | 1.50 |
| 530 | | TRYSSFVNMERDLA | YYSSFVNME | 0.6776 | 1.20 |
| 531 | | RYYSSFVNMERDLAS | YYSSFVNME | 0.6667 | 1.40 |
| 672 | | PFSGETVFMENPG | FSGETVFMS | 0.6723 | 1.30 |
| 673 | A2 | FSGETVFMENPGL | FMSMENPGL | 0.8114 | 0.04 |
| 674 | | SGETVFMENPGLW | FMSMENPGL | 0.8441 | 0.01 |
| 675 | | GETVFMENPGLWI | FMSMENPGL | 0.8596 | 0.01 |
| 676 | | ETVFMENPGLWIL | FMSMENPGL | 0.8604 | 0.01 |
| 677 | | TVFMENPGLWILG | FMSMENPGL | 0.8539 | 0.01 |
| 678 | | VFMENPGLWILGC | FMSMENPGL | 0.8120 | 0.04 |
| 723 | | YEDISAYLLSKNNAI | YLLSKNNAI | 0.7360 | 0.40 |
| 724 | | EDISAYLLSKNNAIE | YLLSKNNAI | 0.7736 | 0.12 |
| 725 | | DISAYLLSKNNAIEP | YLLSKNNAI | 0.7851 | 0.08 |
| 726 | | ISAYLLSKNNAIEPR | YLLSKNNAI | 0.7990 | 0.06 |
| 727 | | SAYLLSKNNAIEPRS | YLLSKNNAI | 0.7886 | 0.07 |
| 728 | | AYLLSKNNAIEPRSF | YLLSKNNAI | 0.7488 | 0.25 |
| 1780 | | SRPYSFYSSLISYEE | YSFYSSLIS | 0.6858 | 1.00 |
| 1781 | | RPYSFYSSLISYEED | YSSLISYEE | 0.6963 | 0.80 |
| 1782 | A3 | PYSFYSSLISYEEDQ | YSSLISYEE | 0.6941 | 0.80 |
| 1783 | | YSFYSSLISYEEDQR | YSSLISYEE | 0.6778 | 1.20 |
| 1976 | | IRWYLLSMGNSNIH | LLSMGNSNEN | 0.6577 | 1.60 |
| 1977 | | RWYLLSMGNSNIHS | LLSMGNSNEN | 0.6641 | 1.50 |
| 2050 | | LARLHYSGSINAWST | YSGSINAWS | 0.6588 | 1.60 |
| 2051 | C1 | ARLHYSGSINAWSTK | YSGSINAWS | 0.6866 | 1.00 |
| 2052 | | RLHYSGSINAWSTKE | YSGSINAWS | 0.6865 | 1.00 |
| 2053 | | LHYSGSINAWSTKEP | YSGSINAWS | 0.6535 | 1.70 |
| 2214 | | GRSNAWRPQVNNPKE | WRPQVNNPK | 0.6514 | 1.80 |
| 2215 | C2 | RSNAWRPQVNNPKEW | WRPQVNNPK | 0.6755 | 1.20 |
| 2216 | | SNAWRPQVNNPKEWL | WRPQVNNPK | 0.6758 | 1.20 |
| 2217 | | NAWRPQVNNPKEWLQ | WRPQVNNPK | 0.6539 | 1.70 |
| 270 | | FLEHTFLVRNHRQA | HTFLVRNHR | 0.7366 | 1.70 |
| 271 | | LEGHTFLVRNHRQAS | FLVRNHRQA | 0.7796 | 0.90 |
| 272 | A1 | EGHTFLVRNHRQASL | FLVRNHRQA | 0.7914 | 0.70 |
| 273 | | GHTFLVRNHRQASLE | FLVRNHRQA | 0.7892 | 0.80 |
| 274 | | HTFLVRNHRQASLEI | FLVRNHRQA | 0.7390 | 1.70 |
| 366 | | PSFIQIRSVAKKHPK | IRSVAKKHP | 0.7616 | 1.20 |
| 367 | a2 | SFIQIRSVAKKHPKT | IRSVAKKHP | 0.7761 | 0.90 |
| 368 | | FIQIRSVAKKHPKTW | IRSVAKKHP | 0.7820 | 0.90 |
| 369 | | IQIRSVAKKHPKTWV | IRSVAKKHP | 0.7707 | 1.00 |
| 83 | A1 | TVVITLKNMASHPV | VITLKNMAS | 0.7069 | 1.90 |
| 287 | | EISPITFLTAQTLLM | ITFLTAQTL | 0.7113 | 1.80 |
| 456 | A2 | EVGDTLLIIFKNQAS | LIIFKNQAS | 0.7306 | 1.40 |

| | | | | | |
|------|----|------------------|-----------|--------|------|
| 457 | | VGDTLLIIFKNQASR | LIIFKNQAS | 0.8181 | 0.25 |
| 458 | | GDTLLIIFKNQASRP | LIIFKNQAS | 0.8307 | 0.17 |
| 459 | | DTLLIIFKNQASRPY | LIIFKNQAS | 0.8461 | 0.12 |
| 460 | | TLIIFKNQASRPYN | LIIFKNQAS | 0.8433 | 0.12 |
| 461 | | LLIIFKNQASRPYNI | LIIFKNQAS | 0.8062 | 0.40 |
| 524 | | SDPRCLTRYSSSFVN | LTRYSSSFV | 0.7620 | 0.80 |
| 525 | | DPRCLTRYSSSFVNM | TRYSSSFVN | 0.7980 | 0.40 |
| 526 | | PRCLTRYSSSFVNME | TRYSSSFVN | 0.8048 | 0.40 |
| 527 | | RCLTRYSSSFVNMER | TRYSSSFVN | 0.8182 | 0.25 |
| 528 | | CLTRYSSSFVNMERD | TRYSSSFVN | 0.7951 | 0.50 |
| 529 | | LTRYSSSFVNMERDL | TRYSSSFVN | 0.7394 | 1.20 |
| 611 | | SNIMHSINGYVFDSL | IMHSINGYV | 0.7068 | 1.90 |
| 1753 | | NEHLGLLGPYIRAEV | HLGLLGPYI | 0.7141 | 1.80 |
| 1769 | A3 | DNIMVTFRNQASRPY | MVTFRNQAS | 0.7251 | 1.50 |
| 1770 | | NIMVTFRNQASRPYS | MVTFRNQAS | 0.7321 | 1.30 |
| 2139 | | IFNPPIIARYIRLHP | IARYIRLHP | 0.7150 | 1.70 |
| 2140 | | FNPPPIIARYIRLHPT | IARYIRLHP | 0.7552 | 0.90 |
| 2141 | C1 | NPPIIARYIRLHPTH | IARYIRLHP | 0.7666 | 0.80 |
| 2142 | | PPIIARYIRLHPHXY | IARYIRLHP | 0.7737 | 0.70 |
| 2143 | | PIIARYIRLHPHYS | IARYIRLHP | 0.7778 | 0.60 |
| 2144 | | IIARYIRLHPHYSI | IARYIRLHP | 0.7725 | 0.70 |

Tabela 6: Peptídeos com forte afinidade pelos alelos de HLA-DR. Score: score de afinidade; Afinid: afinidade medida por IC₅₀ (nM). Análise realizada em NetMHCII (JENSEN et al. 2018).

Vale lembrar que vários peptídeos de FVIII se ligam a esses e outros alelos, porém não tendem a provocar resposta imune devido ao mecanismo de Tolerância Central. A Tabela 7 leva isso em consideração, quantificando os epítomos a partir de score de afinidade em associação ao score de imunogenicidade. Os peptídeos incluídos são aqueles que não só apresentaram forte afinidade aos alelos (Tabela 6), como também se classificaram com os 50 maiores scores de imunogenicidade (WANG et al., 2008; WANG et al., 2010; DHANDA et al., 2018).

Tabela 7

Quantificação da potência imunogênica de epítomos do FVIII a partir dos scores de imunogenicidade e de afinidade ao MHC-II

| Domínio | Peptídeo | Início | Fim | Score Imunog | Score de afinidade ao alelo | | | |
|---------|-----------------|--------|-----|--------------|-----------------------------|------------|------------|------------|
| | | | | | DRB1* 0101 | DRB1* 0401 | DRB1* 1101 | DRB1* 1501 |
| A1 | YDTVVITLKNMASHP | 81 | 95 | 70,92 | 0.8326 | | | 0.7883 |
| A1 | ITLKNMASHPVSLHA | 86 | 100 | 84,41 | 0.8272 | | | 0.7069 |
| A1 | ITFLTAQTLLMDLGQ | 291 | 305 | 98,20 | | 0.7162 | | 0.7113 |
| a1 | PSFIQIRSVAKKHPK | 366 | 380 | 77,10 | | | 0.7718 | |
| A2 | EVGDTLLIIFKNQAS | 456 | 470 | 71,38 | | 0.6829 | | 0.7883 |
| A2 | LLIIFKNQASRPYNI | 461 | 475 | 74,14 | | 0.6829 | | 0.7883 |
| A2 | SNIMHSINGYVFDSL | 611 | 625 | 83,26 | | | | 0.7068 |

| | | | | | | | |
|----|------------------|------|------|-------|--------|--------|--------|
| A2 | SINGYVFDSLQLSVC | 616 | 630 | 96,45 | | | 0.7068 |
| A2 | LHEVAYWYILSIGAQ | 631 | 645 | 87,93 | 0.8197 | | |
| A2 | ETVFMSPMENPGLWIL | 676 | 690 | 71,66 | 0.8691 | 0.6723 | |
| a2 | ISAYLLSKNNAIEPR | 726 | 740 | 73,65 | 0.8040 | 0.7675 | |
| A3 | DNIMVTFRNQASRPY | 1769 | 1783 | 65,88 | | | 0.7286 |
| A3 | RIRWYLLSMGSNENI | 1939 | 1953 | 83,19 | | 0.6609 | |
| C1 | SQFIIMYSLDGKKWQ | 2099 | 2113 | 82,15 | 0.8233 | | |
| C1 | IIARYIRLHPHYSI | 2144 | 2158 | 83,27 | | | 0.7464 |

Tabela 7: Score Imunog: *score* de imunogenicidade. Destaque para o resíduo 291-305, com o maior *score* de imunogenicidade. Análise cruzada dos resultados obtidos a partir de IEDB Resources (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2021) e NetMHCII (JENSEN et al., 2018).

Considerando os epítomos descritos na Tabela 5 e o epítomo de maior *score* de imunogenicidade apresentado na Tabela 7 (Ile291-Gln305), foi realizada uma análise de previsão do impacto que SNPs não sinônimas teriam sobre a atividade de FVIIIa. O parâmetro de cálculo é o *score* em escala $-100 < \textit{score} < 100$, sendo os menores valores equivalentes a ausência de impacto sobre a atividade da molécula, e os maiores valores, a presença de impacto (ROSTLAB, 2016). A Tabela 8 lista as opções mais promissoras de substituição, levando-se em conta *score* e informações adicionais da literatura. Cada proposta de substituição é explicada detalhadamente em seguida.

Tabela 8

Possíveis substituições na sequência de rFVIII e seu impacto sobre a atividade da molécula

| Resíduo | Substituição | Impacto previsto | Score | Precisão |
|---------|--------------|------------------|-------|----------|
| Leu299 | Ile | neutro | -89 | 93% |
| Arg484 | Lys | neutro | -70 | 82% |
| Tyr487 | Phe | neutro | -25 | 61% |
| Arg489 | Lys | neutro | -47 | 72% |
| Pro492 | Ala | neutro | -12 | 57% |
| Arg593 | Lys | neutro | -28 | 61% |
| His2315 | Asn | neutro | -78 | 87% |
| Glu2327 | Asp | neutro | -88 | 93% |

Tabela 8: Possíveis substituições de aminoácido para redução do reconhecimento imune de epítomos imunogênicos de FVIII, de acordo com a literatura (Tabela 5) e análises *in silico* de potencial imunogênico (Tabela 7). Impacto neutro ($\textit{score} < 0$) indica que a substituição não afeta a atividade da molécula. Análise realizada por SNAP2 (ROSTLAB, 2016).

O epítomo Ile291-Gln305 foi inserido na ferramenta SNAP2 (ROSTLAB, 2016) para identificação do melhor resíduo a se substituir, conforme ausência de efeito sobre a atividade do FVIII. A Figura 10 é o resultado gerado pela ferramenta.

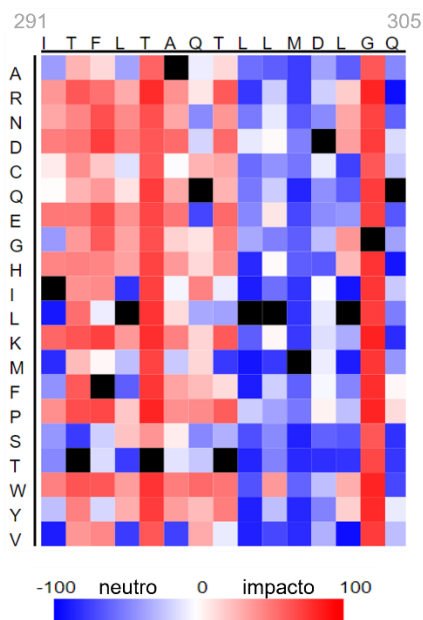


Figura 10: *Heatmap* obtido por SNAP2 indicando o grau de impacto de cada substituição de aminoácido no epítipo Ile291-Gln305, indicado como imunogênico na análise *in silico* realizada em IEDB Resources e NetMHCII, sobre a atividade da proteína. Os quadrados pretos representam as opções em que determinado aminoácido seria substituído por ele mesmo, isto é, sem alteração; o significado dos tons de vermelho e azul está indicado pela escala abaixo do *heatmap*.

De acordo com o heatmap, os resíduos Leu299 e Met301 poderiam ser substituídos por qualquer outro aminoácido sem apresentar impacto. Para mínima alteração sobre a estrutura secundária da proteína e sua estabilidade, o resíduo de metionina, cuja cadeia lateral contém um átomo de enxofre, seria mantido; e Leu299 seria substituído por Ile devido à semelhança estrutural das suas cadeias laterais e ao forte sinal obtido com essa substituição para ausência de impacto sobre a atividade ($score = -89$).

De forma semelhante, Arg484 poderia ser substituído por Lys devido à semelhança estrutural das cadeias laterais, ambas as quais apresentam carga positiva, e ao forte sinal para ausência de impacto. O mesmo raciocínio foi aplicado para as demais substituições, considerando-se os parâmetros na seguinte ordem de prioridade: (i) ausência de impacto de acordo com SNAP2, isto é, $score < 0$; (ii) semelhança de característica entre os aminoácidos, a fim de não afetar a estabilidade da proteína; e (iii) forte sinal para ausência de impacto, isto é, $score < -50$. Este último parâmetro recebe essa classificação, pois, de acordo com o laboratório responsável pelo SNAP2 (ROSTLAB, 2016), existe correlação entre o

valor do score e a severidade do impacto (ou garantia de ausência de impacto), porém ela não é linear.

No caso de Pro492, sabe-se que prolinas têm importante participação na integridade de regiões de alfa-hélice na estrutura secundária de proteínas (SAUER; SAN; MATTHEWS, 1992), e por isso substituí-las por outros aminoácidos poderia afetar a estabilidade e funcionalidade da proteína. Porém, Lubin et al. (1997) demonstraram que a substituição Pro492Ala reduz significativamente o reconhecimento do epítipo por inibidores, sem alterar a atividade do FVIII.

O resíduo Arg593 merece destaque, pois foi identificado por James et al. (2011) como essencial para proliferação de linfócitos T após reconhecimento do epítipo. Logo, substituí-lo por Lys provavelmente levaria a uma forte redução na imunogenicidade do FVIII.

Todos os resíduos listados na Tabela 8 se localizam na superfície da molécula (PyMOL, 2015), portanto todos estariam susceptíveis a reconhecimento imune e, conseqüentemente, podem ser a chave para reduzir essa ocorrência.

4.3 Proposta envolvendo aspectos biotecnológicos na produção do rFVIII

Para produção da nova molécula de rFVIII sendo proposta, seria empregada a técnica de mutagênese dirigida (SDM), que consiste na modificação *in vitro* de regiões específicas de um plasmídeo de DNA dupla-fita (dsDNA) por meio de *primers* customizados de acordo com a mutação que se pretende obter. Os *primers*, um para cada uma das duas fitas de DNA, são desenhados *in silico* e amplificados por PCR com DNA polimerase de alta processividade. Após a reação de mutagênese, é adicionada a endonuclease *Dpn I* para digestão da fita-mãe, isolando-se assim a fita sintetizada com a mutação. Em seguida é realizada a transformação de células competentes com o material genético obtido, cujo ponto fragmentado é reparado dentro das células (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015; ZENG et al., 2018).

Preparado o gene, ele seria transferido para as células CHO na preparação do MCB e, após estabelecido o WCB, seriam iniciados os ciclos de produção em fermentadores. Quanto ao restante do processo de fabricação, seria proposto seguir

o exemplo da fabricação de ReFacto® (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2014), como descrito por Boedeker (2001): as células são adaptadas a cultura em suspensão com HSA e insulina recombinante como aditivos ao meio de cultura. Em seguida se realizam cinco etapas de purificação além da filtração inicial: cromatografia de troca catiônica, de imunoafinidade, de troca aniônica, hidrofóbica e filtração em gel. Ainda é aplicada uma etapa de inativação viral, e na formulação são empregados os aditivos sacarose, polisorbato 80, histidina e cálcio. Não há adição de produtos de origem animal ou humana.

5. DISCUSSÃO

Conforme identificados os detalhes do perfil molecular do FVIII, isto é, seus sítios essenciais para atividade e suas regiões de glicosilação e sulfatação, essas informações foram cruzadas com dados relatados na literatura em estudos *in vivo* ou com pacientes referentes a hemofilia com inibidores (JACQUEMIN et al., 2000; SCANDELLA, 2002; JACQUEMIN et al., 2003; SASGARY, 2003; KESSEL et al., 2008; JAMES et al., 2011; YADA et al., 2015). Especificamente, foram coletados os resíduos ou sítios da molécula que foram mencionados como envolvidos, de alguma maneira, no desenvolvimento dos inibidores (Tabela 5).

Com isso, ficou claro que os epítomos relatados como imunogênicos realmente coincidem com regiões da molécula essenciais para sua função, ou seja, é fácil entender o motivo pelo qual os inibidores têm impacto sobre o quadro clínico dos pacientes.

No entanto, quando se realizaram as análises *in silico* de afinidade do FVIII por MHC-II e de *score* de imunogenicidade, os resultados obtidos (Tabelas 6 e 7) não tiveram conexão com as informações anteriores. Nenhum dos epítomos reportados na literatura foi identificado pelos programas como imunogênicos ou como ligantes de MHC-II. Algumas hipóteses para a razão por trás disso são listadas a seguir: (i) os programas podem ter captado epítomos com capacidade de ligarem-se ao MHC-II e até de ativarem linfócitos T e, eventualmente, provocarem formação de anticorpos, porém estes podem não ser neutralizantes, isto é, os

epítomos não impactam na funcionalidade da molécula, e portanto anticorpos que se liguem a eles não bloqueariam sua atividade e não provocariam resposta clínica; (ii) a seleção de alelos de HLA pode não ter sido adequada, tanto quanto a sua resposta ao FVIII como quanto a sua presença em parcela significativa da população, e dado o elevado grau de variabilidade do sistema HLA, seria necessária uma investigação árdua para selecionar os candidatos corretos; e (iii) limitações inerentes às análises, como precisão e qualidade dos programas utilizados, podem comprometer a validade dos resultados.

A hipótese (i) é fundamentada pelo fato de que os epítomos obtidos pelos programas não coincidem com as regiões descritas como determinantes para atividade do FVIII (FAY et al., 1994; LENTING et al., 1996; BAJAJ et al., 2001; JENKINS et al., 2004; NGO et al., 2008). No entanto, o epítomo identificado pelos programas com maior potencial de imunogenicidade foi listado como uma das opções para substituição na Tabela 8, pendentes análises experimentais para verificar sua participação na formação de inibidores.

Também foram selecionados como opções para modificação, a fim de se reduzir sua imunogenicidade, os epítomos da Tabela 5. Mais especificamente, foram selecionados sete resíduos pontuais contidos nesses epítomos e que são essenciais para o reconhecimento dos sítios pelo sistema imune e, conseqüentemente, para a formação de inibidores (Tabela 8).

A partir do presente estudo, propõe-se a substituição Arg593Lys como a mais promissora para reduzir a imunogenicidade do FVIII, considerando sua importância para a proliferação de linfócitos T na formação de inibidores e o fato de não causar alteração na atividade do fator. A proposta, portanto, seria inserir essa substituição por técnicas de SDM. Seria interessante também realizar o mesmo procedimento para cada uma das outras substituições listadas e avaliar experimentalmente seu impacto sobre a formação de inibidores.

Além da substituição, ainda propõe-se incluir parte da região a3 na sequência peptídica devido à importância da Tyr1680 sulfatada para a afinidade do FVIII ao FvW (KANNICHT et al., 2013), que auxilia na redução de reconhecimento da molécula pelo sistema imune e favorece sua estabilidade. Para evitar clivagem

prematura dessa região adicional, seria necessário estudar técnicas de *capping* para proteger Arg1689, sítio de ação da trombina (NGO et al., 2008). Seriam necessários também estudos mais aprofundados para definição exata da região a ser inserida e para escolha do emprego ou não de peptídeos *linkers*.

Por fim, seria selecionada a linhagem de células CHO para produção. Observou-se que o perfil de glicosilação de rFVIII produzido dessa maneira é comparável ao de FVIII humano, com poucas divergências de grande efeito (Tabela 4). O presente trabalho identificou diferença apenas no padrão de ligação dos ácidos siálicos (majoritariamente α 2,3, em comparação com o padrão α 2,3 e α 2,6 humano) e na proporção de Neu₅Gc observado (CANIS et al., 2018). Neste caso, seria preciso quantificar os níveis absolutos de Neu₅Gc presentes para então concluir se haveria necessidade de intervenção, que consistiria no emprego de glicosidases específicas para clivagem desses glicanos da proteína. É interessante notar também que o grau de variação entre pdFVIII e o rFVIII proveniente de células HEK parece levemente maior do que aquele entre pdFVIII e rFVIII de células CHO, ao menos nos aspectos aqui considerados. As células HEK, mesmo que humanas, apresentam perfil significativamente diferenciado em razão do seu tecido de origem. Logo, pode-se definir que a escolha por uma linhagem celular humana, no caso de produção de FVIII, não agrega vantagem tão expressiva quanto à ocorrência de imunogenicidade. Além disso, células CHO apresentam vantagens em relação a células HEK no aspecto do processo produtivo, e a literatura relatando seu uso e sua segurança é mais extensa, favorecendo maior aceitação do ponto de vista de agências regulatórias (KIM; KIM; LEE, 2011).

6. CONCLUSÃO

A partir do apresentado, propõe-se um *Biobetter* de rFVIII, a ser obtido por engenharia genética, com a mutação Arg593Lys e com inserção de parte da região a3. A proteína seria expressa em células CHO, uma linhagem amplamente empregada na produção de biofármacos por sua segurança e por seu perfil de modificações pós-traducionais semelhante ao de células humanas.

Os benefícios esperados em relação aos produtos de rFVIII já existentes no mercado seriam maior afinidade ao FvW e menor ocorrência de inibidores. Espera-se que um produto como esse tenha o potencial garantir um aumento na qualidade de vida dos pacientes, que teriam um medicamento mais eficaz e por mais tempo, com eventos adversos reduzidos e menores riscos de episódios hemorrágicos. Naturalmente, seriam necessários extensos estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e de segurança, entre outros, para estabelecer o alcance desse potencial.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. B Cell Activation and Antibody Production. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. (Ed.). 5. ed. 2005. cap. 9, p. 189 – 215.

AGILENT TECHNOLOGIES. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit: Instruction Manual Catalog # 200518 (30 reactions) and 200519 (10 reactions). Santa Clara, 2015. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200518.pdf>. Acesso em: 03 out. 2021.

BAJAJ, S. P. et al. Factor IXa:factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the $\alpha 2$ subunit of factor VIIIa. v. 276, n. 19, p. 16302 – 16309, 5 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278963/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

BOEDEKER, B. G. D. Production Processes of Licensed Recombinant Factor VIII Preparations. v. 27, n. 04, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11547361/>. Acesso em: 04 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Manual de Hemofilia. Manual de Hemofilia, 2ª ed., Brasília, p. 1 – 82, 2015. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_hemofilia_2ed.pdf. Acesso em: 01 mar. 2021.

CANIS, K. et al. In-depth comparison of *N*-glycosylation of human plasma-derived factor VIII and different recombinant products: from structure to clinical implications. v. 16, n. 8, 8 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.14204>. Acesso em: 19 fev. 2021.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. UniProtKB - P00451 (FA8_HUMAN). 2021. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00451>. Acesso em: 29 ago. 2021.

DELIGNAT, S. et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. v. 92, n. 10, p. 1423 – 1426, 10 2007. Disponível em: <https://haematologica.org/article/view/4611>. Acesso em: 02 out. 2021.

DHANDA, S. K. et al. Predicting HLA CD4 Immunogenicity in Human Populations. v. 0, n. JUN, p. 1369 –, 6 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29963059/>. Acesso em: 03 out. 2021.

EFFER, B. et al. Glycosylation of Erwinase results in active protein less recognized by antibodies. v. 163, p. 107750 –, 11 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X20303041?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2021.

FAY, P. et al. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. v. 269, n. 32, p. 20522 – 20527, 8 1994. Disponível em: [http://www.jbc.org/article/S0021925817320240/fulltexthttp://www.jbc.org/article/S0021925817320240/abstracthttps://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)32024-0/abstract](http://www.jbc.org/article/S0021925817320240/fulltexthttp://www.jbc.org/article/S0021925817320240/abstracthttps://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)32024-0/abstract). Acesso em: 12 ago. 2021.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. v. 32, n. 5, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000500016&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 01 mar. 2021.

HELDEN, P. M. W. van et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. v. 142, n. 4, 8 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18510679/>. Acesso em: 02 jun. 2021.

JACQUEMIN, M. et al. A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. v. 95, n. 1, p. 156 – 163, 1 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10607698/>. Acesso em: 04 out. 2021.

JACQUEMIN, M. et al. CD4+ T-cell clones specific for wild-type factor VIII: A molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A. v. 101, n. 4, p. 1351 – 1358, 2 2003. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/101/4/1351/105953/CD4-T-cell-clones-specific-for-wild-type-factor>. Acesso em: 04 out. 2021.

JAMES, E. A. et al. T-cell responses in two unrelated hemophilia A inhibitor subjects include an epitope at the factor VIII R593C missense site. v. 9, n. 4, p. 689 – 4 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251204/>. Acesso em: 11 ago. 2021.

JENKINS, V. et al. Contribution of Factor VIIIa A2 and A3-C1-C2 Subunits to the Affinity for Factor IXa in Factor Xase†. v. 43, n. 17, p. 5094 – 5101, 5 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi036289p>. Acesso em: 12 ago. 2021.

JENSEN, K. K. et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. v. 154, n. 3, p. 394 – 406, 7 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29315598/>. Acesso em: 03 out. 2021.

KANNICHT, C. et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. v. 131, n. 1, p. 78 – 88, 1 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23058466/>. Acesso em: 02 out. 2021.

KESSEL, C. et al. Humoral immune responsiveness to a defined epitope on factor VIII before and after B cell ablation with rituximab. v. 46, n. 1, p. 8 – 15, 11 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715645/>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KESSLER, M.; GOLDSMITH, D.; SCHELLEKENS, H. Immunogenicity of biopharmaceuticals. v. 21, n. suppl_5, 10 2006. Disponível em: https://academic.oup.com/ndt/article/21/suppl_5/v9/1906130?login=true. Acesso em: 01 mar. 2021.

KIM, J. Y.; KIM, Y.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. v. 93, n. 3, p. 917 – 930, 12 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3758-5>. Acesso em: 20 out. 2021.

LENTING, P. J. et al. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. v. 271, n. 4, p. 1935 – 1940, 1 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8567641/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LIEUW, K. Many factor VIII products available in the treatment of hemophilia A: an embarrassment of riches? Volume 8, 6 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479262/>. Acesso em: 03 mar. 2021.

LISSITCHKOV, T. et al. Efficacy and safety of simoctocog alfa (NuwiqR) in patients with severe hemophilia A: a review of clinical trial data from the GENA program. v. 10, 1 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6595650/>. Acesso em: 04 mar. 2021.

LLC, S. The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8. 2015.

LUBIN, I. M. et al. Analysis of the Human Factor VIII A2 Inhibitor Epitope by Alanine Scanning Mutagenesis. v. 272, n. 48, 11 1997. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)89703-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)89703-X/fulltext). Acesso em: 20 out. 2021.

MOISE, L. et al. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. v. 142, n. 3, 3 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661611003391?casa_token=GFgifWhcAfAAAAAA:WOrkoA7gB-Lwh1VXMA6afVOFhxoUN3LkpyWqij-004Jllj2sVRzajUonz_ZI0bE-eryHECnONE0. Acesso em: 11 mar. 2021.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. IEDB Analysis Resource: MHC-II Binding Predictions. 2021. Disponível em: <http://www.iedb.org/>. Acesso em: 05 set. 2021.

NGO, J. C. K. et al. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. v. 16, n. 4, p. 597 – 606, 4 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400180/>. Acesso em: 28 abr. 2021.

NGO, J. C. K. et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences (2021): 3CDZ. 2021. Nucleic Acids Research 49: D437–D451 doi: 10.1093/nar/gkaa1038. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/3CDZ>. Acesso em: 02 abr. 2021.

NOVO NORDISK A/S. ZONOVATE: fator VIII de coagulação recombinante: Responsável técnico Luciane M. H. Fernandes. Gentofte, 2018. Disponível em: https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordisk-br/patients/Bulas-pacientes/Zonovate_Bula_Paciente.pdf. Acesso em: 02 mar. 2021.

PERKINELMER INFORMATICS, INC. ChemDraw. 2019. V 19.0. Disponível em: <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>. Acesso em: 03 out. 2021.

PIO, S. F.; OLIVEIRA, G. C. de; REZENDE, S. M. As bases moleculares da hemofilia A. v. 55, n. 2, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/GjwBJmLtxsR7NJvPWdCkVfD/?lang=pt>. Acesso em: 27 fev. 2021.

REILY, C. et al. Glycosylation in health and disease. v. 15, n. 6, p. 346 – 366, 3 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41581-019-0129-4>. Acesso em: 24 ago. 2021.

REIPERT, B. M. et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. v. 86, n. 6, 12 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11776297/>. Acesso em: 11 mar. 2021.

ROSTLAB. SNAP2 - Rost Lab Open. 2016. Disponível em: <https://rostlab.org/owiki/index.php/Snap2>. Acesso em: 03 out. 2021.

SASGARY, M. Characterization and Analysis of FVIII-specific T Cells in Hemophilic Mice Treated With Human Factor VIII - Development of New Strategies for Tolerance Induction. 2003. Tese (Doutorado). Disponível em: <http://www.ub.tuwien.ac.at>. Acesso em: 07 ago. 2021.

SAUER, U. H.; SAN, D. P.; MATTHEWS, B. W. Tolerance of T4 lysozyme to proline substitutions within the long interdomain alpha-helix illustrates the adaptability of proteins to potentially destabilizing lesions. v. 267, n. 4, 2 1992. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)45892-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)45892-9/fulltext). Acesso em: 20 out. 2021.

SCANDELLA, D. New Characteristics of Anti-Factor VIII Inhibitor Antibody Epitopes and Unusual Immune Responses to Factor VIII. v. 28, n. 3, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12098091/>. Acesso em: 07 ago. 2021.

SHANKARKUMAR, U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. v. 4, n. 2, 6 2004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09723757.2004.11885875>. Acesso em: 11 mar. 2021.

SRIVASTAVA, A. et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. v. 26, n. S6, 8 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hae.14046>. Acesso em: 27 fev. 2021.

STOILOVA-MCPHIE, S. et al. Domain organization of membrane-bound factor VIII. v. 99, n. 7, p. 448 – 459, 7 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23616213/>. Acesso em: 28 abr. 2021.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Summary of Basis for Approval: Antihemophilic Factor (Recombinant): ReFactorR. 2000. Disponível em: <http://wayback.archive-it.org/7993/20170723023526/https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM059084.pdf>. Acesso em: 01 out. 2021.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Rockville: FDA, 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-assessment-therapeutic-protein-products>. Acesso em: 02 mar. 2021.

WANG, P. et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. v. 11, n. 1, p. 1 – 12, 11 2010. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-568>. Acesso em: 03 out. 2021

WANG, P. et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. v. 4, n. 4, 4 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18389056/>. Acesso em: 03 out. 2021.

WATERS, B. et al. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4 +CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. 2009. 193 – 203 p. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/113/1/193/1303341/zh800109000193.pdf>. Acesso em: 16 mai. 2021.

YADA, K. et al. Mild hemophilia A patient with novel Pro1809Leu mutation develops an anti-C2 antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII activity. v. 13, n. 10, 10 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jth.13118>. Acesso em: 07 ago. 2021.

YOUNG, G. New challenges in hemophilia: long-term outcomes and complications. v. 2012, n. 1, 12 2012. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2012/1/362/83847/New-challenges-in-hemophilia-long-term-outcomes>. Acesso em: 27 fev. 2021.

YORK, W. S. et al. GlyGen: Computational and Informatics Resources for Glycoscience. Details For Glycoprotein P00451. 2019. Disponível em: <https://glygen.org/protein/P00451#glycosylation>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ZENG, F. et al. Efficient strategy for introducing large and multiple changes in plasmid DNA. v. 8, n. 1, p. 1 – 12, 1 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20169-8>. Acesso em: 04 out. 2021

8. ANEXOS

8.1 Aspectos Éticos

O presente trabalho trata-se de revisão sistemática da literatura e, dessa forma, aspectos bioéticos não se aplicam. Como estudo exclusivamente teórico, cabe considerar apenas que as informações aqui descritas têm como propósito o fomento ao conhecimento científico, e não se pretende nenhum conflito com patentes ou empresas citadas.



Data e assinatura do aluno(a)



Data e assinatura do orientador(a)