

Produção de fator FVIII por engenharia genética

Produção de fator FVIII da coagulação por tecnologia do DNA recombinante

Virginia Proenca Picanco

Doutoranda em Ciências Biomédicas-FMRP-USP e participante do programa de doutorado sanduiche DAAD/Cnpq com a Universidade de Frankfurt
v.picanco@pegasus.fmrp.usp.br

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Hemocentro de Ribeirão Preto
dimas@fmrp.usp.br

Dr. Sven Becker

Institute for Transfusion Medicine and Immunohematology
Red Cross Blood Donor Service Baden-Wuerttemberg / Hessen
Frankfurt am Main
Alemanha
sbecker@bsbhessen.de

Dr. Torsten Tomm

Institute for Transfusion Medicine and Immunohematology Red Cross Blood Donor Service - Baden-Wuerttemberg / Hessen
Frankfurt am Main
Alemanha
ttomm@bsbhessen.de

Imagem cedida pelos autores

Hemofilia A no Brasil

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária resultante da deficiência de uma das várias proteínas do sangue envolvidas no processo de coagulação. Cerca de 350.000 pessoas em todo o mundo sofrem de hemofilia A em que o fator VIII não é produzido, não funciona ou existe em quantidades reduzidas.

No Brasil, estima-se que existam cerca de 7000 hemofílicos que são tratados, na sua maioria, com concentrados de fator VIII obtidos a partir do plasma humano. Este tipo de tratamento é caro e muitas vezes não disponível na quantidade necessária. No mercado brasileiro cada unidade internacional (UI) de fator VIII é comercializada ao preço médio de US \$ 0,50. A dispensação anual média por hemofílico é de 30.000 UI, aproximadamente US \$ 15.000,00/ paciente/ano, totalizando cerca de 100 milhões de dólares por ano. O tratamento atual para a hemofilia A é baseado na infusão intravenosa de concentrados de FVIII, profilaticamente ou na ocorrência de um sangramento. Os problemas com estes concentrados, incluindo o alto custo, a inconveniência, e o risco da transmissão de doenças virais, tais como, hepatitis e HIV, aumentaram o interesse em expressar este fator em sistemas celulares *in vitro* ou *in vivo*.

Gene do fator VIII

O gene do fator VIII foi clonado e caracterizado em 1984. Seu locus situa-se na região 28 do braço longo do cromossomo X (Xq28). É

constituído por 26 exons cujo tamanho varia entre 69 e 3106 pb e 25 íntrons que podem atingir o tamanho de 32,4 kb, pertencendo a um dos maiores genes humano (0,1% do cromossomo X)¹⁻³.

Estrutura e função

A proteína deduzida da sequência de nucleotídeos do cDNA contém 2351 aminoácidos. A análise da estrutura primária mostrou a organização em domínios: A1- *a1*- A2- *a2*- B- *a3*- A3- C1- C2, sendo a cadeia pesada constituída pelos domínios A1- *a1*-A2-*a2*-B e a cadeia leve pelos domínios *a3*-A3-C1-C2.

O fator VIII é uma glicoproteína que ativa o fator X no processo da coagulação sanguínea. É sintetizada como um polipeptídeo de cadeia única de cerca de 330 kDa e é clivada, gerando a cadeia pesada de 210 kDa e a cadeia leve de 80 kDa que se associam por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. O domínio B, o maior domínio, não participa da atividade coagulante da proteína e sua função ainda permanece desconhecida.⁴

Expressão do fator VIII em sistemas *in vitro*

Vários experimentos testaram a transfecção do gene do fator VIII, na sua forma inteira ou sem o domínio B, em sistemas celulares, seguida da avaliação de sua atividade funcional. Os estudos iniciais mostraram níveis muito baixos de expressão em todas as linhagens celulares estudadas.^{2,4-7}

Em princípio, três seriam os fatores limitantes para a obtenção de

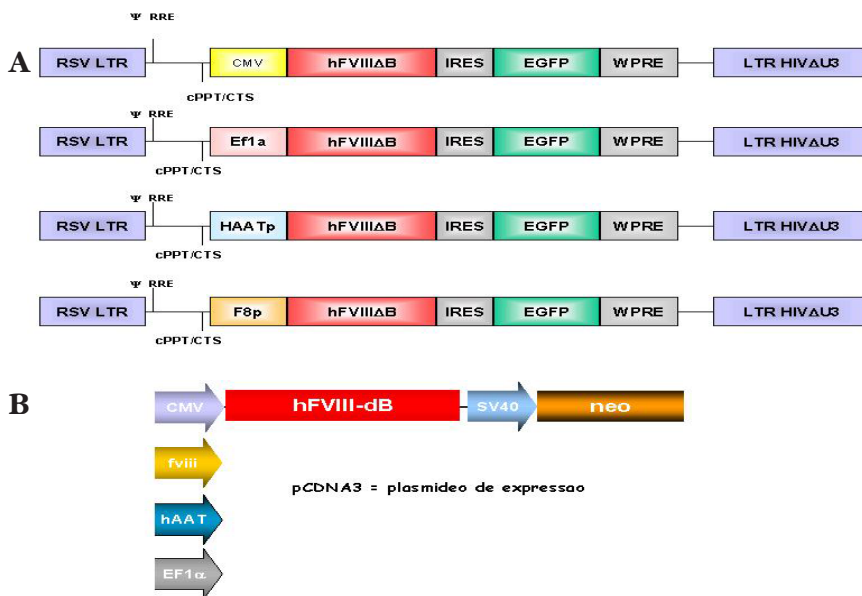


Figura 1: A. Construções Lentivirais. As construções lentivirais foram realizadas no vetor 1054 (cedido gentilmente por Naldini L), onde o FVIII sem o domínio B foi clonado sob controle dos promotores CMV, HAAT, FVIIIp e EF1- α . **B.** Construções plasmidiais. Nas construções plasmidiais o vetor utilizado foi o pCDNA3.1 e diferentes promotores (CMV, HAAT, FVIIIp e EF1- α) foram clonados juntamente com o FVIII sem o domínio B.

níveis elevados de expressão da proteína do fator VIII: 1) o tamanho do gene; 2) o seu baixo nível de expressão de mRNA; e, 3) a secreção ineficiente do produto deste gene.

É conveniente destacar que, apesar de mais elevados, os níveis de expressão obtidos com o fator VIII são muito baixos quando comparados aos obtidos para diversas outras proteínas. Informações adicionais sobre as modificações pós-traducionais e o mecanismo de secreção do fator VIII tornam-se primordiais para maior entendimento deste aspecto.

Terapia gênica para hemofilia A

A hemofilia A é uma doença que se presta para a terapia gênica, uma vez que se sabe muito sobre a sua transmissão, sobre a localização do gene defeituoso e sobre a estrutura e função do fator produzido por este gene. É de se salientar que a concentração sanguínea de fator VIII obtida não é crítica, sendo que um pequeno aumento da concentração plasmática de FVIII pode converter um quadro de hemofilia grave em hemofilia moderada.

O desenvolvimento da terapia gênica para a hemofilia A tem sido extensivamente explorado, utilizando estratégias com vetores adenovirais e

retrovirais *ex vivo* e *in vivo*. Na terapia *ex vivo* tem sido utilizada uma variedade de células transduzidas com retro ou adenovirus e transplantadas em camundongos hemofílicos. Apesar de níveis terapêuticos de FVIII serem detectados na circulação, a expressão declina gradualmente devido ao tempo limitado de sobrevivência das células transplantadas ou devido ao silenciamento da transcrição do transgene.⁸⁻¹²

O uso de vetores retrovirais é dificultado pelo baixo título do vetor e por baixos níveis de expressão do FVIII. Recentemente, modificações nos vetores retrovirais permitiu a produção de altos títulos do vetor¹³⁻¹⁵, apesar da incapacibilidade destes vetores retrovirais de transduzir células quiescentes, limitando o seu uso na terapia gênica *in vivo*.

Vetores adenovirais podem transduzir uma variedade de células, incluindo células quiescentes e foi observada eficiente produção de FVIII em transdução *in vivo*.¹⁶ Esta expressão do FVIII foi gradualmente perdida devido à resposta imune contra o vetor ou contra o produto do transgene.

Vetores lentivirais, baseados no HIV, são uma ferramenta promissora para terapia gênica, diferentemente do retrovirus MLV (Moloney

murine leukemia based), os lentivirus são capazes de transduzir estávelmente células quiescentes em vários órgãos^{15, 17}. Contudo, a resposta imune do hospedeiro contra o produto transgênico expresso pode resultar na perda da expressão da proteína na circulação¹⁸.

Resultados obtidos no Instituto de Medicina Transfusional de Frankfurt mostram que células endoteliais progenitoras derivadas de cordão umbilical (CBECS)¹⁹ e células Hematopoiéticas²⁰ transduzidas com vetor lentiviral contendo o cDNA do FVIII mantêm a expressão estável do FVIII por várias gerações, indicando que estas células podem ser usadas futuramente na terapia gênica. Além disso, um estudo detalhado da via de secreção do FVIII mostra que do FVII recombinante, com ou sem o domínio B, expresso em células que não secretam o FVIII fisiologicamente fica retido em compartimentos celulares, como o retículo endoplasmático, limitando a secreção deste fator²¹. Análise de fatores envolvidos na secreção do FVIII, linhagens celulares adequadas à expressão e secreção, assim como a utilização de determinados promotores poderão facilitar a expressão do FVIII recombinante.

Objetivos

O objetivo principal deste projeto é produzir o fator VIII de coagulação em sistemas celulares *in vitro*, por técnicas de engenharia recombinante. Este objetivo se justifica com base no pressuposto de menor custo e maior segurança, visto que seriam produtos praticamente isentos de agentes patogênicos, ao contrário do produto obtido do plasma humano.

Em colaboração com o Instituto de Medicina Transfusional de Frankfurt objetivamos obter altos níveis de fator VIII em linhagens celulares de mamífero e também a construção de vetores lentivirais para uma futura aplicação em estudos *in vivo* (terapia gênica).

Construções

Estudos usando a primeira geração de vetores adenovirais

mostraram que promotores específicos para fígado, em vez de promotores celulares fortes, podem aliviar a ativação do sistema imune do hospedeiro, sugerindo que a resposta imune está relacionada com a transdução de células apresentadoras de antígeno ¹⁶. Baseado nesses resultados, foram construídos vetores contendo, além dos promotores universais CMV e EF-1a, promotores específicos de fígado, HAAT e F8p (Figura 1).

Vetores lentivirais e plasmidiais foram construídos com diferentes tipos de promotores, para observar a especificidade dos promotores em linhagens celulares de fígado. Em todas as construções realizadas foram utilizado o cDNA do FVIII sem o domínio B (Figura 1).

No momento, estes vetores estão sendo testados em culturas celulares para posteriormente serem aplicados em estudos *in vivo*.

Considerações finais

O crescente interesse em se entender os mecanismos de regulação da secreção e função do fator VIII leva à realização de experimentos engenhosos que combinam abordagens de bioquímica e engenharia genética, trazendo informações inusitadas sobre esse fator de coagulação sanguínea. Apesar dos avanços no desenvolvimento de vetores mais seguros e nas técnicas de transferência gênica, a resposta imunológica do hospedeiro contra o transgene, as dificuldades de produção em larga escala e sua padronização, ainda são grandes barreiras para seu uso clínico.

Estabelecer linhagens celulares de mamíferos transformadas com construções recombinantes contendo o FVIII que expressem a proteína em níveis elevados será um passo fundamental para novos avanços na terapêutica da hemofilia e na caracterização dos processos envolvidos na biossíntese do fator VIII. Isto permitirá também estabelecer, no Brasil, a metodologia para a produção de fatores de coagulação através de tecnologia de DNA recombinante.

Referências bibliográficas

- 1- Gitschier J *et al* (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**:326-330.
- 2- Toole J.J. *et al* (1984) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* **312**:342-347.
- 3- Vehar G.A. *et al* (1984) Structure of active human factor VIII. *Nature* **312**:3 7-342.
- 4- Kaufman R.J *et al* (1989) Effect of von Willebrand Factor Coexpression on the Synthesis and Secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol. Cell Biol.* **9**:1233-1242.
- 5- Yonemura *et al.*, 1993. Efficient production of recombinant human factor VIII by co-expression of the heavy and light chains. *Protein Eng.* 1993 Aug;6(6):669-74.
- 6- Kjalke *et al.*, 1995. Amino acid residues 721-729 are required for full factor VIII activity. *Eur J Biochem.* 1995 Dec 15;234(3):773-9.
- 7- Burke *et al* (1986) The functional domains of coagulation factor VIII:C. *J. Biol. Chem.* **261**:12574-12578
- 8- Hoeben *et al* (1993). Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. *Thromb Haemost.* 1992 Mar 2;67(3):341-5.
- 9- Zatloukal K *et al*, 1994. In vivo production of human factor VII in mice after intrasplenic implantation of primary fibroblasts transfected by receptor-mediated, adenovirus-augmented gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):5148-52
- 10- Chuah *et al*, 2000,
- 11- VandenDriessche *et al*, 1999. Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 31;96(18):10379-84.
- 12- Dwarki VJ *et al*, 1995. Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 14;92(4):1023-7.
- 13- Chuah MK, *et al*, 2000. Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablative immunodeficient mice. *Hum Gene Ther.* 2000 Mar 20;11(5):729-38
- 14- Gallo-Penn AM *et al*, 2001. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):107-13.
- 15- Naldini L *et al*, 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11382-8.
- 16- Pastore L *et al*, 1999. Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 1999 Jul 20;10(11):1773-81.
- 17- Naldini L *et al* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996 Apr 12;272(5259):263-7.
- 18- Park F *et al* (2000). Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):1173-6.
- 19- Herder *et al* (2003). Sustained Expansion and Transgene Expression of Coagulation Factor VIII- Transduced Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Dec 23 (12) 2266-72.
- 20- Tonn T *et al*. Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor FVIII. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell.* 2002 Aug. 11(4) ; 695-704
- 21- Becker S *et al*. Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells. *Artigo aceito pela revista Thromb. Hemost.*