

Plataforma Lentiviral Otimizada para Produção Escalonável de GCase Recombinante e Sintética Humana: Clones Celulares para Aplicação em Terapia Enzimática e Gênica na Doença de Gaucher

Ana Carolina Coelho¹; Frederico G.F. Lobão Rodrigues Gomes¹; Claudia Emília Vieira Wiezel¹; Gabriella Macedo Mascarenhas Diniz¹; Jéssica Luana Souza Cardoso¹; Vania D’Almeida²; Velia Siciliano³; Ron Weiss⁴; Stanton Gerson⁵; **Aparecida Maria Fontes^{1*}**

¹Departamento da Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; ²Escola de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; ³Istituto Italiano di Tecnologia, Center for Advanced Biomaterials for Healthcare, Italy; ⁴Synthetic Biology Center, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, EUA; ⁵Case Comprehensive Cancer Center, Case Western Reserve University, EUA.*e-mail: aparecidamfontes@usp.br

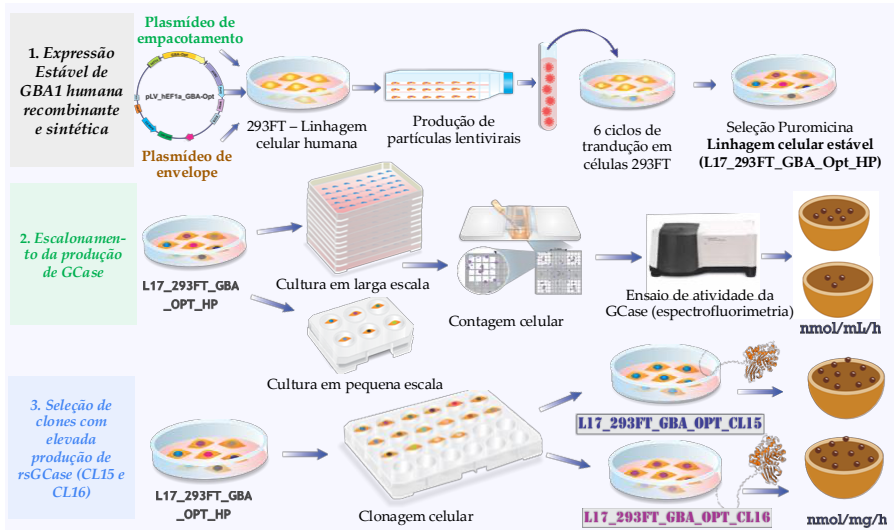
INTRODUÇÃO

A **Doença de Gaucher (DG)** é uma condição genética com **padrão de herança autossômica recessiva** causada por mutações no gene **GBA1**, levando à deficiência da enzima lisossomal β -glicocerebrosidase (GCase) (Grabowski, 2008, Elstein et al 2024). A **terapia de reposição enzimática (TER)** com GCase recombinante é o tratamento padrão, mas seu alto custo e dependência de importações comprometem a sustentabilidade no tratamento no Brasil.

OBJETIVO

Neste estudo, desenvolvemos uma **plataforma lentiviral (LV)** contendo **GBA1 códon-otimizado** sob promotor hEF1 α , com o objetivo de estabelecer linhagens celulares humanas **293FT** produtoras de β -glicocerebrosidase (GCase) recombinante e sintética, visando aplicações em TRE e terapia gênica no Brasil

METODOLOGIA



O vetor lentiviral **LV_EF1 α _GBA_Opt** foi construído utilizando biologia sintética (gBlocks e PCR overlap) e clonado pelo sistema Gateway. Partículas virais foram concentradas e tituladas por qPCR (**$7,88 \times 10^8$ partículas/ mL**). Células 293FT foram transduzidas em seis ciclos (**MOI 30–50**) com spinoculação e seleção com puromicina, gerando a população heterogênea **L17_293FT_GBA_OPT_HP**. Onze clones foram isolados por plaqueamento e expandidos. A atividade de GCase foi quantificada por **ensaio fluorimétrico** (4-MUG) em lisados e sobrenadantes. A **escalabilidade** foi avaliada em cultura de 10 layers (560 mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população **L17_293FT_GBA_OPT_HP** apresentou atividade enzimática secretada de **$459,5 \pm 24,82$ nmol/ mL**, com aumento de 62,4 vezes em relação ao controle ($7,04 \pm 0,4$ nmol/mL/h; $p < 0,0001$). A atividade intracelular foi de **$307,5 + 53,5$ nmol/ mg proteína/h**, superior à do controle ($95,6 \pm 16,5$ nmol/mg/h; $p = 0,0026$ (Figura 1).

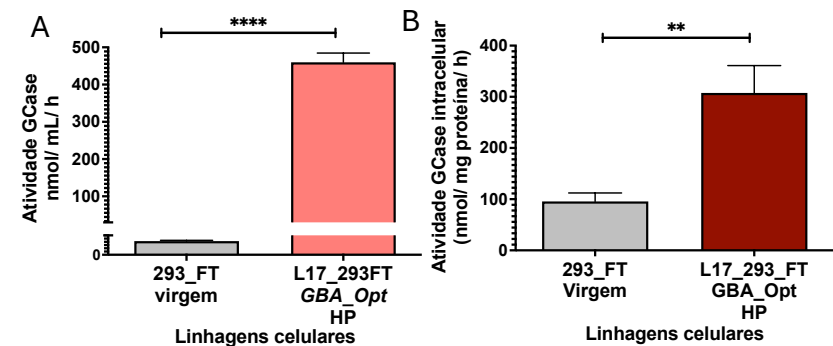


Figura 1: Atividade da GCase recombinante: em sobrenadantes (A) e lisados de células (B) L17_293FT_GBA_OPT_HP após seleção com puromicina.

A linhagem **L17_293FT_GBA_OPT_HP** manteve a atividade enzimática em diferentes volumes de cultivo, produzindo **209,52 nmol/mL/h** em placa de 6 poços e **201.931 nmol/mL/h** no sistema de 10 camadas (Figura 2).

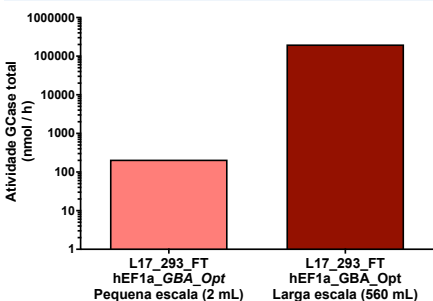


Figura 2: Produção de GCase em larga escala: aumento de 963 vezes no total secretado, com 96,4% da eficiência mantida em relação à pequena escala.

Após a seleção com puromicina, foram isolados **11 clones** derivados da população **L17_293FT_GBA_OPT_HP** (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade enzimática da GCase em clones isolados da linhagem L17_293FT_GBA_OPT_HP.

Clones	Atividade GCase nmol/mL/h	Clones	Atividade GCase nmol/mL/h
L17_CL5	265,087	L17_CL_13	440,95
L17_CL7	89,911	L17_CL_15	585,464
L17_CL8	230,045	L17_CL_16	683,952
L17_CL9	301,160	L17_CL_17	207,610
L17_CL10	118,907	L17_CL_18	167,931
L17_CL11	285,561		

Os **11 clones** revelaram ampla variação produtiva: três (27%) com alta produção (**>400 nmol/mL/h**), cinco (45%) moderada (**200-400 nmol/mL/h**), e três (28%) baixa produção (<200 nmol/mL/h). **CL15 e CL16** destacaram-se como **mais promissores** (Tabela 1). Também observou-se que a morfologia dos mesmos foi mantida (Figura 3A - clone 16) e os níveis de atividade intracelular foram: **CL15** com **$763,8 \pm 135,1$ nmol/mg/h** e **CL16** com **$752,0 \pm 152,1$ nmol/mg/h** 5 (Figura 3B).

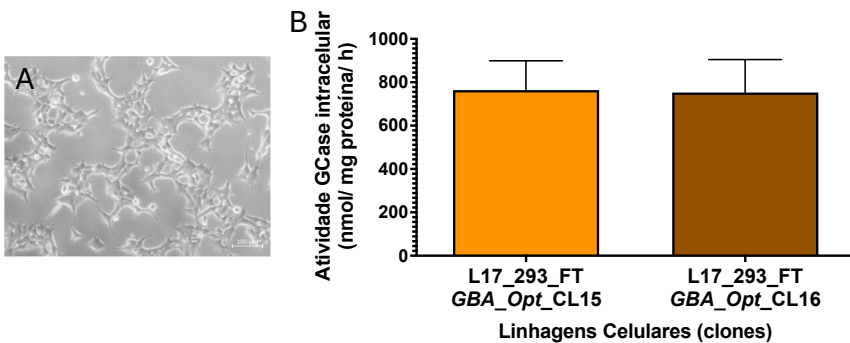


Figura 3: Análise morfológica do clone 16 (A) e atividade GCase intracelular dos clones 15 e 16 (B).

CONCLUSÃO

A plataforma desenvolvida combina **otimização de códon**, expressão sob promotor **hEF1 α** e **vetores lentivirais**, resultando em clones com alta produtividade de GCase. Os resultados apoiam sua aplicação translacional em **TER** e **terapia gênica** para a **Doença de Gaucher**.

REFERÊNCIAS

Grabowski, Lancet 2008, 372:1263-1271; Elstein et al., 2024. J Clin Med 13.

AGRADECIMENTOS

