



DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO COM MEIOS CONCENTRADOS PARA CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS EM PERFUSÃO

Ioná Walter Bettinardi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

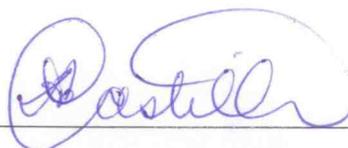
Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO COM MEIOS
CONCENTRADOS PARA CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS EM PERFUSÃO

Ioná Walter Bettinardi

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:



Prof^a Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.



Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.



Eng. Alvio Figueredo Cardero, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2016

Bettinardi, Ioná Walter

Desenvolvimento de Estratégias de Alimentação com Meios Concentrados para Cultivo de Células Animais em Perfusão/ Ioná Walter Bettinardi. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2016.

XI, 104 p.: il.; 29,7 cm

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2016.

Referências Bibliográficas: p. 96-104.

1. Células animais. 2. Biofármacos. 3. Perfusão. 4. Estratégia de alimentação. I. Castilho, Leda dos Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

À Prof^ª Leda, por viabilizar esse trabalho em seus aspectos técnicos e financeiros e, principalmente, por acreditar no meu potencial de realização.

Aos membros da banca, Prof^º Ricardo A. Medronho e Dr. Alvio F. Cardero, pelo aceite ao meu convite e pelas sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC), pelos ensinamentos e pelo convívio diário. Em especial, ao Alexandre, pela amizade e caronas nos fins-de-semana ao Fundão; à Juliana, pelos ensinamentos em perfusão; à Thayana, por compartilharmos as nossas experiências no árduo caminho da pesquisa; ao Igor, por incentivar o pensamento crítico. Um agradecimento especial à Renata, pela dedicação em manter o laboratório em funcionamento.

Ao Dr. Ernesto Chico (CIM – Cuba), pelos ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Ricardo Teixeira, do Laboratório Bioetanol, pelo uso do YSI.

Ao Célio, do NUCAT, por me ajudar com as instalações das linhas de gases.

À Mary, sempre disposta a ajudar nas questões burocráticas.

Aos Professores Tito Alves e Fábio Toniolo, pelas sugestões nos seminários de acompanhamento.

Aos colegas, professores e funcionários do PEQ, pelo companheirismo, dedicação e lições aprendidas.

Ao Troner, por incentivar o meu ingresso à COPPE.

Ao “Bonde do Rui”: Bruna, Hudson, Mariana Carvalho, Mariana Galassi, Nathália, Sara e, claro, Rui. Esse trabalho deve muito a vocês por eu chegar sempre às 8h ao Fundão.

Ao “Biotec in Rio”, amigos da graduação: Reinaldo, Siew, Paulo, Pércio e André. À Fernanda, pela longa e sincera amizade, e pelo alicerce emocional durante a minha estadia no Rio.

Aos meus pais, Maurício e Edicléa. Simplesmente por tudo.

À Iara. É um privilégio tê-la como irmã.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Àqueles que aqui não mencionei, e que de alguma forma contribuíram e participaram nessa empreitada.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO COM MEIOS CONCENTRADOS PARA CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS EM PERFUSÃO

Ioná Walter Bettinardi

Fevereiro/2016

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho, um meio de cultivo concentrado, originalmente desenvolvido para batelada alimentada, foi utilizado para alimentar um processo de perfusão com células CHO produtoras de um anticorpo monoclonal recombinante. Diferentes estratégias de alimentação, baseadas na aplicação de taxas de diluição inversamente proporcionais à concentração de nutrientes essenciais no meio e na manutenção de uma baixa concentração de glicose, foram comparadas à alimentação com o meio de cultivo basal por meio de estudos em pequena escala em modo pseudoperfusão. A concentração de produto obtida com o meio concentrado foi maior em comparação à alimentação com o meio basal, porém a produtividade volumétrica diminuiu devido à menor concentração de células viáveis (X_v). A utilização do meio concentrado acarretou em uma elevação gradual de até cerca de 60% na osmolalidade, o que possivelmente reduziu a viabilidade celular ao longo do cultivo. Em corridas de perfusão realizadas em um biorreator de bancada utilizando um sedimentador inclinado como dispositivo de retenção celular, a viabilidade, a concentração de células viáveis e a concentração de anticorpo passaram por um pico e depois decresceram. Nestas corridas em biorreator, o acúmulo de lactato e o aumento da osmolalidade provavelmente foram os responsáveis pela inibição de crescimento, perda de produtividade e presença de turbidez no perfundido.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DEVELOPMENT OF FEEDING STRATEGIES USING CONCENTRATED MEDIA
FOR ANIMAL CELL PERFUSION PROCESSES

Ioná Walter Bettinardi

February/2016

Advisor: Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

In the present study, a concentrated medium originally developed for fed-batch processes was used to feed a recombinant CHO cell perfusion process for monoclonal antibody production. Different feeding strategies, based on dilution rates inversely proportional to the concentration of essential nutrients in the feed media, and aiming to maintain glucose at low level, were compared to the control condition fed with basal medium through small-scale pseudo-perfusion runs. The antibody titer in concentrated perfusion was higher than in the control condition, although volumetric productivity was reduced due to lower viable cell concentration (X_v). Moreover, a gradual increase of up to 60% in osmolality was observed, which possibly reduced cell viability over the whole cultivation time. In perfusion runs using a bench-scale bioreactor fitted with an inclined settler as cell retention device, cell viability, X_v and product titer achieved peak levels and were then decreased. Lactate accumulation and osmolality increase were probably responsible for the growth inhibition, productivity loss and turbidity observed in the perfusate stream.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xi
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	4
2.1 Anticorpos	4
2.2 Anticorpos monoclonais (mAb).....	7
2.2.1 <i>Mercado dos mAbs.....</i>	<i>9</i>
2.2.2 <i>Aplicação dos mAbs</i>	<i>10</i>
2.3 Produção de mAbs por cultivo de células animais.....	16
2.3.1 <i>Linhagens para produção de mAbs.....</i>	<i>18</i>
2.3.2 <i>Cultivo em biorreatores de tanque agitado.....</i>	<i>19</i>
2.3.2.1 <i>Nutrientes e metabólitos.....</i>	<i>20</i>
2.3.2.2 <i>Parâmetros físicos.....</i>	<i>22</i>
2.3.3 <i>Modos de operação de biorreatores</i>	<i>24</i>
2.3.4 <i>Batelada alimentada.....</i>	<i>26</i>
2.3.5 <i>Perfusão.....</i>	<i>28</i>
2.3.5.1 <i>Equipamentos de retenção.....</i>	<i>31</i>
2.3.5.2 <i>Controle e operação de reatores em perfusão.....</i>	<i>33</i>
2.3.5.3 <i>Processos de perfusão em pequena escala</i>	<i>35</i>
2.3.6 <i>Perfusão com alimentação controlada.....</i>	<i>36</i>
3 Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 Materiais e Métodos	41
4.1 Linhagem celular	41
4.2 Manutenção dos cultivos celulares	41
4.2.1 <i>Meio de cultivo.....</i>	<i>41</i>
4.2.2 <i>Banco de trabalho.....</i>	<i>42</i>
4.2.3 <i>Condições de cultivo</i>	<i>42</i>
4.3 Ensaios analíticos	43
4.3.1 <i>Concentração de células e viabilidade celular.....</i>	<i>43</i>

4.3.2	<i>Concentração de glicose e lactato</i>	43
4.3.3	<i>Concentração de anticorpo</i>	44
4.3.4	<i>Osmolalidade</i>	45
4.4	Ensaio de pseudoperfusão (PP)	45
4.4.1	<i>Primeiro ensaio para avaliação da pseudoperfusão (PP 1): comparação com batelada</i>	46
4.4.2	<i>Segundo ensaio de pseudoperfusão (PP 2): comparação entre alimentação com TC-LECC e TCx2D</i>	47
4.4.3	<i>Terceiro ensaio de pseudoperfusão (PP 3): alimentação com diferentes misturas de TC-LECC e TCx2D</i>	47
4.4.4	<i>Ensaio em PP para avaliação do método adaptativo</i>	48
4.5	Ensaio de perfusão em biorreator	50
4.6	Cálculos	53
4.6.1	<i>Fração de volume de troca (%)</i>	53
4.6.2	<i>Taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ_{exp})</i>	54
4.6.3	<i>Taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}), de formação de lactato (q_{lac}) e de mAb (q_{mab})</i>	54
4.6.4	<i>Produtividade volumétrica (P_v)</i>	55
5	Resultados e Discussão	57
5.1	Preparo do banco de trabalho de células CHO DP-12	57
5.2	Ensaio de pseudoperfusão	58
5.2.1	<i>Ensaio PP 1</i>	58
5.2.1.1	<i>Batelada (condição 1)</i>	58
5.2.1.2	<i>Pseudoperfusão (condições 2 e 3)</i>	62
5.2.2	<i>Ensaio PP 2</i>	66
5.2.3	<i>Ensaio PP 3</i>	72
5.2.4	<i>Ensaio em PP – método adaptativo</i>	79
5.3	Ensaio em biorreatores em perfusão	83
5.3.1	<i>Alimentação com TCx2D (ensaio BIO007)</i>	83
5.3.2	<i>Alimentação com TC-LECC:TCx2D 1:1 (ensaio BIO008)</i>	87
6	Conclusões e Sugestões	94
7	Referências Bibliográficas	96

Lista de Figuras

Figura 2.1. Representações de um anticorpo típico IgG, na forma da letra Y. a) Composição das quatro cadeias e seus domínios de imunoglobulina variáveis (V_L e V_H) e constantes (C_L , C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}), unidas por meio de pontes dissulfídicas; b) Molécula de anticorpo apresentando as cadeias pesadas (verde), as cadeias leves (amarelo), a região constante (sombreado em azul) e a região variável (sombreado em rosa). c) As regiões determinantes de complementaridade (CDR), que conferem a especificidade na ligação anticorpo-antígeno. Figuras a) e b) adaptadas de MURPHY <i>et al.</i> (2010). Figura c) adaptada de TAMASHIRO e AUGUSTO (2008).	5
Figura 2.2. As cinco classes de imunoglobulinas. Os domínios das cadeias leves estão apresentados nas cores vermelho e roxo, e os das cadeias pesadas, em verde e azul. Os símbolos em laranja correspondem às N-glicanas, e em amarelo, às O-glicanas. Adaptado de SPEARMAN <i>et al.</i> (2011).	6
Figura 2.3. Relação entre produção anual e volume para diferentes níveis de produtividade volumétrica. Adaptado: CHICO <i>et al.</i> (2008).	18
Figura 2.4. Fatores que influenciam na sobrevivência das células em biorreator. Adaptado: KUYSTERMANS e AL-RUBEAI (2011).	20
Figura 2.5. Representação esquemática de um processo de perfusão com equipamento de retenção celular externo ao reator. Para as correntes ilustradas (entrada, saídas e recirculação), geralmente são empregadas bombas peristálticas. Adaptado: CHOTTEAU (2015).	28
Figura 4.1. a) Biorreator RALF Plus 3,4 L (BioEngineering) operando em perfusão, utilizando o sedimentador inclinado CS10 como equipamento de retenção. b) Frascos tipo <i>carboy</i> de polipropileno autoclaváveis (Nalgene) contendo meio de alimentação (lado esquerdo) e perfundido (lado direito), mantidos a 4°C.	51
Figura 4.2. a) Sedimentador inclinado CS10 com trocador de calor, módulo de vibração acoplado (peça vermelha) e alinhado a 30° em relação à vertical. B) Interior do sedimentador, em que se visualizam as lamelas. Fontes: LAGES (2015); Biotechnology Solutions (2007).	52
Figura 5.1. Perfis de concentração de células viáveis e de viabilidade obtidos em passagens em meio TC-LECC para a produção do banco de trabalho (WCB) CHO DP-12.	58
Figura 5.2. Curvas de crescimento celular e de viabilidade para batelada (condição 1, ensaio PP 1), realizada em <i>tubespín</i> . Dados apresentados na forma média±desvio-padrão (DP) para triplicata biológica.	59
Figura 5.3. Perfis de concentração de glicose e de lactato obtidos em cultivo em batelada (condição 1, ensaio PP 1). Dados apresentados como média±DP para triplicata biológica.	60
Figura 5.4. Análise do perfil metabólico para consumo de glicose e produção e/ou consumo de lactato em cultivo em batelada. A inclinação das curvas indica as respectivas taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc} – valores com sinal positivo) e lactato (q_{lac}) em um dado ponto.	61
Figura 5.5. a) Curva de concentração de anticorpo anti-IL8 produzido em batelada (dados apresentados como média±DP em triplicata biológica). b) Relação entre ICV e concentração de mAb; a inclinação da curva representa q_{mab} no ponto avaliado.	62
Figura 5.6. Curvas de concentração de células viáveis, viabilidade e taxa de diluição referentes às condições 1 (batelada), 2 (TC-LECC) e 3 (TCx2D). Dados apresentados como média±DP para triplicata biológica.	63
Figura 5.7. Perfis de concentração de (a) glicose e de (b) lactato para as condições 2 e 3, ensaio PP 1 (média±DP para triplicata biológica). A partir do dia 6 (início da alimentação), foram plotados os valores de concentração antes e após a troca de meio.	64
Figura 5.8. Concentração de mAb referente às condições 1 (batelada), 2 e 3 (média±DP para triplicata biológica).	66
Figura 5.9. Curvas de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) referentes às condições 1 (TC-LECC), 2 (TCx2D) e controle (um <i>tubespín</i> em batelada simples). Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica (exceto batelada).	67

Figura 5.10. Perfis de concentração de glicose (a) e de lactato (b) para as condições 1, 2 e batelada, ensaio PP 2 (média±DP para duplicata biológica, exceto batelada).....	69
Figura 5.11. Perfil de osmolalidade para as condições 1, 2 e batelada, ensaio PP2. Dados apresentados como média±DP em duplicata biológica (exceto batelada).....	71
Figura 5.12. Perfil de concentração de mAb referente às condições 1, 2 e batelada (média±DP para duplicata biológica, exceto batelada).....	72
Figura 5.13. Curva de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) para as condições 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e), ensaio PP 3. Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica.....	74
Figura 5.14. Concentração de glicose e de lactato para as condições 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e), ensaio PP 3. Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica.	75
Figura 5.15. Perfil de concentração de mAb referente às condições 1, 2, 3, 4 e 5 (média±DP para duplicata biológica).	78
Figura 5.16. Curva de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) obtidas nos ensaios de avaliação do método adaptativo “ad1” e “ad2”.	80
Figura 5.17. Perfis de concentração de glicose (a) e de lactato (b) para as ensaios “ad1”(dados apresentados como média±DP obtidos de triplicata biológica) e “ad2”(média±DP para duplicata biológica).	81
Figura 5.18. Perfil de concentração de mAb para os ensaios “ad1” (média±DP para triplicata biológica) e “ad2” (média±DP para duplicata biológica). Para a sequência “mAb_ad2”, são apresentados os dados a partir do início da alimentação (dia 5), quando foi possível coletar um maior volume de amostra necessário para a quantificação de produto.	82
Figura 5.19. Curvas de concentração celular e de viabilidade, e perfil da taxa de diluição do perfundido (vvd), utilizando meio TCx2D como meio de alimentação, ensaio BIO007. Dados apresentados como média±DP em duplicata analítica.	84
Figura 5.20. Perfil de glicose e lactato, ensaio BIO007. Dados apresentados como média±DP em duplicata analítica.....	85
Figura 5.21. Perfil de osmolalidade, ensaio BIO007. Dados apresentados como média±DP em duplicata analítica.....	86
Figura 5.22. Perfis de concentração de mAb de amostras coletadas do biorreator e de corrente de perfundido, ensaio BIO007 (dados em média±DP em duplicata analítica).....	87
Figura 5.23.a) Perfis de X_v (média±DP em duplicata analítica) e viabilidade avaliados no reator, e de células viáveis presentes no perfundido (X_{v_perf}). b) Perfis de X_v (reator), da taxa de diluição referente ao perfundido (D_p) e de purga (D_B).	89
Figura 5.24. Concentração de glicose e lactato, ensaio BIO008 (dados apresentados como média±DP em duplicata analítica).....	90
Figura 5.25. Taxa específica de crescimento, ensaio BIO008 (perfusão iniciada no dia 3).	91
Figura 5.26. Perfil das taxas metabólicas de consumo de glicose (q_{glc} , em valores absolutos), formação/consumo de lactato (q_{lac}) e produção de anticorpo (q_{mab}), ensaio em biorreator BIO008.	92
Figura 5.27. Perfil de mAb (dados em média±DP em duplicata analítica) e osmolalidade monitorados ao longo do ensaio em biorreator BIO008.....	92

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Produtos baseados em mAbs aprovados para uso terapêutico pelo FDA e EMA, ordenados por cronologia de aprovação. Atualização: março de 2016. Adaptado: ACTIP (2013); WALSH (2014); The Antibody Society (2015). NA – não aprovado	12
Tabela 2.2. Comparação entre os modos de operação de biorreatores utilizados no cultivo de células animais. Adaptado: FIKE (2009).....	25
Tabela 2.3. Comparação entre batelada alimentada, perfusão e perfusão com diferentes estratégias de controle na alimentação. Os valores de CSPR não foram determinados para TENG <i>et al.</i> (2011) devido à ausência de monitoramento de X_v . NA – não aplicável.....	39
Tabela 5.1. Estabelecimento de novas taxas de diluição para cada uma das cinco condições avaliadas no ensaio PP 3, recalculadas em função da concentração de glicose real.....	72
Tabela 5.2. Valores de osmolalidade (mOsm/kg) medidos nos dias 4, 7, 11 e 15 para as cinco condições avaliadas no ensaio PP 3. Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica. Na condição 5, as medições para os dias 4, 11 e 15 não apresentam o desvio-padrão devido a falhas na determinação da osmolalidade.	73

1 Introdução

Os biofármacos são proteínas ou derivados de ácidos nucleicos produzidos por formas alternativas à extração direta de organismos naturalmente (não-recombinantes) produtores, e são destinados a aplicações terapêuticas ou para uso como ferramentas de diagnóstico *in vivo* (WALSH, 2002). Os anticorpos monoclonais (mAbs) constituem a classe de proteínas terapêuticas mais estudada e utilizada atualmente, aprovados para o tratamento de uma variedade de doenças que afligem desde alguns milhares de pacientes com síndromes raras, como a hemoglobinúria paroxística noturna; centenas de milhares que padecem de câncer e esclerose múltipla; e milhões de pessoas que sofrem de asma e doenças autoimunes (MELLADO e CASTILHO, 2008; ECKER *et al.*, 2015).

No período de 2010 a 2014, o mercado de biofármacos cresceu a taxas constantes, atingindo um valor de vendas mundiais de US\$ 140 bilhões em 2013. Sete dos 10 biofármacos mais vendidos no mundo são mAbs e derivados, os quais corresponderam a US\$ 54,2 bilhões em 2013. Atualmente, os mAbs representam cerca de 30% dos biofármacos aprovados pelas agências reguladoras dos EUA e da Europa (WALSH, 2014).

Na lista de 2015 de produtos considerados estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, dos 21 itens, 11 são medicamentos, sendo seis biológicos. Diante da necessidade de gerar uma economia na ordem de R\$ 4,1 bilhões por ano nas compras públicas, e com o intuito de estabelecer as tecnologias de produção no Brasil, o Ministério da Saúde tem incentivado a formação das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) envolvendo laboratórios públicos e privados. Dentre os produtos que receberam o interesse de empresas, destacam-se o adalimumabe, o infliximabe e o rituximabe, anticorpos usados no tratamento de artrite reumatoide (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

As células de mamíferos recombinantes representam o principal sistema de produção de biofármacos, devido à sua capacidade em realizar a correta síntese, enovelamento e as modificações pós-traducionais que conferem atividade biológica à proteína de interesse (AL-RUBEAI, 2015). As terapias com anticorpos exigem a aplicação de altas doses por um longo período de tratamento, uma demanda que tem sido atendida pela indústria biofarmacêutica com a instalação de biorreatores com

capacidade de milhares de litros operando geralmente em batelada alimentada (GAUGHAN, 2015).

A partir da seleção de linhagens altamente produtivas e com o avanço das tecnologias de produção na fase de *upstream*, que incluem melhorias na composição de meios e no controle de processos, a concentração do produto de interesse obtida em bioprocessos com células animais alcançou valores na ordem de gramas por litro, mais de 100 vezes superior em relação aos processos desenvolvidos na década de 80, e comparável a sistemas de produção baseados em bactérias e leveduras (WURM, 2004; LI *et al.*, 2010; JOSTOCK, 2011). A batelada alimentada e a perfusão são as modalidades que podem fornecer as maiores produtividades na operação de biorreatores para a produção de mAbs, cuja produtividade volumétrica é superior em relação à batelada simples (CHICO *et al.*, 2008; GAUGHAN, 2015). Apesar das vantagens de cada modo de operação em relação à complexidade de operação e à manutenção de condições favoráveis à produção em estado estacionário, a estratégia e a composição do meio de alimentação devem ser estudadas para cada processo, a fim de garantir o suprimento de nutrientes, minimizar a formação de metabólitos secundários tóxicos e fornecer o produto de interesse em elevada concentração (FIKE, 2009). A perfusão com alimentação controlada (*controlled-fed perfusion*) consiste em reduzir as taxas de diluição aplicadas a uma perfusão por meio da alimentação com uma solução concentrada dos nutrientes mais consumidos pelas células, de modo a manter uma elevada produtividade volumétrica, prover o produto em uma forma mais concentrada para as etapas de purificação e reduzir os custos relativos à produção e estocagem de grandes volumes de meio e de perfundido (YANG *et al.*, 2000; CHOTTEAU, 2015).

No presente trabalho, foram avaliadas estratégias de alimentação com meios concentrados para um processo de cultivo em perfusão da linhagem CHO DP-12 produtora de um anticorpo monoclonal anti-IL-8 recombinante. Para comparar as estratégias de alimentação entre o meio de cultivo basal e um meio concentrado, ambos isentos de componentes de origem animal, foram inicialmente realizados experimentos em pseudoperfusão (processo semicontínuo ou intermitente). Foram avaliados o perfil de crescimento celular, o consumo de nutrientes, a formação de metabólitos e a produtividade. Posteriormente, algumas estratégias utilizando meio concentrado foram avaliadas em um biorreator em escala de bancada, utilizando um sedimentador inclinado como equipamento de retenção de células. Este trabalho inaugurou a linha de pesquisa

de produção de anticorpos monoclonais no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC), do Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas do grupo das imunoglobulinas presentes na circulação, tecidos e mucosas, secretadas por linfócitos B diferenciados em resposta à exposição a estruturas estranhas ao organismo, conhecidas como antígenos (ROQUE *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2008; MURPHY *et al.*, 2010). A estrutura molecular confere duas funções ao anticorpo: o reconhecimento do agente patogênico que induziu a resposta imune, por meio de uma ligação específica ao antígeno; e o recrutamento de outras células e moléculas que vão destruir o patógeno ao qual o anticorpo se ligou, conhecido como função efetora (MURPHY *et al.*, 2010)

A representação esquemática típica de uma imunoglobulina da classe G (IgG) assume a forma da letra Y (Figura 2.1). A molécula, com massa de aproximadamente 150 kDa, é composta de duas cadeias pesadas idênticas C_H (*heavy chain*), cada uma com 50 kDa, e duas cadeias leves idênticas C_L (*light chain*), com 25 kDa cada. Ligações dissulfídicas unem ambas as cadeias pesadas, assim como cada cadeia pesada a uma cadeia leve (Figura 2.1c). Cada cadeia consiste em uma série de domínios de imunoglobulina, sequências similares, compactadas, com cerca de 110 aminoácidos de comprimento. A cadeia leve possui dois domínios: o variável (V_L), correspondente à porção aminoterminal da cadeia, e o constante (C_L). A cadeia pesada contém quatro domínios, sendo a porção aminoterminal do tipo variável (V_H), e as demais do tipo constante, designadas como C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} (Figura 2.1a). Juntos, os domínios variáveis de ambas as cadeias compõem a região variável do anticorpo (Figura 2.1b), onde ocorre a ligação ao antígeno. Os demais domínios correspondem à região constante, que é glicosilada, e confere a função de elicitar as células de defesa do sistema imune.

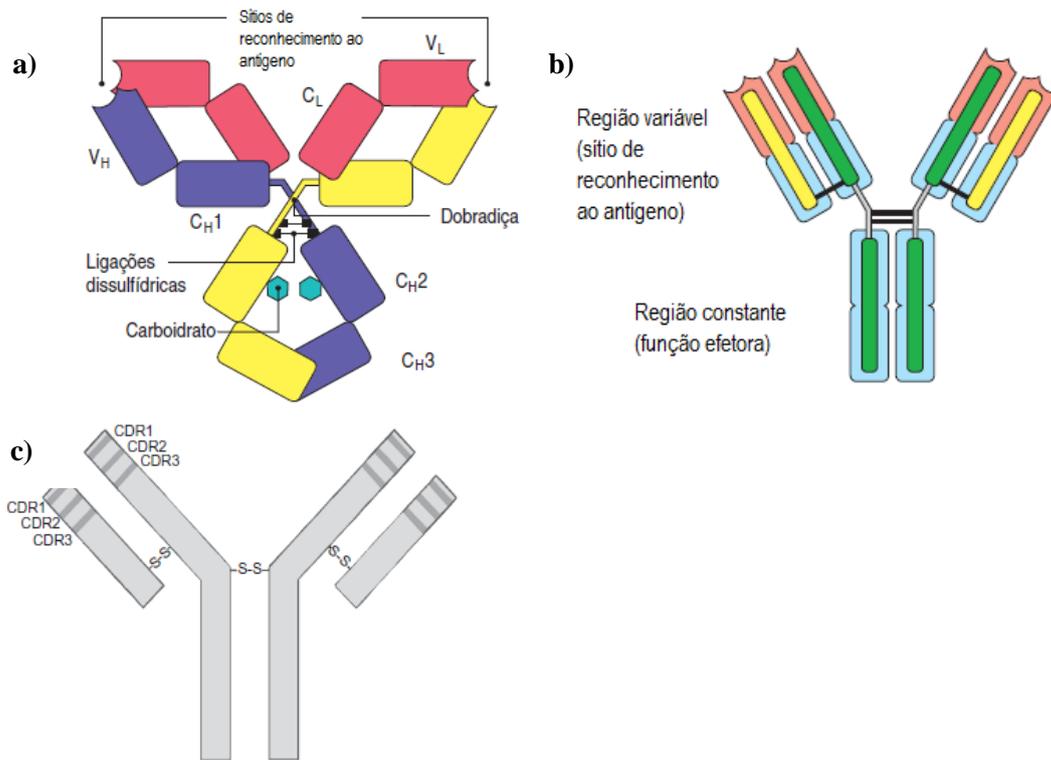


Figura 2.1. Representações de um anticorpo típico IgG, na forma da letra Y. a) Composição das quatro cadeias e seus domínios de imunoglobulina variáveis (V_L e V_H) e constantes (C_L , C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}), unidas por meio de pontes dissulfídicas; b) Molécula de anticorpo apresentando as cadeias pesadas (verde), as cadeias leves (amarelo), a região constante (sombreado em azul) e a região variável (sombreado em rosa). c) As regiões determinantes de complementaridade (CDR), que conferem a especificidade na ligação anticorpo-antígeno. Figuras a) e b) adaptadas de MURPHY *et al.* (2010). Figura c) adaptada de TAMASHIRO e AUGUSTO (2008).

A especificidade na ligação do anticorpo a um antígeno particular é conferida por regiões hipervariáveis presentes nos domínios variáveis do anticorpo, conhecidas como regiões determinantes de complementaridade ou CDRs (Figura 2.1c). Há três CDRs para cada cadeia, sendo que, nas cadeias pesadas, elas compreendem os resíduos de aminoácidos da posição 30 a 36, 49 a 65 e 95 a 103, enquanto que, nas cadeias leves, elas correspondem aos trechos entre os aminoácidos 28 a 35, 49 a 59 e 92 a 103. A combinação das CDRs de ambos os domínios V_L e V_H determina a especificidade antigênica final (MURPHY *et al.*, 2010).

Os isotipos das cadeias leves podem ser do tipo κ ou λ , que se diferenciam por suas regiões constantes. Uma molécula de anticorpo pode ter duas cadeias leve tipo κ ou duas tipo λ , mas não uma de cada tipo (ABBAS *et al.*, 2008). As regiões constantes das cadeias pesadas, também designadas por letras gregas, assumem um número limitado de formas, o que confere a classificação das imunoglobulinas nas classes IgG

(γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) e IgE (ϵ), conforme mostrado na Figura 2.2. Anticorpos do tipo IgG, IgD e IgE são monoméricos, enquanto que IgA apresenta a forma dimérica em secreções como lágrima e saliva, totalizando quatro sítios de ligação. IgM é composto de cinco unidades monoméricas, possuindo 10 sítios de ligação. Em humanos, IgG é a imunoglobulina mais abundante e apresenta-se nas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (MURPHY *et al.*, 2010).

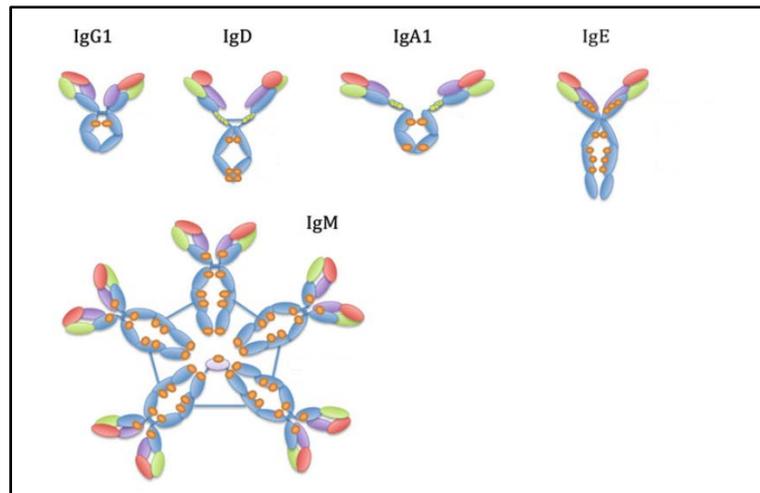


Figura 2.2. As cinco classes de imunoglobulinas. Os domínios das cadeias leves estão apresentados nas cores vermelho e roxo, e os das cadeias pesadas, em verde e azul. Os símbolos em laranja correspondem às N-glicanas, e em amarelo, às O-glicanas. Adaptado de SPEARMAN *et al.* (2011).

Enzimas proteolíticas são empregadas para caracterizar a estrutura e a função dos segmentos das cadeias polipeptídicas dos anticorpos. Na presença de uma protease chamada papaína, o anticorpo é separado em três fragmentos. Dois fragmentos idênticos, denominados fragmentos F_{ab} (*fragment antigen binding*), possuem a atividade de ligação ao antígeno, pois correspondem aos braços da molécula formados pelas cadeias leves completas pareadas com os domínios V_H e C_{H1} da cadeia pesada. O fragmento F_c (*fragment crystallizable*), que compreende os domínios constantes C_{H2} e C_{H3} de ambas as cadeias pesadas unidas pelas ligações dissulfídicas da região da dobradiça, corresponde à região do anticorpo reconhecida pelas células efectoras do sistema imune, sendo também responsável pela ativação do complemento pela via clássica para a destruição de micro-organismos (MURPHY *et al.*, 2010).

2.2 Anticorpos monoclonais (mAb)

O conjunto de diferentes anticorpos produzidos por indivíduos humanos é extenso, com 10^7 a 10^8 moléculas diferentes. Cada linfócito B só produz um anticorpo específico que reconhece uma única região (epítipo) do antígeno (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). Durante a imunização, os linfócitos B que reconhecem os determinantes antigênicos passam a se propagar clonalmente, o que eleva o título de anticorpos provenientes de diferentes clones específicos para aquele antígeno.

Desde o século XIX, cientistas buscavam investigar como o sistema imune era capaz de produzir tantos tipos diferentes de anticorpo com especificidade única. Entretanto, o isolamento e a purificação de anticorpos específicos era um desafio (MARKS, 2015). Os antissoros obtidos a partir de imunização de animais, apesar de sua utilidade, dificultam a caracterização dos anticorpos justamente devido à heterogeneidade das moléculas produzidas, além dos pequenos volumes obtidos e da falta de padronização na produção de lotes (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008; MURPHY *et al.*, 2010).

A produção *in vitro* dos anticorpos monoclonais (mAb), isto é, produzidos por um único clone de linfócito B, só foi possível com o advento da tecnologia de hibridomas em 1975 (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). Os pesquisadores Georges Köhler e Cesar Milstein desenvolveram uma técnica para a produção de hibridomas, células híbridas obtidas a partir da fusão de células esplênicas produtoras de anticorpos, geralmente de um camundongo, com células tumorais denominadas mielomas, também de origem murina. Os hibridomas assim gerados se proliferam indefinidamente secretando anticorpos específicos contra o antígeno usado para imunizar o doador das células esplênicas, e são selecionados aplicando-se diluições seriadas em placas de 96 poços, que teoricamente resultarão em uma única célula por poço. As colônias desenvolvidas são testadas para verificar se secretam o anticorpo de interesse e, em caso positivo, são expandidas para produção em massa do anticorpo. Como cada linhagem de hibridoma descende de uma única célula, todas as células de uma linhagem celular de hibridoma produzem a mesma molécula de anticorpo, chamado, assim, de anticorpo monoclonal (MURPHY *et al.*, 2010).

A preparação de hibridomas é a uma técnica laboriosa. Além disso, o principal problema da aplicação dos anticorpos de origem murina em seres humanos é a sua

imunogenicidade, o que desencadeia uma resposta do tipo HAMA (*human anti-murine antibody*), em que as moléculas introduzidas são reconhecidas como um antígeno pelo sistema imune do paciente, sendo rapidamente eliminadas pela circulação e reduzindo o efeito do tratamento (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). O desenvolvimento da biologia molecular e o conhecimento acumulado sobre a estrutura dos genes responsáveis pela codificação dos anticorpos permitiram desenvolver moléculas com características mais humanas e com potencial imunogênico reduzido (ROQUE *et al.*, 2004). As primeiras tentativas consistiram no desenvolvimento dos mAbs quiméricos, com composição humana de 60 a 70%, obtidos pela troca dos segmentos de DNA correspondentes às regiões variáveis de anticorpos humanos por aqueles relativos às regiões variáveis de um dado anticorpo murino. Apesar do potencial dos anticorpos quiméricos em promover uma resposta do tipo HACA (*human anti-chimeric antibody*), menos intensa em relação à HAMA, atualmente eles representam cerca de 20% dos anticorpos disponíveis no mercado (*The Antibody Society*, 2015). No início da década de 90, foram estabelecidos protocolos para produzir anticorpos 90 a 95% humanos, denominados mAbs humanizados, aplicando a recombinação gênica ou a substituição das regiões CDR no gene de um anticorpo humano pelas mesmas obtidas no gene de um anticorpo murino de especificidade desejada. Esse tipo de anticorpo apresenta em geral uma perda de afinidade em relação aos anticorpos murinos, porém as reações adversas são menos intensas (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). Atualmente, aproximadamente 38% anticorpos aprovados são humanizados (*The Antibody Society*, 2015). Portanto, devido às limitações de uso proporcionadas pelos mAbs quiméricos e humanizados, os anticorpos totalmente humanos apresentam-se como os candidatos mais promissores para a aprovação pelas agências reguladoras para uso terapêutico. De fato, em consulta à lista divulgada pela *The Antibody Society*, cerca de 40% dos mAbs aprovados ou em processo de revisão pelas agências regulatórias correspondem a anticorpos humanos. A produção de hibridomas a partir de células humanas não se apresenta como uma alternativa viável, tanto do ponto de vista ético quanto técnico, devido à dificuldade de obtenção de linfócitos B humanos contra o antígeno desejado, à baixa estabilidade dos mielomas humanos em cultivo *in vitro* e dos hibridomas obtidos e ao risco de contaminação por vírus e príons (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). A exemplo dos mAbs quiméricos e humanizados, as ferramentas de DNA recombinante também podem ser empregadas para introduzir genes de anticorpos humanos em outros organismos (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008; JOSTOCK, 2011). Uma possibilidade

é a produção de camundongos transgênicos *knock-out*, modificados de forma a secretar somente anticorpos humanos, para então extrair suas células esplênicas para a produção de hibridomas.

2.2.1 Mercado dos mAbs

Os anticorpos monoclonais correspondem à classe de biofármacos que mais cresce atualmente. Enquanto que no final da década de 80 os mAbs representavam um pouco mais de 10% dos produtos biológicos aprovados, durante o período entre 2010 e 2014 eles corresponderam a 27% das aprovações, sem incluir os derivados baseados na porção F_c (WALSH, 2014). Segundo um levantamento da *Evaluate Pharma*, o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos biofármacos atingiu a cifra de US\$ 419 bilhões em 2013. Dentre os 20 projetos de P&D de maior valor, nove correspondem ao desenvolvimento de drogas baseadas em mAbs. Nivolumabe (Bristol-Myers Squibb) e pembrolizumabe MK-3475 (Merck & Co.), desenvolvidos para o tratamento de câncer com ação sobre o mecanismo de morte apoptótica PD-1, assumem o primeiro e o segundo lugar, com os respectivos valores de US\$ 23,2 bilhões e US\$ 16,7 bilhões (EvaluateGroup, 2014).

Em 2013, sete dos 10 biofármacos mais vendidos no mundo foram anticorpos monoclonais e derivados, totalizando um valor de vendas mundiais de US\$ 54,2 bilhões. Humira (adalimumabe/ AbbVie & Esai) e Enbrel (etanercept/Amgen, Pfizer & Takeda) assumiram a primeira (US\$ 11 bilhões) e a segunda posição (US\$ 8,76 bilhões) entre os *top ten* de vendas, respectivamente. Em termos de aplicação, a maioria dos anticorpos e derivados foi comercializada para o tratamento de doenças inflamatórias ou autoimunes (US\$ 41 bilhões), seguido pelo câncer, com vendas de US\$ 26 bilhões, cifra esta que equivale a 29% do mercado de produtos oncológicos (WALSH, 2014).

Entre as principais razões que justificam o crescimento do mercado de mAbs estão a especificidade e a pureza, propriedades-chave que conferem a eficácia aos anticorpos como agentes terapêuticos. Apesar das inúmeras histórias de sucesso no desenvolvimento de anticorpos, muitos problemas ainda precisam ser superados. Para desenvolver uma terapia para uma doença em particular, os cientistas devem primeiro identificar e isolar o alvo a ser reconhecido, geralmente presente em pequena quantidade em uma complexa mistura de proteínas, o qual deve ser capaz de elicitar

uma resposta imune (McDONNELL, 2015). Recentemente, as ferramentas ômicas (genômica, proteômica etc.) têm auxiliado a compreender melhor os mecanismos relacionados à modulação de doenças em âmbito molecular (ECKER *et al.*, 2015).

Do ponto de vista industrial, os anticorpos podem ser facilmente incorporados em plataformas de produção de biofármacos previamente estabelecidas. Além disso, os riscos associados à segurança em testes clínicos são menores em relação a outros medicamentos, devido à sua maior tolerância e à alta especificidade. Diante de todas essas características, os mAbs são frequentemente selecionados como o primeiro candidato para ensaios clínicos que avaliam novas abordagens de tratamento, o que lhes confere uma vantagem do tipo *first-to-market* em caso de sucesso (ECKER *et al.*, 2015).

2.2.2 Aplicação dos mAbs

Os mAbs constituem uma opção para o tratamento de pelo menos 50 doenças, incluindo câncer, desordens autoimunes, problemas cardiovasculares, anemia e doenças infecciosas (MELLADO e CASTILHO, 2008; MARKS, 2015).

No tratamento de tumores, o mecanismo de ação da maioria dos anticorpos consiste no reconhecimento e na ligação específica a receptores da superfície das células cancerosas, o que mantém a integridade das células saudáveis e reduz os efeitos colaterais nos pacientes em comparação a terapias agressivas como a quimio e a radioterapia (MARKS, 2015). No caso de doenças autoimunes, em que o organismo reconhece elementos próprios como agentes estranhos, a abordagem mais comum é desenvolver anticorpos que se ligam à superfície dos linfócitos responsáveis pela resposta imune exacerbada (MELLADO e CASTILHO, 2008).

Os mAbs são os componentes-chave de inúmeros ensaios de diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, como testes de gravidez e ensaios de detecção e quantificação de metabólitos e de moléculas específicas relativas a uma determinada doença. São rotineiramente usados na determinação de tipo sanguíneo e em exames de detecção de doenças infecciosas como hepatite B e AIDS, o que garante a segurança em transfusões sanguíneas e em transplantes de órgãos. Além da área da saúde, outras atividades são contempladas pela aplicação de anticorpos, como por exemplo na agricultura, na

identificação de vírus em plantas e em rebanhos animais; na indústria alimentícia, na detecção de salmonela; e na pesquisa científica, com o uso consagrado em imunoensaios (MARKS, 2015).

O desenvolvimento de produtos baseados em anticorpos, como os ADC (*antibody-drug conjugates*), fragmentos, anticorpos biespecíficos e mesmo os anticorpos policlonais recombinantes são alguns exemplos de aplicações inovadoras dos mAbs. As modificações realizadas na estrutura dos anticorpos buscam, entre outros objetivos, aumentar a função efetora promovida pela porção F_c por meio da glicoengenharia ou substituição de aminoácidos específicos, permitir a penetração em tumores sólidos ou em locais de difícil acesso aos anticorpos inteiros, e a imobilização do antígeno pela ligação simultânea em diversos epítomos, reduzindo os riscos de fracasso da terapia com anticorpos (ROQUE *et al.*, 2004; TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008; WALSH, 2014).

A Tabela 2.1 apresenta um levantamento dos produtos baseados em anticorpos monoclonais para fins terapêuticos aprovados ou em processo de revisão pelas agências reguladoras dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA) e da Europa (*European Medicines Agency* - EMA). O nome não comercial dos anticorpos monoclonais termina com o sufixo *-mab* (*-mabe*, na língua portuguesa), precedido por designações (morfemas) relativas ao organismo de origem, estrutura e alvo (BioAtla, 2014). Os anticorpos de origem murina recebem o morfema *o* antes de *-mabe* (por exemplo, besilesomabe, muromomabe); os quiméricos, o morfema *xi* (abciximabe, rituximabe); os humanizados, o morfema *zu* (daclizumabe, trastuzumabe); e os humanos, o morfema *u* (belimumabe, adalimumabe).

Tabela 2.1. Produtos baseados em mAbs aprovados para uso terapêutico pelo FDA e EMA, ordenados por cronologia de aprovação. Atualização: março de 2016. Adaptado: ACTIP (2013); WALSH (2014); The Antibody Society (2015). NA – não aprovado

Nome	Nome comercial	Empresa	Forma	Linhagem produtora	Alvo	Indicação	Ano de aprovação	
							EUA (FDA)	UE (EMA)
Blinatumomabe	Blincyto	Amgen	mAb biespecífico murino	CHO	CD3/CD19 ^a	Leucemia	2015	2015
Secukinumabe	Cosentyx	Novartis	IgG1 humano	CHO	IL-17 ^b	Psoríase	2015	2015
Pembrolizumabe	Keytruda	Merck	IgG4 humanizado	CHO	PD-1 ^c	Melanoma	2015	2015
Mepolizumabe	Nucala	GSK	IgG1 humanizado	CHO	IL-5	Asma	2015	2015
Nivolumabe	Opdivo	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humano	CHO	PD-1	Melanoma	2015	2015
Alirocumabe	Praluent	Sanofi-Aventis	IgG1 humano	CHO	PCSK9 ^d	Hipercolesterolemia	2015	2015
Idarucizumabe	Praxbind	Boehringer Ingelheim	F _{ab} (IgG1) humanizado	CHO	Dabigatran	Efeito reverso ao dabigatran (anti-coagulante)	2015	2015
Evolocumabe	Repatha	Amgen	IgG2 humano	CHO	PCSK9	Hipercolesterolemia	2015	2015
Dinutuximabe	Unituxin	United Therapeutics Europe	IgG1 quimérico	Sp2/0	GD2 ^e	Neuroblastoma	2015	2015
Ramucirumabe	Cyramza	Eli Lilly	IgG1 humano	NS0	vEGF-2 ^f	Câncer gástrico	2014	2014
Vedolizumabe	Entyvio	Takeda Pharma/Millennium	IgG1 humanizado	CHO	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Colite ulcerativa, doença de Crohn	2014	2014
Siltuximabe	Sylvant	Janssen Biotech	IgG1 quimérico	CHO	IL-6	Doença de Castleman	2014	2014
Obinutuzumabe	Gazyva (EUA), Gazyvaro (UE)	Roche/Genentech	IgG1 humanizado, glicoengenheirada	CHO	CD20 expresso por linfócitos B	Leucemia	2013	2014

Nome	Nome comercial	Empresa	Forma	Linhagem produtora	Alvo	Indicação	Ano de aprovação	
							EUA (FDA)	UE (EMA)
Ado-trastuzumabe emtansine	Kadcyla	Roche/Genentech	IgG1 humanizado imunoconjugado com citotoxina DM1	CHO	HER-2 ^g	Câncer de mama	2013	2013
Raxibacumabe	Abthrax	GSK	IgG 1 humano	NS0	<i>B. anthracis</i>	Antraz	2012	NA
Pertuzumabe	Perjeta	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	CHO	HER-2	Câncer de mama	2012	2013
Brentuximabe vedotin	Adcetris	Takeda Pharma	IgG1 quimérico imunoconjugado	CHO	CD30	Linfoma	2011	2012
Belimumabe	Benlysta	Glaxo Group	IgG1 humano	NS0	BLyS ^h	Lúpus	2011	2011
Ipilimumabe	Yervoy	Bristol-Myers-Squibb	IgG1 humano	CHO	CTLA-4 ⁱ	Melanoma	2011	2011
Denosumabe	Prolia/ Xgeva	Amgen	IgG2 humano	CHO	RANK-L ^j	Osteoporose	2010	2010
Tocilizumabe	RoActemra (UE), Actemra (EUA)	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	CHO	IL-6R	Artrite reumatoide	2010	2009
Besilesomabe	Scintimun	CIS Bio International	IgG1 murino	hibridoma	NCA-95 ^k	Diagnóstico <i>in vivo</i> de locais de inflamação/infecção	NA	2010
Ofatumumabe	Arzerra	Novartis/Genmab	IgG1 humano	NS0	CD20	Leucemia	2009	2010
Canakinumabe	Ilaris	Novartis/Regeneron	IgG1 humano	Sp2/0	IL-1 β	CAPS ^l	2009	2009
Golimumabe	Simponi	Janssen Biotech	IgG1 humano	Sp2/0	TNF- α^m	Artrite reumatoide e psoriática, espondilite anquilosante	2009	2009
Ustekinumabe	Stelara	Janssen Biotech	IgG1 humano	Sp2/0	IL-12/23	Psoríase	2009	2009
Certolizumabe pegol	Cimzia	UCB Pharma	F _{ab} humanizado peguilado	<i>E. coli</i>	TNF- α	Artrite reumatoide	2008	2009

Nome	Nome comercial	Empresa	Forma	Linhagem produtora	Alvo	Indicação	Ano de aprovação	
							EUA (FDA)	UE (EMA)
Catumaxomabe	Removab	Neovii Biotech	MAB biespecífico de rato/camundongo	Hibridoma	EpCAM/CD 3	Ascite maligna	NA	2009
Eculizumabe	Soliris	Alexion	IgG2/4 humanizado	NS0	Proteína de complemento C5	Hemoglobinúria paroxística noturna	2007	2007
Ranibizumabe	Lucentis	Roche/Genentech	IgG1 F _{ab} humanizado	<i>E. coli</i>	vEGF-A	Degeneração macular	2006	2007
Panitumumabe	Vectibix	Amgen/Abgenix	IgG2 humano	CHO	hEGFR ⁿ	Câncer colorretal	2006	2007
Natalizumabe	Tysabri	Biogen Idec	IgG4 humanizado	Mieloma murino	Integrina α -4	Esclerose múltipla	2004	2006
Bevacizumabe	Avastin	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	CHO	vEGF	Câncer colorretal	2004	2005
Cetuximabe	Erbitux	Merck/BMS/Lilly/Imclone Systems	IgG1 quimérico	Sp2/0	EGF	Câncer colorretal	2004	2004
Omalizumabe	Xolair	Novartis	IgG1 humanizado	CHO	IgE	Asma	2003	2005
Ibritumomabe tiuxetan	Zevalin	Spectrum Pharmaceuticals	IgG1 murino	CHO	CD20	Linfoma de não-Hodgkin	2002	2004
Adalimumabe	Humira	AbbVie	IgG1 humano	CHO	TNF	Artrite reumatoide	2002	2003
Alemtuzumabe	Lemtrada (UE), Campath (EUA)	Genzyme	IgG1 humanizado	CHO	CD52	Esclerose múltipla	2013	2013
Trastuzumabe	Herceptin	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	CHO	HER-2	Câncer de mama	1998	2000
Infliximabe	Remicade	Janssen Biotech	IgG1 quimérico	Sp2/0	TNF	Doença de Crohn	1998	1999
Palivizumabe	Synagis	Medimmune/AbbVie/AstraZeneca	IgG1 humanizado	NS0	RSV ^o	Infecção respiratória	1998	1999
Basiliximabe	Simulect	Novartis	IgG1 quimérico	NS0	IL-2R	Rejeição a rim transplantado	1998	1998

Nome	Nome comercial	Empresa	Forma	Linhagem produtora	Alvo	Indicação	Ano de aprovação	
							EUA (FDA)	UE (EMA)
Daclizumabe	Zenapax; Zinbryta	Roche	IgG1 humanizado	NS0	Receptor de IL-2	Rejeição a rim transplantado	1997 (em revisão)	1999 (em revisão)
Rituximabe	MabThera (UE), Rituxan (EUA)	Roche/Biogen-Idec	IgG1 quimérico	CHO	CD20	Linfoma de não-Hodgkin	1997	1998
Sulesomabe	LeukoScan	Immunomedics	F _{ab} murino	Sp2/0	NCA90	Diagnóstico por imagem de osteomielite	NA	1997
Capromab pendetide	ProstaScint	EUSA Pharma/Cytogen	IgG murino	Hibridoma	PSMA ^p	Diagnóstico de câncer de próstata	1996	NA
Abciximabe	ReoPro	Janssen Biologics	F _{ab} IgG1 quimérico	Sp2/0	Receptores GPIIb/IIIa	Prevenção de coágulos	1993	NA

^aCD – cluster of differentiation

^bIL – interleukin

^cPD – programmed death

^dPCSK9 - proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

^eGD2 - disialoganglioside^fvEGF – vascular endothelial growth factor

^gHER-2 – human epidermal growth factor receptor 2

^hBLyS - B-lymphocyte stimulator

ⁱCTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

^jRANK-L - receptor activator for nuclear factor κ B ligand

^kNCA - nonspecific crossreacting antigen-95

^lCAPS - cryopyrin-associated periodic syndromes

^mTNF – tumor necrosis factor

ⁿhEGFR - human epidermal growth factor receptor

^oRSV – respiratory syncytial virus

^pPSMA - prostate-specific membrane antigen

2.3 Produção de mAbs por cultivo de células animais

As terapias com anticorpos podem exigir a aplicação frequente e prolongada de altas doses de produto no paciente (GAUGHAN, 2015). Algumas indicações demandam a produção de até centenas de quilogramas de produto por ano (HAN *et al.*, 2011), o que, em comparação com outros biofármacos, é significativo.

Logo após o desenvolvimento da tecnologia dos hibridomas, o que permitiu selecionar os clones produtores de anticorpos específicos, a produção em massa de anticorpos consistia na injeção dos hibridomas na cavidade intraperitoneal de camundongos, de forma a produzir tumores ascíticos contendo uma concentração superior a 10 g/L de mAb de elevada pureza. Entretanto, o sofrimento imposto aos animais e o risco de contaminação do produto com substâncias exógenas ao paciente justificaram a busca por métodos *in vitro* como alternativas de produção (FALKENBERG, 1998; TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). Conforme apresentado na Tabela 2.1, a grande maioria dos mAbs atualmente aprovados para fins terapêuticos são produzidos *in vitro* por células de mamíferos recombinantes adaptadas ao crescimento em suspensão e cultivadas em biorreatores de grande escala (WURM, 2004; JOSTOCK, 2011; AL-RUBEAI, 2015; GAUGHAN, 2015).

As tecnologias desenvolvidas para a produção de proteínas terapêuticas têm como objetivos principais minimizar o tempo de fabricação do insumo para a realização dos ensaios clínicos (necessários para aprovação de um novo produto no mercado) e, após sua aprovação, prover a quantidade suficiente para atender às demandas do mercado a um custo aceitável por dose (BIRCH e RACHER, 2006). O desenvolvimento de um processo de produção *in vitro* de um mAb exige a seleção e o estudo de um sistema de expressão, de um bioprocessos que viabilize a secreção da proteína de interesse, de técnicas de purificação e de concentração do produto e de métodos analíticos para a determinação da pureza final (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). O estabelecimento de uma plataforma de produção baseada em células animais inicia-se com o desenvolvimento e a seleção de linhagens recombinantes altamente produtivas, seguida pela otimização do processo e do meio de cultivo em sistemas de pequena escala, como placas de 96 poços e frascos agitados. As condições mais promissoras são testadas em biorreatores de bancada, equipamentos que permitem o monitoramento e controle de parâmetros como pH, temperatura, aeração e agitação. O escalonamento do

processo é então avaliado utilizando-se biorreatores de maiores volumes. Durante essa etapa, em geral busca-se cumprir os requisitos das boas práticas de fabricação e a demanda de material para os ensaios pré-clínicos (GAUGHAN, 2015).

Os recentes avanços na seleção das linhagens celulares, na composição dos meios de cultivo e na operação dos biorreatores (ou seja, nas etapas de processamento *upstream*) conduziram ao alcance de concentrações de anticorpos na faixa 2 a 10 g/L em escala industrial, por meio de processos em batelada alimentada com produtividade específica de cerca de 20 pg/cel/d operando por, no mínimo, três semanas e com uma concentração de células viáveis (X_v) superior a $20 \cdot 10^6$ cels/mL (WURM, 2004; BIRCH e RACHER, 2006). Consequentemente, as etapas de purificação (processamento *downstream*) passaram a representar um gargalo na produção, já que uma eficiente recuperação e os altos índices de pureza são determinantes para o sucesso de um biofármaco (HAN *et al.*, 2011).

A produtividade volumétrica (P_v) é um parâmetro que determina as dimensões da planta necessária para atender à capacidade de produção, definida em função da demanda anual do mercado pelo produto de interesse. Uma vez que a quantidade de produto a ser obtida depende não apenas da capacidade de produção em biorreatores, mas também do rendimento das etapas de purificação, a indústria busca estabelecer os processos de maior produtividade. De acordo com CHICO *et al.* (2008), a produtividade volumétrica é definida por (Equação 1):

$$P_V = \frac{P_{ac}}{t_{proc} V} = \frac{V q_p \int X_v dt}{t_{proc} V} \quad (1)$$

em que:

P_{ac} – massa de produto acumulada ao longo do processo;

t_{proc} – tempo de processo (inclui o tempo de preparo do reator, de crescimento e de produção);

V – volume;

q_p – produtividade específica;

X_v – concentração de células viáveis.

Como pode ser observado na Equação 1, P_v é uma variável dependente de X_v e de q_p . Portanto, muitas das estratégias adotadas para elevar P_v baseiam-se ou em obter cultivos de alta densidade celular, ou em selecionar clones com elevada produtividade específica q_p , ou ambos os parâmetros (CHU e ROBINSON, 2001; CHICO *et al.*, 2008). Cultivos de linhagens altamente produtivas em elevada concentração celular operando em perfusão podem ser eventualmente associados a condições operacionais que, apesar da menor taxa de crescimento, aumentam q_p , como redução da temperatura (CHUPPA *et al.*, 1997; LAGES, 2015), adição de ácidos graxos (OH *et al.*, 1993; LAGES, 2015), aumento da osmolalidade (OZTURK e PALSSON, 1991a), entre outros. O impacto da magnitude de P_v na capacidade de produção é evidente ao se observar a Figura 2.3, em que a demanda pelo produto pode ser atendida por volumes de reator com ordens de grandeza bastante distintos.

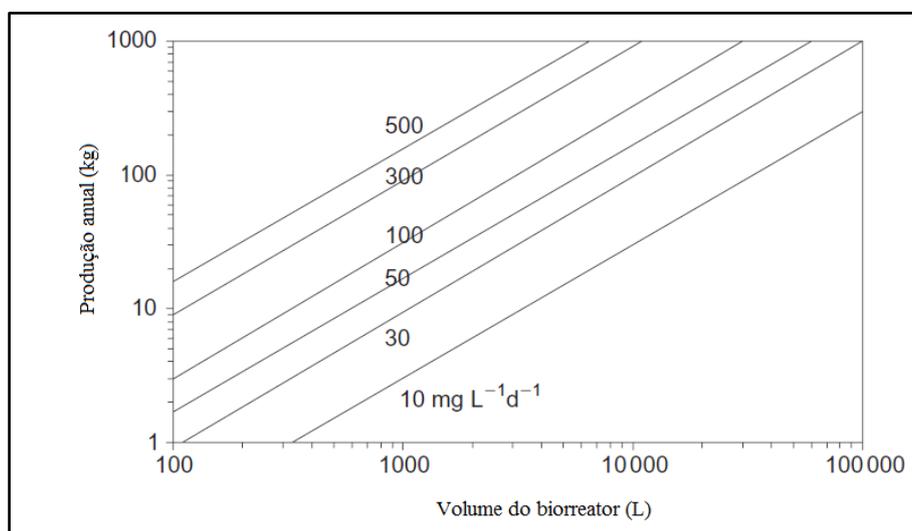


Figura 2.3. Relação entre produção anual e volume para diferentes níveis de produtividade volumétrica. Adaptado: CHICO *et al.* (2008).

2.3.1 Linhagens para produção de mAbs

As células de mamífero mais utilizadas na produção de anticorpos recombinantes são CHO (*Chinese hamster ovary*) e as linhagens de mieloma murino NS0 e Sp2/0. Outros tipos, como os hibridomas, BHK (*baby hamster kidney*), HEK-293 (*human embryonic kidney*) e a linhagem PER.C6, derivada da retina humana, também têm sido empregados (GAUGHAN, 2015). Entretanto, a linhagem CHO é a mais utilizada, correspondendo a aproximadamente 35% dos sistemas de expressão dos biofármacos aprovados no período de 2010-2014 (WALSH, 2014). Os principais

motivos para o emprego das células CHO são o rápido crescimento, a facilidade de transfecção do gene de interesse, a rápida adaptação ao crescimento em suspensão em meios isentos de soro animal, e a realização de modificações pós-traducionais, em especial a glicosilação, semelhantes ao padrão humano, além de serem mais seguras frente à propagação de agentes adventícios eventualmente patogênicos a seres humanos (KUMAR *et al.*, 2007; JAYAPAL *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2012). As linhagens de CHO produtoras de mAbs mais empregadas são: i) derivadas de CHO-K1, originalmente estabelecida em 1957 por Puck e colaboradores (PUCK *et al.*, 1958); ii) derivadas de CHO-DUXB11 e CHO-DG44, mutantes derivadas de CHO-K1, cujos clones produtores são selecionados mediante a amplificação do gene da diidrofolato redutase (DHFR) presente no vetor de expressão; iii) derivadas de CHO-K1SV, baseadas na amplificação gênica por meio da glutamina sintetase (GS) (BIRCH e RACHER, 2006; GAUGHAN, 2015; FISCHER *et al.*, 2015).

2.3.2 *Cultivo em biorreatores de tanque agitado*

Os biorreatores do tipo tanque agitado (ou *stirred tank reactor* - STR) para o cultivo de células animais em suspensão ou aderidas em microcarreadores são o sistema mais popular de produção de mAbs na indústria biofarmacêutica (KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011). No início de uso dos biorreatores, houve muitos relatos de queda de viabilidade celular, supostamente relacionados aos efeitos deletérios da agitação sobre as frágeis células animais (CHICO *et al.*, 2008). Entretanto, estudos têm demonstrado que o efeito provocado pela explosão de microbolhas de gases é mais danoso às células do que as tensões de cisalhamento relativas ao regime turbulento proporcionado pela agitação (NIENOW, 2006). Além disso, a agitação é um parâmetro crítico para cultivos de alta concentração celular, devido às maiores dificuldades em se manter a homogeneidade nesse tipo de sistema (OZTURK, 1996).

Os tanques de aço inoxidável com qualidade farmacêutica (AISI 316L) são bastante utilizados devido à capacidade de acomodar grandes volumes e à facilidade de limpeza e de esterilização. O uso dos biorreatores com bolsas descartáveis (*single-use bioreactors* – SUB) tem se popularizado em anos recentes por questões relativas à redução de custo capital, menores períodos de *turn-around* para limpeza e carregamento

dos reatores, e flexibilidade para conduzir diferentes processos de produção em uma mesma planta (KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011; GAUGHAN, 2015).

Os reatores STR devem proporcionar um ambiente em que gradientes de pH, de oxigênio dissolvido (DO), de temperatura e de concentração de nutrientes são minimizados, de forma a evitar a morte das células e a garantir a sua viabilidade ao longo do cultivo. O uso de impelidores, preferencialmente com grande área de contato (NIENOW, 2006), associado à injeção de uma corrente de gases normalmente composta por ar, oxigênio puro e dióxido de carbono (CO_2), garante a homogeneização do meio, o suprimento de oxigênio adequado à demanda das células e o controle do pH. Diversos estudos realizados na área têm demonstrado a importância de se avaliar a influência dos parâmetros de operação sobre a quantidade e a qualidade do produto de interesse (KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011). A Figura 2.4 apresenta as principais características da operação de biorreatores sob condições monitoradas e controladas, a fim de se garantir o sucesso do cultivo.

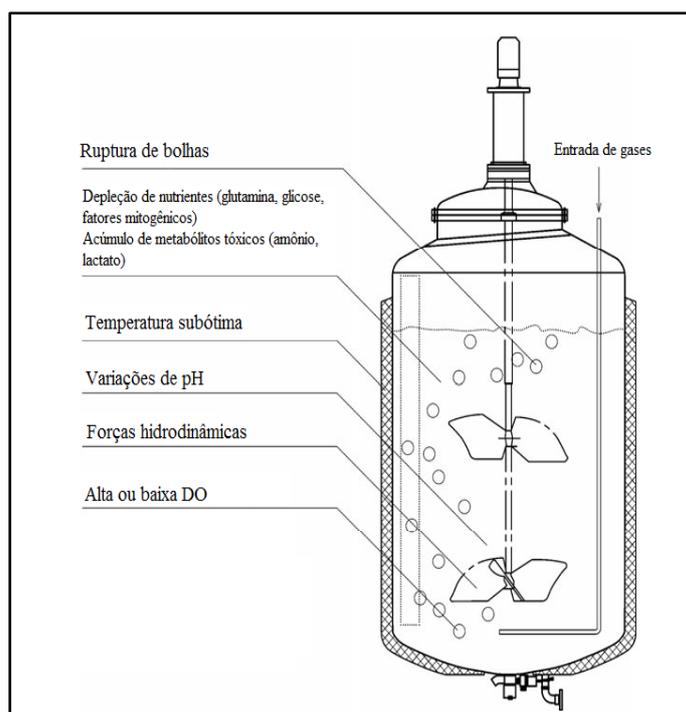


Figura 2.4. Fatores que influenciam na sobrevivência das células em biorreator. Adaptado: KUYSTERMANS e AL-RUBEAI (2011).

2.3.2.1 Nutrientes e metabólitos

O metabolismo das linhagens imortalizadas cultivadas *in vitro* é altamente desregulado comparado ao das células *in vivo*, apresentando taxas de consumo de

glicose e de glutamina que excedem às suas necessidades (*overflow metabolism*), o que resulta em elevados fluxos nas vias da glicólise e da glutaminólise e consequente acúmulo de subprodutos como lactato, amônio e alanina (AMABLE e BUTLER, 2008).

As células animais requerem uma grande variedade de nutrientes para o crescimento e a manutenção. Os meios de cultivo livres de soro contêm tipicamente fontes de carbono, aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, agentes tamponantes e outros componentes como fatores de crescimento e metais em quantidade-traço (XIE e ZHOU, 2006).

A glicose tem um papel fundamental no metabolismo celular, pois é a fonte primária para a produção de compostos energéticos e precursores para a síntese de biomassa. A concentração normalmente presente nos meios de cultivo varia entre 5 e 25 mM (0,9-4,5 g/L), e pode chegar a 56 mM (10 g/L) (MORAES *et al.*, 2008). Um fenômeno bastante observado em cultivos *in vitro* de células de mamíferos é a glicólise aeróbia ou “efeito Warburg”, no qual a glicose é preferencialmente convertida em lactato, mesmo em concentrações não limitantes de oxigênio. Apesar do menor rendimento energético, a redução do piruvato a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) proporciona uma regeneração de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) mais rápida em relação à entrada do piruvato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e à regeneração via fosforilação oxidativa na mitocôndria (WAHRHEIT, 2014). Esse mecanismo seria uma maneira de células altamente proliferativas maximizarem o seu crescimento na presença de nutrientes em excesso. Entretanto, o lactato, em determinadas concentrações, inibe o crescimento celular devido a alterações do pH e ao aumento da osmolalidade do meio (OZTURK *et al.*, 1992; LAO e TOTH, 1997; CRUZ *et al.*, 2000). O lactato também é um subproduto do metabolismo da glutamina, especialmente quando a glicose encontra-se em condições limitantes (XIE e ZHOU, 2006). Para diversas linhagens celulares, foi observado que a quantidade de glicose consumida pelas células, e consequentemente de lactato formado, está diretamente relacionada à concentração de glicose presente no meio (XIE e ZHOU, 2006). Uma vez que a taxa de consumo de glicose geralmente é superior à demanda das células, sugere-se adicionar esse substrato durante o cultivo (o que corresponde ao princípio da batelada alimentada, descrita no item 2.3.4), de modo a limitar o acúmulo de lactato no meio (AMABLE e BUTLER, 2008). Além disso, a concentração de glicose pode afetar a concentração de células viáveis e a produtividade (AMABLE e BUTLER, 2008). Para

diferentes concentrações iniciais de glicose em ensaios em batelada com células CHO produtoras de eritropoetina (EPO), SUN e ZHANG (2001) observaram que a concentração final de EPO obtida aumentou quando a glicose aumentou de 8,9 para 17,9 mM, assim como o rendimento de lactato em relação à glicose também se elevou. Entretanto, a concentração da proteína de interesse diminuiu à medida que a glicose aumentou de 17,9 para 49,6 mM, ao passo que o rendimento de lactato permaneceu constante para esse intervalo.

A glutamina é um aminoácido precursor para a síntese de outros aminoácidos e nucleotídeos, além de exercer um papel fundamental como fonte de carbono e de energia para a formação de compostos intermediários do ciclo dos TCA (AMABLE e BUTLER, 2008). A glutamina é normalmente adicionada ao meio em concentrações entre 1 e 5 mM (MORAES *et al.*, 2008). A amônia é o principal subproduto do metabolismo da glutamina, oriunda tanto da reação de glutaminase (formação de glutamato) quanto da degradação não-enzimática da glutamina em ácido pirrolidina carboxílico. A amônia também inibe o crescimento celular, porém o seu efeito tóxico se torna evidente já em concentrações cerca de dez vezes menores em relação ao lactato (CRUZ *et al.*, 2000). Valores típicos de concentração de amônia na produção de mAbs encontram-se na faixa de 2-10 mM, enquanto que, para o lactato, podem variar entre 1 até 300 mM (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008). Além disso, a amônia afeta o padrão de glicosilação de proteínas (BORYS *et al.*, 1994, YANG e BUTLER, 2002). A utilização de linhagens CHO-GS, que não requerem glutamina presente no meio, é uma possibilidade para contornar o problema de acúmulo de amônia (BIRCH e RACHER, 2006). Da mesma forma que a glicose, quanto maior a concentração de glutamina, maior a taxa específica de consumo pelas células, e, por conseqüência, maior a quantidade de amônia formada. Assim, tanto as formulações de meio quanto as estratégias de alimentação buscam manter uma concentração mínima desses componentes-chave, suficiente para manter a viabilidade celular, aumentar a eficiência de sua utilização e minimizar o acúmulo dos metabólitos tóxicos (XIE e ZHOU, 2006).

2.3.2.2 Parâmetros físicos

O crescimento celular é afetado geralmente por valores de pH do meio inferiores a 6,8 e superiores a 7,8, pois as mudanças no pH intracelular alteram a atividade de enzimas (KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011). Em biorreatores, o controle de pH

normalmente é realizado a partir de um sinal medido por um eletrodo de pH (TONSO, 2008), sendo injetado CO₂ para acidificar o meio e utilizando-se NaOH ou Na₂CO₃ para elevar o pH. Segundo OZTURK e PALSSON (1991b), em avaliação de diferentes valores de pH para cultivo em batelada de um hibridoma, a concentração máxima de anticorpo foi obtida em pH 7,2 devido à maior concentração celular alcançada, enquanto que a produtividade específica de anticorpo (q_p) foi duas vezes maior em meio ácido (pH 6,9), o que sugere a possibilidade de estabelecer cultivos bifásicos, com a fase inicial de crescimento em pH neutro, seguida pela fase de produção em pH menor.

Na literatura, são reportados valores para a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido (DO) entre 40 a 60% da saturação de ar no meio líquido (KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011) e de 10 a 20% (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008) para a produção de mAbs. Este, porém, é um fator que depende da linhagem empregada, das condições de cultivo e da fase de crescimento celular. A injeção forçada de gases por borbulhamento direto, apesar de proporcionar a oxigenação necessária ao meio, pode comprometer a integridade das células devido à grande energia dissipada com o rompimento das bolhas na superfície do líquido (KUNAS e PAPOUTSAKIS, 1990). A adição de polímeros, como Pluronic-F68 e metil-celulose, reduz a quantidade de células aderidas às bolhas sem afetar significativamente a transferência de oxigênio. Entretanto, esses aditivos podem prejudicar as etapas posteriores de purificação (CHICO *et al.*, 2008).

Os valores típicos de temperatura utilizados na produção de mAbs variam entre 36,5-37°C, entretanto valores menores (31-34°C) vêm sendo aplicados em cultivos bifásicos, já que a baixa temperatura promove um aumento na produtividade específica (q_p), possivelmente devido ao prolongamento da fase G1 do ciclo celular ou ao aumento na estabilidade do mRNA (KUMAR *et al.*, 2007; KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011).

Os sais à base de Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄⁻², PO₄³⁻ e HCO₃⁻ influenciam a osmolalidade do meio, uma importante variável avaliada no caso de alterações da formulação de meios ou em processos que utilizam meios concentrados para alimentação, como a batelada alimentada (BIBILA e ROBINSON, 1995). Os valores de osmolalidade adequados para cultivo de células animais se situam entre 260 e 320 mOsm/kg (FRESHNEY, 2005). Estudos demonstraram que o aumento da osmolalidade pode promover o aumento em q_p , mas não necessariamente um aumento

significativo da concentração de produto no meio, uma vez que o estresse hiperosmótico pode induzir a apoptose ou a necrose celular, reduzindo a concentração de células. Por exemplo, OZTURK e PALSSON (1991a) observaram uma redução na taxa específica de crescimento celular (μ) de 0,040 para 0,024 h⁻¹ e um aumento 2,2 vezes na produtividade específica de um mAb secretado por um hibridoma cultivado a 435 mOsm/kg, comparado ao valor padrão de 290 mOsm/kg. KIM e LEE (2002) avaliaram um aumento de 2,5 vezes na q_p de um anticorpo em células CHO (SH2-0.32-bcl-2) cultivadas a 522 mOsm/kg em relação ao cultivo em 290 mOsm/kg. Além disso, foram observados índices de viabilidade acima de 80% mantidos por um período maior para uma linhagem CHO superexpressora da proteína Bcl-2 (uma inibidora da caspase-3 mediadora do processo apoptótico) em comparação à CHO SH2-0.32-bcl-2, ambas cultivadas em condições hiperosmóticas. NASSERI *et al.* (2014) observaram um aumento de duas vezes em q_p e na massa total de anticorpo produzida pela linhagem CHO-DUKXB 11 ao elevar gradualmente a osmolalidade para 450 mOsm/kg em um processo de batelada alimentada.

2.3.3 Modos de operação de biorreatores

A Tabela 2.2 compara as principais características dos modos de operação mais empregados no cultivo de células animais. Os principais fatores levados em consideração na escolha de um dos modos para escala industrial são a estabilidade e a produtividade referentes à linhagem celular selecionada, a quantidade de produto necessária para atender à demanda de mercado, a estabilidade do produto à temperatura de cultivo, a experiência técnica prévia das equipes envolvidas na produção e o atendimento às exigências das agências regulatórias (CHICO *et al.*, 2008).

Tabela 2.2. Comparação entre os modos de operação de biorreatores utilizados no cultivo de células animais. Adaptado: FIKE (2009). NA – não se aplica

	Batelada	Batelada alimentada	Quimiostato	Perfusão	Perfusão com alimentação controlada
Complexidade do processo	Baixa	Baixa	Média	Alta	Alta
Longevidade da cultura	Dias	Dias/semanas	Meses	Meses	Meses
Concentração do produto de interesse	Baixa-média	Superior à batelada	Baixa	Superior à batelada	Potencialmente alta
Concentração dos nutrientes na alimentação	NA	> 1X	1X	1X	> 1X
Volume inicial de operação (%)	100	40-60	100	100	100
Troca de volume por dia (vvd)	NA	NA	1	Igual ou superior a 1	Menor que perfusão
Concentração dos metabólitos secundários	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Média
Volume a purificar	Baixo	Baixo	Alto	Alto	Médio
Operação em condições constantes	Não	Não	Sim	Sim	Sim

É importante mencionar que, no caso dos processos contínuos ou alimentados, diferentes estratégias de alimentação utilizando distintas formulações de suplementos podem ser adotadas de acordo com a demanda nutricional das células. Por exemplo, se um suplemento muito concentrado for utilizado como meio de alimentação em uma perfusão, a baixa taxa de diluição empregada pode ser suficiente para fornecer os nutrientes mais consumidos pelas células. Por outro lado, uma taxa mais baixa para a remoção dos metabólitos tóxicos pode impedir a operação do processo por períodos mais longos (FIKE, 2009).

Os modos de operação mais empregados na indústria para a produção de mAbs são atualmente a batelada, a batelada alimentada e o processo contínuo com retenção de células ou perfusão (CHU e ROBINSON, 2001; BIRCH e RACHER, 2006; GAUGHAN, 2015).

A batelada é a forma mais simples de se operar um reator, na qual todos os nutrientes são adicionados no início da corrida, e a proteína de interesse é coletada uma única vez ao final do processo. Apenas a entrada de gases é realizada de modo contínuo,

para garantir o suprimento de oxigênio para as células ao longo da corrida. Muitos estudos sobre o metabolismo, parâmetros de cultivo, escalonamento e otimização de meios são realizados em batelada, devido à sua simplicidade de operação. Uma variante conhecida como batelada repetida, que consiste em coletas periódicas seguidas pela adição de meio fresco até completar o volume de trabalho, pode melhorar a viabilidade econômica do processo, uma vez os períodos de inatividade relativos à limpeza, esterilização e preparo do biorreator para uma nova corrida são reduzidos. A produtividade da batelada é geralmente limitada pela baixa concentração celular alcançada (entre 1 e $4 \cdot 10^6$ cels/mL, porém dependendo das características da linhagem e do meio utilizado), pelo acúmulo de metabólitos secundários tóxicos e, sobretudo, devido à heterogeneidade das condições reacionais às quais as células são submetidas (CHICO *et al.*, 2008; KUYSTERMANS e AL-RUBEAI, 2011).

Uma possibilidade para aumentar a produtividade da batelada seria reabastecer o reator com os nutrientes mais consumidos pelas células. As tentativas de se utilizar desde o início do cultivo um meio basal concentrado ou fortificado com os nutrientes mais consumidos pelas células resultaram em um aumento modesto da longevidade das culturas e rendimentos na produção de mAbs de duas a oito vezes superior em relação ao meio convencional, segundo BIBILA e ROBINSON (1995). No entanto, a presença de uma elevada concentração de determinados nutrientes no início da corrida pode inibir o crescimento celular e induzir à formação de subprodutos tóxicos. A solução, portanto, seria introduzir os nutrientes gradualmente à medida que estes são consumidos pelas células, operação que caracteriza a batelada alimentada ou *fed-batch*.

2.3.4 Batelada alimentada

Este modo de operação inicia-se como uma batelada com o volume de trabalho reduzido, geralmente entre 40 e 60%. Quando as células atingem a fase exponencial de crescimento e os nutrientes são consumidos mais rapidamente, inicia-se a alimentação, que pode ser ou com o meio basal mais concentrado, ou com um meio contendo os nutrientes mais consumidos em maior concentração (meio fortificado), ou com suplementos (*cocktails*) contendo apenas os nutrientes mais consumidos, como a glicose, a glutamina e os aminoácidos em alta concentração. Como consequência, há o prolongamento das fases exponencial e estacionária do processo, o que garante a

obtenção de maiores concentrações de células viáveis e de concentrações de produto superiores em relação à batelada (BIBILA e ROBINSON, 1995; WLASCHIN e HU, 2006).

Em vista da flexibilidade e simplicidade de operação, e principalmente por proporcionar elevadas produtividades, a batelada alimentada foi amplamente adotada a partir da década de 1990 pela indústria biofarmacêutica (BIBILA e ROBINSON, 1995; XIE e ZHOU, 2006). A batelada alimentada não é recomendável para a produção de proteínas lábeis à temperatura de cultivo ou sujeitas à ação de proteases e glicosidases, devido ao longo tempo de residência dentro do biorreator (BIBILA e ROBINSON, 1995; CHICO *et al.*, 2008). Além disso, assim como a batelada, há o acúmulo dos metabólitos secundários tóxicos, os quais podem inibir o crescimento celular. Uma maneira de minimizar a formação desses metabólitos, em especial o lactato e a amônia, é desenvolver estratégias de alimentação que limitem a concentração de glicose e de glutamina, respectivamente (LJUNGGREN e HÄGGSTRÖM, 1992; WLASCHIN e HU, 2006). Outro parâmetro que deve ser avaliado é a osmolalidade, a qual tende a aumentar com a introdução de meios mais concentrados e com o acúmulo de lactato ao longo do processo (BIBILA e ROBINSON, 1995).

O regime de alimentação pode ser realizado de forma contínua ou intermitente, de acordo com diferentes estratégias que levem em consideração a composição do meio de alimentação e a condição fisiológica das células. O uso do meio basal concentrado pode ser adotado como uma estratégia inicial de alimentação, por ser uma maneira mais simples e rápida de se estabelecer o processo de batelada alimentada. Outra possibilidade, mais laboriosa, é a determinação da concentração residual dos nutrientes no meio (conhecida como *spent medium analysis*), que permite corrigir a taxa e a composição da alimentação de forma iterativa, refinando o processo de acordo com as características de produção da linhagem ao longo do processo (BIBILA e ROBINSON, 1995). Um exemplo é o estudo realizado por XIE e WANG (1994), que desenvolveram uma estratégia de alimentação baseada na equação estequiométrica de crescimento de uma linhagem de hibridoma que garantiu o fornecimento suficiente de nutrientes, além de reduzir em 26 vezes a taxa específica de formação de lactato (q_{lac}) e em 50 vezes a taxa específica de formação de amônia (q_{amm}), tendo aumentado em cinco vezes a concentração total de células e em 10 vezes a concentração de anticorpo em relação à batelada convencional.

2.3.5 Perfusão

A perfusão, ou processo contínuo com retenção de células, consiste em uma solução para mitigar a baixa produtividade volumétrica do quimiostato (processo contínuo simples), pois, neste modo de operação, as células permanecem retidas no biorreator (CHICO *et al.*, 2008). Na perfusão, são estabelecidas uma corrente de alimentação de meio fresco e uma corrente de saída para a remoção do produto formado. Diferentemente do quimiostato, na perfusão há um equipamento de retenção acoplado à saída, do qual duas correntes são geradas: a do perfundido (ou sobrenadante isento ou quase isento de células, contendo o produto de interesse), e a de células concentradas, que são recicladas ao reator (Figura 2.5). Uma vez que se busca trabalhar com vazões iguais tanto no somatório das correntes de entrada quanto no de saída, o volume de trabalho é mantido constante. A contínua renovação do meio, quando acompanhada de uma remoção pequena e controlada de células, proporciona um ambiente constante às células, com impactos positivos ao metabolismo celular e à qualidade do produto (CHOTTEAU, 2015).

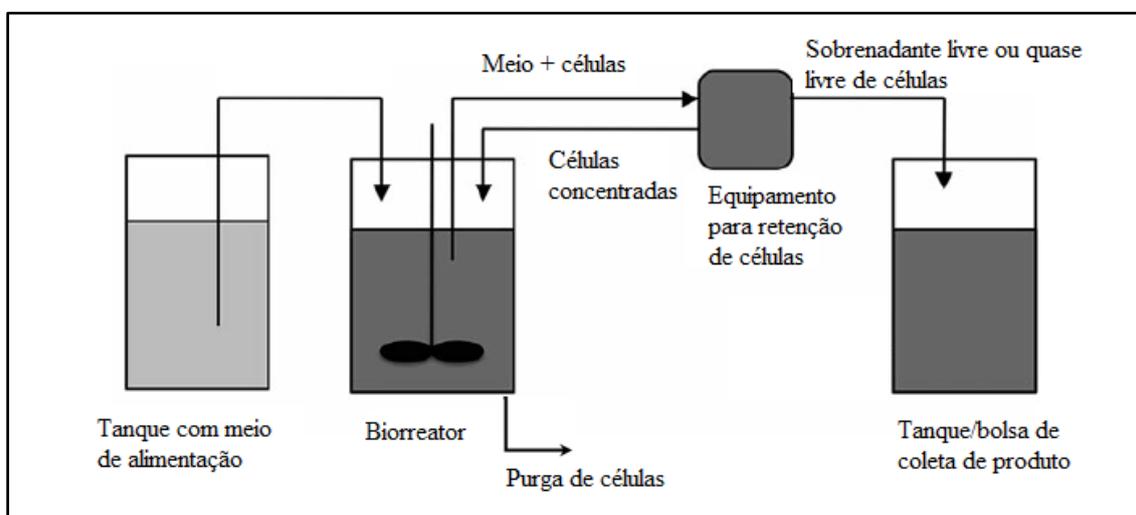


Figura 2.5. Representação esquemática de um processo de perfusão com equipamento de retenção celular externo ao reator. Para as correntes ilustradas (entrada, saídas e recirculação), geralmente são empregadas bombas peristálticas. Adaptado: CHOTTEAU (2015).

A taxa de diluição ou de perfusão (D), definida pela Equação 2, corresponde ao número de trocas de volume do reator por um período de tempo, sendo expressa como vvd (volume de meio por volume de reator por dia) ou d^{-1} :

$$D = Q/V \quad (2)$$

onde:

Q – vazão volumétrica de alimentação;

V – volume de trabalho do biorreator.

Além de determinar as vazões das correntes de entrada e de saída, a taxa de diluição é um importante parâmetro avaliado na produção de proteínas lábeis, pois quanto maior o valor de D, menor o tempo de residência do produto dentro do reator e, conseqüentemente, menor o tempo de exposição à temperatura de cultivo ou a enzimas degradadoras presentes no meio reacional.

A presença do equipamento de retenção possibilita a aplicação de taxas de diluição superiores à taxa específica máxima de crescimento celular (μ), sem que ocorra o fenômeno de lavagem ou *wash-out*. Dessa forma, o aumento da vazão de alimentação confere uma maior disponibilidade de nutrientes às células e, por conseguinte, possibilita obter uma maior concentração de células (CHICO *et al.*, 2008; KOMPALA e OZTURK, 2006). Entretanto, para estabelecer o estado estacionário, ou ainda prevenir a sobrecarga dos equipamentos de retenção, são necessárias purgas (*cell bleeding*) controladas de meio contendo células (FACCIOTTI, 2001; KONSTANTINOV *et al.*, 2006). A vazão de purga de células pode ser determinada a partir do balanço de massa de células no estado estacionário (Equação 3):

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - \alpha D_p X_v - D_B X_v = 0 \quad (3)$$

onde:

μ - taxa específica de crescimento;

α - fator de perda de células. O termo αX_v corresponde à concentração de células presentes no perfundido;

D_p – taxa de perfusão;

D_B – taxa de purga ou remoção controlada de células.

Em geral, o cultivo é inicialmente operado como uma batelada, com uma concentração inicial de células entre $0,3-0,6 \cdot 10^6$ cels/mL. Na metade da fase exponencial de crescimento esperada para um processo que permanecesse em batelada, é iniciada a perfusão, até que a concentração celular desejada seja alcançada. Nessa primeira etapa, de acúmulo de células, o crescimento celular é maximizado pela operação do reator nas condições ótimas para a proliferação das células (OZTURK, 1996). A taxa de perfusão igual a 1 vvd normalmente é adotada, a qual pode suportar uma concentração celular de até $20 \cdot 10^6$ cels/mL para muitos processos baseados em células CHO, além de ser um valor conveniente para o ajuste das vazões de entrada e de saída do sistema (CHOTTEAU, 2015). Entretanto, taxas de perfusão inferiores a 1 vvd podem ser aplicadas para menores valores de X_v , ou então a troca de meio pode ser iniciada imediatamente após a inoculação, no caso de valores iniciais de X_v mais elevados (CHOTTEAU, 2015). Uma vez alcançada a concentração de células de trabalho desejada, os reatores entram na fase de produção, sendo operados por longos períodos (em alguns casos, até seis meses) e controlados por meio de remoção controlada de células, de forma que X_v permaneça constante (OZTURK, 1996).

Do ponto de vista técnico, a perfusão é um processo mais complexo, pois requer o uso de dispositivo de retenção celular e exige a instalação e a operação de equipamentos mais sofisticados que garantam a sua operação por longos períodos (KADOURI e SPIER, 1997; CHOTTEAU, 2015). A presença de correntes de entrada e de saída pode conferir à perfusão maior probabilidade de contaminação, embora KADOURI e SPIER (1997) argumentem que o encerramento e a preparação de consecutivos ciclos de batelada são mais suscetíveis a erros operacionais e, conseqüentemente, a contaminações.

Dentre as vantagens da perfusão em relação à batelada e à batelada alimentada, destaca-se a possibilidade de manutenção do estado estacionário, condição em que as células são expostas a poucas variações ao longo do cultivo. Outra possibilidade oferecida pela perfusão é a redução do tempo de residência do produto dentro do reator, fato que deve ser levado em consideração na produção de proteínas lábeis (BONHAM-CARTER e SHEVITZ, 2011). Devido aos longos períodos de duplicação característicos de células animais, é mais eficiente manter as células dentro do reator, o que permite obter cultivos com alta densidade celular, na ordem 10^7 a 10^8 cels/mL, e maiores produtividades volumétricas (KOMPALA e OZTURK, 2006). Essa característica,

associada a períodos de operação mais longos, confere à perfusão a vantagem de se trabalhar com sistemas mais compactos, tanto os setores de processamento *upstream* quanto *downstream*, fato que pode reduzir o investimento requerido para uma nova planta industrial, considerando-se o alto custo dos equipamentos e a infra-estrutura necessários para o cultivo de células animais (CHICO *et al.*, 2008). A possibilidade de se utilizar industrialmente reatores com capacidade entre 250 e 2000 L, faixa compatível com os equipamentos com bolsas descartáveis atualmente disponíveis, têm incentivado o uso da perfusão pela indústria biofarmacêutica, embora os processos em batelada alimentada ainda prevalecem na produção de moléculas estáveis, como os mAbs (CHOTTEAU, 2015; GAUGHAN, 2015).

2.3.5.1 Equipamentos de retenção

Diversos equipamentos para retenção celular têm sido utilizados no cultivo de células animais, cuja capacidade de separação se baseia na diferença de tamanho, de densidade, carga elétrica, constante dielétrica e propriedades de superfície (VOISARD *et al.*, 2003). Os equipamentos podem ser instalados internamente ou externamente ao reator, sendo que esta última configuração proporciona maior facilidade de troca e um escalonamento independente ao do reator (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Um equipamento de retenção deve idealmente apresentar as seguintes características:

- Uma elevada eficiência de retenção, mesmo quando são aplicadas elevadas taxas de perfusão;
- Robustez, de modo que o equipamento não precise ser trocado durante a corrida, proporcione fácil esterilização e, se for o caso, possibilidade de reutilização;
- Adaptabilidade para diferentes processos;
- Não prejudicar o crescimento celular. Se externo, o tempo de residência no equipamento deve ser o menor possível, já que as condições ambientais (temperatura, OD etc.) não necessariamente são iguais às do biorreator.

Cada equipamento apresenta as suas vantagens e desvantagens de operação, conforme revisado por CASTILHO e MEDRONHO (2002), VOISARD *et al.*(2003),

CASTILHO e MEDRONHO (2008) e CASTILHO (2015). Por exemplo, os filtros de fibra oca são bastante utilizados por proporcionarem elevada área de filtração, porém a principal desvantagem é o entupimento progressivo dos poros (*fouling*) e consequente interrupção da corrida. Para minimizar esse problema, uma possibilidade é aumentar o fluxo de líquido sobre a membrana, porém, nessas condições, as células podem ser submetidas a altas tensões de cisalhamento. SHEVITZ (2003) propôs o sistema de filtração tangencial alternante (*alternating tangential flow – ATF*), no qual um diafragma acoplado à base do módulo de fibras ocas é sujeito a ciclos de pressurização e de vácuo. O movimento alternado produzido, além de ser controlado de forma a minimizar as tensões de cisalhamento, reverte periodicamente a direção do escoamento e promove uma retro lavagem das membranas, o que reduz a probabilidade de entupimento.

Os sedimentadores gravitacionais estão entre os equipamentos de mais simples operação, sendo a grande maioria instalada externamente ao reator. Há dois tipos de sedimentadores. No primeiro, as células sedimentam em um fluxo vertical contrário à corrente líquida, de modo que a velocidade de sedimentação das células viáveis deve ser maior do que a velocidade do líquido, o que demanda grandes áreas de sedimentação. O segundo tipo de sistema proporciona a sedimentação das células entre superfícies inclinadas (lamelas), nas quais as células escorregam para a parte inferior e geram um fluxo contrário ao de subida do líquido, o que aumenta a eficiência de sedimentação. Os parâmetros típicos na operação dos sedimentadores inclinados são a largura (5-15 cm) e o comprimento (15-40 cm) das lamelas, o espaço entre elas (0,5-0,7 cm) e o ângulo de inclinação em relação ao eixo vertical (20-30°) (VOISARD *et al.*, 2003).

Os sedimentadores inclinados têm como principais vantagens proporcionar menores tensões de cisalhamento sobre as células e separar as células viáveis das mortas, sendo estas eliminadas preferencialmente pela corrente de perfundido (BATT *et al.*, 1990). Entretanto, para elevadas taxas de perfusão, são requeridas maiores áreas para separação, o que limita a faixa de operação desse equipamento em 100 L/d (VOISARD *et al.*, 2003; CHOTTEAU, 2015). Outras desvantagens são os tempos de residência relativamente longos e a tendência de as células se aderirem sobre as lamelas. Para minimizar a adesão, o recobrimento das lamelas com silicone (BATT *et al.*, 1990) ou a aplicação de vibração intermitente (SEARLES *et al.*, 1994) são estratégias comumente empregadas. Trocadores de calor na entrada do sedimentador são bastante

utilizados para resfriar o meio contendo as células, com o objetivo de reduzir correntes de convecção que interfiram na sedimentação e de desacelerar o metabolismo celular durante a circulação externa ao biorreator (SEARLES *et al.*, 1994; CHOTTEAU, 2015).

2.3.5.2 Controle e operação de reatores em perfusão

Uma vez que a alta concentração de células torna a dinâmica de resposta da perfusão mais rápida, o sistema de controle dos parâmetros deve promover um monitoramento confiável e ajustes em um curto período de tempo. A concentração celular, viabilidade e concentração de substratos e metabólitos geralmente são medidas por meio de amostragens *off-line* (KOMPALA e OZTURK, 2006), porém sistemas de monitoramento *on-line* são desejáveis para permitir o controle desses parâmetros em tempo real (KONSTANTINOV, 1996; OZTURK, 1996). Além dos parâmetros físicos como pH, DO e temperatura, a taxa de perfusão também deve ser controlada, o que é normalmente realizado a partir do monitoramento da concentração celular, taxa de consumo de oxigênio (OUR) ou concentração dos metabólitos (KOMPALA e OZTURK, 2006). OZTURK *et al.* (1996) propuseram o conceito da taxa específica de perfusão (*cell specific perfusion rate – CSPR*), definido pela Equação 4, que representa o volume de meio fornecido a uma célula por um dia (KONSTANTINOV *et al.*, 2006):

$$CSPR = D/X_v \quad (4)$$

Substituindo a Equação 4 nas equações de balanço de massa para substrato e produto no estado estacionário, obtêm-se as Equações 5 e 6, respectivamente:

$$S = S_0 - \frac{q_s}{CSPR} \quad (5)$$

$$P = P_0 + \frac{q_p}{CSPR} \quad (6)$$

onde:

S_0 – concentração de substrato na corrente de alimentação;

q_s – taxa específica de consumo de substrato;

P_0 – concentração de produto na corrente de alimentação;

q_p – taxa específica de formação de produto.

Considerando que as taxas específicas não variam com a concentração celular e com o tempo, a manutenção de CSPR em um valor constante (ou seja, alterando a taxa de perfusão proporcionalmente à concentração de células viáveis) garante a uniformidade do processo na fase de produção (OZTURK,1996). Os valores de CSPR normalmente empregados variam entre 0,05 a 0,5 nL/cel/d (KONSTANTINOV *et al.*, 2006). DOWD *et al.* (2003) avaliaram a aplicação do conceito de CSPR no controle de uma perfusão com células CHO produtoras de ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Avaliando a faixa entre 0,04 a 0,4 nL/cel/d, a máxima concentração de produto foi obtida para uma taxa de 0,2 nL/cel/d, sendo que para valores menores de CSPR a viabilidade celular diminuiu, enquanto que, para taxas superiores, o produto na saída foi diluído devido às maiores taxas de diluição aplicadas.

A composição nutricional do meio é um fator essencial na determinação da taxa de diluição utilizada no processo. Segundo KOMPALA e OZTURK (2006), muitas formulações sustentam uma concentração de $10 \cdot 10^6$ cels/mL a uma taxa de 1 vvd. Portanto, para uma concentração de $100 \cdot 10^6$ cels/mL, seriam necessárias taxas de 10 vvd. Apesar do uso de reatores com menor capacidade, elevados volumes de meio de alimentação podem ser necessários para manter a alta concentração celular, o que gera uma grande quantidade de perfundido contendo o produto na forma mais diluída, o que acarreta em uma maior demanda dos equipamentos de purificação (FIKE, 2009). Além da elevação de custos com o preparo de grandes quantidades de meio, é necessário avaliar o desempenho na retenção de células do equipamento de perfusão operando a altas taxas de diluição (KOMPALA e OZTURK, 2006). Uma possível solução seria reduzir a quantidade de meio alimentado desenvolvendo formulações mais concentradas ou fortificadas que levem em consideração as exigências nutricionais da linhagem utilizada, em um método análogo ao estabelecimento das estratégias de batelada alimentada. Os primeiros estudos, na década de 1990, demonstraram que o uso de meios de duas a três vezes mais concentrado para alimentar uma perfusão de fato reduziu as taxas de diluição e proporcionou um aumento na concentração do produto de interesse (KOMPALA e OZTURK, 2006). Entretanto, questões relativas ao aumento de osmolalidade, à viabilidade da cultura celular e à estabilidade do produto quando este é submetido a maiores tempos de residência devem ser avaliadas.

2.3.5.3 Processos de perfusão em pequena escala

Idealmente, o desenvolvimento de um processo de perfusão deve ser realizado com o biorreator acoplado a um dado dispositivo de retenção celular. No entanto, ensaios em pequena escala operados de forma semicontínua (i.e., a alimentação e a coleta de perfundido realizadas de forma intermitente) podem ser utilizados para simular a perfusão, permitindo uma varredura dos parâmetros de operação que posteriormente podem ser avaliados ou refinados em um biorreator de bancada ou de produção. Os ensaios de pseudoperfusão (também denominada quase- ou semiperfusão) permitem analisar simultaneamente diversas condições de alimentação, como tipo de meio de alimentação e taxa de diluição, de modo a gerar uma grande quantidade de informações de forma rápida e com menor custo (CHOTTEAU, 2015). ALTAMIRANO *et al.* (2001) utilizaram a pseudoperfusão em frascos *spinner*, aplicando uma taxa de diluição de 0,5 vvd, para avaliar o desacoplamento entre a fase de proliferação celular (utilizando glicose como fonte de carbono) e a fase produtiva, na qual a glicose foi substituída por galactose, um carboidrato que, por ser metabolizado de forma mais lenta, proporcionou o arraste do ciclo celular e o aumento da duração do tempo de cultivo com uma viabilidade celular superior em relação à condição controle mantida apenas com glicose. YOON e AHN (2007) avaliaram o efeito de propionato de sódio sobre a produtividade específica de células CHO produtoras de hormônio folículo-estimulante (FSH), utilizando ensaios em pseudoperfusão em frascos *spinner* para o posterior desenvolvimento em um biorreator em perfusão. Pelo fato de estender a duração dos cultivos em relação à batelada simples, a pseudoperfusão também foi adotada por VERGARA *et al.* (2012) para avaliar diferentes estratégias de cultivo bifásico aplicando ou uma redução de temperatura, ou a combinação de baixa temperatura e substituição de glicose por galactose, com o intuito de aumentar a produção de ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tPA) por células CHO.

Nesses ensaios, normalmente são utilizados frascos do tipo *erlenmeyer* ou *spinner*, porém os tubos de 50 mL com tampa ventilada mantidos em agitação orbital, conhecidos como *tubespins*, apresentam-se como a opção mais prática devido à facilidade de manuseio, à possibilidade de avaliar centenas de diferentes condições dentro do espaço disponível e à elevada taxa de transferência de oxigênio proporcionada (DeJESUS *et al.*, 2004; XIE *et al.*, 2011). A troca de meio, diária ou não, é realizada manualmente e de forma intermitente, operação que, de certa maneira, assemelha-se a

uma batelada repetida, porém com a diferença de que o cultivo é centrifugado (simulando a retenção de células), e o sobrenadante obtido é parcial ou totalmente descartado e substituído em igual quantidade por meio fresco. Devido às trocas sucessivas de meio e, pelo fato de as células serem retidas por centrifugação, a concentração celular atinge valores superiores àqueles obtidos em batelada simples, sendo possível estabelecer um estado quase-estacionário com a remoção diária de células. A ausência de controle de pH e DO nesses sistemas pode implicar em uma baixa adequação desses sistemas para simular processos com elevada densidade celular (CHOTTEAU, 2015), embora VILLIGER-OBEBEK *et al.* (2015), após otimizar os parâmetros de agitação orbital e obter um valor máximo de X_v de $50 \cdot 10^6$ cels/mL, demonstraram que os experimentos de pseudoperfusão em *tubespins* apresentaram um desempenho similar àqueles realizados em um biorreator de 15 L para a seleção de clones e de meios de cultivo que proporcionaram as maiores produtividades e o atendimento aos requisitos de atividade biológica (VILLIGER-OBEBEK *et al.*, 2015).

2.3.6 Perfusão com alimentação controlada

A proposta desse modo de operação é combinar as vantagens da batelada alimentada e da perfusão, ou seja, introduzir um meio de alimentação mais concentrado (ou uma combinação do meio basal com suplementos contendo os nutrientes mais consumidos em alta concentração) a taxas de diluição menores (YANG *et al.*, 2000; FIKE, 2009). Dessa forma, busca-se reduzir a quantidade de meio usado na alimentação, coletar menores volumes de perfundido contendo o produto mais concentrado e manter a remoção dos subprodutos tóxicos (FIKE, 2009). A taxa de alimentação precisa ser estritamente controlada, para evitar a depleção dos nutrientes mais consumidos pelas células e, ao mesmo tempo, manter estes nutrientes em baixas concentrações no meio, de forma a minimizar a formação de metabólitos secundários tóxicos (YANG *et al.*, 2000).

A redução das taxas de diluição em um processo de alta densidade celular como a perfusão é um desafio, já que se busca obter as elevadas concentrações de produto da batelada alimentada em condições que podem limitar ou mesmo inviabilizar a manutenção do cultivo celular por longos períodos por esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo de metabólitos tóxicos. KONSTANTINOV *et al.* (2006) propuseram a

estratégia denominada *push-to-low*, a qual estabelece a redução progressiva das taxas de diluição até que a concentração do produto obtida seja equivalente à da batelada alimentada. Essa proposta foi aplicada para uma perfusão com hibridomas produtores de um anticorpo anti-TNF, na qual a CSPR foi reduzida de 0,3 nL/cel/d para 0,07 nL/cel/d, sendo que, em cada degrau de redução, foram avaliadas as taxas metabólicas e a concentração de nutrientes obtidas no estado estacionário, e então propostas modificações na composição do meio a ser alimentado nos degraus posteriores. Assim, com a taxa de diluição reduzida de seis para 1,3 vvd, e um valor de X_v mantido constante a $20 \cdot 10^6$ cels/mL, a concentração de produto no meio foi elevada em 500%, não sendo observadas alterações em q_p e na produtividade volumétrica. Os autores ressaltaram que essa estratégia pôde ser aplicada pelo fato de anticorpos serem moléculas estáveis, já que menores taxas de diluições implicam em maiores tempos de residência (nesse caso, um aumento de quatro para 17 h).

O estabelecimento de estratégias de controle de alimentação com meios concentrados ou suplementados tem apresentado resultados de produtividade promissores em comparação à batelada alimentada e à perfusão convencional, conforme mostra a Tabela 2.3. YANG *et al.* (2000) aplicaram uma taxa de alimentação calculada diariamente com base na concentração celular estimada para o período seguinte, de forma a manter a concentração de glicose no meio inferior a 1 g/L e, por conseguinte, minimizar a formação de lactato. Entretanto, foram observadas modificações no padrão de distribuição das glicofomas em comparação ao produto obtido em batelada. FENG *et al.* (2006) demonstraram que a introdução de uma corrente de alimentação de aminoácidos, ajustada conforme a OUR, promoveu um aumento significativo na concentração de mAb, além de uma redução entre 20 e 30% nas taxas específicas de formação de lactato (q_{lac}) e de amônia (q_{amm}). Os autores constataram que a perfusão com alimentação controlada, além de manter as características do produto, como pureza e capacidade de ligação ao antígeno, foi mais eficiente em relação à perfusão convencional, uma vez que a CSPR no estado estacionário foi reduzida de 0,10 para 0,06 nL/cel/d. Essa redução comprovou que a suplementação de aminoácidos de acordo com o estado fisiológico das células supriu adequadamente os nutrientes às células, além de aumentar a produtividade, conforme preconizado por KONSTANTINOV *et al.* (2006). TENG *et al.* (2011) descreveram uma combinação de estratégias de alimentação e de perfusão, respectivamente, conforme ou a necessidade em se garantir uma

concentração mínima de glicose no meio ou em se remover lactato e amônia quando estes estivessem próximos de atingir concentrações inibitórias. As taxas específicas de consumo e de formação de produtos foram determinadas a partir de dados obtidos *off-line* em intervalos de 12 h de amostragem, para evitar flutuações no metabolismo devido a causas inesperadas. Apesar de trabalhosa, os autores comprovaram a viabilidade de implementação dessa estratégia como um aperfeiçoamento da alimentação controlada, de modo a reduzir o acúmulo de metabólitos tóxicos proporcionado pela aplicação de baixas taxas de perfusão.

Tabela 2.3. Comparação entre batelada alimentada, perfusão e perfusão com diferentes estratégias de controle na alimentação. Os valores de CSPR não foram determinados para TENG *et al.* (2011) devido à ausência de monitoramento de X_v . NA – não aplicável.

Linhagem celular	Produto	Sistema e equipamento de retenção celular	Meio de alimentação	Estratégia de alimentação	Modo de operação				Referência
					Bat. alim.	Perfusão	Perf. alim. contr.		
Mieloma Sp2/0	Epratuzumabe	Biorreator de 15 L acoplado a módulo de fibras ocas	Glicose a 75 g/L em meio livre de soro	Manutenção de glicose inferior a 1 g/L	Produtividade volumétrica (U/L/d)	30 ^a	125	275	YANG <i>et al.</i> (2000)
					Concentração máxima de produto (U/L)	120	125	275	
					X_v máximo (E06 cels/mL)	2,7	10	15-18	
					CSPR (nL/cel/d)	NA	0,17-0,67	0,11-0,17	
Híbridoma	IgG1	Biorreator de 5 L com <i>spinfilter</i> 10 μ m	Solução de glicose (10,8 g/L) + glutamina (90 mM), e mistura de aminoácidos	Alimentação de aminoácidos com base na OUR, com q_{glc} e q_{lac} constantes no estado estacionário	Produtividade volumétrica (mg/L/d)	24	169	325	FENG <i>et al.</i> (2006)
					Concentração máxima de produto (mg/L)	189	169	325	
					X_v máximo (E06 cels/mL)	8,2	12	19	
					CSPR (nL/cel/d)	NA	0,10-0,16	0,06-0,16	
CHO	Antígeno de superfície da hepatite B	Reator de 3,6 L com leito empacotado contendo microcarreadores de disco	Solução contendo glicose (90 g/L), glutamina (150 mM) e mistura de aminoácidos	Glicose a 1,26 g/L (alimentação), ou lactato e amônia inferiores a valores inibitórios (perfusão)	Produtividade volumétrica (mg/L/h)	0,0125 ^b	0,029	0,028	TENG <i>et al.</i> (2011)
					Concentração máxima de produto (em mg/L)	2,3	0,5	1,65	
					X_v máximo (E06cels/mL)	5,1	10	13	

^a $V_T = 3$ L

^b $V_T = 1,5$ L

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar diferentes estratégias de alimentação empregando um meio de cultivo concentrado e menores taxas de diluição para aumentar a concentração de anticorpo monoclonal (mAb) produzido em um processo de perfusão com células CHO recombinantes.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar a cinética de crescimento celular, viabilidade, consumo de glicose, formação de lactato e de mAb em batelada simples;
- Comparar o desempenho de cultivos conduzidos em pequena escala em modo de pseudoperfusão, alimentados com meio de cultivo basal (TC-LECC), com meio concentrado (TCx2D) ou com a combinação de ambos, sob diferentes estratégias de alimentação;
- Avaliar o uso de meio concentrado e de uma combinação de meio basal e meio concentrado utilizando um biorreator de bancada operando em perfusão.

4 Materiais e Métodos

4.1 Linhagem celular

A linhagem CHO DP-12 clone#1934 (ATCC® CRL-12445), previamente adaptada ao crescimento em suspensão, foi utilizada no presente trabalho. Segundo GONZALEZ *et al.* (2000), as células CHO DP-12 foram obtidas a partir da transfecção de células CHO-DUXB11 com um vetor de expressão bicistrônico DHFR-intron (LUCAS *et al.*, 1996) denominado p6G4V11N35E.choSD.10, coexpressor das cadeias leve e pesada do anticorpo humanizado IgG1 variante 6G4V11N35E. Esse anticorpo possui afinidade à interleucina 8 (IL-8), uma citocina com massa molecular de aproximadamente 8,3 kDa e composta por 72 aminoácidos, responsável por ativar os neutrófilos, células do sistema imune que, quando recrutadas, são capazes de atravessar a parede dos vasos sanguíneos e se deslocar ao local afetado, desencadeando uma reação inflamatória (BAGGIOLINI e CLARK-LEWIS, 1992). O plasmídeo foi transfectado por lipoinfecção e as células foram cultivadas em meio livre de GHT (glicina, hipoxantina e timidina). Alguns clones foram selecionados e amplificados em concentrações crescentes de metotrexato (MTX), sendo o clone#1934 aIL8.42 NB 28605/14 selecionado por apresentar a maior produtividade específica, capaz de produzir 250 mg/L de anticorpo (GONZALEZ *et al.*, 2000).

4.2 Manutenção dos cultivos celulares

4.2.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo basal utilizado foi TC-LECC (Xell AG), quimicamente definido e livre de componentes de origem humana ou animal, cuja composição é confidencial. Esse meio foi adquirido em pó e preparado em água ultrapura (Milli-Q, Millipore), esterilizado por filtração com membranas de 0,2 µm de poliétersulfona (Sartopore 2, Sartorius) e acondicionado em garrafas de 1 a 2 L estéreis à temperatura de 4°C e ao abrigo da luz. Para o cultivo de células CHO DP-12, esse meio foi suplementado de acordo com BECKMANN *et al.* (2012), com 8 mM de L-glutamina (Gibco), 0,1 mg/L de fator de crescimento semelhante à insulina (Long®R3IGF1, Xell AG) e 200 nM de MTX (Hytas).

O meio TCx2D (Xell AG), cuja concentração de glicose e de glutamina é aproximadamente três vezes superior em relação ao TC-LECC, foi adotado como o meio concentrado para os experimentos de pseudoperfusão em frascos agitados e de perfusão em biorreator de bancada. A composição desse meio também é confidencial.

4.2.2 Banco de trabalho

Um banco de trabalho (*working cell bank* - WCB) foi preparado a partir de um criotubo do banco mestre (*master cell bank* - MCB) de células CHO DP-12 do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC), do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

Um criotubo de 1 mL do MCB, mantido a -80°C e contendo 10^7 células, foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37°C . O conteúdo do criotubo foi ressuspensão em cerca de 10 mL de TC-LECC suplementado com L-glutamina, IGF e mistura 1:1 de hipoxantina e timidina (HT), e centrifugado (CT-6000, Cientec) a 200g durante cinco minutos à temperatura ambiente. O *pellet* obtido foi ressuspensão em meio fresco e as células incubadas conforme item 4.2.3. Foram realizadas passagens das células em meio fresco em intervalos de dois dias, até que a viabilidade celular atingisse um valor superior a 95%. As células foram então centrifugadas, ressuspensas em meio TC-LECC fresco contendo dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 10% (v/v), aliqüotadas para 30 criotubos (Corning Inc.) em frações de 1 mL contendo 10^7 células, e acondicionadas a -80°C , formando o banco de trabalho usado ao longo do presente estudo.

4.2.3 Condições de cultivo

Para a realização dos experimentos, um criotubo do WCB foi descongelado em banho-maria, o conteúdo foi ressuspensão em 10 mL de meio TC-LECC e centrifugado (200g, 5 minutos) para a remoção do DMSO. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensão em um volume de meio suficiente para uma concentração de células viáveis (X_v) entre 0,5 e $1 \cdot 10^6$ cels/mL, e incubado em frascos de policarbonato com tampa ventilada tipo *erlenmeyer* (Corning Inc.) ou tubos de polipropileno com fundo cônico e tampa ventilada (*tubespins*,

TPP) em estufa (Thermo Electro Corporation), a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ e agitação entre 160 e 180 rpm. As plataformas de agitação (*shakers*) disponíveis tinham órbita de 2,5 cm (109/1TCM, Nova Ética) ou de 5 cm (ES-X, Kuhner, e Innova 2300, New Brunswick).

Para a obtenção de inóculo em quantidade suficiente para os experimentos, foram realizadas passagens em meio fresco em intervalos de dois a quatro dias, com X_v inicial entre 0,5 e $1 \cdot 10^6$ cels/mL.

4.3 Ensaios analíticos

4.3.1 Concentração de células e viabilidade celular

A concentração celular foi determinada pelo método da exclusão de azul de tripan (DOYLE e GRIFFITHS, 1998). A contagem manual de células totais (viáveis e não-viáveis) foi realizada em câmara de Neubauer em amostras de cultivo coradas com corante azul de tripan 0,4% m/v (Sigma). Dez microlitros da suspensão foram aplicadas em cada um dos lados da câmara, e visualizadas em microscópio óptico.

A viabilidade foi calculada como a razão entre a concentração de células viáveis (i.e., não coradas com azul de tripan) e a concentração de células totais (coradas e não coradas).

4.3.2 Concentração de glicose e lactato

As concentrações de glicose (Glc) e de lactato (Lac) foram avaliadas no sobrenadante de amostras de cultivo por meio do analisador bioquímico YSI 2700 *Select Analyser* (YSI Inc.). Quando necessário, as amostras foram pré-diluídas em tampão PBS, de modo que as concentrações de glicose e de lactato estivessem próximas a 2,5 g/L e 0,5 g/L respectivamente, valores de referência do padrão interno de calibração.

4.3.3 Concentração de anticorpo

A quantificação de anticorpo foi realizada por meio de cromatografia de afinidade com proteína A (PA ID Cartridge, Applied Biosystems), com coluna de dimensões 2,1 mm diâmetro x 30 mm comprimento, acoplada a um filtro pré-coluna (Upchurch A356, VWR), em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence HPLC, Shimadzu).

Um anticorpo IgG obtido de soro humano (I4506, Sigma) foi utilizado como padrão externo de calibração. Um frasco de 10 mg de anticorpo liofilizado foi ressuspenso em 1 mL de solução NaCl 150 mM, aliquotado em frações de 25 µL e congelado a -20°C. Para cada nova corrida de quantificação, uma fração foi descongelada, diluída em 475 µL de meio TC-LECC, homogeneizada em vórtex e filtrada em seringa com membrana de tamanho de poro de 0,45 µm (Millex®-GV, Millipore). A concentração de proteína foi determinada por medida de absorvância a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), considerando o coeficiente de extinção molar para IgG de 13,6. A curva-padrão do ensaio em HPLC foi obtida pela injeção em duplicata de volumes entre 1 e 80 µL, sendo correlacionadas as massas às respectivas áreas do pico de eluição determinadas por detector de UV com comprimento de onda de 280 nm.

O tampão de diluição de amostra, carregamento e de lavagem (tampão A), composto por NaH₂PO₄ 10 mM e NaCl 150 mM (Vetec), foi ajustado para pH 7,20 com NaOH 1 M. O tampão de eluição (tampão B), com pH 2, continha NaCl 150 mM e HCl 12 mM. O tampão C, utilizado para a preservação da coluna após o uso, foi preparado com NaH₂PO₄ 10 mM e azida sódica (NaN₃) 0,02%, com pH ajustado para 7,40. Todos os tampões foram preparados em água ultrapura, filtrados em membrana 0,22 µm (Millipore) e armazenados a 4°C.

As amostras de cultivo foram centrifugadas e congeladas a -20°C até o momento da análise. O sobrenadante obtido foi então diluído com tampão A (quando necessário), filtrado com filtro de seringa de 0,45 µm e acondicionado em *vials* 12x32 mm (Waters), com um volume mínimo de 200 µL. No caso de volumes inferiores, foram utilizados insertos com capacidade de 150 µL (WAT094171, Waters). Os *vials* foram acondicionados no compartimento do auto-amostrador (SIL-20AC, Shimadzu), juntamente com um *vial* contendo TC-LECC filtrado (usado como branco) e um *vial* contendo a solução-padrão de IgG humano. Para verificar a reprodutibilidade da coluna, foram realizadas pelo menos seis

injeções de 40 µL de IgG padrão, de modo que o coeficiente de variação CV (equivalente à razão entre o desvio-padrão e a média aritmética) fosse igual ou inferior a 2% (AZEVEDO, 2012).

O tempo de duração de cada corrida foi de nove minutos, com uma vazão entre 2 e 3 mL/min, em temperatura ambiente. O volume de amostra injetado foi de 80 µL. O programa LC Solution (Shimadzu) foi utilizado para a programação das corridas e para a quantificação da massa de anticorpo nas amostras, com base na área dos picos obtidos para cada amostra na curva-padrão. A concentração de anticorpo [mAb], expressa em mg/L, foi calculada conforme a Equação 7 (Applied Biosystems, 2002):

$$[\text{mAb}] = \frac{m}{V} \times FD \times 1000 \quad (7)$$

onde:

m – massa de anticorpo quantificada em cada amostra (µg), com base na curva-padrão;

V – volume de injeção (µL);

FD – fator de diluição da amostra.

4.3.4 Osmolalidade

As medições de osmolalidade foram realizadas utilizando o osmômetro K-7400 (Knauer), por depressão do ponto de congelamento do sobrenadante de amostras de cultivo, conforme as instruções do fabricante.

4.4 Ensaios de pseudoperfusão (PP)

Os ensaios de pseudoperfusão (PP) foram realizados utilizando tubos agitados (*tubespins*, TPP), incubados sob agitação a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. O meio TC-LECC suplementado conforme item 4.2.1 foi adotado como o meio de cultivo basal na inoculação dos tubos para todos os experimentos. Para iniciar a troca de meio, os tubos foram centrifugados (200g, 5 minutos), e o volume de sobrenadante substituído por meio fresco foi determinado de acordo com a taxa de diluição adotada, calculado com base no volume de

trabalho do sistema, i.e., considerando a soma do volume de empacotamento das células e do volume do sobrenadante líquido. Para estabelecer um estado quase-estacionário de concentração celular, remoções controladas de células foram realizadas previamente à centrifugação.

4.4.1 Primeiro ensaio para avaliação da pseudoperfusão (PP 1): comparação com batelada

Nesse experimento, foram comparados o perfil de crescimento celular, consumo e formação de metabólitos e produção de anticorpo para a batelada simples e diferentes condições de pseudoperfusão. Foram avaliadas quatro condições, cada uma em triplicata biológica (i.e., três tubos para cada condição):

- 1) operação em batelada simples;
- 2) PP utilizando TC-LECC como meio de alimentação, aplicando uma taxa de diluição arbitrariamente selecionada: 0,5 vvd (quando $\text{Glc} \sim 2 \text{ g/L}$), 0,75 vvd (quando $1 < \text{Glc} < 2 \text{ g/L}$) e 1 vvd quando $\text{Glc} < 1 \text{ g/L}$;
- 3) PP utilizando TCx2D para alimentação, aplicado em degraus entre 0,1 e 0,3 vvd;
- 4) PP utilizando TCx2D para alimentação, aplicado a uma taxa de diluição calculada conforme a demanda das células por glicose (ver item 4.4.4).

Os 12 tubos foram inoculados com uma suspensão celular a $0,3\text{-}0,4 \cdot 10^6 \text{ cels/mL}$ e incubados sob agitação a 170 rpm (ES-X, Kuhner AG). Amostras foram coletadas diariamente para a contagem de células e medição de glicose e lactato. Alíquotas do sobrenadante foram congeladas a -20°C para a posterior determinação de concentração de anticorpo. Inicialmente, os tubos foram mantidos em batelada até que a concentração de glicose atingisse entre 1 e 2 g/L. A partir desse ponto, iniciou-se a pseudoperfusão conforme definido para as condições 2, 3 e 4, sendo o volume de trabalho de 10 mL. Novas amostras foram coletadas pós-alimentação para medir glicose e lactato.

4.4.2 Segundo ensaio de pseudoperfusão (PP 2): comparação entre alimentação com TC-LECC e TCx2D

Esse experimento teve como objetivo comparar a alimentação entre o meio de cultivo basal (TC-LECC) e o meio concentrado (TCx2D), aplicados a taxas de diluição inversamente proporcionais à concentração de glicose e glutamina do meio. Para isso, foram avaliadas duas condições, em duplicata biológica:

1) PP utilizando TC-LECC como meio de alimentação, aplicado a uma taxa de diluição crescente (0,15; 0,30; 0,45; 0,75 e 1 vvd);

2) PP utilizando TCx2D como meio de alimentação. Uma vez que esse meio é aproximadamente três vezes mais concentrado em glicose e glutamina em relação ao TC-LECC, as taxas de diluição aplicadas corresponderam a um terço em relação à condição 1 (i.e., 0,05; 0,10; 0,15; 0,25 e 0,35 vvd, respectivamente).

Como controle, foi mantido um tubo em batelada simples. Os cinco tubos foram inoculados com uma suspensão celular a $0,3-0,4 \cdot 10^6$ cels/mL, incubados sob agitação a 168 rpm (Innova 2300, New Brunswick), com um volume inicial de 30 mL. Da mesma forma que o ensaio anterior, amostras foram coletadas diariamente para determinação de X_v , Glc, Lac e osmolalidade, e alíquotas foram armazenadas a -20°C para quantificar anticorpo. A perfusão foi iniciada no dia 3, i.e., na metade da fase exponencial de crescimento celular, sendo o volume mantido constante em 25 mL em vez de 30 mL, devido às alíquotas de amostras coletadas durante a fase em batelada. Os tubos foram centrifugados conforme item 4.4 e, após a alimentação, amostras foram coletadas para medir as novas concentrações de glicose e de lactato.

4.4.3 Terceiro ensaio de pseudoperfusão (PP 3): alimentação com diferentes misturas de TC-LECC e TCx2D

Nesse experimento, foram avaliadas cinco diferentes composições de meio de alimentação resultantes da mistura de meio TC-LECC com meio TCx2D. Para cada composição, foi determinado um perfil de alimentação de acordo com a concentração de

glicose em relação à do meio basal TC-LECC (Glc_{rel}), obtida após a mistura dos meios. As cinco condições, testadas em duplicata, foram:

1) PP alimentado com TC-LECC ($Glc_{rel} = 1$), visando a taxas de diluição de 0,15; 0,30; 0,50 e 1 vvd;

2) PP alimentado com TC-LECC:TCx2D em proporção 3:1 ($Glc_{rel} = 1,5$), visando a 0,10;0,20;0,33 e 0,67 vvd;

3) PP alimentado com TC-LECC:TCx2D em proporção 1:1 ($Glc_{rel} = 2$), visando a 0,075;0,15;0,25 e 0,5 vvd;

4) PP alimentado com TC-LECC: TCx2D em proporção 1:3 ($Glc_{rel} = 2,5$), visando a 0,060;0,12;0,20 e 0,40 vvd;

5) PP alimentado com TCx2D ($Glc_{rel}=3$); visando a 0,05;0,10;0,17 e 0,33 vvd.

As taxas de diluição efetivamente adotadas em função das concentrações de Glc medidas após o preparo das misturas de TC-LECC E TCx2D são mostradas na Tabela 5.1, na seção 5 (Resultados e Discussão).

A concentração de células inoculadas nos 10 tubos foi de aproximadamente $0,4 \cdot 10^6$ cels/mL, cultivadas em batelada durante três dias a 170 rpm em agitador de órbita 2,5 cm (109/1TCM, Nova Ética) disponível para o ensaio. Devido à órbita pequena, o volume inicial de trabalho foi de apenas 5,5 mL para garantir a homogeneização das células, conforme demonstrado por CASTILHO (2011). Amostras (50 μ L) foram coletadas para medir X_v , Glc e Lac, não sendo armazenadas alíquotas para análises posteriores devido ao pequeno volume disponível para amostragem nos primeiros dias. A partir do terceiro dia, foi iniciada a pseudoperfusão conforme as condições estabelecidas, mantendo um volume de trabalho de 5 mL. Alíquotas do sobrenadante coletado pós-centrifugação foram armazenadas e congeladas à -20°C para medição de osmolalidade e quantificação de anticorpo.

4.4.4 Ensaio em PP para avaliação do método adaptativo

O objetivo desses experimentos foi avaliar uma estratégia de alimentação baseada na demanda de glicose pelas células. A manutenção de uma baixa concentração de nutrientes, suficiente para manter a viabilidade celular e a produtividade, é uma maneira de reduzir o

acúmulo de subprodutos tóxicos, o que foi demonstrado em trabalhos de LI *et al.* (2005) e TENG *et al.* (2011).

Foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro correspondente à condição 4 do ensaio de PP 1 (item 4.4.1), com volume de trabalho de 10 mL e agitação a 170 rpm (ES-X, Kuhner); e o segundo em paralelo ao ensaio PP 3 (item 4.4.3), com volume de trabalho de 5 mL e agitação a 170 rpm (109/1TCM, Nova Ética). O meio de alimentação utilizado foi TCx2D aplicado a uma taxa de diluição calculada diariamente com base na demanda de glicose pelas células, de acordo com as Equações 8-11:

$$F_{n+1} = \frac{1}{\Delta t \cdot (Glc_A - Glc_n)} \cdot [S_{n+1} + (Glc_{crit} - Glc_n) \cdot V] \quad (8)$$

$$S_{n+1} = q_{glc} \cdot \sqrt{Xv_n \cdot Xv_{n+1}} \cdot \Delta t \cdot V \quad (9)$$

$$q_{glc} = \frac{Glc_{n-1} - Glc_n}{\sqrt{Xv_{n-1} \cdot Xv_n} \cdot \Delta t} \quad (10)$$

$$Xv_{n+1} = Xv_n \cdot e^{\mu \cdot \Delta t} \quad (11)$$

onde:

F_{n+1} – vazão de meio TCx2D necessária para atender a demanda de glicose para as 24 horas seguintes (L/h);

Δt – intervalo de tempo $t_{n+1} - t_n$, correspondente às 24 horas seguintes (h);

Glc_A – concentração de glicose no meio TCx2D (g/L);

Glc_n – concentração de glicose medida no instante t_n (g/L);

S_{n+1} – consumo total de glicose previsto para as 24 horas seguintes (g);

Glc_{crit} – concentração mínima de glicose mantida no meio, definida neste trabalho em 1 g/L (5,55 mM);

V – volume de trabalho (L);

q_{glc} - taxa específica de consumo de glicose (g/cel/d);

Glc_{n-1} - concentração de glicose medida após a alimentação no instante de tempo t_{n-1} ;

X_{vn} - concentração de células viáveis medida no dia (cel/L);

X_{vn+1} - concentração de células viáveis estimada para as 24 h seguintes;

μ - taxa específica de crescimento calculada para o intervalo t_n-t_{n-1} (d^{-1});

Foi utilizado o conceito de média geométrica para expressar a variação média da concentração celular nos intervalos de tempo amostrados.

A alimentação foi iniciada quando a concentração de glicose atingiu entre 1 e 2 g/L (5,55 e 11,1 mM). As condições de centrifugação e amostragem pré- e pós-alimentação foram as mesmas adotadas nos respectivos experimentos de pseudoperfusão em curso.

4.5 Ensaios de perfusão em biorreator

Os experimentos de perfusão foram realizados em um biorreator RALF Plus (BioEngineering AG), com um volume de trabalho de 1,1 L (Figura 4.1a). O programa BioScadaLab foi utilizado para controlar pH (7,2), temperatura (37°C), agitação (100 rpm) e DO (40% da saturação do ar). A mistura gasosa composta por ar, oxigênio puro e CO₂ foi injetada por meio de um tubo aberto submerso. O controle de temperatura foi realizado por meio de recirculação de água por uma camisa externa ao vaso. A DO foi controlada por uma cascata de controle de injeção de ar e oxigênio puro. O controle de pH foi realizado com a injeção de CO₂ para acidificação e adição de Na₂CO₃ 1 M por bomba peristáltica com rotação fixa (Peripex W1, BioEngineering) para alcalinização. Foram utilizadas duas turbinas (uma com pás inclinadas e uma do tipo Rushton) para a homogeneização da cultura.

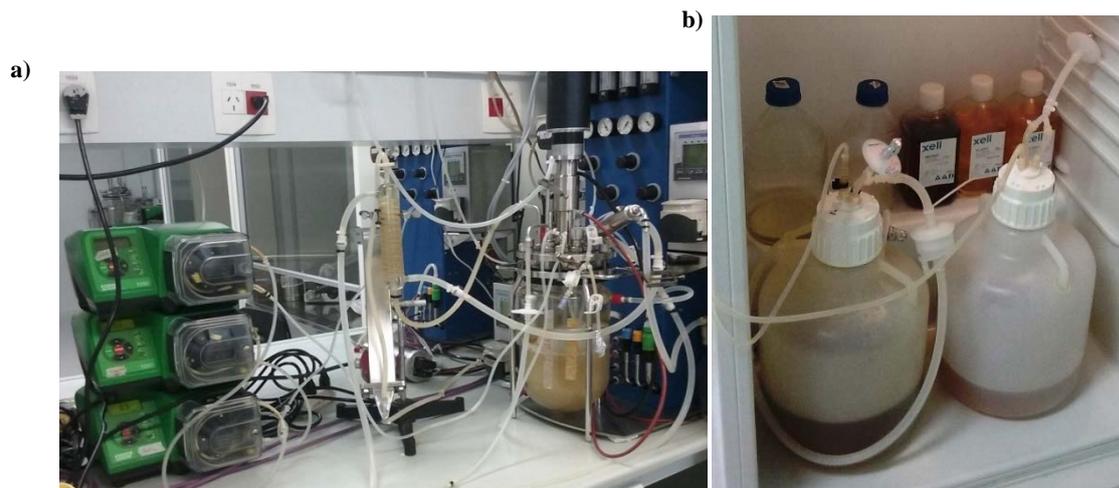


Figura 4.1. a) Biorreator RALF Plus 3,4 L (BioEngineering) operando em perfusão, utilizando o sedimentador inclinado CS10 como equipamento de retenção. b) Frascos tipo *carboy* de polipropileno autoclaváveis (Nalgene) contendo meio de alimentação (lado esquerdo) e perfundido (lado direito), mantidos a 4°C.

O sedimentador inclinado CS10 (Biotechnology Solutions) foi o equipamento de retenção utilizado (Figura 4.2a), operado conforme as recomendações do fabricante (Biotechnology Solutions, 2007). Ele possui quatro lamelas (Figura 4.2b), com área total de 484 cm², e a vazão máxima de operação recomendada é de 8 L/d de perfundido. O equipamento foi posicionado em um ângulo de 30° em relação à vertical. Anterior à entrada ao sedimentador, as células foram resfriadas à temperatura de 20°C em um condensador em serpentina. A vazão de recirculação das células concentradas foi de 35 mL/min. Para minimizar a aderência das células às lamelas e a consequente queda na eficiência de reciclo, foi utilizado um módulo de vibração, cujo ciclo de operação (15 s ligado e 10 min desligado) foi controlado por um temporizador programável (GraLab 451).

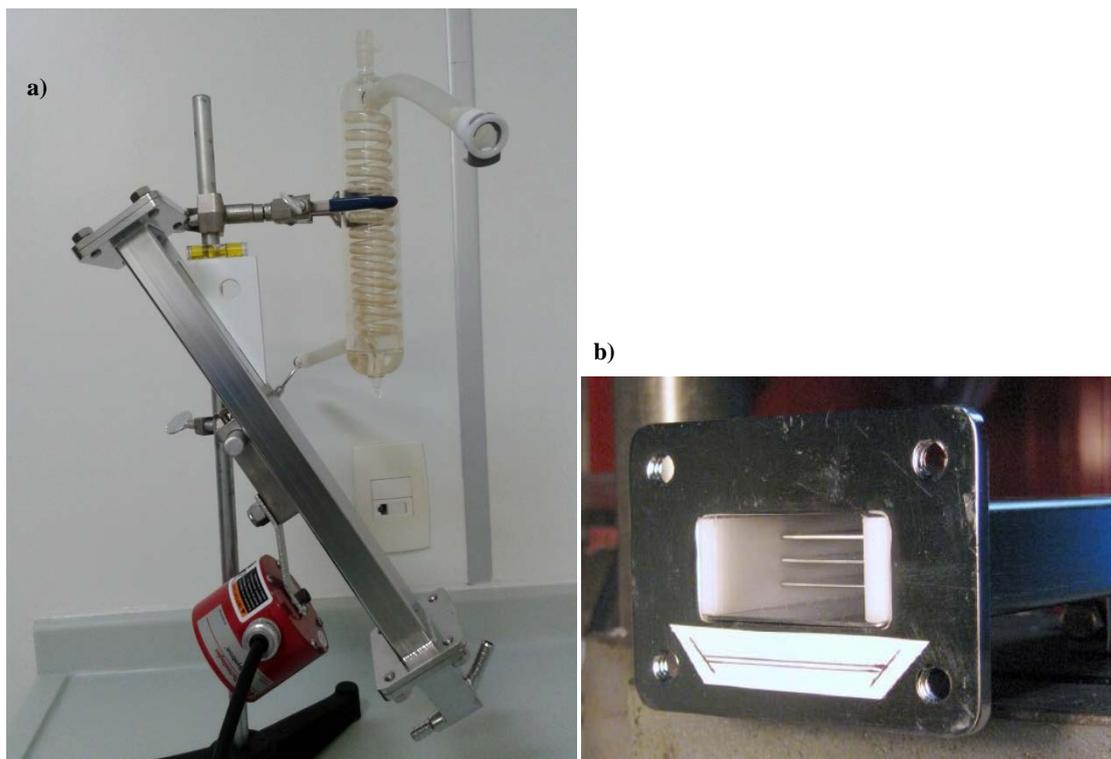


Figura 4.2. a) Sedimentador inclinado CS10 com trocador de calor, módulo de vibração acoplado (peça vermelha) e alinhado a 30° em relação à vertical. B) Interior do sedimentador, em que se visualizam as lamelas. Fontes: LAGES (2015); Biotechnology Solutions (2007).

Foram utilizadas três bombas peristálticas modelo 520U (Watson Marlow) para a corrente de alimentação de meio, saída de perfundido do sedimentador e saída controlada de células (purga). Uma bomba peristáltica com rotação variável Peripex W2 (BioEngineering) foi utilizada para a recirculação das células sedimentadas ao biorreator. A calibração das bombas foi realizada utilizando tubos Marprene® (Watson Marlow, especificação 902.0016.024), com diâmetro interno de 1,6 mm e espessura de parede de 2,4 mm. As curvas de calibração para cada bomba foram construídas cronometrando-se o tempo necessário para encher um balão volumétrico para cada velocidade de rotação pré-determinada.

As vazões de alimentação, saída de perfundido e de purga foram monitoradas por meio de pesagem dos frascos de coleta de perfundido (*carboy* de polipropileno) e de purga. Considerando a relação 1 L = 1 kg, a vazão de alimentação foi calculada pelo balanço de massa (Equação 12):

$$Q_A = Q_P + Q_B \tag{12}$$

onde:

Q_A – vazão de alimentação (L/d);

Q_P – vazão de perfundido (L/d);

Q_B – vazão de purga ou *bleed* (L/d).

As vazões correspondentes às taxas de diluição e de purga foram estabelecidas por meio de ajuste na rotação das bombas peristálticas, de acordo com as curvas de calibração.

O biorreator foi inoculado a uma X_v inicial de aproximadamente $0,6 \cdot 10^6$ cels/mL em meio TC-LECC, com um volume inicial de 1,5 L. Durante os primeiro três dias, o reator operou em batelada simples e, após esse período, foi iniciada a alimentação e a operação do sedimentador inclinado, com um volume de trabalho constante em 1,1 L, considerando o volume de aproximadamente 0,4 L necessário para o preenchimento do sedimentador e conexões.

Foram realizadas duas corridas de perfusão. Na primeira, denominada BIO007, foi utilizado o meio concentrado TCx2D como meio de alimentação, aplicado a taxas de diluição crescentes entre 0,1 e 0,35 vvd. No caso da segunda corrida (BIO008), por ser realizada em paralelo ao ensaio PP 3 (item 4.4.3), optou-se em utilizar como meio de alimentação a mistura TC-LECC:TCx2D na proporção 1:1 ($Glc_{rel} = 2$), correspondente à condição intermediária dentre as avaliadas no ensaio PP 3. As taxas de diluição aplicadas corresponderam a 0,075; 0,15; 0,25 e 0,50 vvd, conforme proposto na terceira condição do ensaio PP 3.

Amostras foram coletadas diariamente para determinar X_v , Glc, Lac e osmolalidade. Alíquotas de sobrenadante foram mantidas a -20°C para posterior quantificação de mAb.

4.6 Cálculos

4.6.1 Fração de volume de troca (%)

A taxa de diluição (vvd) aplicada nos experimentos de pseudoperfusão e de perfusão em biorreator foi expressa como valores percentuais do volume de trabalho, a fim de facilitar a visualização de acordo com a escala utilizada nos gráficos, sendo $1 \text{ vvd} = 100\%$,

4.6.2 Taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ_{exp})

O valor de μ_{exp} para um cultivo em batelada foi determinado por meio do modelo exponencial de crescimento (Equação 13) aplicado à fase exponencial, portanto aos pontos de X_v correspondentes à região linear de um gráfico $\ln(X_v)$ vs. tempo:

$$X_v = X_{v0} e^{\mu_{exp} t} \quad (13)$$

onde:

X_{v0} – concentração de células viáveis inicial;

t – tempo;

μ_{exp} - taxa específica de crescimento na fase exponencial.

4.6.3 Taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}), de formação de lactato (q_{lac}) e de mAb (q_{mab})

As taxas específicas para cultivos em batelada foram determinadas conforme descrito por RENARD *et al.* (1988), plotando-se os valores cumulativos de glicose, lactato e mAb em função dos valores da integral de células viáveis (ICV). Para o cálculo de ICV em um dado tempo n , expresso em cels·d/mL, foi adotada a regra do trapézio (Equação 14):

$$ICV_n = \sum_{i=1}^n \frac{(X_{v_{n-1}} + X_{v_n})}{2} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (14)$$

A inclinação da curva obtida em cada ponto correspondeu ao valor da taxa específica nesse ponto.

Nos ensaios de pseudoperfusão, o sistema foi avaliado como uma batelada durante cada intervalo de amostragem $t_n - t_{n-1}$. As taxas específicas q_n para cada intervalo foram calculadas conforme Equação 15:

$$q_n = \frac{(C_{n-1} - C_n)}{\sqrt{(X_{v_{n-1}} \cdot X_{v_n})} \cdot (t_n - t_{n-1})} \quad (15)$$

Onde C corresponde à concentração do metabólito avaliado.

Para os ensaios de perfusão, as taxas específicas foram determinadas de acordo com as Equações 16 e 17, com base nas equações de balanço de massa para substrato e produto (CHICO *et al.*, 2008):

$$q_P = \frac{1}{\sqrt{(X_{v_{n-1}} \cdot X_{v_n})}} \cdot \left(\frac{P_{n-1} - P_n}{t_n - t_{n-1}} + \bar{D} \cdot \bar{P} \right) \quad (16)$$

$$q_{glc} = \frac{1}{\sqrt{(X_{v_{n-1}} \cdot X_{v_n})}} \cdot \left[-\frac{Glc_{n-1} - Glc_n}{t_n - t_{n-1}} + \bar{D} \cdot (Glc_A - \overline{Glc}) \right] \quad (17)$$

onde:

q_P – taxa específica de formação de produto (lactato ou mAb);

q_{glc} – taxa específica de consumo de glicose;

P – concentração de produto (lactato ou mAb);

\bar{D} – taxa de diluição média no intervalo Δt , levando em consideração a corrente de purga, quando aplicada;

\bar{P}, \overline{Glc} – concentração de produto e/ou glicose média no intervalo Δt .

4.6.4 Produtividade volumétrica (P_v)

Os valores de P_v foram calculados de acordo com a definição expressa pela Equação 1. Na condição de batelada, a massa acumulada de produto (P_{ac}) foi calculada multiplicando-se o volume pela concentração de anticorpo determinada no último dia de experimento (Equação 18):

$$P_{ac} = [mAb] \cdot V \quad (18)$$

Para cada condição avaliada nos ensaios de pseudoperfusão, os valores de P_{ac} foram determinados levando em consideração o volume de sobrenadante descartado em cada dia de troca, conforme apresentado pela Equação 19:

$$P_{ac} = V_F \cdot [mAb]_F + \sum([mAb]_H \cdot V_H) \quad (19)$$

onde:

V_F – volume total do cultivo ao final do experimento;

$[mAb]_F$ – concentração de mAb determinada ao final do experimento;

$[mAb]_H$ – concentração de mAb determinada no sobrenadante coletado para cada dia em que foi realizada a troca de meio (exceto no último dia, quando o experimento foi encerrado);

V_H – volume de sobrenadante coletado, calculado em função do volume de trabalho e da taxa de diluição aplicada no dia (exceto no último dia).

5 Resultados e Discussão

5.1 Preparo do banco de trabalho de células CHO DP-12

Embora não constitua um dos objetivos de pesquisa no presente trabalho, nesse item serão apresentados os perfis de crescimento e de viabilidade celular referentes às passagens realizadas para a propagação de células no preparo do banco de trabalho (WCB).

Células animais cultivadas por longos períodos são suscetíveis a modificações genéticas, o que pode levar a alterações no seu padrão de crescimento e de produção da proteína recombinante. Além disso, as culturas estão suscetíveis a contaminações por micro-organismos e a falhas de operação de equipamentos, como *shakers* e estufas de incubação. Portanto, o objetivo de se produzir um banco de trabalho é garantir que culturas repetidas, iniciadas a partir de criotubos idênticos contendo células submetidas a um mesmo número de passagens, mantenham constantes as características de crescimento e de produção ao longo de um estudo ou para fins de produção industrial (LÉO *et al.*, 2008).

O banco de trabalho (WCB) projetado para os experimentos realizados no presente trabalho foi preparado a partir de um criotubo do banco mestre de células do laboratório (MCB), criopreservado a -80°C em meio de cultivo TC42 (Xell AG) isento de componentes de origem animal. Segundo informações do fabricante, esse meio possui uma composição similar ao meio TC-LECC, o qual foi desenvolvido a partir de TC42.

As primeiras tentativas de produção do WCB foram realizadas descongelando dois criotubos do MCB e transferindo o conteúdo para um frasco tipo *spinner* (Techne), para um volume final de 45 mL e sob agitação magnética 60 rpm. Entretanto, as células não sobreviveram a essas condições, provavelmente devido à baixa taxa de agitação (dados não apresentados).

A Figura 5.1. apresenta os perfis de crescimento celular e de viabilidade obtidos em cultivo realizado sob agitação orbital a 180 rpm (109/1TCM, Nova Ética), em *tubespin*, e posteriormente em frascos *erlenmeyer*. Três dias após o descongelamento em *tubespin*, observou-se uma redução de viabilidade de 85% para 59%. Foi realizada a

troca de meio (passagem 1), com a centrifugação das células seguida pela ressuspensão em meio TC-LECC fresco em igual volume. Três dias depois, a viabilidade aumentou para 84%. A partir desse momento, as passagens foram realizadas utilizando frascos *erlenmeyer*, com a ampliação do volume de trabalho de 30 para 100 mL. Em um total de cinco passagens, as células alcançaram uma concentração final de $3,3 \cdot 10^6$ cels/mL e viabilidade de 96%. Foram produzidos 31 criotubos contendo 1 mL de suspensão com 10^7 células.

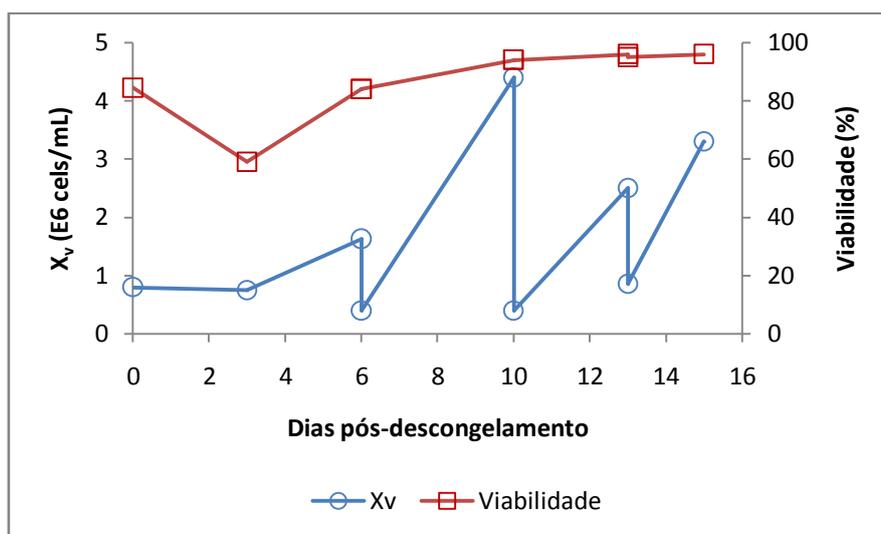


Figura 5.1. Perfis de concentração de células viáveis e de viabilidade obtidos em passagens em meio TC-LECC para a produção do banco de trabalho (WCB) CHO DP-12.

5.2 Ensaio de pseudoperfusão

5.2.1 Ensaio PP 1

5.2.1.1 Batelada (condição 1)

A condição 1 (batelada) apresentou duração de 9 dias, com valor máximo de X_v de $15 \cdot 10^6$ cels/mL alcançado no dia 7 (Figura 5.2). Na fase exponencial de crescimento, correspondente aos dias 1 a 4, as células apresentaram taxa específica de crescimento (μ_{exp}) de $0,81 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$ ($0,034 \text{ h}^{-1}$), equivalente a um tempo de duplicação (t_D) de $20,7 \pm 2,0$ horas. Esses valores estão próximos aos dados encontrados por CASTILHO (2011), que, para um cultivo dessa linhagem celular em meio TC42WP (Xell AG) realizado em *tubespins* com volume de trabalho de 20 mL e agitação 185 rpm, obteve μ_{exp} igual a $0,79 \text{ d}^{-1}$ e t_D de 21,1 horas. Em BECKMANN *et al.* (2012), os valores

máximos de X_v alcançados para cultivos em batelada oriundos de bancos de trabalho produzidos em diferentes períodos a partir de um cultivo de CHO DP-12 mantido por 426 dias variaram entre $11 \cdot 10^6$ e $21 \cdot 10^6$ cels/mL, sendo determinados os valores de μ_{exp} entre $0,71$ - $0,88$ d^{-1} .

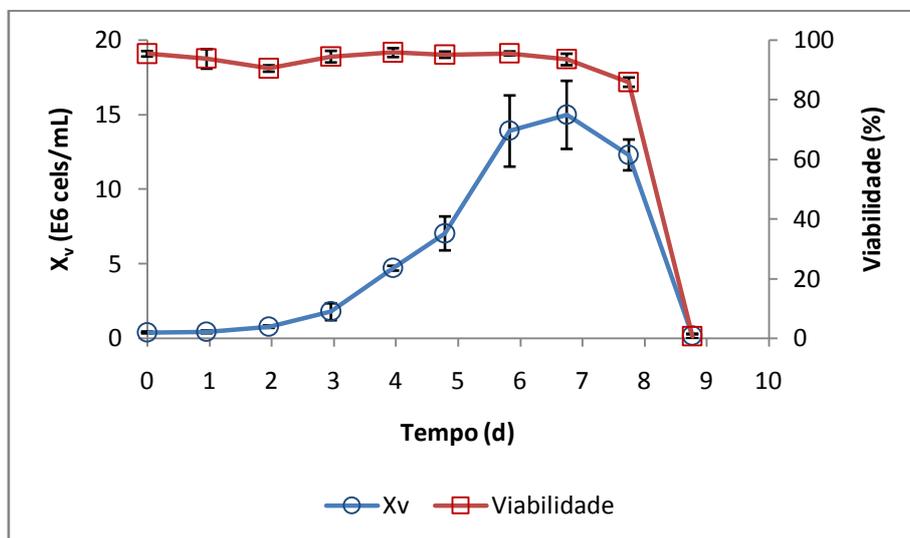


Figura 5.2. Curvas de crescimento celular e de viabilidade para batelada (condição 1, ensaio PP 1), realizada em *tubespin*. Dados apresentados na forma média±desvio-padrão (DP) para triplicata biológica.

No dia 7, a glicose atingiu o valor mínimo de $0,72$ mM, e desse modo, a taxa de consumo de lactato foi superior em relação à de produção (Figura 5.3). A utilização do lactato, fruto da ocorrência de um *shift* metabólico, sustentou as células até o dia 8, quando ambos os metabólitos se esgotaram e os valores de X_v e de viabilidade passaram a cair drasticamente. Apesar dos potenciais efeitos deletérios sobre o crescimento e a formação de produto, o lactato também pode servir como fonte de carbono e de energia para as células, principalmente quando a glicose se esgota (TSAO *et al.*, 2005). *In vivo*, parte do lactato é reoxidado a piruvato e secretado para o sangue. Parte é transferida para o fígado, sendo aerobicamente metabolizado para CO_2 ou convertido para glicose (AMABLE e BUTLER, 2008). As concentrações inibitórias de lactato variam entre as diferentes linhagens celulares (OZTURK *et al.*, 1992).

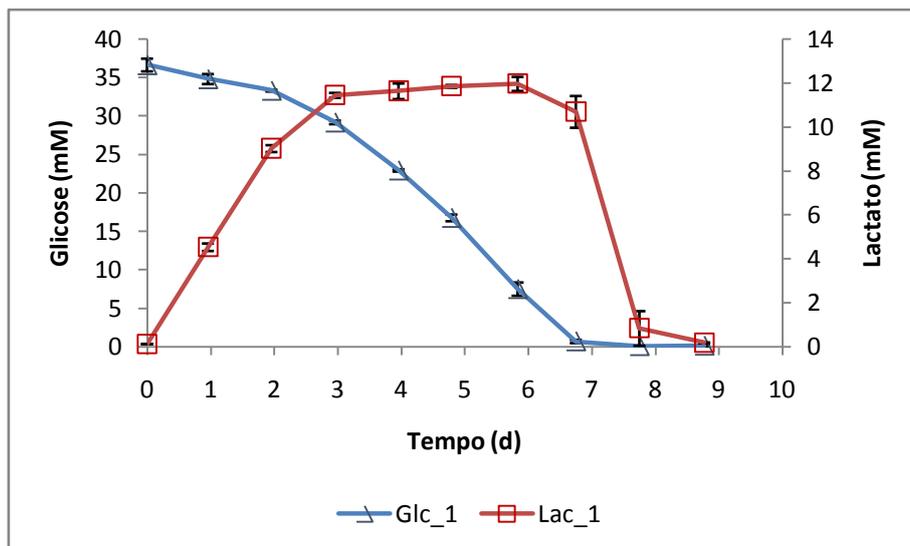


Figura 5.3. Perfis de concentração de glicose e de lactato obtidos em cultivo em batelada (condição 1, ensaio PP 1). Dados apresentados como média±DP para triplicata biológica.

A Figura 5.4 mostra que as taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e de formação e/ou consumo de lactato (q_{lac}), correspondentes à inclinação das curvas de concentração de Glc e Lac em função de ICV, não são constantes ao longo do cultivo. Esses perfis estão consistentes com aqueles obtidos por TSAO *et al.* (2005) para a linhagem CHO-DUKXB11, para a qual também foram observados os maiores valores de q_{glc} na fase inicial de cultivo, quando as células estão ativamente crescendo, acompanhada pelo rápido acúmulo de lactato. Na fase exponencial, os valores de q_{glc} e de q_{lac} determinados foram, respectivamente, de -0,095 pmol/cel/h e 0,045 pmol/cel/h. Esse comportamento corresponde à glicólise aeróbia (ZAGARI *et al.*, 2013; WAHRHEIT, 2014). Quando as células alcançaram um aparente estado estacionário de crescimento e a glicose atingiu uma concentração muito baixa, foi observado o início do consumo de lactato, evidenciado pelo decréscimo do valor líquido de lactato acumulado no meio. As mudanças das taxas específicas para esses metabólitos comprovaram que o estado fisiológico das células não se manteve constante ao longo da batelada, o que é esperado para esse modo de operação.

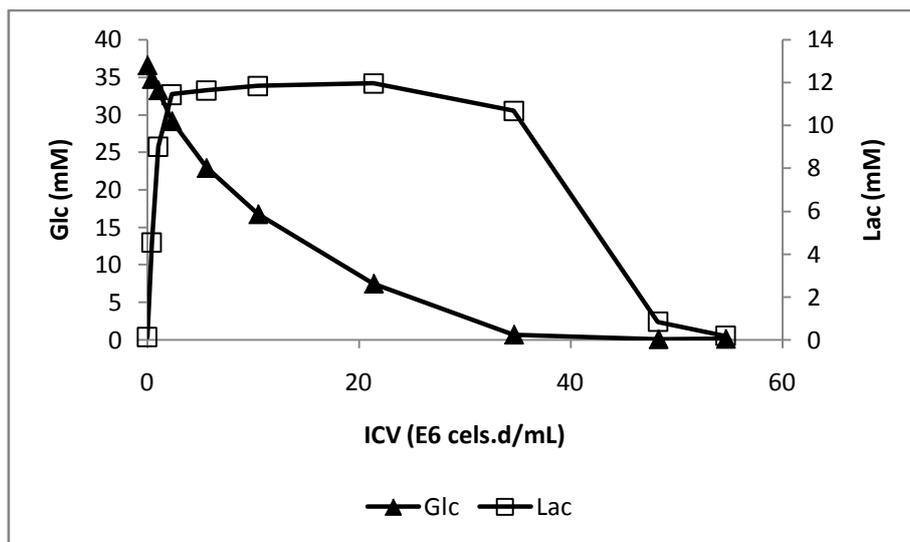


Figura 5.4. Análise do perfil metabólico para consumo de glicose e produção e/ou consumo de lactato em cultivo em batelada. A inclinação das curvas indica as respectivas taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e lactato (q_{lac}) em um dado ponto.

Com relação à produção de mAb, a maior concentração alcançada foi de $122,1 \pm 32,4$ mg/L no dia 7, conforme apresentado na Figura 5.5a. Esse resultado foi similar ao obtido por KLAUSING *et al.* (2011) em um cultivo em biorreator em batelada (110 mg/L), porém inferior ao que se preconiza no catálogo da ATCC para a linhagem CHO DP-12 clone#1934, de 250 mg/L. O perfil da taxa específica de produção de anticorpo (q_{mab}) evidencia que esse valor permanece constante durante a fase exponencial e no início da fase estacionária, seguida por uma redução que coincide com a fase de morte das células (Figura 5.5b). O valor de q_{mab} determinado para a região linear foi de 3,4 pcd (picograma de proteína por célula por dia), comparável aos resultados obtidos em batelada por KLAUSING *et al.* (2011), de 1,2 pcd, e HAREDY *et al.* (2013), de 2,8 pcd.

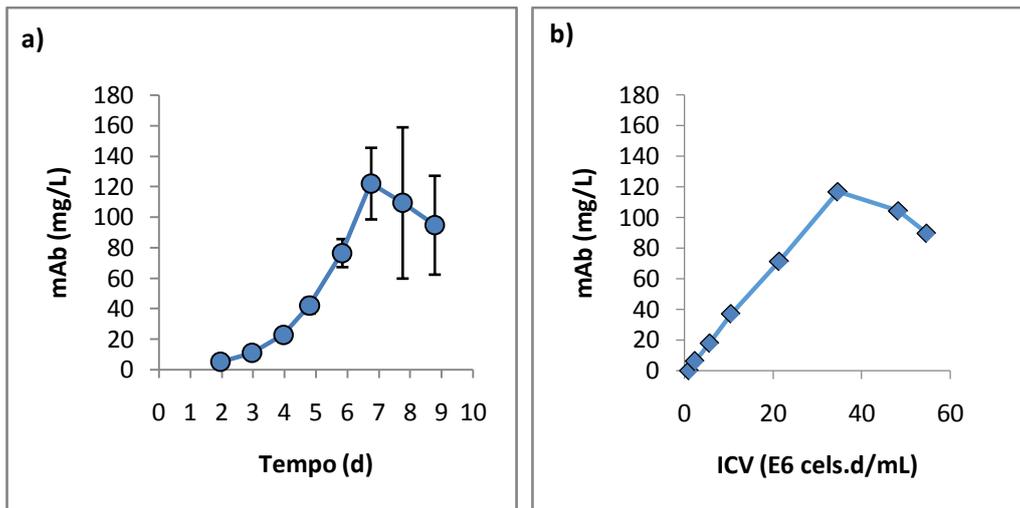


Figura 5.5. a) Curva de concentração de anticorpo anti-IL8 produzido em batelada (dados apresentados como média±DP em triplicata biológica). b) Relação entre ICV e concentração de mAb; a inclinação da curva representa q_{mab} no ponto avaliado.

5.2.1.2 Pseudoperfusão (condições 2 e 3)

Nas condições 2 e 3, a duração dos cultivos foi de 11 dias, dado que a viabilidade caiu a menos de 70%, conforme mostra a Figura 5.6. Os valores de μ_{exp} determinados para as condições 2 e 3 no período entre os dias 1 a 4 foram respectivamente de $0,79 \pm 0,04$ e $0,82 \pm 0,06$ d^{-1} , correspondentes aos valores de t_D de $21,0 \pm 1,06$ h e $20,3 \pm 1,49$ h respectivamente. Esses valores são equivalentes aos calculados para a condição 1 em batelada (item 5.2.1.1).

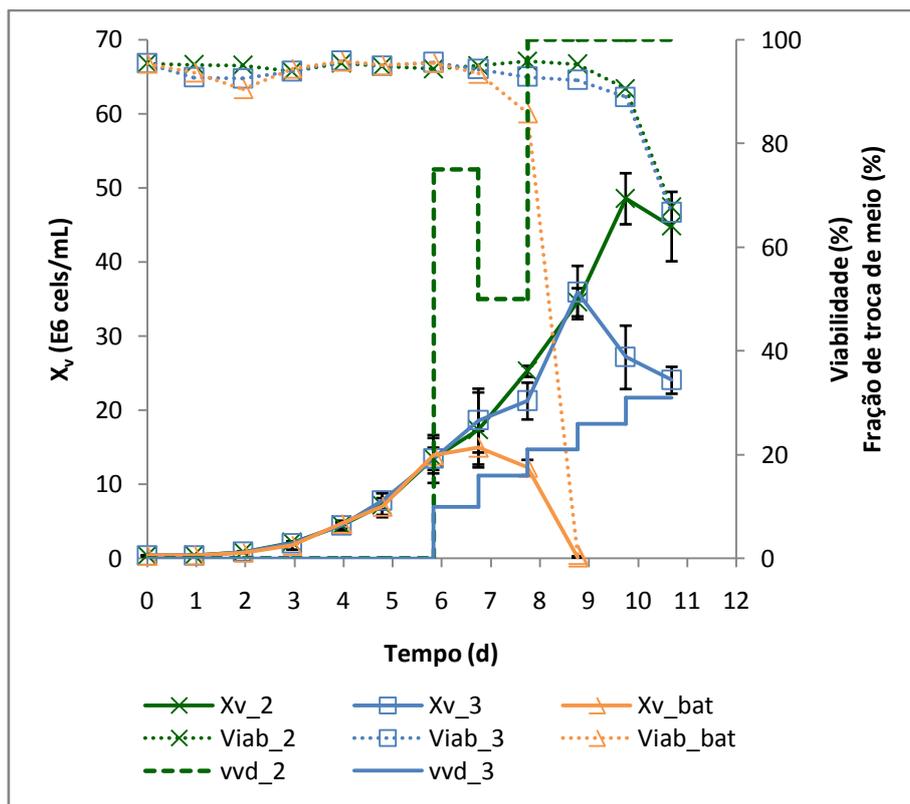


Figura 5.6. Curvas de concentração de células viáveis, viabilidade e taxa de diluição referentes às condições 1 (batelada), 2 (TC-LECC) e 3 (TCx2D). Dados apresentados como média±DP para triplicata biológica.

Conforme se observa na Figura 5.6, o prolongamento da fase exponencial até o décimo dia para a condição 2, e até o nono dia para a condição 3, foi evidenciado determinando-se os valores de μ_{exp} respectivamente de $0,525 \pm 0,003 \text{ d}^{-1}$ e $0,57 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ (considerando que não houve perda de células na remoção do sobrenadante), ao passo que, na batelada, as fases estacionária e de morte, condições nas quais $\mu \leq 0$, corresponderam ao período entre os dias 6 e 9 (Figura 5.2). Os valores de t_D para as condições 2 e 3 foram respectivamente $31,7 \pm 0,17$ e $29,1 \pm 0,87 \text{ h}$.

A troca de meio foi iniciada no sexto dia, quando a concentração de glicose (Figura 5.7a) atingiu valores entre 1 (5,55 mM) e 2 g/L (11,1 mM).

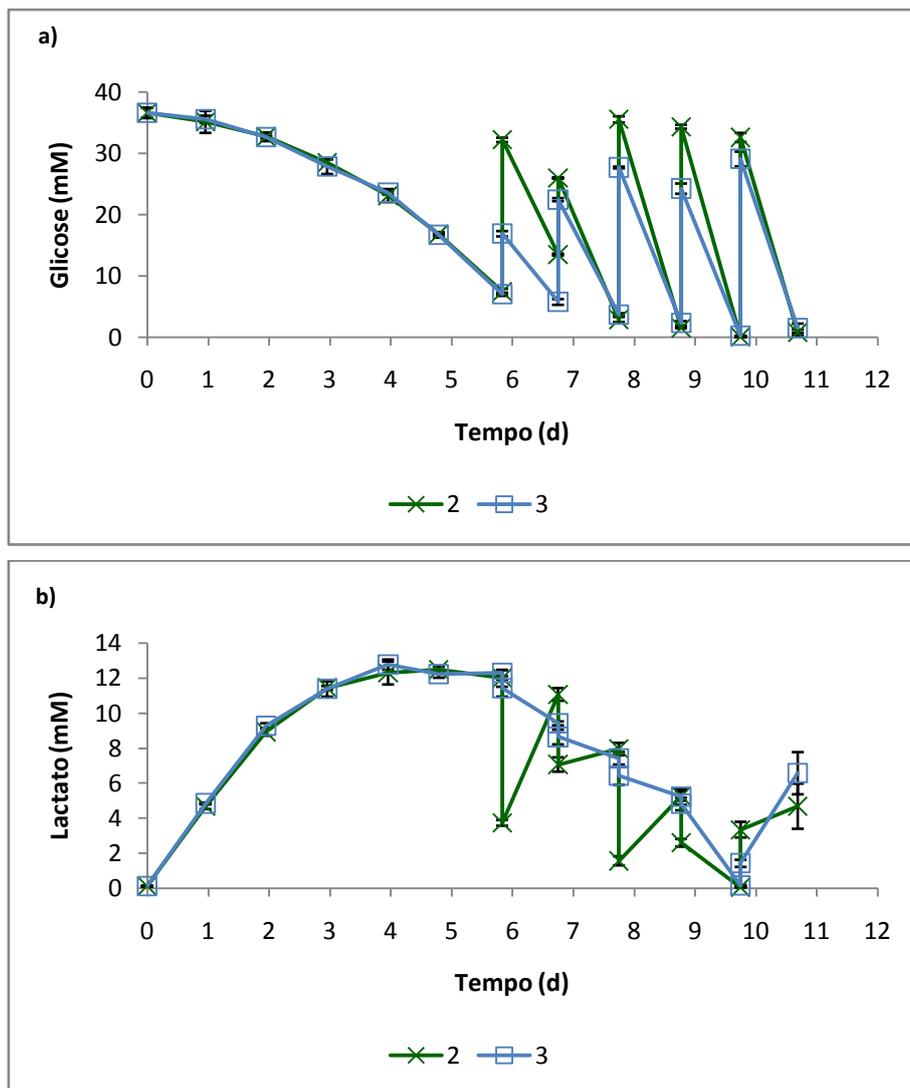


Figura 5.7. Perfis de concentração de (a) glicose e de (b) lactato para as condições 2 e 3, ensaio PP 1 (média±DP para triplicata biológica). A partir do dia 6 (início da alimentação), foram plotados os valores de concentração antes e após a troca de meio.

Na condição 2, alimentada com meio TC-LECC, inicialmente foi aplicada uma taxa de perfusão de 0,75 vvd, pois a concentração de glicose determinada foi de 7,5 mM (1,35 g/L), conforme critério apresentado no item 4.4.1. No dia seguinte, uma vez que a concentração de glicose foi de 13,5 mM (2,43 g/L), a taxa de perfusão foi reduzida para 0,5 vvd. Dos dias 8 a 11, a taxa de perfusão foi mantida em 1 vvd, conforme apresentado na Figura 5.6. Apesar de ter sido adotada uma estratégia de alimentação dependente de determinadas faixas de Glc, não era esperado reduzir a taxa de diluição ao longo do experimento, como, por exemplo, entre os dias 6 e 7 (redução de 0,75 para 0,5 vvd), visto que as células deveriam estar em ativo crescimento em decorrência da aplicação de uma corrente de entrada de nutrientes e de remoção de metabólitos tóxicos.

Após a troca de meio, a concentração de glicose da condição 2 aumentou para um valor médio de $31,7 \pm 3,7$ mM (próxima à concentração do meio TC-LECC fresco, de aproximadamente 33 mM), enquanto que a concentração de lactato foi reduzida de $6,89 \pm 3,44$ para $3,67 \pm 2,11$ mM. A viabilidade manteve-se acima de 90% até o dia 10, e X_v alcançou um pico de $(48,6 \pm 3,5) \cdot 10^6$ cels/mL no dia 10 (Figura 5.6). No dia seguinte, o valor de X_v diminuiu para $(45,0 \pm 4,7) \cdot 10^6$ cels/mL e a viabilidade caiu para $67,7 \pm 3,8\%$, possivelmente porque a alimentação a 1 vvd com o meio basal não foi suficiente para suprir os nutrientes em quantidade suficiente para as células. O valor de Glc medido no dia 11 foi de apenas $0,83 \pm 0,44$ mM.

Na condição 3, na qual o meio concentrado TCx2D foi usado para alimentação, a taxa de perfusão variou entre 0,10 e 0,30 vvd, com incrementos diários de 0,05 vvd (Figura 5.6). O valor máximo de X_v , de $(36,0 \pm 1,90) \cdot 10^6$ cels/mL, foi alcançado no dia 9, com viabilidade de $92,2 \pm 2,1\%$. Ao ser aplicada a taxa de 0,26 vvd no dia 9, o valor de X_v no dia 10 diminuiu para $(27,2 \pm 4,3) \cdot 10^6$ cels/mL, com viabilidade de $89,0 \pm 1,4\%$. Uma possível causa para essa redução poderia ser o fornecimento insuficiente de glicose, uma vez que a concentração reduziu de $24,3 \pm 0,83$ mM (dia 9, pós-alimentação) para $0,28 \pm 0,05$ mM (dia 10). O lactato também foi consumido nesse período, com redução de $4,78 \pm 0,33$ para $0,17 \pm 0,04$ mM. As taxas de consumo de glicose (q_{glc}) estimadas no intervalo entre os dias 9 e 10 para as condições 2 e 3 foram respectivamente de $-0,044$ e $-0,032$ pmol/cel/h, enquanto que as taxas de consumo de lactato (q_{lac}) foram de $-3,35$ e $-6,40$ pmol/cel/h (ou seja, um aumento de 1,9 vezes), respectivamente. Com relação ao perfil metabólico na condição 3, foi observado que, mesmo após o suprimento de glicose pela adição de TCx2D, a concentração de lactato diminuiu em todos os intervalos avaliados, exceto entre os dias 10 e 11 (Figura 5.7). Esse resultado sugere que a estratégia em degraus adotada na condição 3 não forneceu quantidade suficiente de glicose às células, e estas passaram a consumir o lactato acumulado. A depleção da glutamina (não avaliada) também pode ter favorecido o consumo de lactato, conforme observado por ZAGARI *et al.* (2013). Por outro lado, o *shift* metabólico, quando controlado, representa uma situação desejável, pois o lactato reduz o pH do meio e pode afetar a qualidade do produto (LI *et al.*, 2012; WAHRHEIT, 2014). Outras possibilidades para a diminuição da concentração celular na condição 3 poderiam ser as características do próprio meio TCx2D, como pH próximo a 6,5 e

osmolalidade de 470 mOs/kg. Entretanto, pH e osmolalidade não foram monitorados nesse experimento.

A Figura 5.8 apresenta os perfis de mAb obtidos para as condições 1 (batelada), 2 e 3. Enquanto que na batelada o valor de P_v calculado foi de $10,8 \pm 2,2$ mg/L/d, foram estimados os valores de $36,9 \pm 20,1$ e $36,8 \pm 12,9$ mg/L/d, respectivamente, para as condições 2 e 3. Salienta-se que essas determinações foram realizadas a partir de dados de concentração de mAb com um erro experimental expressivo entre as replicatas biológicas. Portanto, a princípio, não seria possível afirmar: 1) que as condições de pseudoperfusão foram mais produtivas em relação à batelada; 2) que, em um teste de hipóteses, as condições 2 e 3 apresentariam valores de P_v distintos para um certo nível de confiança, já que o erro associado está na mesma ordem de grandeza das médias calculadas.

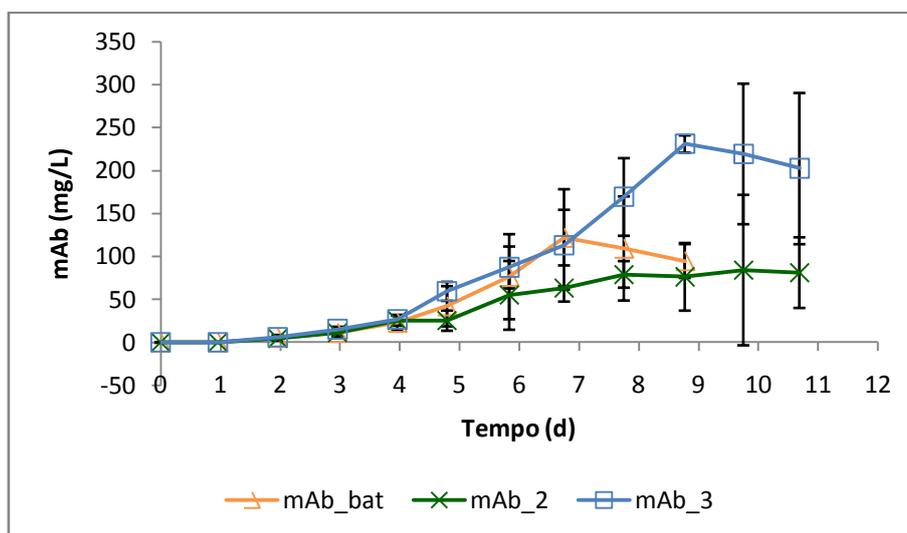


Figura 5.8. Concentração de mAb referente às condições 1 (batelada), 2 e 3 (média \pm DP para triplicata biológica).

5.2.2 Ensaio PP 2

No ensaio PP 2, foram comparados os perfis de crescimento celular, de produção de mAb e de consumo e/ou formação de glicose e lactato para duas condições de pseudoperfusão: 1) alimentação com TC-LECC; e 2) alimentação com TCx2D, em taxas de diluição equivalentes a um terço das taxas aplicadas na condição 1.

Diferentemente do ensaio PP 1, a alimentação foi iniciada no terceiro dia de experimento, quando a concentração de glicose atingiu $4,01 \pm 0,21$ g/L e o valor médio

de X_v foi de $(3,55 \pm 0,26) \cdot 10^6$ cels/mL, conforme mostra a Figura 5.9. Foi adotado iniciar a alimentação na metade da fase exponencial de crescimento, uma condição normalmente aplicada nos processos de perfusão. As taxas foram incrementadas em degraus, variando entre 0,15 e 1 vvd (condição 1), e 0,05 e 0,35 vvd (condição 2), embora alguns autores recomendem iniciar a alimentação a 1 vvd em processos alimentados com o meio de cultivo basal (CHOTTEAU, 2015).

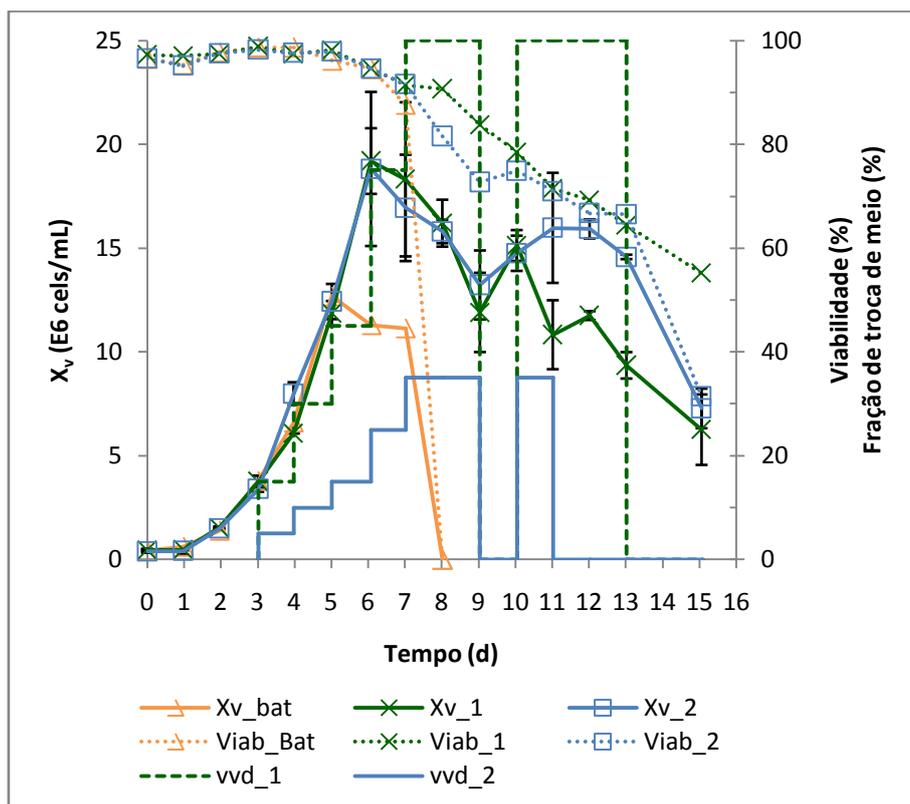


Figura 5.9. Curvas de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) referentes às condições 1 (TC-LECC), 2 (TCx2D) e controle (um *tubespín* em batelada simples). Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica (exceto batelada).

Entre os dias 3 e 5, a concentração de células foi igual para as duas condições e no controle em batelada. Enquanto que na batelada o valor máximo de X_v foi de $12,7 \cdot 10^6$ cels/mL alcançado no quinto dia, os picos para as condições 1 e 2 coincidiram no dia seguinte, com X_v médio igual a $(19,0 \pm 0,27) \cdot 10^6$ cels/mL. Apesar do aumento das taxas de diluição para os valores máximos de 1 e 0,35 vvd respectivamente nas condições 1 e 2, a concentração celular e a viabilidade reduziram. Para fins de comparação, no experimento anterior (PP 1), o valor máximo de X_v alcançado foi aproximadamente duas vezes superior. A causa provável para essa redução seria o maior volume de trabalho adotado nesse experimento (25 mL vs. 10 mL do ensaio PP

1), o que limitou a difusão do oxigênio devido à maior altura de líquido no tubo. XIE *et al.* (2011) observaram que o aumento do volume de trabalho e a redução da velocidade de agitação orbital reduziram o valor do k_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) em cultivos de CHO-DG44 mantidos em *tubespins*. Para uma velocidade de 180 rpm, os valores de k_{La} obtidos para os volumes de 10, 20 e 35 mL foram respectivamente de 24,3; 21,5 e 14,2 h^{-1} , a uma concentração X_v de aproximadamente $6 \cdot 10^6$ cels/mL alcançados para 10 e 20 mL (dados não fornecidos para 35 mL). Entretanto, a influência da velocidade de agitação orbital foi maior em relação à variação do volume do trabalho, uma vez que, a 160 rpm, o valor de k_{La} diminuiu cerca de 60% com o aumento do volume de 10 para 35 mL (XIE *et al.*, 2011). DeJESUS *et al.* (2004) não evidenciaram limitação de oxigênio nem alterações significativas de pH em cultivos mantidos em *tubespins* com X_v igual a $5 \cdot 10^6$ cels/mL, porém o volume de trabalho adotado foi de apenas 5 mL. CASTILHO (2011) observou que, para uma agitação de 185 rpm em um *shaker* com órbita de 5 cm, o desempenho do crescimento celular em *tubespins* com volumes de trabalho de até 30 mL se manteve inalterado. Contudo, a concentração máxima de células alcançada naquele trabalho foi de aproximadamente $12 \cdot 10^6$ cels/mL em cultivos em batelada, ao passo que na pseudoperfusão são obtidos maiores valores de X_v , aumentando a demanda global de oxigênio. Apesar da criticidade da DO, foi dado seguimento ao ensaio, de modo a comparar a aplicação de taxas de diluição proporcionalmente à concentração dos meios usados. As taxas máximas de diluição para cada uma das condições foram mantidas até o dia 9. A viabilidade para ambas as condições diminuiu a partir do sexto dia, sendo que redução foi mais rápida na condição 2.

A Figura 5.10a mostra que a alimentação com TC-LECC a 1 vvd na condição 1 foi suficiente para manter uma concentração de glicose entre 5,5 e 11 mM. Já para a condição 2, apesar de aplicado um terço das taxas de diluição da condição 1, atrelado ao fato de o meio TCx2D ser três vezes mais concentrado em glicose e glutamina, o valor de Glc sempre foi superior em relação à condição 1, mesmo com as concentrações de X_v similares para ambas as condições. Considerando que os níveis de X_v até o dia 10 foram muito semelhantes nas duas condições, a diferença no padrão de consumo de glicose poderia estar associada a outros fatores, tais como, por exemplo, a osmolalidade mais elevada na condição 2.

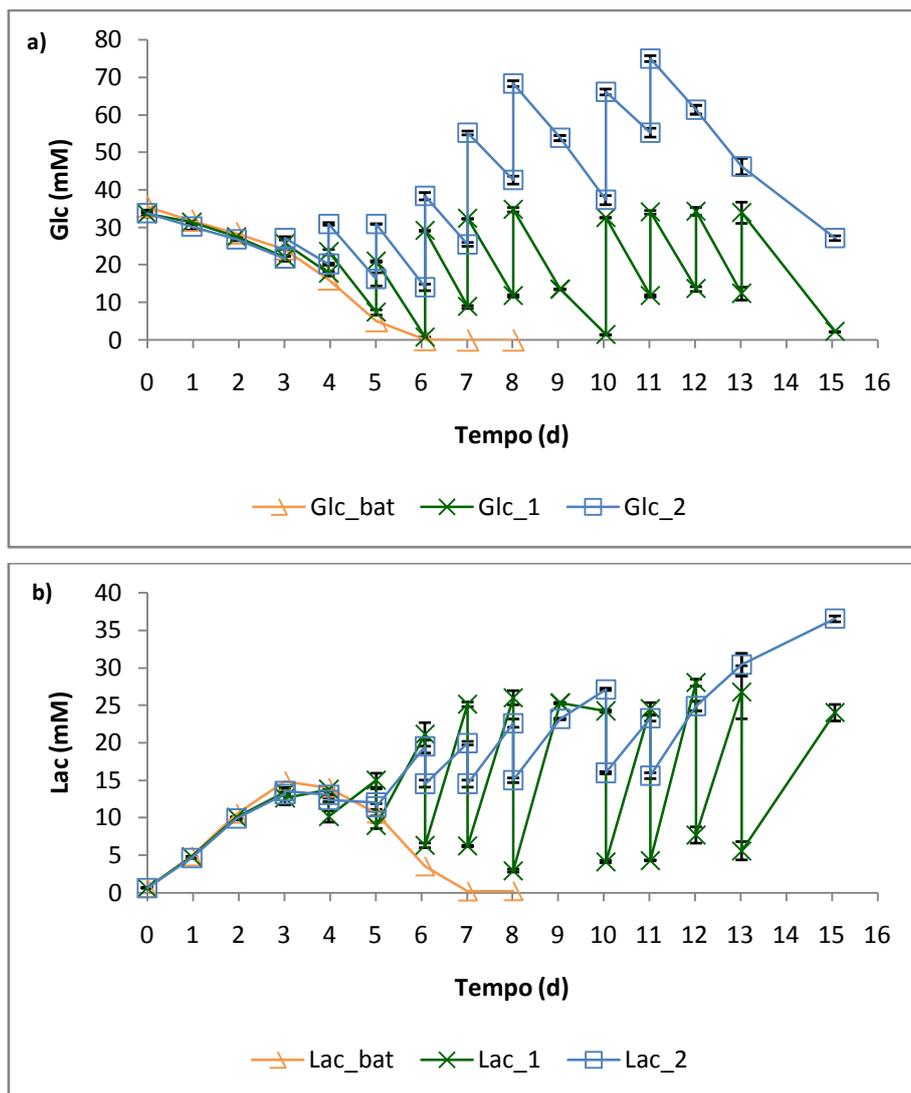


Figura 5.10. Perfis de concentração de glicose (a) e de lactato (b) para as condições 1, 2 e batelada, ensaio PP 2 (média±DP para duplicata biológica, exceto batelada).

Entre os dias 9 e 10, a alimentação foi interrompida em ambas as condições. As concentrações de glicose medidas no dia 9 foram $13,5 \pm 0,05$ mM na condição 1, e $53,8 \pm 0,72$ mM na condição 2. Foi observado um discreto aumento em X_v nesse intervalo para ambas as condições, além de uma pequena recuperação da viabilidade na condição 2 (Figura 5.9). Contudo, a Glc praticamente se esgotou na condição 1 ($1,44 \pm 0,05$ mM), o que provavelmente induziu ao consumo de lactato, cuja concentração residual manteve-se praticamente constante (de $25,2 \pm 0,11$ para $24,2 \pm 0,11$ mM). Na condição 2, a concentração de lactato nesse período aumentou de $23,2 \pm 0,11$ para $27,1 \pm 0,11$ mM. A alimentação foi restabelecida ao valor máximo de taxa de diluição determinado para ambas as condições, sendo novamente interrompida

na condição 2 entre os dias 11 e 15 (último dia do experimento), devido ao acúmulo de glicose, que alcançou o valor máximo de $75\pm 0,77$ mM no dia 11. Nos dias 12 e 13, a condição 2 apresentou valores de X_v significativamente superiores em relação à condição 1, apesar de não ter sido realizada a troca de meio com TCx2D.

A concentração de lactato pré-alimentação manteve-se praticamente constante em $25,5\pm 1,33$ mM na condição 1. Na condição 2, não foi observado o *shift* metabólico a exemplo do ensaio PP 1, provavelmente porque o nível de glicose sempre permaneceu elevado. Destaca-se que entre, os dias 11 e 15, período em que a alimentação com TCx2D foi suspensa, esse metabólito acumulou-se, atingido uma concentração máxima de $36,5\pm 0,44$ mM no último dia (Figura 5.10b). Além disso, no intervalo entre os dias 13 e 15, a viabilidade celular caiu drasticamente de 66 para 31% nessa condição (Figura 5.9).

A Figura 5.11 mostra que, na condição 2, houve um aumento gradual na osmolalidade, enquanto que na condição 1 houve a estabilização em 280 mOsm/kg, valor dentro da faixa de 260-320 mOsm/kg recomendada para cultivos de células animais (OZTURK e PALSSON, 1991a). Na batelada, o perfil de osmolalidade foi semelhante ao de lactato (i.e., aumento seguido pelo decréscimo), já que o lactato contribui para a osmolalidade do meio (OZTURK *et al.*, 1992). O alcance de valores próximos a 500 mOsm/kg na condição 2, inibitório para muitas células animais, estaria relacionado ao fato de o próprio meio TCx2D apresentar uma osmolalidade mais elevada (entre 445-475 mOsm/kg), o que justificaria a diminuição da concentração de células viáveis e consequentemente o acúmulo de glicose.

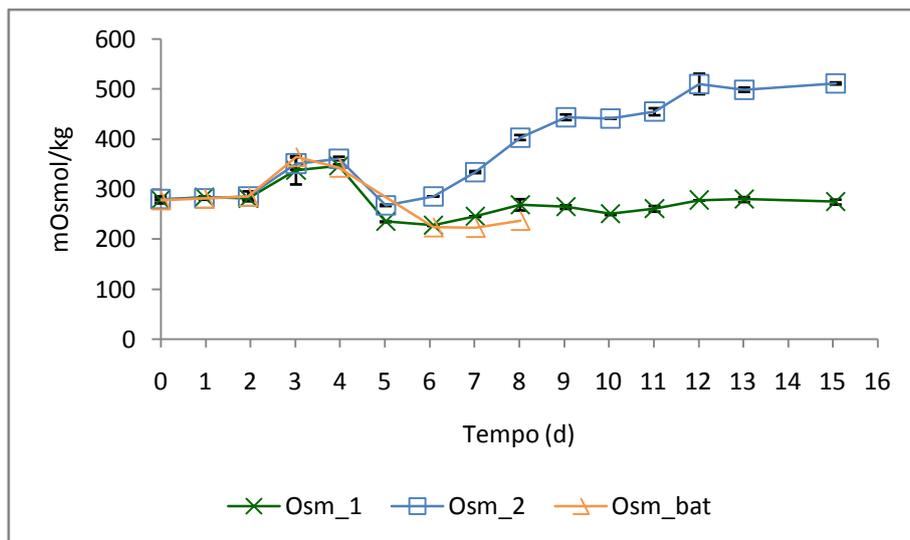


Figura 5.11. Perfil de osmolalidade para as condições 1, 2 e batelada, ensaio PP2. Dados apresentados como média±DP em duplicata biológica (exceto batelada).

A concentração de anticorpo determinada na condição 2 foi, em média, quatro vezes superior em relação à condição 1 entre os dias 7 e 10, conforme apresentado na Figura 5.12. Em alguns trabalhos, foi observado que as condições hiperosmóticas podem elevar a taxa específica de produtividade (q_p). Por exemplo, OZTURK e PALSSON (1991a) observaram um aumento de pelo menos duas vezes em q_{mab} no cultivo em batelada de um hibridoma a 435 mOsm/kg em relação à condição controle de 290 mOsm/kg, porém acompanhado por uma redução de 50% na taxa específica de crescimento. Entretanto, os valores de q_{mab} avaliados em cada intervalo de amostragem não indicaram uma tendência de aumento à medida que a osmolalidade se elevou gradualmente na condição 2 (dados não apresentados). Os valores de produtividade volumétrica (P_v) calculados para a condição 1 ($16,7 \pm 0,7$ mg/L/d) e condição 2 ($12,1 \pm 0,1$ mg/L) não se apresentaram estatisticamente distintos (teste t de Student, nível de significância de 5%). O valor de P_v na condição em batelada foi igual a 13,6 mg/L/d. Apesar de a alimentação com TC-LECC e TCx2D proverem produtividades equivalentes, salienta-se o possível efeito deletério da alta osmolalidade na condição 2 sobre a viabilidade celular, além da aeração insuficiente nesse sistema devido ao maior volume de trabalho.

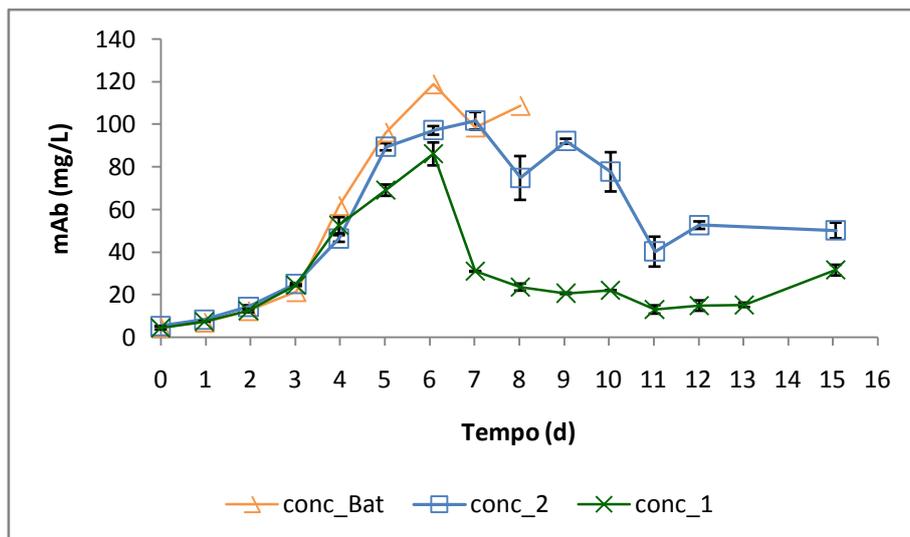


Figura 5.12. Perfil de concentração de mAb referente às condições 1, 2 e batelada (média±DP para duplicata biológica, exceto batelada).

5.2.3 Ensaio PP 3

Com base na experiência adquirida nos ensaios anteriores, foi desenhado um novo grupo de experimentos utilizando misturas de TC-LECC e TCx2D. Os cinco meios de alimentação utilizados nesse ensaio foram preparados com base em diferentes proporções de meio TC-LECC e meio TCx2D, conforme descrito no item 4.4.3. As taxas de diluição inicialmente propostas foram modificadas de acordo com as medições de glicose dos meios preparados, apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Estabelecimento de novas taxas de diluição para cada uma das cinco condições avaliadas no ensaio PP 3, recalculadas em função da concentração de glicose real.

Condição	Meio	Glc real (g/L)	Glc _{rel}	Taxas de diluição (vvd)
1	TC-LECC	7,47	1,0	0,15-0,30-0,50-1
2	TC-LECC 3 :TCx2D 1	10,6	1,4	0,11-0,21-0,36-0,71
3	TC-LECC 1 :TCx2D 1	13,4	1,8	0,083-0,17-0,28-0,55
4	TC-LECC 1 :TCx2D 3	16,4	2,2	0,068-0,14-0,23-0,45
5	TCx2D	18,8	2,5	0,060-0,12-0,20-0,40

A alimentação foi iniciada para as cinco condições no dia 3, quando as células estavam na fase exponencial de crescimento. A concentração de glicose média era de $4,80 \pm 0,04$ g/L ($26,6 \pm 0,22$ mM), e X_v igual a $(4,70 \pm 0,45) \cdot 10^6$ cels/mL.

Nesse ensaio, com duração total de 15 dias, buscou-se manter uma concentração celular constante em aproximadamente $40 \cdot 10^6$ cels/mL (estado pseudo-estacionário), inferior ao máximo alcançado no ensaio PP 1 (aproximadamente $50 \cdot 10^6$), para evitar um

rápido declínio da viabilidade associado ao esgotamento da glicose e à limitação na transferência de oxigênio. Para isso, foram realizadas purgas antes da centrifugação das células, cujas taxas (D_B) foram calculadas a partir do balanço de massa de células viáveis conforme Equação 3, considerando que não havia perda de células pelo sobrenadante ($\alpha=0$). Os perfis de X_v (Figura 5.13) obtidos mostram que o valor de $40 \cdot 10^6$ cels/mL foi alcançado para as condições 1, 2 e 3. Para a condição 1, foram realizadas purgas nos dias 8 ($D_B=0,28$ vvd), 12 (0,08 vvd) e 14 (0,03 vvd); para a condição 2, no dia 10 (0,12 vvd); e na condição 3, apenas no dia 11 (0,09 vvd). A necessidade de purgas seria um indício de que foi possível manter o crescimento celular utilizando meios um pouco mais concentrados em relação ao TC-LECC, com a vantagem de se aplicar menores taxas de diluição e conseqüentemente reduzir as quantidades de meio de alimentação e de perfundido, o que impactaria no aumento potencial da concentração de mAb e na redução de custos para a escala industrial. A viabilidade manteve-se acima de 90% por pelo menos 12 dias nessas três condições, enquanto que na condição 5, a viabilidade diminuiu expressivamente a partir do dia 8 (Figura 5.13e). A exemplo dos ensaios PP 1, a alimentação com TCx2D, mesmo aplicado a uma taxa de diluição de um terço em relação ao meio basal TC-LECC, não sustentou um crescimento celular equivalente, possivelmente devido à alta osmolalidade associada a esse meio (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Valores de osmolalidade (mOsm/kg) medidos nos dias 4, 7, 11 e 15 para as cinco condições avaliadas no ensaio PP 3. Dados apresentados como média \pm DP para duplicata biológica. Na condição 5, as medições para os dias 4, 11 e 15 não apresentam o desvio-padrão devido a falhas na determinação da osmolalidade.

Dia	Condição				
	1	2	3	4	5
4	286 \pm 25	300 \pm 16	301 \pm 11	302 \pm 4	294
7	255 \pm 9	294 \pm 9	346 \pm 13	386 \pm 18	422 \pm 30
11	249 \pm 14	301 \pm 6	355 \pm 6	423 \pm 1	498
15	258 \pm 16	304 \pm 9	362 \pm 1	453 \pm 6	528

As taxas de diluição máximas especificadas para as condições 1 (1 vvd), 2 (0,71 vvd) e 3 (0,55 vvd) foram mantidas constantes entre os dias 6 e 11, e entre os dias 6 e 12 para as condições 4 (0,45 vvd) e 5 (0,40 vvd), conforme mostrado na Figura 5.13 e na Figura 5.14. Após esses períodos, todas as taxas foram elevadas para 1 vvd, pois para as condições 1, 2 e 3, o volume de sobrenadante a ser substituído por meio fresco era praticamente equivalente a todo o volume da fase líquida devido ao expressivo volume de empacotamento das células, fato que comprometeu a acurácia na medição

dos volumes. Para as condições 4 e 5, essa estratégia de alimentação foi adotada apenas para comparar o desempenho dos cultivos de forma direta com as demais condições que já estavam a 1 vvd. Essa mudança, em princípio, refletiu-se apenas no aumento da concentração de glicose pós-alimentação nas condições 4 ($83,3 \pm 0,67$ mM) e 5 ($101 \pm 1,61$ mM) (Figura 5.14).

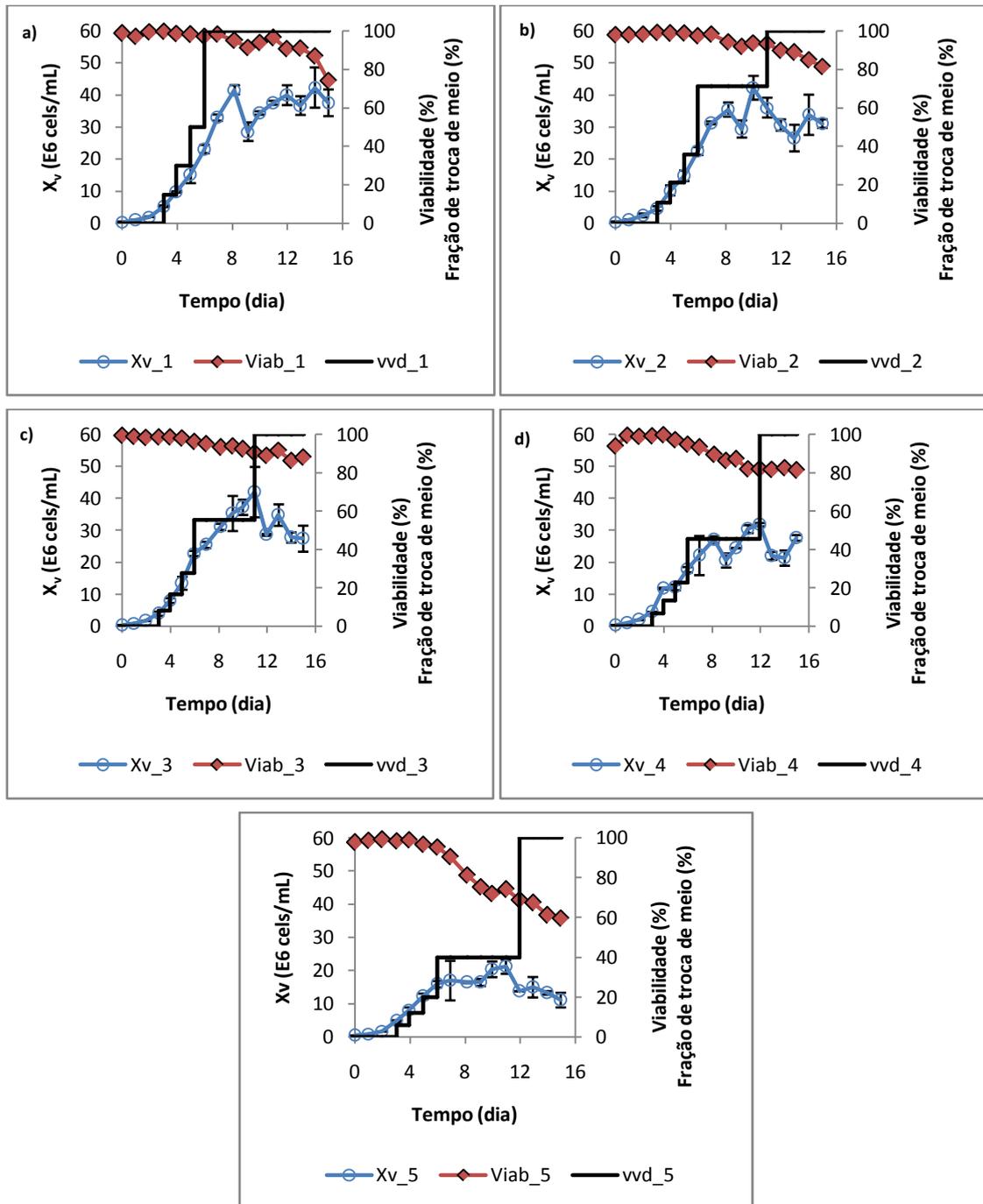


Figura 5.13. Curva de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) para as condições 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e), ensaio PP 3. Dados apresentados como média \pm DP para duplicata biológica.

A comparação entre os perfis de glicose e de lactato evidenciou que a alimentação a 1 vvd com meio TC-LECC (condição 1) foi capaz de manter uma concentração máxima de $40 \cdot 10^6$ cels/mL e viabilidade superior a 90% na maior parte do experimento, porém com elevado risco de perda devido ao rápido esgotamento de glicose e também de lactato no meio. Um comportamento diferente foi observado nas condições 2 e 3, cujos valores de Glc residual oscilaram, respectivamente, entre 2,78-14,4 e 8,89-25,0 mM, os quais reduziriam as chances de esgotamento desse substrato. Não foi observado o *shift* metabólico do lactato para essas duas condições. Na condição 5, foi observado, a exemplo da condição 2 no ensaio PP 2, um acúmulo de glicose, cuja concentração pós-alimentação chegou próximo a 111 mM.

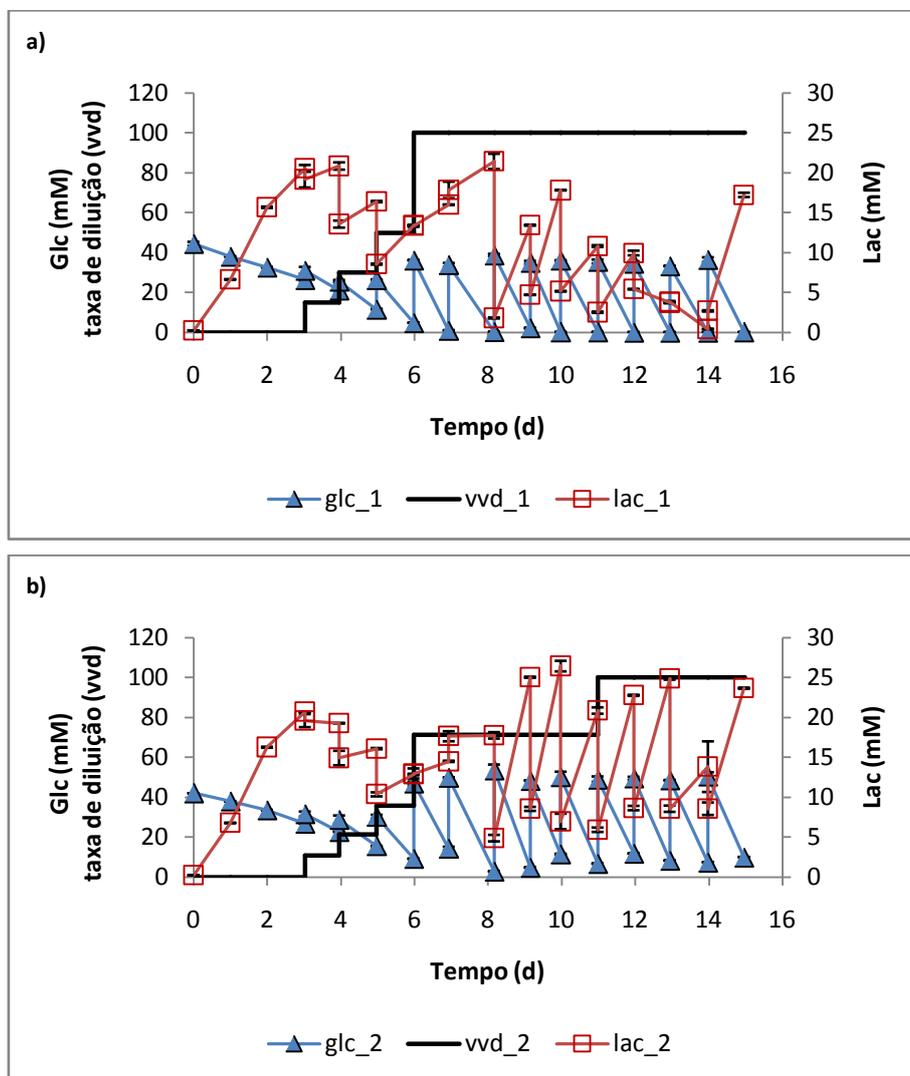


Figura 5.14. Concentração de glicose e de lactato para as condições 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e), ensaio PP 3. Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica.

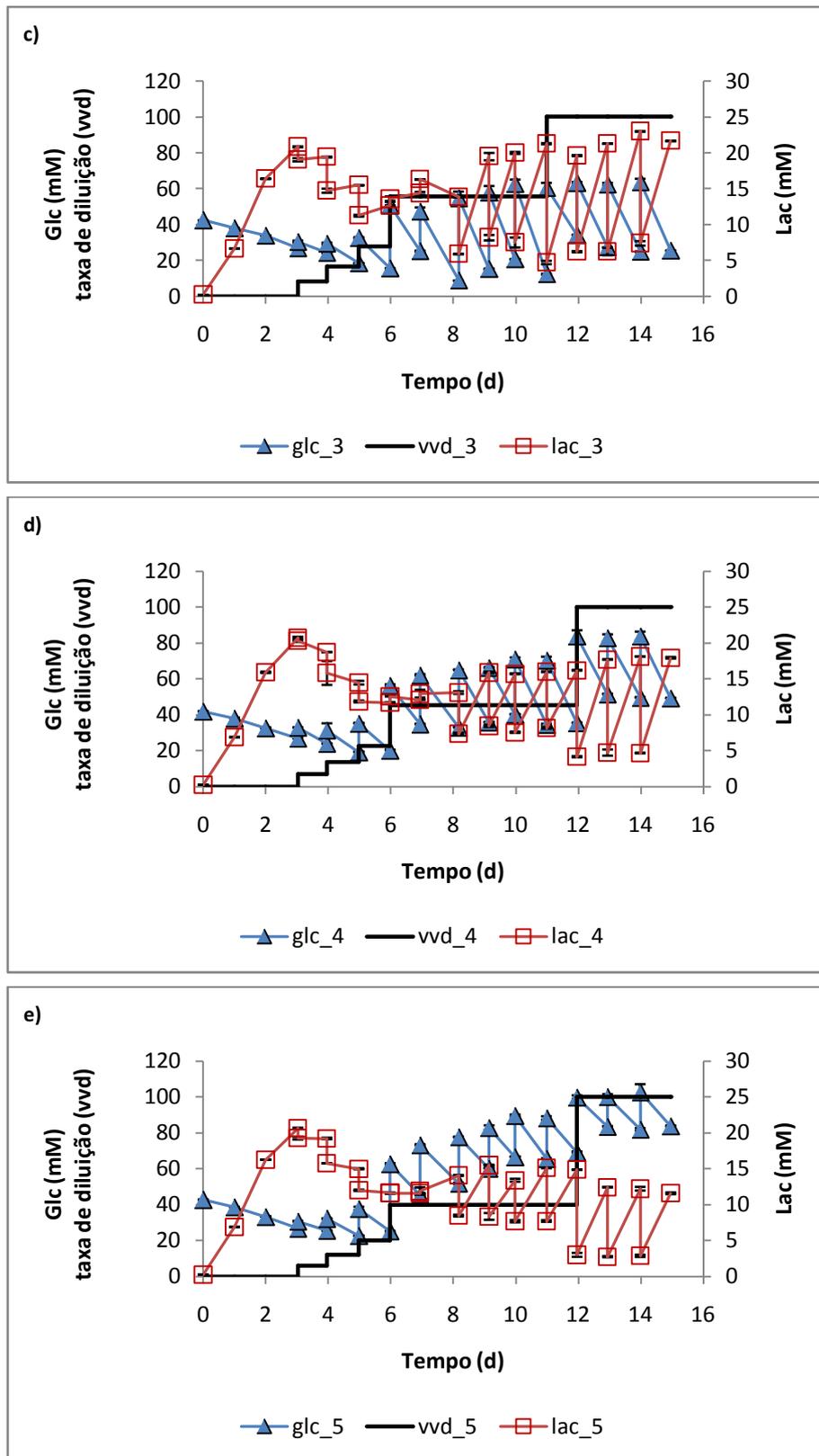


Figura 5.14(cont.). Concentração de glicose e de lactato para as condições 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d) e 5 (e), ensaio PP 3. Dados apresentados como média±DP para duplicata biológica.

Conforme mostrado na Tabela 5.2, a osmolalidade avaliada em determinados dias apontou uma tendência à diminuição na condição 1, provavelmente devido ao rápido consumo de nutrientes pelas células. Na condição 2, a osmolalidade manteve-se constante em aproximadamente 300 mOsm/kg, enquanto que nas demais condições, houve um aumento ao longo da cinética, conferida pela utilização mais pronunciada do meio TCx2D e/ou pelo acúmulo de lactato. Para a condição 5, algumas medições não foram realizadas com sucesso provavelmente devido à natureza da amostra (alta osmolalidade), apesar de a calibração do osmômetro ter sido realizada em um configuração que conferiu uma maior taxa de congelamento, de acordo com a recomendação do fabricante.

De acordo com a Figura 5.15, o perfil de produção de mAb foi semelhante ao observado no ensaio PP 2, i.e., foi alcançado um pico de concentração no dia 6 para todas as condições (exceto a nº 4), seguida por uma importante diminuição até o final do experimento. Dentre as condições avaliadas, a nº 5 apresentou o maior pico ($140 \pm 15,9$ mg/L), porém seguido por um declínio para os menores níveis observados, abaixo de 10 mg/L. A redução poderia, novamente, ser atribuída ao aumento do número de células não viáveis, com consequente liberação de proteases no meio. Entretanto, a diminuição de produto ao longo do tempo na condição 1 não era esperada, já que esta simulou a condição controle devido à alimentação com TC-LECC, não sendo impostas alterações significativas de osmolalidade. Uma possível causa seria a alimentação insuficiente a 1 vvd para manter a concentração de células tão alta quanto $40 \cdot 10^6$ cels/mL, sugerida pelos valores de Glc iguais a zero a partir do sexto dia, o que teria direcionado o metabolismo para as atividades de manutenção das células em detrimento à produção. Outro aspecto a ser investigado seria uma possível instabilidade da linhagem para processos mais longos, embora KANEKO *et al.* (2010) tenham comprovado a estabilidade genética de uma linhagem recombinante de células CHO em um cultivo em reator de escala piloto por pelo menos 100 dias, com redução na produtividade específica em detrimento à maior taxa de crescimento em altas densidades celulares. BECKMANN *et al.* (2012) observaram uma redução significativa de produtividade para um banco de células CHO DP-12 criopreservadas no 420º dia de um cultivo mantido com passagens a cada 2-3 dias em relação aos bancos de células com 21, 95 e 165 dias de cultivo. Além da perda de 99% das cópias do gene de interesse, a diminuição da expressão do anticorpo também foi associada ao mau

funcionamento do mecanismo de *splicing* do mRNA, o qual foi relacionado à forma de construção do vetor bicistrônico, mesmo na presença de MTX ao longo dos experimentos (BECKMANN *et al.*, 2012).

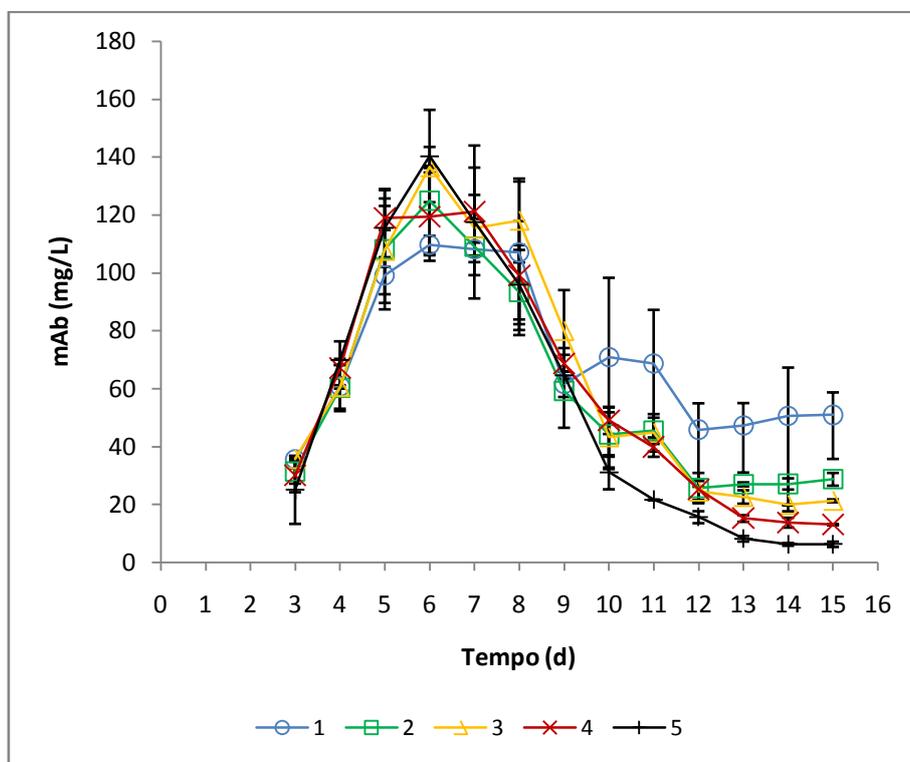


Figura 5.15. Perfil de concentração de mAb referente às condições 1, 2, 3, 4 e 5 (média±DP para duplicata biológica).

O aumento significativo da osmolalidade nos ensaios 4 e 5 não permitiu o alcance de valores de X_v comparáveis à condição 1, alimentada apenas com meio TC-LECC. Outra observação refere-se aos valores de produtividade volumétrica, a qual é dependente de X_v . Enquanto que, para a condição 1, foi determinado um valor de P_v igual a $43,3 \pm 5,87$ mg/L/d, para a condição 5 foi determinado um valor de $16,7 \pm 2,00$ mg/L/d. Para as condições 2, 3 e 4, foram calculados os valores de $32,2 \pm 4,10$; $28,0 \pm 2,94$ e $21,0 \pm 1,88$ mg/L/d, respectivamente.

Levando em consideração os valores de q_{mab} determinados para cada intervalo de amostragem utilizando a Equação 15, a condição 5 apresentou um aumento de 87% na produtividade específica em relação à condição 1 (4,50 pcd vs. 2,40 pcd), comparando os valores médios das taxas calculadas nos intervalos de amostragem no período entre os dias 3 e 6. Nas condições 2 e 3, cujos valores de X_v e de [mAb] foram similares à condição 1, as taxas médias no intervalo entre o terceiro e sexto dias foram respectivamente 3,00 e 3,48 pcd. Para a condição 4, o valor médio determinado foi de

3,12 pcd. Avaliando apenas o intervalo entre os dias 5 e 6, quando foram alcançados os picos de [mAb] para todas as condições, os respectivos valores de q_{mab} obtidos foram de 0,56 pcd (condição 1), 0,92 pcd (condição 2), 1,62 pcd (condição 3), 0,03 pcd (condição 4) e 1,80 pcd (condição 5). Com exceção da condição 4, em que o baixo valor de q_{mab} estaria relacionado à ausência de produção de anticorpo no período avaliado, seria possível afirmar que os maiores valores de q_{mab} estariam relacionados à maior osmolalidade, o que está de acordo com diversos trabalhos posteriores ao de OZTURK e PALSSON (1991a), que observaram superprodução em condições hiperosmóticas. Os possíveis mecanismos de estímulo à produtividade decorrentes de alta osmolalidade incluem, entre outros: o aumento das taxas metabólicas, inclusive as de incorporação de aminoácidos do meio em co-transporte de íons Na^+ para o interior da célula; o aumento da capacidade de síntese decorrente do aumento do volume celular; e o aumento do pH intracelular, condição eventualmente associada a importantes eventos da síntese proteica (CHERLET e MARC, 1999). Entretanto, apesar da associação positiva entre osmolalidade e produtividade específica, é importante avaliar o efeito deletério sobre a concentração de células, o que foi evidenciado pela redução de aproximadamente 50% na produtividade volumétrica (P_v) da condição 5 em relação à condição 1.

5.2.4 Ensaio em PP – método adaptativo

O método adaptativo consistiu em avaliar a possibilidade de manter o cultivo a uma baixa concentração de glicose, de modo que o metabolismo fosse direcionado em detrimento ao acúmulo de lactato. Essa condição foi avaliada em paralelo a dois ensaios independentes (PP 1 e PP 3), sendo que o volume de trabalho adotado foi diferente em cada experimento (10 e 5 mL, respectivamente), devido a limitações decorrentes da quebra de agitadores orbitais do laboratório.

Os perfis de concentração de células viáveis, de viabilidade e de alimentação não foram iguais para ambos os experimentos, conforme mostrado na Figura 5.16. Enquanto que no ensaio “ad1”, realizado em paralelo ao ensaio PP 1, a alimentação com meio TCx2D foi iniciada no dia 6, com $(14,8 \pm 3,23) \cdot 10^6$ cels/mL, no ensaio “ad2”, a alimentação foi iniciada no dia 5 com $(12,4 \pm 1,20) \cdot 10^6$ cels/mL. Em “ad1”, foi alcançado o valor máximo de X_v de $(44,8 \pm 3,3) \cdot 10^6$ cels/mL no dia 9 com viabilidade $90,8 \pm 3,0\%$, enquanto que em “ad2”, o valor máximo de X_v foi de apenas

($18,1 \pm 1,66$) $\cdot 10^6$ cels/mL alcançado no dia 7, com viabilidade de $92,2 \pm 0,01\%$. Além da menor concentração celular, a redução de viabilidade foi mais rápida no ensaio “ad2”. A condição adaptativa “ad1” proporcionou uma concentração de células viáveis superior em comparação às condições 2 e 3 do ensaio PP 1 no intervalo dos dias 7 a 9 (Figura 5.6). Entretanto, no dia seguinte, a concentração de células viáveis diminuiu rapidamente para $(26,8 \pm 3,0) \cdot 10^6$ cels/mL e a viabilidade para $87,7 \pm 0,4\%$, comportamento também observado em “ad2” após o alcance do pico de X_v . Ressalta-se que a diminuição de X_v entre os dias 9 e 10 também foi observada para a condição 3 do ensaio PP 1, sendo que ambas as condições foram alimentadas utilizando meio TCx2D a taxas similares, de 0,30 e 0,26 vvd respectivamente.

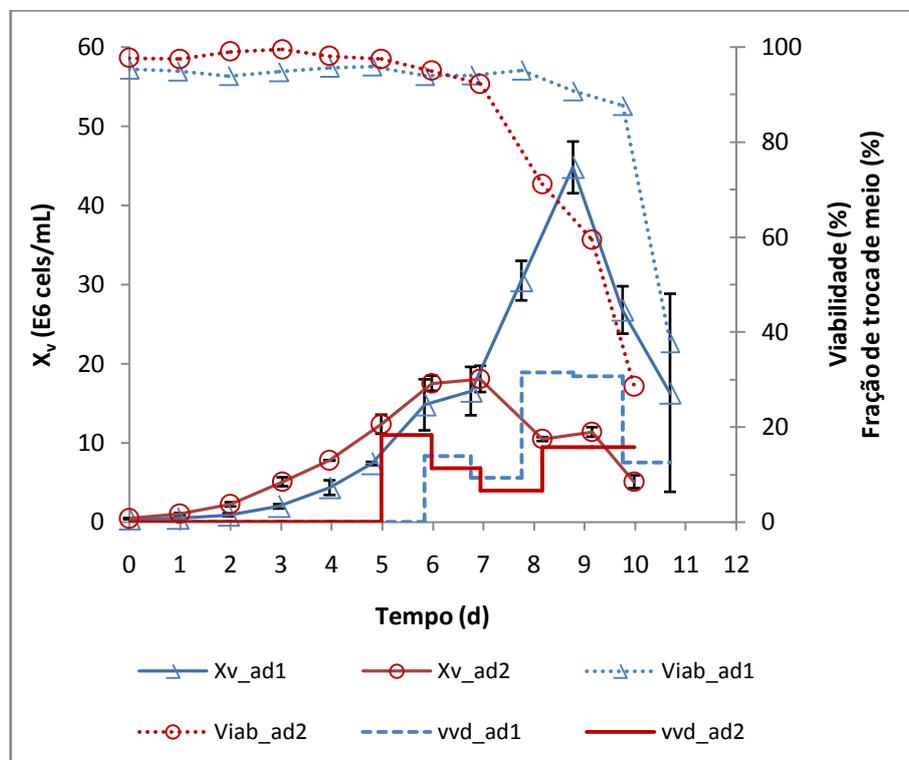


Figura 5.16. Curva de X_v , viabilidade e taxa de diluição (vvd) obtidas nos ensaios de avaliação do método adaptativo “ad1” e “ad2”.

A taxa de diluição inicial variou entre 0,14 e 0,18 vvd, seguida por uma redução para aproximadamente 0,10 vvd. Devido ao alcance de uma maior X_v no ensaio “ad1”, a maior taxa de diluição aplicada foi de 0,31 vvd (próxima ao valor máximo teoricamente esperado para o uso do meio concentrado TCx2D, de 0,35 vvd), enquanto que para “ad2” a taxa aumentou apenas para 0,16 vvd. Apesar de o cálculo da vazão de alimentação considerar a manutenção de uma concentração mínima de glicose de 5,55 mM, esse substrato alcançou valores tão baixos quanto 0,22 mM a partir do dia 7,

exceto nos dias 9 e 10 para o ensaio “ad1”, quando a Glc esteve acima de 5,55 mM (Figura 5.17a). Como consequência do esgotamento da glicose, foi observado o *shift* metabólico para o consumo de lactato (diminuição nas medições pré-alimentação) na maioria dos intervalos de amostragem (Figura 5.17b), o que manteve a concentração desse metabólito abaixo de 11 mM, exceto no intervalo dos dias 9-10 para o ensaio “ad2”, com o rápido acúmulo para $12,7\pm 0,33$ mM. A causa dessa elevação é desconhecida, e a possibilidade de uma alta concentração de glicose foi descartada, já que o valor de Glc pós-alimentação no dia 9 não foi superior em relação aos dias anteriores (aproximadamente 22,2 mM).

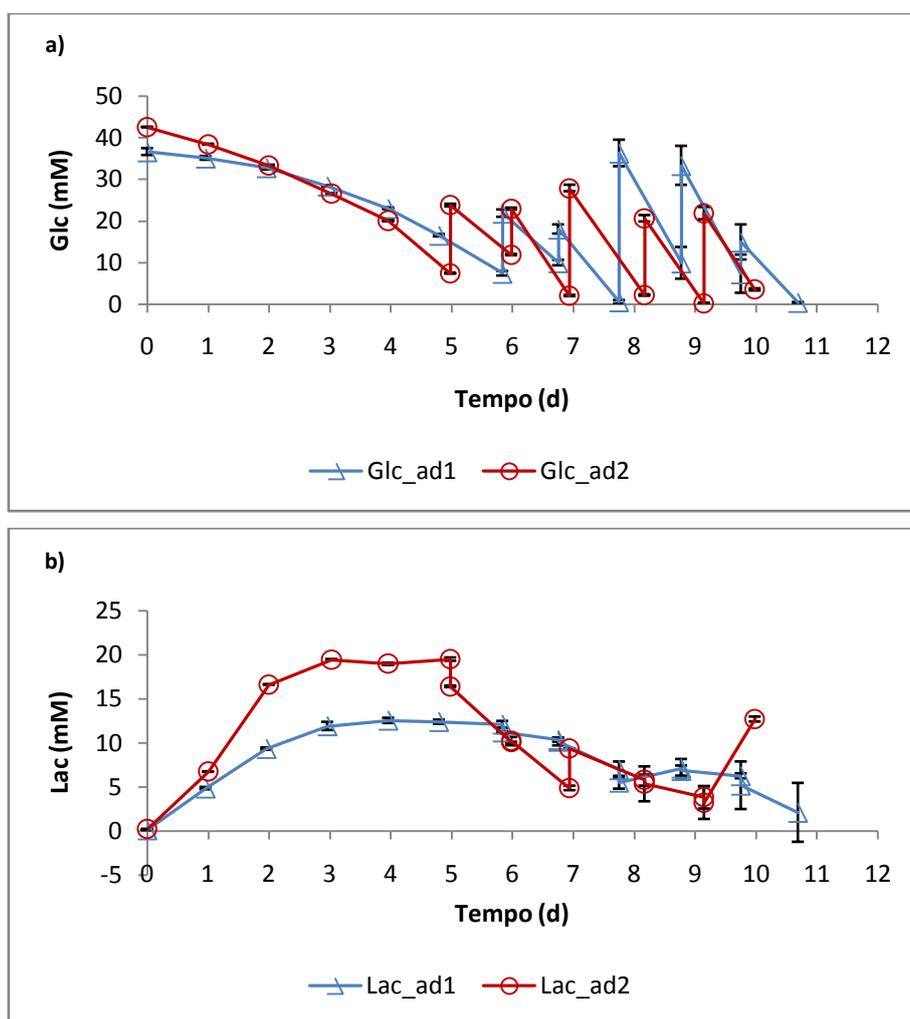


Figura 5.17. Perfis de concentração de glicose (a) e de lactato (b) para as ensaios “ad1” (dados apresentados como média±DP obtidos de triplicata biológica) e “ad2”(média±DP para duplicata biológica).

Em comparação às condições avaliadas em paralelo nos ensaios PP 1 e PP 3, a concentração de anticorpo para ambos os ensaios com alimentação adaptativa foram superiores (Figura 5.18). No ensaio “ad1”, a concentração máxima alcançada foi de

175±0,01 mg/L no dia 10, enquanto que para o ensaio “ad2”, o pico ocorreu no dia 9, de 192±25,5 mg/L. Os valores de P_v calculados foram de 28,0±8,97 e 23,0±2,48 mg/L/d, respectivamente.

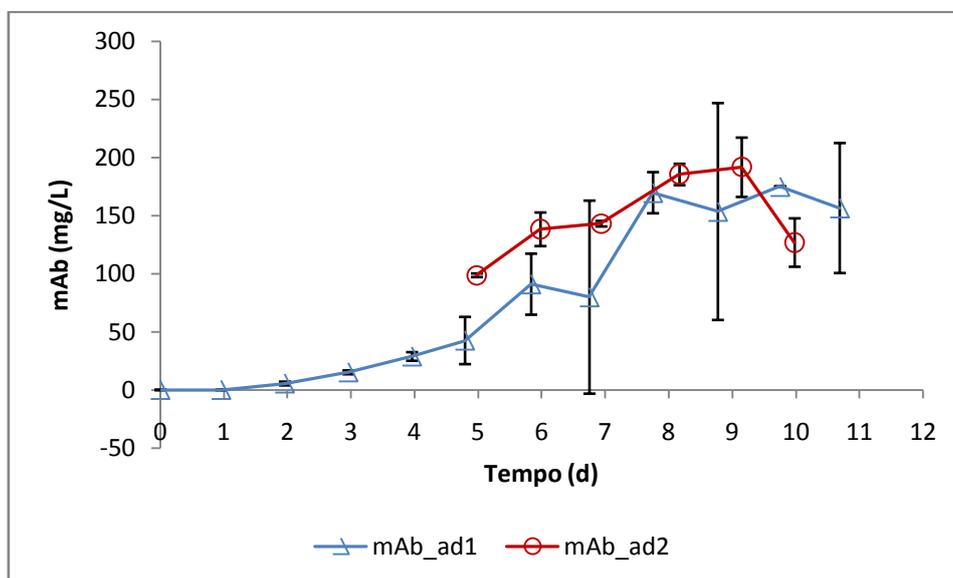


Figura 5.18. Perfil de concentração de mAb para os ensaios “ad1” (média±DP para triplicata biológica) e “ad2” (média±DP para duplicata biológica). Para a sequência “mAb_ad2”, são apresentados os dados a partir do início da alimentação (dia 5), quando foi possível coletar um maior volume de amostra necessário para a quantificação de produto.

Apesar dos resultados promissores com relação à produção de anticorpo, o método adaptativo proposto necessitaria de uma série de modificações para manter uma maior viabilidade celular por um período mais longo. A principal delas seria modificar a composição do meio de alimentação, o que não seria possível no âmbito do presente trabalho, uma vez que essa informação não é revelada pelo fabricante. Entretanto, a osmolalidade sugere a presença de uma alta concentração de sais devido à forma concentrada do meio. Uma possibilidade seria então formular um meio contendo os nutrientes mais consumidos (glicose, glutamina e aminoácidos) em alta concentração, e eventualmente isento ou com uma concentração mínima de sais, a exemplo do trabalho de ZHOU *et al.* (1997), que propuseram uma estratégia de alimentação para um cultivo de hibridoma em batelada alimentada utilizando uma mistura dos meios DMEM/F12 livres de sais, e concentrados em 19,8 vezes. As concentrações de glicose e de glutamina utilizadas na alimentação foram respectivamente de 59,4 g/L (330 mM) e 99 mM, muito superiores em relação ao presente trabalho. Adotando a OUR para estimar a demanda nutricional e determinar a vazão de alimentação, esses autores conseguiram reduzir o acúmulo de lactato e de amônia (um problema recorrente em

bateladas alimentadas) mantendo a concentração de glicose tão baixa quanto 0,5 mM (0,09 g/L). Foi relatado também um aumento na concentração de anticorpo em relação à batelada simples e a outras estratégias de batelada alimentada, embora não seja possível compará-los por meio da produtividade volumétrica com base nos resultados apresentados.

Além da composição, a estratégia de aplicação do meio de alimentação também deve ser explorada, conforme estabelecidos nos trabalhos de perfusão com alimentação controlada apresentados por YANG *et al.* (2000), FENG *et al.* (2006) e TENG *et al.* (2011). Para essa linha de investigação, os ensaios em biorreatores de bancada seriam mais adequados devido à opção do monitoramento dos parâmetros de cultivo, especialmente no estabelecimento de estratégias com base em medições *on-line* dos metabólitos-chave. Os resultados de simulações apresentados por GAMBHIR *et al.* (1999) indicaram o potencial de alimentação com meios concentrados para aumentar a concentração de células e a produtividade, sendo observada a importância das medições *on-line* para manipular o estado fisiológico das células e, assim, minimizar a formação de metabólitos que exerçam a inibição de crescimento durante a fase transiente. Além disso, foi ressaltada novamente a importância de se formular meios de alimentação contendo apenas os nutrientes essenciais, de modo a permitir o aumento da osmolalidade em uma estreita faixa de operação (GAMBHIR *et al.*, 1999).

5.3 Ensaios em biorreatores em perfusão

O objetivo dos ensaios em biorreator foi avaliar o perfil de concentração de células, viabilidade e produtividade em um processo de perfusão alimentado com meios mais concentrados do que o meio basal (TC-LECC). Como discutido anteriormente, essa forma de operação já foi reportada na literatura como perfusão com alimentação controlada, que consiste em uma combinação da batelada alimentada com a perfusão convencional.

5.3.1 Alimentação com TCx2D (ensaio BIO007)

Nesse experimento, foram utilizados o meio basal TC-LECC para a inoculação, e o meio concentrado TCx2D para a alimentação. A estratégia adotada seria equivalente

aos ensaios PP 2 e PP 3, ou seja, variando entre 0,05 e 0,35 vvd. Portanto, considerando o volume de trabalho de 1,1 L, as vazões aplicadas corresponderiam respectivamente a 0,055 e 0,385 L/d. Contudo, devido à disponibilidade de bombas peristálticas com cabeçote compatível para mangueira com parede de espessura de 2,4 mm, a vazão mínima disponível foi de 0,063 L/d. A alimentação foi iniciada entre os dias 3 e 4 (correspondente à fase exponencial), com X_v próxima a $5 \cdot 10^6$ cels/mL (Figura 5.19) e concentração de glicose de 13,9 mM (Figura 5.20).

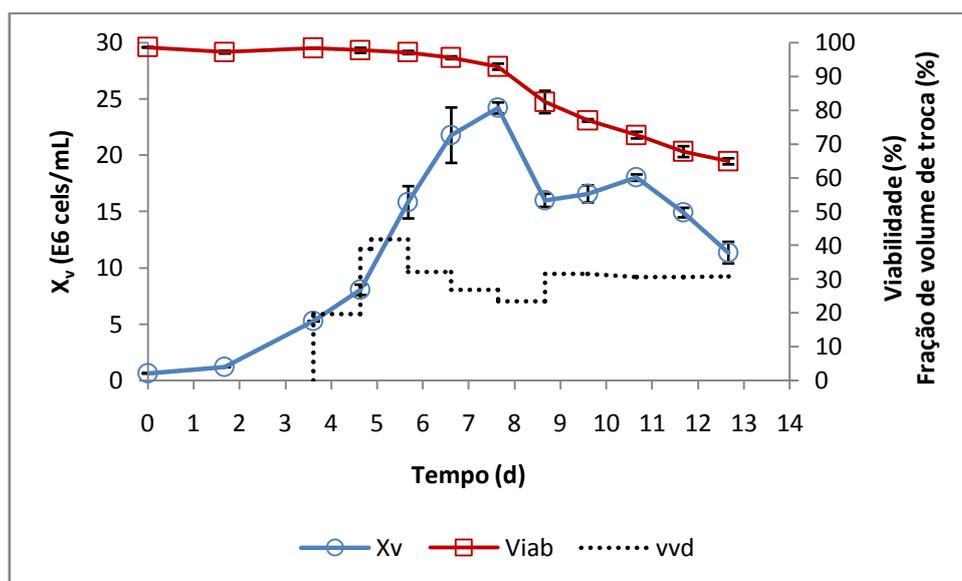


Figura 5.19. Curvas de concentração celular e de viabilidade, e perfil da taxa de diluição do perfundido (vvd), utilizando meio TCx2D como meio de alimentação, ensaio BIO007. Dados apresentados como média \pm DP em duplicata analítica.

Os valores de vazão volumétrica determinados experimentalmente por meio de pesagem do *carboy* de coleta apresentaram diferença significativa em relação ao valor teórico (dados não apresentados). Por exemplo, enquanto a taxa de diluição inicial teórica foi de 0,1 vvd, o valor experimental medido foi de 0,19 vvd. Esses erros foram atribuídos à seleção de mangueira Marprene® com especificações de diâmetro interno e espessura que não se mostraram as mais adequadas para as baixas vazões utilizadas, as quais foram estabelecidas no limite inferior de rotação das bombas. No dia 5, a taxa de diluição foi elevada para o valor máximo teórico de 0,35 vvd (experimental: 0,39 vvd), pois o valor de Glc estava abaixo de 5,55 mM, o que representou um risco para a continuidade do experimento. Portanto, o incremento na taxa de diluição não foi realizado em degraus conforme a proposta inicial. Posteriormente, alguns ajustes nas vazões de alimentação e de perfundido foram necessários para manter o volume do

reator constante, monitorado por aferição visual do nível de líquido em uma escala na parede do vaso. A taxa de diluição manteve-se constante em 0,30 vvd a partir do dia 9.

A concentração máxima de células viáveis, alcançada no dia 8, foi de aproximadamente $25 \cdot 10^6$ cels/mL, com viabilidade de 93%, e a uma taxa D igual a 0,27 vvd. O perfil de X_v mostrou-se semelhante em relação ao ensaio PP 2 (condição 2), no qual o valor máximo de $19 \cdot 10^6$ cels/mL (viabilidade 95%) foi alcançado no dia 6, embora a uma taxa de diluição cerca de 45% menor (0,15 vvd). Em relação aos resultados do ensaio PP3 (condição 5), apesar do valor máximo de X_v igual a $21 \cdot 10^6$ cels/mL, este foi alcançado no 11º dia, com uma viabilidade de apenas 74%, e a um valor de D igual a 0,40 vvd. A queda da viabilidade a partir do dia seguinte, assim como observada nos ensaios PP 2 e PP 3 nas condições alimentadas com TCx2D, provavelmente não foi devido à baixa concentração de glicose, a qual manteve-se entre 5 e 14 mM até o fim do ensaio (Figura 5.20). Contudo, o lactato atingiu uma concentração máxima de aproximadamente 44 mM no dia 5, superior aos valores máximos usualmente medidos nos ensaios de pseudoperfusão, seguida por uma redução associada ao *shift* metabólico para consumo e estabilização próxima a 22 mM.

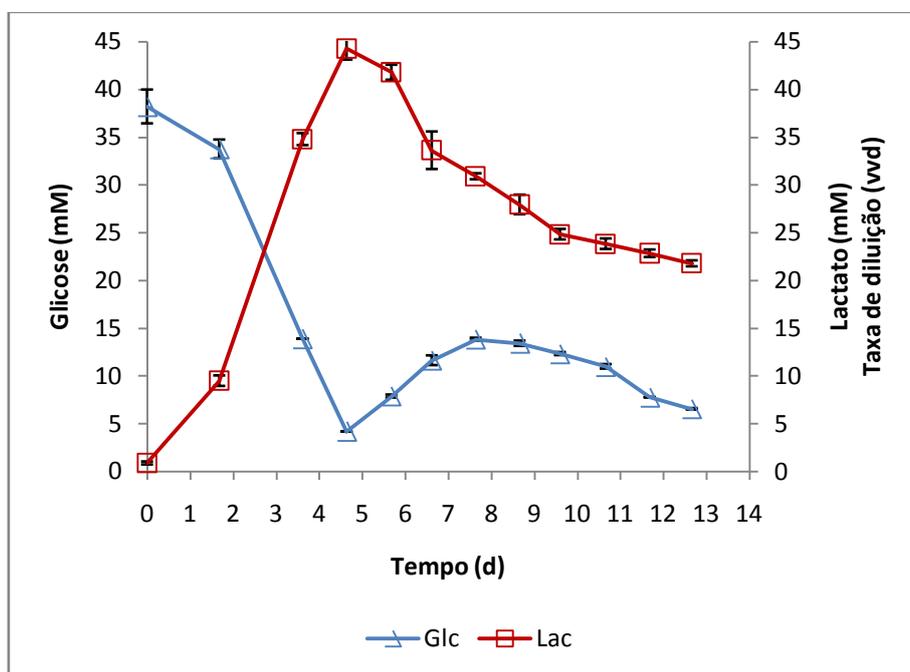


Figura 5.20. Perfil de glicose e lactato, ensaio BIO007. Dados apresentados como média±DP em duplicata analítica.

Foi observado o aumento gradual da osmolalidade, conforme monitoramento apresentado na Figura 5.21, conferido tanto pelo próprio meio de alimentação quanto

pela maior concentração de lactato presente no meio. Apesar de o lactato acidificar o meio, não foi observado um consumo expressivo de base (dados não apresentados), cuja adição também implica em aumento de osmolalidade (OZTURK, 1996).

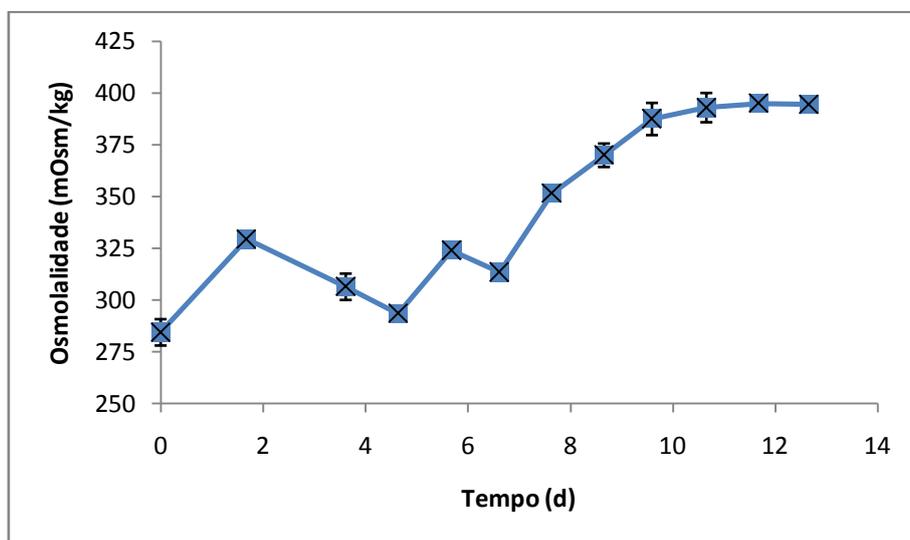


Figura 5.21. Perfil de osmolalidade, ensaio BIO007. Dados apresentados como média±DP em duplicata analítica.

Não houve uma perda significativa de células viáveis pela corrente de perfundido, nem houve necessidade em realizar purgas para remoção controlada de células, já que a concentração de células diminuiu ao longo do experimento. Entretanto, a partir do dia 9, foi observada uma turbidez no perfundido, a qual permaneceu até o último dia de cultivo. A possibilidade de contaminação bacteriana foi descartada após a ausência de crescimento em ágar Luria-Bertani (incubação durante 48 h a 37°C). Uma observação em microscópio de amostras a fresco atribuiu essa turbidez à presença de uma grande quantidade de debris e de células mortas.

Para verificar a possibilidade de retenção de produto no reator, foram realizadas análises de quantificação do anticorpo tanto em amostras coletadas no reator e na corrente de perfundido, conforme apresentado pela Figura 5.22. Devido ao elevado erro experimental observado a partir do dia 8, não foi possível afirmar se a concentração de mAb em ambas as correntes foram similares. Uma justificativa para os erros observados seria o tempo de processamento das análises em duplicata analítica programadas no HPLC (geralmente, realizadas *overnight*). Durante o período entre as análises, haveria a possibilidade de degradação do produto devido à presença de proteases liberadas pelo conteúdo citoplasmático, dada a inspeção visual de turbidez do perfundido e a constatação de grande quantidade de debris celulares.

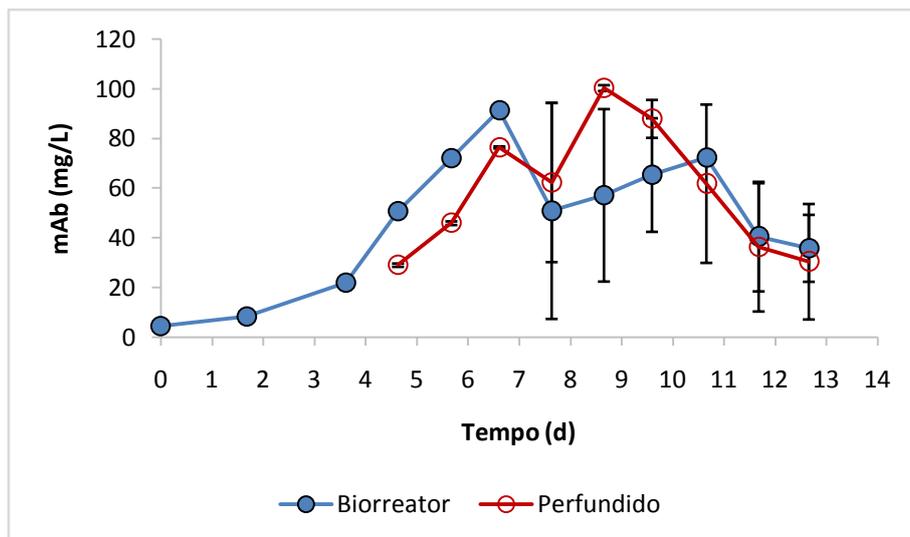


Figura 5.22. Perfis de concentração de mAb de amostras coletadas do biorreator e de corrente de perfundido, ensaio BIO007 (dados em média±DP em duplicata analítica).

Em comparação aos ensaios PP 2 e PP 3 nas condições alimentadas com meio TCx2D (condições 2 e 5, respectivamente), o perfil de concentração de anticorpo obtida no ensaio em reator também apresentou um pico de concentração entre os dias 6 e 7 seguida por uma redução, em vez da manutenção do estado estacionário. Esse comportamento parece estar associado ao perfil de viabilidade das células, o qual também diminuiu logo após o alcance do valor máximo de X_v .

5.3.2 Alimentação com TC-LECC:TCx2D 1:1 (ensaio BIO008)

Esse ensaio teve como objetivo avaliar em um reator de bancada a condição intermediária de alimentação testada simultaneamente no ensaio PP 3, i.e., meio de alimentação TC-LECC:TCx2D na proporção 1:1. A concentração de glicose, medida em 13,5 g/L (75 mM), correspondeu a um valor de Glc_{rel} igual a 1,8 vezes em relação à do meio basal TC-LECC. Dessa forma, a estratégia de alimentação proposta foi igual à condição 3 do ensaio PP 3: aumento gradual da taxa de diluição de 0,083 – 0,167 – 0,278 – 0,55 vvd.

Conforme apresentado na Figura 5.23b, a alimentação foi iniciada no terceiro dia, com X_v de $4,5 \cdot 10^6$ cels/mL e concentração de glicose a 18,9 mM. A concentração máxima de células foi alcançada no dia 8 ($32,5 \cdot 10^6$ cels/mL) e, a partir desse momento, foi aplicada uma taxa de purga (D_B) de 0,1 vvd. Apesar da presença da purga entre os

dias 8 e 16, não foi possível estabelecer uma concentração constante de células, a qual oscilou entre 20 e $30 \cdot 10^6$ cels/mL, acompanhada por uma redução na viabilidade de 92 para 84%. A partir do dia 17, X_v e viabilidade caíram, e a corrente de purga foi cessada.

A partir do dia 7, foi observada uma turbidez no perfundido referente à presença de células viáveis a uma concentração de $0,71 \cdot 10^6$ cels/mL, indicando uma queda na eficiência de separação do sedimentador. No dia seguinte, essa concentração aumentou para $1,4 \cdot 10^6$ cels/mL (Figura 5.23a). Devido a uma falha do temporizador, foi constatado que o módulo vibracional estava funcionando no modo contínuo, e não no padrão intermitente inicialmente configurado. Com isso, a sedimentação das células foi prejudicada, acarretando em perda pelo perfundido. O problema foi solucionado pela troca do temporizador, evidenciado pela ausência de células no perfundido até o dia 16. A partir do dia 17, foi constatada novamente a presença de células no perfundido e, dessa vez, o motivo foi a presença de uma grande quantidade de bolhas na entrada do sedimentador. A presença de bolhas ocorreu devido à alta velocidade de agitação (no caso, 200 rpm), uma vez que devido à problemas na estabilização da DO em 40%, a agitação foi ajustada manualmente em 100 – 150 – 180 – 200 rpm entre os dias 10 e 17. Com isso, uma grande turbulência foi observada na saída do reator para o sedimentador e isso poderia estar prejudicando o estabelecimento do regime laminar dentro do sedimentador. A redução de 200 para 150 rpm entre os dias 17 e 18 eliminou as bolhas e diminuiu a perda de células viáveis pelo perfundido de aproximadamente $2 \cdot 10^6$ para $0,6 \cdot 10^6$ cels/mL até o final do experimento.

Da mesma forma que no ensaio BIO007, houve problemas para estabilizar as taxas de diluição, conforme se observa na Figura 5.23b. Devido ao rápido esgotamento de glicose, não foi possível manter por um longo período a taxa em 0,55 vvd. Portanto, foi necessário aplicar uma taxa de 1 vvd a partir do dia 7, cujos valores experimentais variaram entre 0,77 e 1,27 vvd até o final do experimento, mesmo realizando os ajustes na vazão de alimentação de acordo com a relação $Q_A = Q_B + Q_P$.

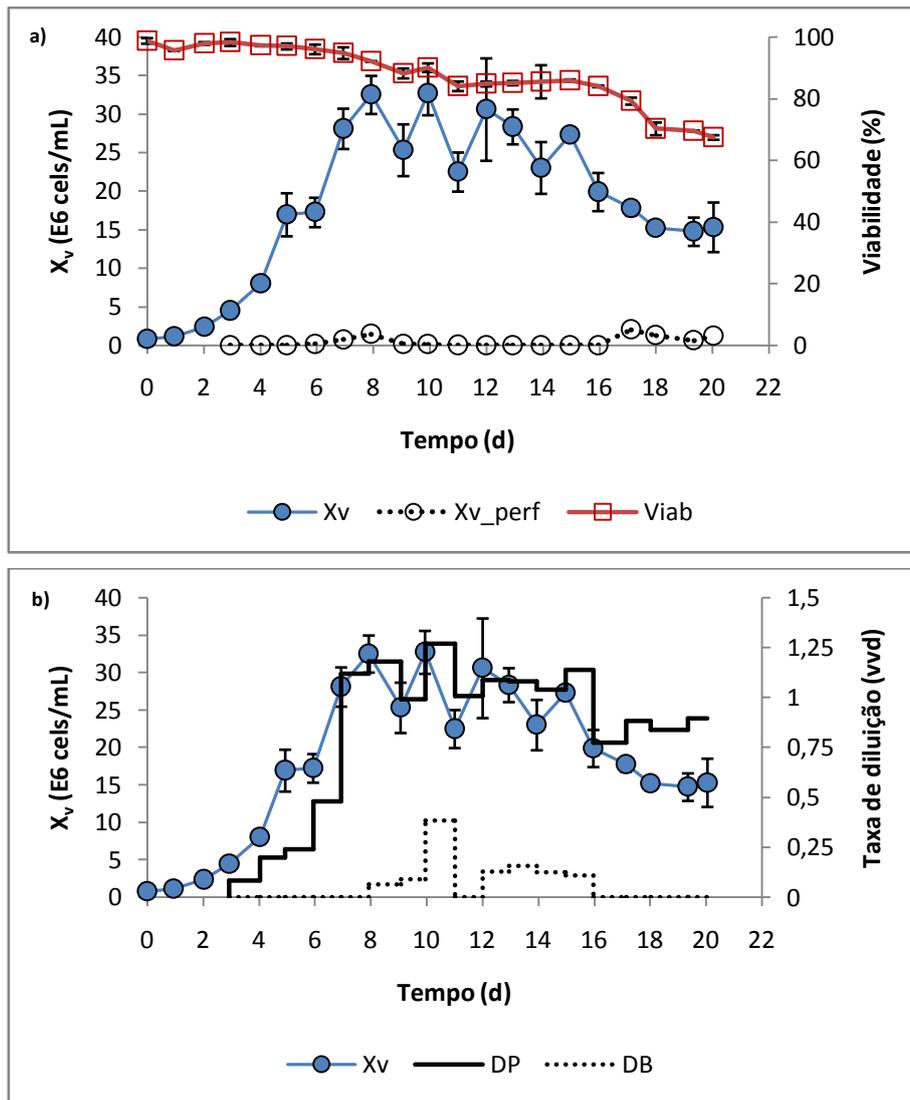


Figura 5.23.a) Perfis de X_v (média±DP em duplicata analítica) e viabilidade avaliados no reator, e de células viáveis presentes no perfundido (X_{v_perf}). b) Perfis de X_v (biorreator), da taxa de diluição referente ao perfundido (D_P) e de purga (D_B).

A partir do dia 5, a concentração de glicose manteve-se muito próxima a zero (Figura 5.24). Foi observado acúmulo de lactato entre os dias 0 e 4, seguido pelo *shift* metabólico, e a partir do dia 8, a concentração se estabilizou entre 44 e 55 mM. Essa foi a primeira vez no presente trabalho que foram alcançadas concentrações de lactato tão altas. Embora a concentração inibitória de lactato varie de acordo com a linhagem celular, dados da literatura apontam os valores apresentados como inibitórios ao crescimento e à produtividade de um modo geral. Por exemplo, OZTURK *et al.* (1992) observaram uma redução superior a 50% no valor de μ_{exp} para hibridomas cultivadas a uma concentração inicial de lactato superior a 40 mM, a qual estaria relacionada à toxicidade da molécula de lactato *per se*, e não pela alta osmolalidade associada. LAO e

TOTH (1997) constataram uma redução de 45% na taxa específica de crescimento de células CHO produtoras de uma proteína recombinante na presença de 60 mM de lactato, além de profundas modificações no metabolismo, como q_{Lac} igual a zero, diminuição de 20% no consumo de glicose e glutamina e de 64% na taxa de formação de amônia. Entretanto, segundo esses autores, a produtividade não foi alterada. Em cultivos de células BHK produtoras de uma proteína de fusão, CRUZ *et al.* (2000) observaram que o aumento de lactato de 0 a 60 mM reduziu em 40% a produtividade específica e em sete vezes a concentração da proteína recombinante. Os efeitos deletérios do lactato foram atribuídos não apenas ao aumento da osmolalidade, mas também à redução do pH intracelular.

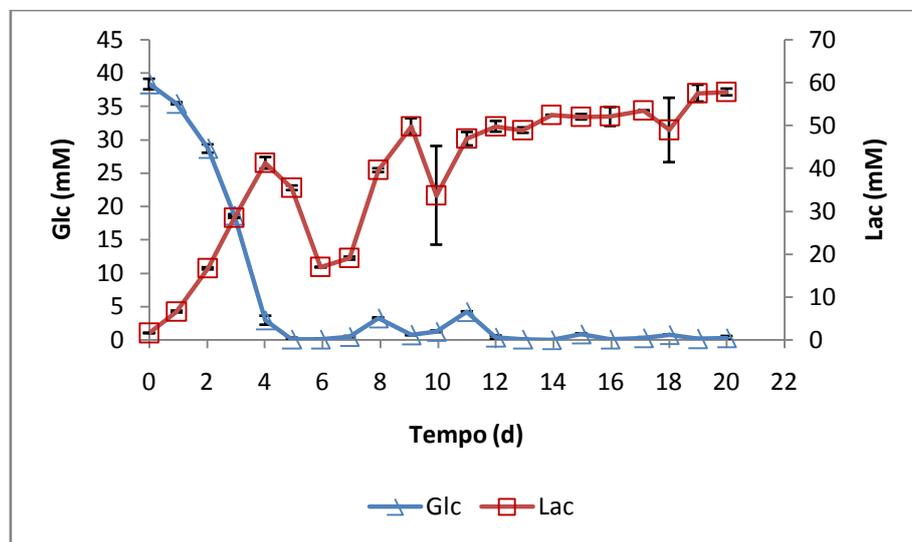


Figura 5.24. Concentração de glicose e lactato, ensaio BIO008 (dados apresentados como média±DP em duplicata analítica).

A determinação dos valores de μ (Figura 5.25) evidenciou uma tendência de queda a partir do quinto dia, o que indicaria a inibição de crescimento. Esse comportamento estaria possivelmente relacionado ao direcionamento do metabolismo para a manutenção das atividades celulares frente ao estresse provocado pela osmolalidade mais elevada.

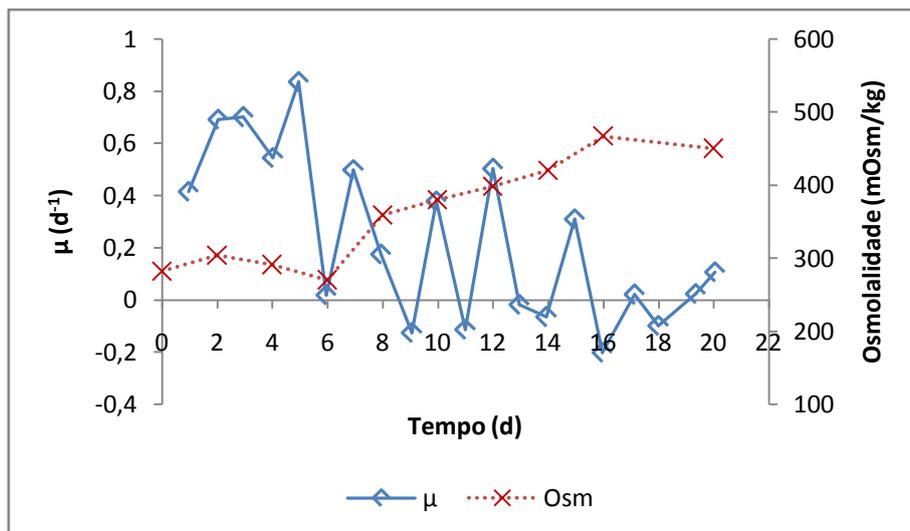


Figura 5.25. Taxa específica de crescimento, ensaio BIO008 (perfusão iniciada no dia 3).

Os perfis das taxas específicas q_{glc} , q_{lac} e q_{mab} , conforme mostrado na Figura 5.26, indicam a estabilização dos valores a partir do dia 10, com destaque para a importante redução na produção de anticorpo. Apesar de não ter sido avaliada a influência da concentração inicial de lactato ou de osmolalidade, é possível atribuir o aumento de q_{glc} a valores iguais ou maiores aos observados no início do cultivo às condições adversas provocadas pela elevação da osmolalidade devido à introdução de um meio concentrado na alimentação. De acordo com os dados de OZTURK *et al.* (1992), as taxas metabólicas de um modo geral aumentaram na presença de concentrações crescentes de lactato. Já no estudo de LAO e TOTH (1997) com células CHO, o valor de q_{lac} diminuiu à medida que o lactato aumentou (um indício da inibição da lactato desidrogenase pelo excesso de seu substrato), porém para ensaios em paralelo, em que o aumento da osmolalidade foi provocado pela adição de NaCl, o valor de q_{lac} aumentou.

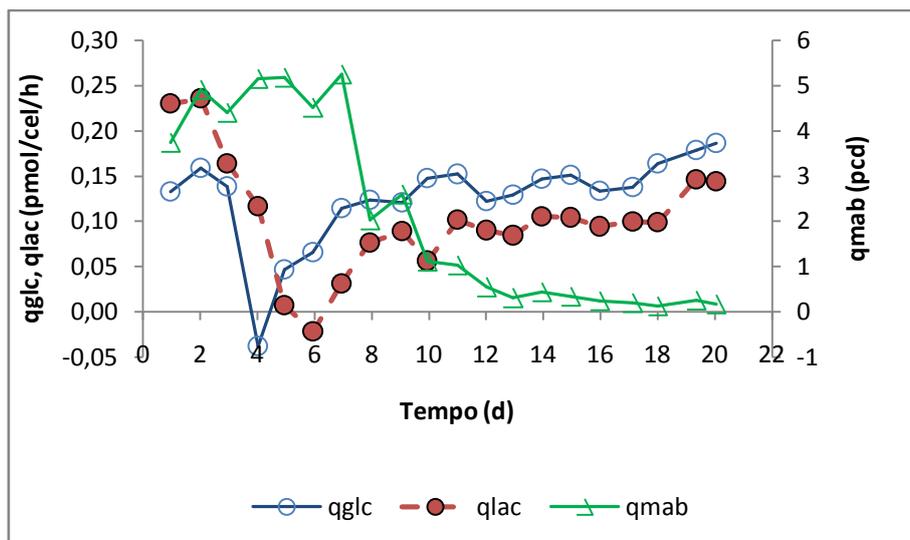


Figura 5.26. Perfil das taxas metabólicas de consumo de glicose (q_{glc} , em valores absolutos), formação/consumo de lactato (q_{lac}) e produção de anticorpo (q_{mab}), ensaio em biorreator BIO008.

Com relação à produção de anticorpo, novamente foi observado um perfil semelhante ao ensaio BIO007 e ao ensaio PP 3, em que a concentração de mAb atingiu um pico (no caso, no dia 7, de $140 \pm 5,90$ mg/L), seguido por uma importante redução e estabilização em um valor de apenas $5,6 \pm 2,2$ mg/L a partir do dia 14 (Figura 5.27).

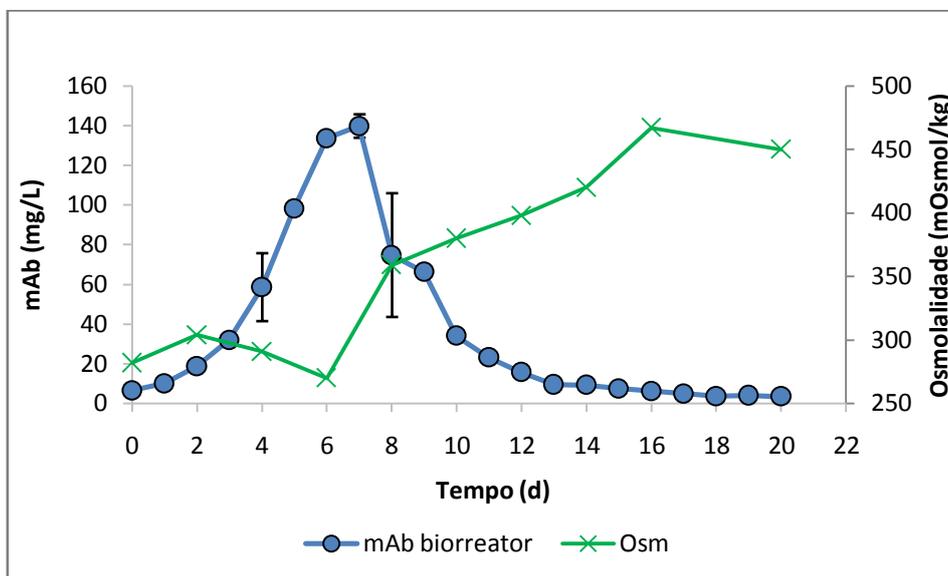


Figura 5.27. Perfil de mAb (dados em média±DP em duplicata analítica) e osmolaridade monitorados ao longo do ensaio em biorreator BIO008.

A provável causa para esse comportamento, novamente, seria o aumento da osmolaridade (Figura 5.27). O acúmulo de metabólitos tóxicos não identificados, como a amônia, seria outra possibilidade. A aplicação de taxas de diluição correspondentes a

tempos de residência de pelo menos 24 h, associada à degradação por enzimas liberadas pelas células não viáveis, seria outra possibilidade a ser investigada, embora de um modo geral os anticorpos sejam considerados moléculas estáveis.

A título de comparação, CHERLET e MARC (1999) avaliaram a possibilidade de um aumento gradual da osmolalidade em um cultivo contínuo de hibridomas OKT3 alimentado com meio basal com valores crescentes de osmolalidade entre 335 e 450 mOsm/kg, aplicados uma taxa de diluição constante de 0,48 vvd durante aproximadamente 10 dias. Segundo os autores, essa seria uma estratégia para estimular a produtividade e reduzir a inibição do crescimento por meio da adaptação das células em condições de hiperosmolalidade. Enquanto que, para os valores intermediários de 370 e 400 mOsm/kg, a concentração de produto quase dobrou em relação à condição controle (335 mOsm/kg), para os valores mais altos de 425 e 450 mOsm/kg (portanto, próximos aos valores medidos a partir do 12º dia do ensaio BIO008), a concentração de anticorpo e a produtividade não sofreram alterações significativas. Além disso, a análise de IgG intracelular por citometria de fluxo evidenciou o surgimento de uma população de células não secretoras de anticorpo nas condições de hiperosmolalidade, a qual chegou a representar 25% do total após 50 dias de cultivo (CHERLET e MARC, 1999).

6 Conclusões e Sugestões

Um meio de cultivo concentrado (TCx2D) foi utilizado para alimentar um processo de perfusão com células CHO, a fim de reduzir a taxa de diluição aplicada e fornecer o produto (mAb) em uma forma mais concentrada. Com a aplicação de taxas de diluição inversamente proporcionais às concentrações de glicose e de glutamina presentes em TCx2D, foi observado um aumento na concentração de anticorpo e na produtividade específica em relação à condição alimentada com o meio basal TC-LECC. Entretanto, efeitos deletérios sobre o crescimento e a viabilidade celular foram associados à elevação de cerca de 60% na osmolalidade, propriedade intrínseca ao meio concentrado devido à alta concentração de componentes. Na avaliação de diferentes composições de meios resultantes da mistura de TC-LECC e TCx2D, os meios com fatores de concentração de 1,4 e 1,8 vezes superior em relação ao meio basal proporcionaram cultivos que alcançaram $40 \cdot 10^6$ cels/mL com a aplicação de taxas de diluição inferiores à taxa empregada com o meio basal, de 1 vvd. A alimentação com meios com fator de concentração superior a duas vezes, apesar do aumento na produtividade específica de anticorpo possivelmente associada à elevação da osmolalidade, resultou em uma perda de viabilidade mais rápida e diminuição da concentração de produto.

Na condição adaptativa, em que as taxas de diluição foram modificadas conforme a demanda de glicose pelas células, tanto a glicose quanto o lactato mantiveram-se em baixas concentrações, e a concentração de produto foi superior em relação à condição alimentada com TC-LECC. Contudo, foi observado um rápido decaimento da viabilidade celular, o que não proporcionou o aumento da produtividade volumétrica.

Em dois ensaios em biorreator de bancada utilizando o sedimentador lamelado como equipamento de retenção celular, foram aplicados como alimentação o meio TCx2D a uma taxa de diluição entre 0,1 e 0,35 vvd, e a mistura TC-LECC:TCx2D 1:1 entre 0,1 e 1 vvd. Para ambos, foi confirmada a queda de produção associada à perda de viabilidade celular. A presença de lactato em concentrações próximas a 60 mM, reportada como tóxica para diversas linhagens celulares, provavelmente afetou o crescimento e a produtividade. O acúmulo desse metabólito poderia estar relacionado ao aumento da osmolalidade associado à introdução de meio concentrado pela corrente de

alimentação. A condição de hiperosmolalidade, entre 400 e 500 mOsm/kg, mesmo elevada de forma gradual, não possibilitou a adaptação das células. Como consequência da diminuição da viabilidade celular, foi observada uma turbidez no perfundido associado à presença de debris e à liberação do conteúdo citoplasmático, o que eventualmente pode ter causado a degradação proteolítica do produto.

Para o aperfeiçoamento dessa linha de pesquisa, sugere-se desenvolver uma formulação do meio de alimentação contendo os nutrientes essenciais (glicose, glutamina e aminoácidos) mais concentrados, visando à eliminação ou à manutenção em concentrações fisiológicas dos sais, principais contribuintes para o aumento da osmolalidade. A determinação dos coeficientes estequiométricos com base nas taxas metabólicas seria uma maneira de garantir a correta proporção de nutrientes, embora essa estratégia limite a sua aplicabilidade para outras linhagens celulares, e exija uma extensa avaliação das condições ao longo do cultivo. Ensaio em batelada poderiam ser realizados para avaliar o efeito das concentrações iniciais de glicose (ou outros nutrientes-chave, como glutamina) sobre o crescimento e a produção, proporcionando maiores informações para o controle da alimentação usando meios concentrados. A osmolalidade é um parâmetro que também poderia ser explorado para aumentar a produtividade específica, desde que estabelecida uma faixa de valores que não iniba o crescimento celular. A adaptação prévia de linhagens para valores de osmolalidade superiores à faixa fisiológica poderia garantir a manutenção da viabilidade por um período de cultivo mais longos, característico da perfusão. Em relação ao regime de alimentação, o método adaptativo (também chamado de alimentação dinâmica) poderia aumentar a eficiência do metabolismo voltado para a produção em detrimento à formação de subprodutos tóxicos, desde que atrelado a um sistema de controle robusto com base em medições *on-line*. Por fim, seria necessário investigar o impacto dos diferentes modos de operação de biorreatores sobre a qualidade do produto, em especial o padrão de glicosilação.

7 Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª Ed. Filadélfia: Elsevier, 2008.

ACTIP. "Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use (status 2013)." 2013. Disponível em: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/> (acesso em 13 de setembro de 2014).

AL-RUBEAI, M., ed. *Animal Cell Culture*, vol. 9. 1ª Ed., Heidelberg: Springer, 2015.

ALTAMIRANO, C.; CAIRÓ, J., GÒDIA, F. "Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control." *Biotechnology and Bioengineering* 76 (4), pp. 351-60, 2001.

AMABLE, P., BUTLER, M. "Cell metabolism and its control in culture." In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 4. New York: Taylor&Francis, 2008.

The Antibody Society. *Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or United States*. 2015. Disponível em: http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php (acesso em 23 de agosto de 2015).

Applied Biosystems. "PA immunodetection sensor cartridge for perfusion immunoassay technology". *Operating Instructions*, 2002.

AZEVEDO, A. "IgG quantification by analytical protein A chromatography." *Protocolo*, Bioseparations Laboratory do Instituto Superior Técnico (IST) da Universidade de Lisboa, 2012.

BAGGIOLINI, M., CLARK-LEWIS, I. "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." *Federation of European Biochemical Societies* 307 (1), pp. 97-101, 1992.

BATT, B.C., DAVIS, R.H., KOMPALA, D.S. "Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor." *Biotechnology Progress* 6, pp. 458-64, 1990.

BECKMANN, T.F., KRÄMER, O., KLAUSING, S. *et al.* "Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis." *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, pp. 659-71, 2012.

BIBILA, T., ROBINSON, D. "In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production." *Biotechnology Progress* 11, pp. 1-13, 1995.

BioAtla. "Antibody nomenclature." 2014. Disponível em: http://www.bioatla.com/wp-content/uploads/Appendix_antibodynomenclature.pdf (acesso em 24 de agosto de 2014).

Biotechnology Solutions. "Biotechnology solutions CS10 cell settler suggestions for operation and assembly." *Manual*. 2007.

BIRCH, J., RACHER, A.. "Antibody production." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, pp. 671-85, 2006.

BONHAM-CARTER, J., SHEVITZ, J. "A brief history of perfusion biomanufacturing." *BioProcess International* 9, pp. 24-31, 2011.

BORYS, M.C., LINZER, D.I.H., PAPOUTSAKIS, E.T. "Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cell in a pH-dependent manner." *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 505-14, 1994.

CASTILHO, L.R. "Desenvolvimento de processos contínuos com reciclo celular para obtenção de biofármacos: estudo de diferentes meios de cultivo e equipamentos de retenção de células animais." Relatório de atividades de pós-doutorado, Bielefeld, 2011.

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R. "Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures". *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 74, pp. 129-170, 2002.

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R. "Animal cell separation." In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 11. New York: Taylor&Francis, 2008.

CASTILHO, L.R. "Continuous animal cell perfusion processes: the first step toward integrated continuous biomanufacturing". In: SUBRAMANIAN, G. *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*. 1ª Ed., cap. 6. New York: Wiley-VCH, 2015.

CHERLET, M., MARC, A. "Hybridoma cell behaviour in continuous culture under hyperosmotic stress." *Cytotechnology* 29, pp. 71-84, 1999.

CHICO, E., RODRÍGUEZ, G., FIGUEREDO-CARDERO, A. "Bioreactors for animal cells." In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 9. New York: Taylor&Francis, 2008.

CHOTTEAU, V. "Perfusion processes". In: AL-RUBEAI, M. *Animal Cell Culture*, vol. 9. 1ª Ed., cap. 15. Heidelberg: Springer, 2015.

CHU, L., ROBINSON, D. "Industrial choices for protein production by large-scale cell culture." *Current Opinion in Biotechnology* 12, p. 180-7, 2001.

CHUPPA, S., TSAI, Y.S., YOON, S. *et al.* "Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells." *Biotechnology and Bioengineering* 55 (2), pp. 328-38, 1997.

CRUZ, H.J., FREITAS, C.M., ALVES, P.M. *et al.* "Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells." *Enzyme and Microbial Technology* 27, pp. 43-52, 2000.

DeJESUS, M., GIRARD, P., BOURGEOIS, M. *et al.* "TubeSpin satellites: a fast track approach for process development with animal cells using shaking technology." *Biochemical Engineering Journal* 17, pp. 217-23, 2004.

DOWD, J.E., JUBB, A., KWOK, K.E., PIRET, J.M. "Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates." *Cytotechnology* 42, pp. 35-45, 2003.

DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B.. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. 1ª Ed. Chinchester: Wiley, 1998.

ECKER, D., JONES, S.D., LEVINE, H. "The therapeutic monoclonal antibody market." *mAbs* 7(1), pp. 9-14, 2015.

EvaluateGroup. "Evaluate Pharma world preview 2014, outlook to 2020." 2014. Disponível em: www.evaluategroup.com/wp2014 (acesso em 13 de setembro de 2015).

FACCIOTTI, M.C.R. "Fermentação contínua." In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*, vol. 2. 1ª Ed., cap. 12. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

FALKENBERG, F.W. "Monoclonal antibody production: problems and solutions." *Research in immunology* 149, pp. 542-7, 1998.

FENG, Q., MI, L. LI, L. *et al.* "Application of 'oxygen uptake rate-amino acids' associated mode in controlled-fed perfusion culture." *Journal of Biotechnology* 122, pp. 422-430, 2006.

FIKE, R. *Nutrient supplementation strategies for biopharmaceutical production Part I: identifying a formulation*. 2009. Disponível em: <http://www.bioprocessintl.com/upstream-processing/biochemicals-raw-materials/nutrient-supplementation-strategies-for-biopharmaceutical-production-185084/> (acesso em 18 de novembro de 2014).

FISCHER, S.; HANDRICK, R.; OTTE, K. "The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives." *Biotechnology Advances* 33, pp. 1878-1896, 2015.

FRESHNEY, R. *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*. 5^a Ed. New York: Wiley, 2005.

GAMBHIR, A., ZHANG, C., EUROPA, A., HU, W.S. "Analysis of the use of fortified medium in continuous culture of mammalian cells." *Cytotechnology* 31, pp. 243-54, 1999.

GAUGHAN, C.L. "The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies." *Molecular Diversity*, pp. 1-16, agosto 2015.

GONZALEZ, T.N., LEONG, S.R., PRESTA, L.G. Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies. Patente US 6,025,158. 15 de fevereiro de 2000.

HAN, X.J., HEWIG, A., VEDANTHAM, G. "Recovery and purification of antibody." In: AL-RUBEAI, M. *Antibody Expression and Production*, vol. 7. 1^a Ed., cap. 14. Dordrecht: Springer, 2011.

HAREDY, A.M., NISHIZAWA, A., HONDA, K. *et al.* "Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression." *Cytotechnology* 65, pp. 993-1002, 2013.

JAYAPAL, K., WLASCHIN, W.S., HU, W.S., YAP, M. "Recombinant protein therapeutics from CHO cells: 20 years and counting." *Chemical Engineering Progress* 103, pp. 40-7, 2007.

JOSTOCK, T. "Expression of antibody in mammalian cells." In: AL-RUBEAI, M. *Antibody Expression and Production*, vol. 7. 1^a Ed., cap. 1. Dordrecht: Springer, 2011.

KADOURI, A., SPIER, R.E. "Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells." *Cytotechnology* 24, pp. 89-98, 1997.

KANEKO, Y., SATO, R., AOYAGI, H. "Evaluation of Chinese hamster ovary cell stability during repeated batch culture for large-scale antibody production." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109 (3), pp. 274-80, 2010.

KIM, J.Y., KIM, Y.G., LEE, G.M. "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, pp. 917-30, 2012.

KIM, N.S., LEE, G.M. "Response of recombinant Chinese hamster ovary cells to hyperosmotic pressure: effect of Bcl-2 overexpression." *Journal of Biotechnology* 95, pp. 237-48, 2002.

KLAUSING, S., KRÄMER, O., NOLL, T. “Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays.” *BMC Proceedings* Vol. 5, pp. 98-100, 2011.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.” *Nature* 256, pp. 495-7, 1975.

KOMPALA, D., OZTURK, S. “Optimization of high cell density perfusion bioreactors.” In: OZTURK, S., HU, W.S. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. 1ª Ed., cap. 11. Boca Ratón: Taylor&Francis, 2006.

KONSTANTINOV, K. “Monitoring and control of the physiological state of cell cultures.” *Biotechnology and Bioengineering* 52, pp. 271-89, 1996.

KONSTANTINOV, K., GOUDAR, C., NG, M. *et al.* “The 'push-to-low' approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 101, pp. 75-98, 2006.

KUMAR, N., GAMMEL, P., CLYNES, M. “Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture.” *Cytotechnology* 53, pp. 33-46, 2007.

KUNAS, K.T., PAPOUTSAKIS, E.T. “Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment.” *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 476-483, 1990.

KUYSTERMANS, D., AL-RUBEAI, M. “Bioreactor systems for producing antibody from mammalian cells.” In: AL-RUBEAI, M. *Antibody Expression and Production*, vol. 7. 1ª Ed., cap. 2. Dordrecht: Springer, 2011.

LAGES, J.C.L., 2015. Desenvolvimento de um processo de cultivo contínuo com reciclo celular para produção de um biofármaco lábil. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LAO, M.S., TOTH, D. “Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture.” *Biotechnology Progress* 13, pp. 688-691, 1997.

LÉO, P., GALESI, A.L.L., SUAZO, C.A.T., MORAES, A.M. “Animal cells: basic concepts.” In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 2. New York: Taylor&Francis, 2008.

LI, L., MI, L. FENG, Q. *et al.* “Increasing the culture efficiency of hybridoma cells by the use of integrated metabolic control of glucose and glutamine at low levels.” *Biotechnology Applied Biochemistry* 42, pp. 73-80, 2005.

LI, F., VIJAYASANKARAN, N., SHEN, A. *et al.* “Cell culture processes for monoclonal antibody productions.” *mAbs* 2(5), pp. 466-77, 2010.

LI, J., WONG, C.L., VIJAYASANKARAN, N. *et al.* “Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance.” *Biotechnology and Bioengineering* 109, pp. 1173-86, 2012.

LJUNGGREN, J., HÄGGSTRÖM, L. “Glutamine limited fed-batch culture reduces the overflow metabolism of amino acids in myeloma cells.” *Cytotechnology*, pp. 45-56, 1992.

LUCAS, B.K., GIERE, L.M., DEMARCO, R.A. *et al.* “High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector.” *Nucleic Acids Research* 24(9), pp. 1774-9, 1996.

MARKS, L. *Monoclonal antibodies: the invisible allies that changed the face of medicine*. 2015. Disponível em: theconversation.com/monoclonal-antibodies-the-invisible-allies-that-changed-the-face-of-medicine-45807 (acesso em 10 de setembro de 2015).

McDONNELL, S. “Production of antibodies in hybridoma and non-hybridoma cell lines.” In: AL-RUBEAI, M. *Animal Cell Culture*, vol. 9. 1ª Ed., cap. 3. Heidelberg: Springer, 2015.

MELLADO, M.C.M., CASTILHO, L.R. “Recombinant therapeutic proteins.” In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 16. New York: Taylor&Francis, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Medicamentos biológicos lideram lista de novos projetos de PDP*. 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sctie/noticias-sctie/18652-medicamentos-biologicos-lideram-lista-de-novos-projetos-de-pdp> (acesso em 06 de janeiro de 2016).

MORAES, A.M., MENDONÇA, R.Z., SUAZO, C.A.T. “Culture media for animal cells.” In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 5. New York: Taylor&Francis, 2008.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NASSERI, S., GAFFARI, N., BRAASCH, K. *et al.* “Increased CHO cell fed-batch monoclonal antibody production using the autophagy inhibitor 3-MA or gradually increasing osmolality.” *Biochemical Engineering Journal*, pp. 37-45, 2014

NIENOW, A. "Reactor engineering in large scale animal cell culture." *Cytotechnology*, pp. 9-33, 2006.

OH, S., VIG, P., CHUA, F. *et al.* "Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate." *Biotechnology and Bioengineering* 42, pp. 601-10, 1993.

OZTURK, S. "Engineering challenges in high density cell culture systems." *Cytotechnology* 22, pp. 3-16, 1996.

OZTURK, S., PALSSON, B. "Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production." *Biotechnology and Bioengineering* 37, pp. 989-93, 1991a.

OZTURK, S., PALSSON, B. "Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor." *Biotechnology Progress* 7, pp. 481-494, 1991b.

OZTURK, S., RILEY, M., PALSSON, B. "Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production." *Biotechnology and Bioengineering* 39, pp. 418-431, 1992.

PUCK, T.T., CIECIURA, S.J., ROBINSON, A. "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." *Journal of Experimental Medicine* 108, pp. 945-956, 1958.

RENARD, J.M., SPAGNOLI, R., MAZIER, C. *et al.* "Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems." *Biotechnology Letters* 10 (2), pp. 91-6, 1988.

ROQUE, A.C., LOWE, C., TAIPA, A.M. "Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification." *Biotechnology Progress* 20, pp.639-654, 2004.

SEARLES, J.A., TODD, P.W., KOMPALA, D.S. "Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant Chinese hamster ovary cells." *Biotechnology Progress* 10, pp.198-206, 1994.

SHEVITZ, J. Fluid filtration system. Patente US 6,544,424 B1. 08 de abril de 2003.

SPEARMAN, M., DIONNE, B., BUTLER, M. "The role of glycosylation in therapeutic antibodies." In: AL-RUBEAI, M. *Antibody Expression and Production*, vol. 7. 1^a Ed., cap. 12. Dordrecht: Springer, 2011.

SUN, X.M., ZHANG, Y.X. "Effects of glucose on growth, metabolism and EPO expression in recombinant CHO cell cultures." *Chinese Journal of Biotechnology* 17, pp. 698-702, 2001.

TAMASHIRO, W.M., AUGUSTO, E.F.P. "Monoclonal antibodies." In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 17. New York: Taylor&Francis, 2008.

TENG, X.N., YI, X.P., SUN, X.M., ZHANG, Y.X. "Modeling and application of controlled-fed perfusion culture of CHO cells in a bioreactor." *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25, pp. 385-394, 2011.

TONSO, A. "Monitoring and control of cell cultures." In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1ª Ed., cap. 10. New York: Taylor&Francis, 2008.

TSAO, Y.S., CARDOSO, A.G., CONDON, R.G.G. *et al.* "Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism." *Journal of Biotechnology* 118, pp. 316-27, 2005.

VERGARA, M., BECERRA, S., DÍAZ-BARRERA, A. *et al.* "Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA." *Electronic Journal of Biotechnology* 15 (6), 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2225/vol15-issue6-fulltext-2>.

VILLIGER-OBERBEK, A., YANG, Y., ZHOU, W., YANG, J. "Development and application of a high-throughput platform for perfusion-based cell culture processes" *Journal of Biotechnology* 212, pp. 21-9, 2015.

VOISARD, D., MEUWLY, F., RUFFIEUX, P.A., KADOURI, A. "Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells." *Biotechnology and Bioengineering* 82, pp. 751-65, 2003.

WAHRHEIT, J., 2014. *Metabolic dynamics and compartmentation in the central metabolism of Chinese hamster ovary cells*. Tese de D.Sc, *Universität des Saarlandes*, Saarbrücken, Alemanha.

WALSH, G. "Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, pp. 135-8, 2002.

WALSH, G. "Biopharmaceutical benchmarks 2014." *Nature Biotechnology* 32, pp. 992-1002, 2014.

WLASCHIN, K., HU, W.S. "Fed-batch culture and dynamic nutrient feeding." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 101, pp. 43-74, 2006.

WURM, F. "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." *Nature Biotechnology* 22, pp. 1393-8, 2004.

XIE, L., WANG, D.I.C. "Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies." *Biotechnology and Bioengineering* 43, pp. 1175-1189, 1994.

XIE, L., ZHOU, W. "Fed-batch cultivation of mammalian cells for the production of recombinant proteins." In: OZTURK, S., HU, W.S. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. 1^a Ed., cap. 10. Boca Ratón: Taylor&Francis, 2006.

XIE, K., ZHANG, X.W.,HUANG, L. *et al.* "On-line monitoring of oxygen in Tubespín, a novel, small-scale disposable bioreactor." *Cytotechnology* 63, pp. 345-50, 2011.

YANG, J.D., ANGELILLO, Y., CHAUDRY, M. *et al.* "Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process." *Biotechnology and Bioengineering* 69 (1), pp. 74-82, 2000.

YANG, M., BUTLER, M. "Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms." *Biotechnology Progress* 18, pp.129-38, 2002.

YOON, S., AHN, Y.H. "Application of sodium propionate to the suspension culture of Chinese hamster ovary cells for enhanced production of follicle-stimulating hormone". *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12, pp. 497-501, 2007.

ZAGARI, F., JORDAN, M., STETTLER, M. *et al.* "Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity." *New Biotechnology* 30 (2), pp. 238-245, 2013.

ZHOU, W., REHM, J., EUROPA, A., HU, W.S. "Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding." *Cytotechnology* 24, pp. 99-108, 1997.