



CULTIVO DE CÉLULAS BHK PARA A PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE

Priscila Mesquita de Sousa

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire
Leda dos Reis Castilho
Ricardo de Andrade Medronho

Rio de Janeiro
Julho de 2012

CULTIVO DE CÉLULAS BHK PARA A PRODUÇÃO DE FATOR VIII
RECOMBINANTE

Priscila Mesquita de Sousa

TESE 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 À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

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

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Prof. Aldo Tonso, D.Sc.

Prof^a. Elis Cristina Araujo Eleutherio, D.Sc.

Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2012

Sousa, Priscila Mesquita de

Cultivo de Células BHK para a Produção de Fator VIII Recombinante/Priscila Mesquita de Sousa. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XX, 167 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 126-139.

1. Produção de Biofármacos. 2. Fator VIII recombinante. 3. Células BHK. I. Freire, Denise Maria Guimarães *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais Erasmo e Nília,
dedico mais este sonho que
sonhamos juntos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, tudo mesmo;

À minha mãe, Nília (*in memorian*), que deu-me a vida e o ensinamento de como vivê-la da melhor forma;

Ao meu pai, Erasmo (*in memorian*), por tanto amor e pelo apoio incondicional;

Ao meu irmão, Júnior, o companheiro que Deus me deu;

Às minhas avós queridas, Hebe (*in memorian*) e Neuza, pelo amor e dedicação;

Ao Amadeu, pelo amor, apoio e companheirismo tão valiosos;

À minha família, pelo carinho e incentivo;

À família Sahaja Yoga pelo amor, pelas boas vibrações e por compartilhar os ensinamentos de Shri Mataji Nirmala Devi;

Às minhas queridas amigas, em especial Claudia Manhago, Kátia Guimarães, Leyde Gomes, Luciana Portal e Silmeri Gomes que sempre estiveram ao meu lado;

À amiga Erica Schulze, um agradecimento especial pela atenção, carinho, amizade e ajuda durante todo o trabalho e, principalmente, na reta final para conclusão da tese;

À professora Denise Freire, pelo incentivo à realização do doutorado;

Aos meus orientadores Denise Freire, Leda Castilho e Ricardo Medronho por todo conhecimento adquirido, pelas excelentes condições de trabalho, apoio, orientação e amizade;

Ao professor José Cremata (*in memorian*) pelos ensinamentos e pela amizade;

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares – LECC, em especial aos amigos Anderson, Daniel, Daniela, Dora, Erica, Fernanda, Joana, Lidiane e Marluce, pela ajuda no trabalho, pelo apoio, pelo companheirismo e por tantos momentos agradáveis;

Ao INPI e aos novos amigos do INPI;

Ao Programa de Engenharia Química;

Ao CNPq pelo fomento;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e acreditaram neste trabalho.

“Por maior que seja um homem na sociedade, sem amor lhe faltará a força da gravidade, a doce fragrância de uma flor.”

Shri Mataji Nirmala Devi

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

CULTIVO DE CÉLULAS BHK PARA A PRODUÇÃO DE FATOR VIII
RECOMBINANTE

Priscila Mesquita de Sousa

Julho/2012

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Programa: Engenharia Química

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do cultivo de células BHK (*baby hamster kidney cells*) para a produção de fator VIII recombinante em quatro diferentes meios de cultura isentos de soro fetal bovino (SFB). Foram estudados três meios comerciais isentos de soro animal (GMEM-S, *BD Animal Component Free* e *BD Cell Quantum Yield*), a mistura dos meios DMEM e Ham's F12 na proporção 1:1 e, para fins de comparação, avaliou-se, também, esta mistura contendo 1% de SFB. Além disso, estudou-se o cultivo em diferentes temperaturas (33°C, 35°C ou 37°C), visando a determinação da condição que permite melhor crescimento celular e produtividade. Foi realizada uma avaliação da cinética do consumo e acúmulo de aminoácidos e demais nutrientes e metabólitos, que permitiu a identificação de compostos que atingiram concentrações limitantes ou inibitórias durante o cultivo celular. O meio *BD Animal Component Free* mostrou o melhor desempenho, propiciando concentração celular máxima, taxa específica de crescimento e concentração de produto superiores às dos demais meios. A maior concentração de produto foi obtida nos cultivos a 33°C. Apesar de o crescimento celular ter sido menor do que em temperaturas mais elevadas, o metabolismo mostrou-se mais equilibrado, com consumo de glicose e glutamina mais lento e menor formação de metabólitos tóxicos, com elevada obtenção de produto. A menor produtividade observada em temperaturas maiores parece estar relacionada à limitação de glicose e de aminoácidos, tais como glutamina, glutamato e serina, assim como ao acúmulo de alanina, lactato e amônio.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

CULTURE OF BHK CELLS FOR THE PRODUCTION OF THE RECOMBINANT FACTOR VIII

Priscila Mesquita de Sousa

July/2012

Advisors: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Department: Chemical Engineering

The aim of this work was to evaluate the culture of BHK cells (baby hamster kidney cells) for the production of factor VIII using four different culture media free of fetal bovine serum (FBS). Three commercial media (GMEM-S, BD Animal Component Free and BD Cell Quantum Yield) and DMEM/F12 medium, both free of FBS and supplemented with 1% FBS, were studied at different temperatures (33°C, 35°C and 37°C) to determine the condition that provides best cellular growth and productivity. The kinetics of consumption and accumulation of amino acids and other nutrients and metabolites were evaluated. This allowed the identification of compounds that reached inhibiting or limiting concentrations during cell culture. The BD Animal Component Free medium showed better results, giving higher cell concentration, specific growth rates and product concentration. The highest concentration of product was obtained in cultivations at 33°C. Although cell growth was lower than at higher temperatures, the metabolism was better balanced, with slower glucose and glutamine consumption, less formation of toxic metabolites and higher product accumulation. The lower productivity observed at higher temperatures may be related to limitation of glucose and amino acids such as glutamine, glutamate and serine, as well as to the accumulation of alanine, lactate and ammonium.

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Sumário.....	viii
Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xix
1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1-HEMOFILIA	4
2.2-O FATOR VIII	5
2.3-BIOFÁRMACOS	10
2.4-CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS.....	11
2.4.1-Temperatura	11
2.4.2-pH.....	16
2.4.3-Oxigênio Dissolvido	16
2.5-MEIOS DE CULTIVO.....	18
2.5.1-Soro Animal	19
2.5.2-Vitaminas.....	20
2.5.3-Sais	21
2.5.4-Glicose.....	22
2.5.5-Aminoácidos	22
2.5.6-Outros Suplementos	23
2.6-METABOLISMO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	23
2.6.1-Glicose.....	25
2.6.2-Aminoácidos	29
2.6.3-Glutamina	33
3-OBJETIVOS	36
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1-LINHAGEM CELULAR.....	37
4.2-MEIOS DE CULTIVO.....	37
4.2.1-Mistura DMEM/Ham's F12	37

4.2.2-Soro Fetal Bovino	39
4.2.3-GMEM-S.....	39
4.2.4- <i>BD Animal Component Free</i>	39
4.2.5- <i>BD Cell Quantum Yield</i>	40
4.3-DESCONGELAMENTO	40
4.4-CRIOPRESERVAÇÃO.....	41
4.5-AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE MEIOS DE CULTIVO	41
4.6- ENSAIOS DE CINÉTICA DE CRESCIMENTO	42
4.7-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	42
4.7.1-Contagem de Células Totais.....	42
4.7.2-Contagem de Células Não-Viáveis	43
4.7.3-Determinação de Células Viáveis e Viabilidade	44
4.8-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, LACTATO E GLUTAMINA.....	44
4.9-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO.....	45
4.10-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	45
4.11-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FVIII.....	46
4.12-DOSAGEM DA ATIVIDADE DE FVIII	47
4.13-AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FVIII	48
4.14-ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR, METABOLISMO E FORMAÇÃO DE PRODUTO	48
4.15-MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DOS DOCUMENTOS DE PATENTES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE FVIII	53
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1-MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DOS DOCUMENTOS DE PATENTES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE FVIII	55
5.1.1-Origem dos Depositantes	56
5.1.2-Principais Requerentes.....	57
5.1.3-Principais Inventores.....	59
5.1.4-Evolução Temporal dos Pedidos de Patentes.....	60
5.1.5-Principais Áreas Tecnológicas Abordadas	62
5.2- SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO ISENTOS DE SORO	65
5.3-AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE CULTIVO.....	74
5.3.1-Crescimento Celular	74
5.3.2-Consumo de Glicose e Formação de Lactato	78
5.3.3-Consumo de Glutamina e Formação de Amônio.....	84

5.3.4-Formação de Produto	89
5.4-AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FVIII	95
5.5-AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO.....	97
5.5.1-Consumo de Asparagina	101
5.5.2-Consumo de Serina	103
5.5.3-Consumo de Valina	104
5.5.4-Consumo de Metionina	105
5.5.5-Consumo de Aspartato	107
5.5.6-Consumo de Glutamato	108
5.5.7-Consumo de Leucina	111
5.5.8-Produção de Glicina.....	112
5.5.9-Produção de Prolina	113
5.5.10-Produção e Consumo de Alanina.....	114
5.6-PROPOSIÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO MODIFICADA DE MEIO DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FVIII NO MESMO	117
6-CONCLUSÕES	121
7-SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXO I - Ilustração dos cálculos aplicados para a obtenção dos valores das taxas específicas.....	140
ANEXO II – Monitoramento Tecnológico de Patentes.....	141
ANEXO III - Documentos de Patentes Referentes à Produção de FVIII.....	148
ANEXO IV - Perfil de Consumo e Produção de Aminoácidos nos Cultivos de Células BHK Produtoras de FVIII em Diferentes Temperaturas nos Meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KG DH	α -cetoglutarato desidrogenase
AC	Aconitase
AcCoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
alaTA	Alanina aminotransferase
Am	Amônio
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
aspTA	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHK	<i>Baby hamster kidney cells</i> – células de rim de hamster neonate
Bip	<i>Immunoglobulin binding protein</i>
cDNA	DNA cópia
Cel	Célula
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i> – células de ovário de hamster chinês
CIP	Classificação Internacional de Patentes
CS	Citrato sintetase
Cys	Cisteína
DMEM	Meio de Eagle modificado po Dubelcco
DNA	Deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucléico
EM _c	Enzima málica citosólica
EM _m	Enzima málica mitocondrial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FVIIa	Fator FVII da coagulação sanguínea ativado
FVIII	Fator FVIII da coagulação sanguínea
FVIIIa	Fator FVIII da coagulação sanguínea ativado
pdFVIII	Fator FVIII da coagulação sanguínea derivado de plasma
rFVIII	Fator FVIII da coagulação sanguínea recombinante
FVIII _{max}	Concentração máxima de FVIII
FIX	Fator IX da coagulação sanguínea
FX	Fator X da coagulação sanguínea
FXa	Fator X da coagulação sanguínea ativado

FXI	Fator XI da coagulação sanguínea
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FU	Fumarato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GDP	Guanidina difosfato
Glc	Glicose
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GMEM	<i>Glagow's Modified Eagle's Medium</i>
GTP	Guanidina trifosfato
His	Histidina
ICDH	Isocitrato desidrogenase
Ile	Isoleucina
Lac	Lactato
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MDH	Malato desidrogenase
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
Met	Metionina
NAD	Nicotina adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotina adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PAG	Glutaminase ativada por fosfato
PC	Piruvato carboxilase
Pcd	Pg/célula/dia
PDH	Piruvato desidrogenase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Phe	Fenilalanina
PK	Piruvato quinase
Pro	Prolina
q _{aa}	Taxa específica de consumo ou formação de aminoácidos

q_{glc}	Taxa específica de consumo de glicose
q_{gln}	Taxa específica de consumo de glutamina
q_p	Taxa específica de formação de produto (produtividade específica)
SCoA	Succinil coenzyma A
SCoAS	Succinil coenzyma A sintetase
SDH	Succinato desidrogenase
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
t_d	Tempo de duplicação
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UI	Unidade internacional de Atividade
Val	Valina
Vero	Linhagem celular isolada de rim de macaco-verde africano adulto
vWF	Fator de von Willebrand
X_{max}	Concentração máxima de células viáveis durante o cultivo
X_m	Média da concentração de células viáveis
$Y_{Am/gln}$	Fator de conversão de glutamina em amônio
$Y_{lac/glc}$	Fator de conversão de glicose em lactato
$Y_{P/glc}$	Fator de conversão de glicose em produto
$Y_{P/gln}$	Fator de conversão de glutamina em produto
$Y_{P/X}$	Fator de conversão de células em produto
$Y_{X/glc}$	Fator de conversão de glicose em células
$Y_{X/gln}$	Fator de conversão de glutamina em células
WHF	<i>World Federation of Haemophilia</i>
μ	Taxa de específica de crescimento celular
ΔS_{glc}	Variação da concentração de glicose na fase exponencial.
ΔS_{gln}	Variação da concentração de glutamina na fase exponencial.
ΔX	Variação entre a concentração de inóculo e X_{max} na fase exponencial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da estrutura primária do FVIII cadeia completa. A cadeia completa consiste de 2332 aminoácidos distribuídos em nos domínios A1 (1–336), a1 (337–372), A2 (373–710), a2 (711–740), B (741–1648), a3 (1649–1689), A3 (1690–2020), C1 (2021–2173) and C2 (2174–2332) (reproduzido de THIM *et al.*, 2010). .6
- Figura 2: Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato. ADP - adenosina difosfato; ATP - adenosina trifosfato; NAD⁺ - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida); NADP - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida); P - fosfato. Adaptado de ALTAMIRANO *et al.* (2008)..... 26
- Figura 3: Esquema do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) e principais reações a ele associadas. (—) via ativa, (.....) via com baixa atividade, (- - - -) via inativa. AC - aconitase; AcCoA - acetil coenzima A; ADP - adenosina difosfato; α -KG DH – α -cetoglutarato desidrogenase; ATP - adenosina trifosfato; FAD - flavina adenina dinucleotídeo (oxidada); FADH - flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); FU - fumarato desidrogenase; GDH - glutamato desidrogenase; GDP - guanidina difosfato; GTP - guanidina trifosfato; ICDH - isocitrato desidrogenase; MDH - malato desidrogenase; NAD - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida); PAG - glutaminase ativada por fosfato; PC - piruvato carboxilase; PDH - piruvato desidrogenase; PEP - fosfoenolpiruvato; PEPCCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase; SDH - succinato desidrogenase; SCoA - succinil coenzima A; SCoAS - succinil coenzima A sintetase. Adaptado de ALTAMIRANO *et al.* (2008). 27
- Figura 4: Destino dos esqueletos carbonados dos aminoácidos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA). Adaptado de COX & NELSON, (2006). 31
- Figura 5 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo o país de origem dos requerentes (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755). (BR – Brasil, IT – Itália, CN – China, ES – Espanha, CA – Canadá, AU – Austrália, KR – República da Coreia, NL – Holanda, JP - Japão, BE - Bélgica, CH - Suíça, GB – Reino Unido/Grã-Bretanha, SE – Suécia, FR – França, DK – Dinamarca, AT – Áustria, DE – Alemanha, US – Estados Unidos)..... 56
- Figura 6 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo a empresa requerente (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755)..... 58

Figura 7 - Perfil dos requerentes (universidades e empresas) das patentes relacionadas à produção de FVIII (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).....	59
Figura 8 - Principais inventores dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).....	60
Figura 9 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo a data de publicação (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).....	61
Figura 10 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII segundo a principal área tecnológica de aplicação (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).	62
Figura 11 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII da área de cultivo celular segundo a matéria objeto de proteção (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).....	63
Figura 12 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII da área de cultivo celular segundo a célula empregada (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).	64
Figura 13: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12), a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	68
Figura 14: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB), a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	68
Figura 15: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio GMEM-S, a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	69
Figura 16: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio <i>BD Cell Quantum Yield</i> , a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.	70

Figura 17: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio <i>BD Animal Component Free</i> , a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	71
Figura 18: Concentração máxima de FVIII obtida nos cultivos, a 37°C, com os diferentes meios de cultivo analisados.	73
Figura 19: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.	75
Figura 20: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	75
Figura 21: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	76
Figura 22: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.	79
Figura 23: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro indicam 2 experimentos independentes.....	80
Figura 24: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	80
Figura 25: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio na mistura (1:1) nos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes..	84
Figura 26: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio na mistura (1:1) nos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	85
Figura 27: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.	85
Figura 28: Reação de metabolização da glutamina e do glutamato. Fonte: COX & NELSON (2006).	89

Figura 29: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).	90
Figura 30: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).....	90
Figura 31: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII no meio <i>BD Animal Component Free</i>	91
Figura 32: Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio <i>BD Animal Component Free</i>	100
Figura 33: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de asparagina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	102
Figura 34: Reação de formação de glicina a partir de serina. Fonte: COX & NELSON, 2006.	103
Figura 35: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de serina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	104
Figura 36: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de valina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	105
Figura 37: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de metionina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	106
Figura 38: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de aspartato no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	108
Figura 39: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamato no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	109
Figura 40: Síntese de glutamato catalisada pela enzima GDH.	110
Figura 41: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de leucina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	111
Figura 42: Reação de formação de glicina. Fonte: COX & NELSON, 2006.....	112

Figura 43: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o produção de glicina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	113
Figura 44: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a produção de prolina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	114
Figura 45: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a produção e o consumo de alanina no meio <i>BD Animal Component Free</i> . Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.....	115
Figura 46: Esquema sobre a interação do metabolismo da glicose e da glutamina através do piruvato (glutaminólise). ATP - adenosina trifosfato; FADH - flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida). Fonte: ALTAMIRANO, 2000.	116
Figura 47 - Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a concentração de FVIII no meio <i>BD Animal Component Free</i> suplementado com os aminoácidos glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina. 33°C-A: suplementação no início do cultivo; 33°C-B: suplementação após 72h de cultivo; 33°C-C e 37°C: sem suplementação.....	119
Figura 48: Efeito de condições de cultivo sobre a cinética de crescimento celular no meio <i>BD Animal Component Free</i> suplementado com os aminoácidos glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina. 33°C-A: suplementação no início do cultivo; 33°C-B: suplementação após 72h de cultivo; 33°C-C e 37°C: sem suplementação.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio basal DMEM/Ham's F12 (1:1). Fonte: CASTILHO <i>et al.</i> , (2006).....	38
Tabela 2: Variação da viabilidade celular em função da concentração de soro fetal bovino (SFB) durante o processo de adaptação de células BHK ao cultivo em suspensão e livre de SFB em meio DMEM/F12.	67
Tabela 3: Taxa específica de crescimento (μ), concentração celular máxima (X_{max}), taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}), fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$), taxa específica de consumo de glutamina (q_{gln}), fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) e concentração máxima de produto ($FVIII_{max}$) nos meios analisados para o cultivo a 37°C de células BHK produtoras de FVIII.....	71
Tabela 4: Concentração celular máxima (X_{max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).....	76
Tabela 5: Concentração celular máxima (X_{max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).....	76
Tabela 6: Concentração celular máxima (X_{max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas no meio <i>BD Animal Component Free</i>	77
Tabela 7: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/glc}$) e de glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).....	81
Tabela 8: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/glc}$) e de glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).....	81
Tabela 9: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/glc}$) e de glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas no meio <i>BD Animal Component Free</i>	81
Tabela 10: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{X/gln}$) e de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) e taxas específicas	

de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).....	87
Tabela 11: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{x/gln}$) e de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) e taxas específicas de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).	87
Tabela 12: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{x/gln}$) e de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) e taxas específicas de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio <i>BD Animal Component Free</i>	87
Tabela 13: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com a mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12) em diferentes temperaturas.....	91
Tabela 14: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com a mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB) em diferentes temperaturas. ...	91
Tabela 15: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com o meio <i>BD Animal Component Free</i> em diferentes temperaturas.	92
Tabela 16: Concentração de FVIII em meio <i>BD Animal Component Free</i> em diferentes temperaturas após incubação de 24 horas.....	96
Tabela 17: Composição de aminoácidos da sequência proteica do FVIII.....	99
Tabela 18: Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio <i>BD Animal Component Free</i>	100
Tabela 19: Atividade máxima de FVIII ($FVIII_{max}$) e taxa específica de formação de produto (q_p), em termos de atividade coagulante, obtidas nos experimentos com o meio <i>BD Animal Component Free</i>	119

1 – INTRODUÇÃO

A hemofilia é uma doença hemorrágica decorrente da deficiência de uma das proteínas do sangue envolvidas no processo de coagulação, sendo classificada como hemofilia A, B e C. A hemofilia do tipo A é a mais comum e é caracterizada por uma deficiência do fator VIII (FVIII) da coagulação sangüínea.

De acordo com a Federação Mundial de Hemofilia (*World Federation of Haemophilia – WFH*), o número de portadores de hemofilia no mundo é de 162.781, sendo 125.049 portadores de hemofilia do tipo A. No Brasil, o número de portadores de hemofilia é de 10.065. Dentre os 106 países analisados (93,6% da população mundial), o Brasil teve a terceira maior população de portadores de hemofilia, ficando abaixo apenas da Índia (n=13.993) e Estados Unidos (n=17.485). Considerando-se apenas os portadores de hemofilia do tipo A, o Brasil mantém a terceira colocação com 8.449 pacientes, enquanto a Índia tem 11.648 e os Estados Unidos 13.276 (WFH, 2011).

De acordo com o estudo da WFH (2011), o consumo anual mundial de concentrados de FVIII é de 6.013.837.683 UI. No Brasil, o consumo de concentrados de FVIII é de 231.392.750 UI de FVIII, sendo 100% derivado de plasma (pdFVIII). Este número é muito diferente de países como os Estados Unidos, por exemplo, que consomem 1.600.000.000 UI de FVIII, sendo a maioria recombinante (69%). O consumo de FVIII *per capita* no Brasil é 1,15 UI/habitante/ano, enquanto nos Estados Unidos é 5,16 UI/habitante/ano (WFH, 2009; WFH, 2011). Estes dados mostram como o investimento no tratamento da hemofilia A no Brasil ainda é pequeno, além de não incluir FVIII recombinante (rFVIII), apesar do tempo que este produto se encontra no mercado.

O tratamento atual da hemofilia do tipo A no mundo é, majoritariamente, baseado na infusão intravenosa de concentrados de pdFVIII quando da ocorrência de sangramentos (WFH, 2009; WFH, 2011). Estes concentrados apresentam problemas

como o alto custo, a dependência de doadores e o risco de transmissão de agentes patogênicos. Por isso, é cada vez maior o interesse em expressar FVIII recombinante em sistemas celulares.

Os produtos recombinantes apresentam um risco mínimo de transmissão de agentes infecciosos. Além disso, mesmo se o Brasil passasse a produzir fatores sanguíneos a partir do plasma de doadores e se toda quantidade de plasma dos bancos de sangue do país fosse empregada para a obtenção de FVIII, as quantidades obtidas não seriam suficientes para suprir a demanda de todo o país, dada a baixa concentração plasmática de FVIII em indivíduos sadios e a grande demanda deste fator pelos pacientes portadores de hemofilia A.

Assim, o desenvolvimento de tecnologia nacional para a obtenção de rFVIII, através da utilização de técnicas de cultivo de células animais, pode possibilitar a produção de FVIII suficiente para a demanda do Brasil, além de evitar gastos com sua importação.

Como o FVIII é uma proteína de alta massa molar, complexa e glicosilada, sua produção é baseada no cultivo de células de mamíferos.

As condições necessárias para o cultivo de células de mamíferos *in vitro* são semelhantes às encontradas *in vivo*, como temperatura, pH, osmolaridade, quantidade de oxigênio, dióxido de carbono e nutrientes. O meio de cultura é um dos fatores de maior relevância no cultivo de células de mamíferos e tem como função fornecer os substratos necessários para o metabolismo e crescimento celular, além de manter o pH e osmolaridade adequados. As primeiras estratégias para o cultivo de células de mamíferos foram baseadas na utilização de fluidos biológicos (plasma, linfa e soro) e extratos de tecidos. Posteriormente, passou-se a empregar meios de cultivo basais contendo açúcares, sais, vitaminas, lipídeos, proteínas, ácidos orgânicos e aminoácidos, suplementados com soros animais, especialmente o soro fetal bovino (SFB) (MORAES *et al.*, 2008).

Os soros animais são utilizados como suplemento dos meios de cultivo para fornecer fatores de crescimento, hormônios, proteínas de adesão e de transporte às células de mamíferos. No entanto, o soro apresenta desvantagens como composição quimicamente indefinida, alta variabilidade de lote para lote (o que prejudica a reprodutibilidade dos processos de cultivo celular), elevado custo e alta concentração protéica, a qual dificulta a purificação do produto de interesse. Adicionalmente, sendo o soro de origem animal, há o potencial risco de transmissão de agentes patogênicos e, por isso, as agências regulatórias determinam a sua eliminação em processos visando à obtenção de produtos para uso humano (LUBINIECKI, 1998). Desta forma, é de grande importância o desenvolvimento de processos de cultivo celular em meios quimicamente definidos e isentos de soro para os processos de produção de biofármacos.

Neste trabalho, foram avaliados diferentes meios de cultura isentos de soro animal para o cultivo em suspensão de células *BHK* (*baby hamster kidney cells* – células de rim de hamster neonato) produtoras do biofármaco FVIII. Foi realizada uma avaliação cinética do cultivo celular em diferentes meios de cultivo e diferentes temperaturas com o objetivo de identificar aqueles capazes de propiciar alta viabilidade celular e elevada produtividade, visando a determinação da melhor condição para a produção de FVIII. Para isso, o consumo de glicose e aminoácidos, assim como a produção de rFVIII e de metabólitos tóxicos, foram analisados em diferentes temperaturas de cultivo para avaliar o metabolismo de células BHK produtoras de FVIII para a elaboração de novas estratégias de cultivo que levem a maiores níveis de produtividade, viabilidade e crescimento celular.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- A HEMOFILIA

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária resultante da deficiência de uma das proteínas do sangue envolvidas no processo de coagulação.

Os três tipos mais comuns de hemofilia são: hemofilia A, B e C. A hemofilia A, ou clássica, é caracterizada por uma deficiência de FVIII da coagulação sanguínea e engloba aproximadamente 85% dos casos. A hemofilia B é a segunda mais comum, correspondendo a cerca de 15% dos casos, e é caracterizada por uma deficiência de fator IX. A hemofilia C é bem mais rara e ocorre por uma deficiência de fator XI (TRIPLETT, 2000). Cerca de 125.049 pessoas em todo o mundo sofrem de hemofilia A, em que o FVIII não é produzido, não é ativo ou está presente em quantidades reduzidas (PICANCO *et al.*, 2004; WFH, 2011).

A introdução de fatores sanguíneos derivados de plasma obtidos através de processos incluindo etapas de inativação viral e, mais tarde, de produtos recombinantes revolucionou o tratamento de pacientes com hemofilia (FRANCHINI *et al.*, 2011).

A principal vantagem oferecida pelos produtos recombinantes é a independência de doações sanguíneas, que limitam a disponibilidade dos fatores e representam um risco potencial de transmissão de doenças, tal como ocorreu no passado com os vírus da SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) e hepatite B (KELLY *et al.*, 1997). Ademais, estudos mostraram que a taxa de incidência de inibidores de FVIII não é diferente entre pacientes que usam pdFVIII (Fator FVIII da coagulação sanguínea derivado de plasma) ou rFVIII (Fator FVIII da coagulação sanguínea recombinante) (FRANCHINI *et al.*, 2011).

No Brasil, estima-se que existem cerca de 8.449 portadores de hemofilia do tipo A que são tratados, na sua maioria, com concentrados de pdFVIII que são

importados pelo governo brasileiro (REZENDE *et al.*, 2009; WFH, 2011). Este tipo de tratamento é caro e muitas vezes não disponível na quantidade necessária.

2.2 – O FATOR VIII

O FVIII é uma proteína altamente glicosilada que participa do sistema da coagulação sanguínea. Concentrados de FVIII são empregados no tratamento de pacientes com hemofilia do tipo A. O gene do FVIII foi clonado e caracterizado em 1984. Seu *locus* situa-se na região 28 do braço do cromossomo X. É constituído por 26 exons e 25 íntrons (GITSCHIER *et al.*, 1984).

A proteína deduzida da seqüência de nucleotídeos do cDNA contém 2351 aminoácidos. Após sua síntese nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático, o FVIII é translocado ao lúmen reticular. Durante este processo, o peptídeo sinal de 19 aminoácidos localizado na extremidade N-terminal é clivado para gerar uma cadeia polipeptídica madura de 2332 aminoácidos, com massa molar de 264,8 kDa. Já foram observadas em eletroforese (SDS-PAGE) moléculas de FVIII com mais de 330 kDa sob condições não redutoras, provavelmente devido à extensa glicosilação (VEHAR *et al.*, 1984; WANG *et al.*, 2003).

A clivagem do FVIII, que é sintetizado como um polipeptídeo de cadeia única que é clivado, gera uma cadeia denominada leve (80 kDa) e uma cadeia denominada pesada (90-210 kDa), as quais permanecem associadas por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A análise da estrutura primária do FVIII (Figura 1) mostrou a organização em domínios: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, sendo a cadeia pesada constituída pelos domínios A1-a1-A2-a2-B e a cadeia leve pelos domínios a3-A3-C1-C2. Os 3 domínios A são conectados por 3 seqüências acídicas curtas: a1 (resíduos 337-372); a2 (resíduos 711-740) e a3 (resíduos 1649-1689). Considerando-se uma seqüência mais detalhada do FVIII, tem-se: A1a1: 1-372; A2a2: 373-740; B: 741-1648;

a3A3: 1649-2020; C1: 2021-2173 e C2: 2174-2332 (WANG *et al.*, 2003; THIM *et al.*, 2010).

Acredita-se que o domínio B, o maior domínio, esteja envolvido na regulação da expressão e da atividade de FVIII (KAUFMAN *et al.*, 1989; PITTMAN *et al.*, 1994). No entanto, moléculas de rFVIII com o domínio B deletado apresentam atividade biológica assim como as moléculas de rFVIII de cadeia completa, o que mostra que este domínio não influencia a função biológica de FVIII (THIM *et al.*, 2010).

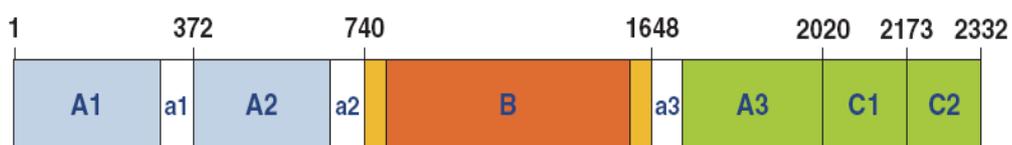


Figura 1: Esquema da estrutura primária do FVIII cadeia completa. A cadeia completa consiste de 2332 aminoácidos distribuídos em nos domínios A1 (1–336), a1 (337–372), A2 (373–710), a2 (711–740), B (741–1648), a3 (1649–1689), A3 (1690–2020), C1 (2021–2173) and C2 (2174–2332) (reproduzido de THIM *et al.*, 2010).

No interior do retículo endoplasmático, unidades de oligossacarídeos com alto conteúdo de manose são adicionadas a resíduos específicos da cadeia polipeptídica. Antes de ser secretado, o FVIII continua seu percurso pelo complexo de Golgi, onde a maioria dos oligossacarídeos N-ligados à cadeia pesada é modificada, gerando estruturas complexas ou híbridas. Uma proporção significativa do FVIII fica retido no retículo endoplasmático complexado com a proteína BiP, uma chaperona envolvida no enovelamento do FVIII (DORNER *et al.*, 1987).

A sulfatação de resíduos de tirosina acontece nas regiões acídicas e entre os domínios A1 e A2. Também no complexo de Golgi, o FVIII é clivado por uma protease desconhecida após o resíduo Arg1648 na seqüência His-Gln-Arg-Glu para gerar a cadeia leve e a cadeia pesada (EATON *et al.*, 1986; BIHOREAU *et al.*, 1991).

No organismo, o FVIII circula no sangue como um heterodímero formado pelas cadeias leve e pesada. Estas cadeias estão ligadas mediante interações dependentes

e independentes de metais, sendo esta interação com metais essencial para a estrutura e função do FVIII (EATON *et al.*, 1987; BIHOREAU *et al.*, 1994; STOYLOVA *et al.*, 1999). Menos de 1% do FVIII secretado pode ser encontrado como cadeia única. Isto foi demonstrado tanto para o pdVIII como para o rFVIII produzido em células BHK (STOYLOVA *et al.*, 1999).

O FVIII heterodimérico circula no sangue formando um complexo não covalente com o fator de von Willebrand (vWF), uma proteína multimérica formada por subunidades idênticas de 220 kDa ligadas por pontes dissulfeto. O FVIII se liga ao vWF com alta afinidade mediante 2 sítios: (i) os resíduos 2173-2332 no domínio C2, os quais também interagem com fosfolípidios, de modo que o vWF bloqueia a ligação prematura do FVIII com superfícies trombogênicas; (ii) os resíduos 1673-1689 no domínio A3, responsáveis por manter a conformação ótima para a interação com o vWF (LEYTE *et al.*, 1989; SAENKO & SCANDELLA, 1997).

A interação do FVIII com o vWF resulta em uma estabilização do FVIII essencial para a sua manutenção na forma ativa na circulação. Os possíveis mecanismos de estabilização são a proteção de sítios de proteólise ou a proteção do FVIII de anticorpos inibidores (JACQUEMIN & SAINT-REMY, 1998). Além de atuar como estabilizador, o vWF inibe interações prematuras entre o FVIII e o FIX ou o FVIII e superfícies fosfolipídicas.

O FVIII tem a estabilidade limitada tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. A sua instabilidade *in vivo* é devida a diversos fatores tais como a ligação a proteínas plasmáticas e anticorpos, inativação proteolítica e degradação não proteolítica. A meia vida do FVIII puro no organismo humano foi estimada entre 15 e 19 horas (LUDLAM *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2003).

O FVIII na sua forma heterodimérica contém uma atividade procoagulante mínima ou não detectável (LOLLAR & FAY, 1993; DONATH *et al.*, 1995). Quando o mesmo é ativado, no processo de coagulação, por ação proteolítica da trombina ou do Fator X ativado (FXa), ocorrem clivagens nas duas cadeias e é gerado um

heterotrímero ativo, que consiste em 3 fragmentos, de 73 (A3-C1-C2), 50 (A1-a1) e 43 (A2-a2) kDa. Ambas proteases, trombina e FXa, clivam nos sítios Arg372 (ligação dos domínios A1 e A2) e Arg740 (ligação entre os domínios A2 e B) na cadeia pesada e Arg1689 (ligação entre a3 e A3) na cadeia leve, convertendo, assim, FVIII inativo no fator heterodimérico ativado (FVIIIa) (EATON *et al.*, 1986).

A clivagem na cadeia leve resulta na separação dos domínios A3-C1-C2, o que promove uma mudança conformacional que facilita a dissociação do vWF e permite a interação entre o FVIIIa e as superfícies fosfolipídicas, incluindo a superfície de plaquetas ativadas (DONATH *et al.*, 1995; REGAN & FAY, 1995). A clivagem no resíduo de Arg740 produz a liberação do domínio B, que não vem a compor o heterotrímero ativado, o que indica que esse domínio não apresenta função nenhuma no FVIIIa (FAY, 1993).

Por isso e devido à maior dificuldade em expressar a cadeia completa de FVIII, diferentes variantes de FVIII com domínio B deletado foram geradas (THIM *et al.*, 2010), incluindo FVIII_{des-797-1652} (EATON *et al.*, 1986), FVIII_{des-771-1652} (BIHOREAU *et al.*, 1991) e FVIII_{des-760-1639} (PITTMAN *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2003). O SQ FVIII, outra molécula de FVIII com o domínio B deletado em que a Ser743 é ligada diretamente à Gln638, foi aprovado para comercialização e uso em terapia sob o nome comercial Refacto®, já que sua atividade biológica não apresentou diferenças em relação ao pdFVIII (SANDBERG *et al.*, 1991, 2001). Estas moléculas de FVIII com domínio B deletado apresentam menor massa molar e, por isso, sua atividade específica, em geral, é maior que das moléculas de FVIII inteiras (WANG *et al.*, 2003).

A complexidade estrutural do FVIII impede a sua expressão em sistemas celulares que não as células de mamíferos, pois outras células carecem de mecanismos para modificar pós-traducionalmente de forma correta o FVIII (SOUKHAREV *et al.*, 2002). Assim, o rFVIII tem sido necessariamente expresso em células de mamíferos, dada a quantidade de modificações pós-traducionais essenciais para sua atividade biológica.

As moléculas de FVIII têm muitos sítios de glicosilação. Dos 25 sítios com Asn-glicanos (N-glicosilação), 19 estão no domínio B. Os 6 sítios de Asn-glicosilação fora do domínio B estão localizados nos resíduos 41, 239, 582, 1685, 1810 e 2118 (WANG *et al.*, 2003). Além disso, o FVIII humano tem vários sítios de Ser- e Thr-glicanos (O-glicosilação). Três estão localizados nos resíduos 346 (cadeia pesada), 1664 e 1680 (cadeia leve), e os outros estão localizados em 718, 719 e 723, na porção C-terminal da subunidade A2 (PITTMAN *et al.*, 1992).

Os produtos que contêm FVIII são liofilizados porque a estabilidade do FVIII *in vitro* no estado líquido é limitada. Em alguns produtos, a estabilidade do FVIII liofilizado depende da presença de proteínas estabilizadoras como a albumina de soro humano. O Kogenate® e o Recombinate® são produtos baseados em rFVIII de cadeia completa que contêm albumina em sua formulação para melhorar a estabilidade do produto. No entanto, para evitar o risco de contaminação por patógenos que podem estar associados à albumina, alguns produtos são desprovidos desta proteína na formulação, como é o caso do Kogenate® FS e do ReFacto®. No entanto, estudos mostraram que a estabilidade destes produtos livres de albumina é significativamente comprometida (WANG *et al.*, 2003).

A estabilidade do FVIII em solução é ainda pior do que o liofilizado. Muitos fatores afetam a estabilidade *in vitro* do FVIII, tais como temperatura, presença de íons metálicos, sais, lipídios ou outros excipientes, adsorção superficial, pH, agitação, exposição à luz, congelamento/descongelamento/secagem, condições de armazenamento e embalagem. Muitos componentes para formulações têm sido avaliados, porém, apenas poucas têm efetivamente estabilizado o FVIII em solução, incluindo sacarose, sorbitol, manitol, histidina, glicina e outros aminoácidos (WANG *et al.*, 2003).

Mesmo que as células de mamíferos consigam secretar um rFVIII com níveis de atividade similares aos níveis do pdFVIII, análises de glicosilação têm demonstrado que o grau e a complexidade das N-glicosilações não são idênticos. Observou-se uma

maior massa molar dos carboidratos do rFVIII secretado por células CHO (*Chinese hamster ovary* – células de ovário de *hamster* chinês), em comparação com o pdFVIII, o que é resultado de uma maior ramificação dos oligossacarídeos complexos N-ligados (KAUFMAN *et al.*, 1987).

Outro estudo comparativo entre o pdFVIII e o rFVIII secretado por células BHK indica que este rFVIII contém estruturas diferentes de oligossacarídeos. No entanto, estudos farmacocinéticos em macacos demonstraram que a atividade e meia-vida do pdFVIII e do rFVIII são similares, o que indica que estas diferenças estruturais não influenciam significativamente a atividade funcional da molécula (HIRONAKA *et al.*, 1992).

Mesmo com diferenças estruturais, produtos recombinantes têm sido aprovados, desde 1992, para uso em terapia humana, já que não foram observados efeitos secundários, nem diferenças significativas na atividade biológica *in vivo* da proteína.

2.3 – BIOFÁRMACOS

As células de mamíferos têm sido cada vez mais empregadas na produção de biofármacos, por serem capazes de sintetizar corretamente proteínas de uso terapêutico que, geralmente, têm elevada massa molar e são complexas e glicosiladas. Também na área de vacinas, as células animais vêm encontrando aplicação crescente para a obtenção de vacinas virais e/ou recombinantes. As linhagens mais utilizadas para a obtenção de biofármacos e vacinas são a CHO.K1, a BHK-21 e a Vero (linhagem isolada de rim de macaco-verde africano adulto), além de hibridomas secretores de anticorpos e mielomas produtores de anticorpos recombinantes. A linhagem BHK-21 foi isolada de cinco *hamsters* de um dia de idade (MACPHERSON & STOCKER, 1962). Esta é uma linhagem de fibroblastos naturalmente aderentes, porém as células podem ser adaptadas ao cultivo em

suspensão. Estas células são muito utilizadas para a propagação de vírus na produção de vacinas veterinárias e também para a produção de alguns biofármacos recombinantes, tais como rFVIII (Kogenate®) e FVIIa (NovoSeven®) (LÉO *et al.*, 2008; MELLADO & CASTILHO, 2008).

O foco de estudos recentes na área de produção de biofármacos tem sido o aumento da produtividade através da manipulação genética das células e/ou de mudanças nas condições de cultivo. Na maioria dos casos, as técnicas adotadas têm levado a um aumento da produtividade dos sistemas empregados (BECERRA, *et al.*, 2012).

2.4 - CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Para o cultivo de células de mamíferos *in vitro* com altas taxas de crescimento e elevada viabilidade celular, em geral, são necessárias condições de cultivo semelhantes às encontradas *in vivo* (temperatura, pH, osmolaridade, concentração de oxigênio, concentração de dióxido de carbono e nutrientes). *In vivo*, as células são supridas pela circulação sanguínea com os nutrientes necessários. *In vitro*, as células precisam de uma combinação complexa de nutrientes e de um rigoroso controle das condições de cultivo (MORAES *et al.*, 2008).

2.4.1 - Temperatura

A temperatura é um fator de grande relevância para o cultivo de células, pois afeta o crescimento, morfologia, metabolismo, viabilidade celular, solubilidade de componentes do meio de cultivo, sensibilidade à tensão de cisalhamento, produtividade, qualidade do produto e ação de proteases. No caso de cultivo de

células de mamíferos para a produção de biofármacos, a temperatura de cultivo é uma das principais variáveis manipuláveis do processo visando a um aumento na produção de proteínas recombinantes (YOON *et al.*, 2006).

Células de mamíferos podem tolerar quedas consideráveis de temperatura, podendo sobreviver por dias a 4°C, assim como serem congeladas e criopreservadas a -196°C. No entanto, estas células não toleram aumentos maiores que 2°C acima da temperatura normal de cultivo (37°C), mesmo que por poucas horas, e morrem rapidamente a 40°C ou acima. Além de seu efeito direto no crescimento celular, a temperatura também pode ter efeitos sobre o pH, visto que a solubilidade do CO₂ aumenta em temperaturas mais baixas (FRESHNEY, 2005).

A influência da temperatura no crescimento celular e na produção de glicoproteínas recombinantes já foi estudada por alguns pesquisadores com o objetivo de obter um processo mais eficiente para a produção de biofármacos. Em temperaturas inferiores a 37°C, embora haja uma diminuição na taxa específica de crescimento, efeitos positivos já foram observados, como o aumento da viabilidade celular e diminuição da atividade de proteases. Além disto, o cultivo em temperaturas menores pode levar a uma produtividade específica maior, porém este efeito não é observado em todos os casos (FOGOLÍN *et al.*, 2005).

JENKINS & HOVEY (1993) empregaram diferentes temperaturas de cultivo (34-39°C) para avaliar o crescimento celular e a produtividade em células CHO. Com isso, foi possível manter as células viáveis por mais tempo e aumentar em 35% a produção da proteína recombinante. Os autores relataram que a diminuição da temperatura levou a um tempo maior na fase G1/G0 do ciclo celular, o que pode ser o fator responsável pelo aumento da produtividade de células cultivadas em temperaturas moderadas.

FOGOLÍN *et al.* (2005) demonstraram que a redução da temperatura de 37°C para 33°C no cultivo de células CHO recombinantes produtoras de GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) levou à redução da taxa

específica de crescimento, ao aumento da viabilidade celular, à melhora da produtividade celular e à redução do consumo de glicose e da formação de lactato. Nesse trabalho, o cultivo das células foi conduzido em duas fases: inicialmente, uma fase de crescimento celular foi conduzida a 37°C para obtenção de uma elevada quantidade de células; depois, uma fase de produção foi realizada, na qual a temperatura foi de 33°C. A concentração celular máxima foi mantida após a redução de temperatura. A viabilidade celular permaneceu acima de 80% durante os 3,7 dias com temperatura reduzida. Além disso, houve aumento de 2,1 vezes na produtividade específica de GM-CSF no cultivo com uma etapa conduzida a 33°C, em relação a um cultivo controle conduzido integralmente a 37°C.

Como a qualidade e, portanto, a eficácia *in vivo* de proteínas recombinantes podem ser afetadas por diversos fatores, os referidos autores avaliaram também o padrão de N- e O- glicosilação da proteína produzida em ambas as condições. Os resultados mostraram que a redução de temperatura não apresentou efeito significativo sobre o padrão de glicosilação do GM-CSF. Além disso, a proteína obtida em ambas as condições apresentou a mesma atividade biológica específica *in vitro*. Estes resultados mostraram, portanto, que o cultivo com redução de temperatura levou a um efeito positivo na produtividade celular específica sem afetar a qualidade do produto (FOGOLÍN *et al.*, 2005).

YOON *et al.* (2006) avaliaram a produtividade de linhagens de células CHO recombinantes produtoras de eritropoetina e de hormônio folículo estimulante, cultivadas a 32°C. Ambas as linhagens celulares apresentaram um aumento significativo na produtividade específica, porém a produtividade volumétrica não aumentou tanto quanto a específica, em função do menor crescimento celular obtido nesta condição. Com o objetivo de aumentar a concentração de células e, então, a produtividade volumétrica, as células foram adaptadas a 32°C através de várias bateladas em frascos do tipo *spinner*. A taxa de crescimento específica das células aumentou, mas a produtividade específica diminuiu. Os autores concluíram que

melhorar o cultivo de células em baixas temperaturas através da adaptação não é uma boa estratégia para aumentar a produção de proteínas recombinantes, visto que a produtividade específica diminuiu durante a adaptação (YOON *et al.*, 2006).

Uma alternativa seria o cultivo em duas fases, no qual as células são cultivadas inicialmente a 37°C para a obtenção de uma elevada concentração celular e, depois, passam a ser cultivadas em temperatura menor para aumentar a produtividade específica. Com isso, pode-se obter uma produtividade volumétrica maior (FOGOLÍN *et al.*, 2005; FOX *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

Esta foi a estratégia adotada por AHN *et al.* (2008), dando continuidade ao trabalho citado acima com células CHO produtoras de eritropoietina. As células foram cultivadas, inicialmente, a 37°C até que a concentração de células viáveis chegasse a 10^7 células/mL e, depois, a temperatura foi ajustada para 25 °C, 28°C, 30°C, 32°C e 37°C (controle). Os autores observaram que a produção acumulada e a produtividade específica de eritropoietina aumentaram em temperaturas mais baixas e foram maiores a 32°C e 30°C, respectivamente. Apesar de a produtividade específica ter sido igual ou maior nas temperaturas abaixo de 32°C, nesta temperatura a produção acumulada foi melhor. Isto mostra que os benefícios proporcionados pelas baixas temperaturas (menores que 32°C) sobre a produtividade específica foram sobrepostos pelos efeitos sobre o crescimento celular. Desta forma, combinando-se os dois efeitos, o cultivo conduzido a 32°C foi o mais satisfatório.

CHUPPA *et al.* (1996) avaliaram o cultivo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII e foi observado que, a 37°C, há maior crescimento, porém a produção de FVIII foi maximizada a 34°C. Com isso, os autores concluíram que, para cultivos em perfusão, deve-se manter a temperatura de 37°C durante o crescimento até chegar à concentração celular máxima e, depois, operar o biorreator a 34°C, durante a etapa de perfusão, visando à maximização da formação de produto. Uma vantagem para o cultivo em temperaturas menores observada pelos autores foi que a

taxa específica de respiração é menor, o que evita problemas associados a limitações na transferência de oxigênio.

Embora o uso de temperaturas reduzidas no cultivo de células de mamíferos venha sendo empregado há mais de 10 anos em diferentes estudos para o aumento da longevidade do cultivo, levando, em muitos casos, a um aumento da produtividade, não há, atualmente, um consenso sobre o que leva ao aumento da produtividade. Isto se deve, principalmente, ao fato de a variação da produtividade estar relacionada à linhagem celular e ao biofármaco. Desta forma, não é simples diferenciar e analisar experimentalmente os efeitos da temperatura de forma isolada nos processos de síntese de proteínas e no crescimento celular. Ou seja, a definição de quanto do aumento da produtividade se deve ao efeito direto da temperatura e quanto se deve a um efeito na taxa de crescimento celular é uma questão complexa (BECERRA *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares que governam a produção de proteínas recombinantes em temperaturas mais baixas são ainda desconhecidos. Diferentes hipóteses tentam explicar o aumento da taxa específica de produção de biofármacos em baixas temperaturas de cultivo, tais como diminuição da taxa de crescimento/ciclo celular, reorganização do citoesqueleto, aumento da síntese do mRNA da proteína recombinante, aumento da meia vida do mRNA, diminuição da síntese de proteínas de forma generalizada, sem comprometer a produção da proteína recombinante, dentre outras (BECERRA *et al.*, 2012). Embora não haja um consenso entre os diferentes estudos, o que pode ser concluído é que o efeito da redução da temperatura na produtividade depende da proteína em questão e da linhagem celular empregada (BECERRA *et al.*, 2012).

2.4.2 - pH

A maioria das linhagens celulares tem o crescimento ótimo em pH 7,4, porém este valor de pH pode variar. Células modificadas geneticamente podem crescer melhor em pH na faixa de 7,0 a 7,4 (FRESHNEY, 2005).

Além disso, o pH ótimo para a expressão de proteínas pode ser diferente do pH que proporciona melhor crescimento celular. Assim, pode ser importante avaliar o cultivo em diferentes valores de pH e verificar se há ganho na produtividade em uma determinada condição.

O meio de cultivo deve ser tamponado para compensar a formação de CO₂ metabólico e a produção de ácido láctico proveniente do metabolismo da glicose. Existem diferentes tipos de controle do pH em cultivos celulares, tais como:

- meios de cultivo naturalmente tamponados para processos em frascos que admitem alguma variação do pH durante o cultivo;
- meios de cultivo tamponados com bicarbonato de sódio e gás carbônico em que o controle do pH se dá pelo equilíbrio $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$;
- adição controlada de CO₂ ao gás aspergido ao biorreator e adição controlada de soluções de álcalis e/ou ácidos ao biorreator. Em biorreatores, a adição de CO₂ ou soluções para o ajuste do pH é controlada a partir do sinal adquirido do eletrodo de pH imerso no meio de cultivo (TONSO, 2008).

2.4.3 - Oxigênio Dissolvido

O requerimento de oxigênio varia de acordo com o tipo de célula a ser cultivado. Para o cultivo de células de mamíferos, normalmente, é importante manter a concentração de oxigênio dissolvido na faixa de 30 a 60% da saturação do ar (COOPER *et al.*, 1958; BALIN *et al.*, 1976; LÉO *et al.*, 2008).

Em culturas com elevada densidade celular, o oxigênio pode ser um fator limitante devido à sua baixa solubilidade em solução aquosa. O suprimento de oxigênio deve ocorrer de forma suave para evitar danos celulares. A aeração pode ser realizada pelos seguintes métodos: aeração superficial, borbulhamento de gás, difusão por membranas, aumento da pressão de oxigênio na alimentação de gás e aumento da pressão no biorreator.

Níveis excessivos de oxigênio podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar a um baixo crescimento e morte celular. Estas espécies reativas são formadas quando a redução do oxigênio não é completa e causam danos severos aos constituintes celulares levando, geralmente, à oxidação e destruição das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (OSTHOFF *et al.*, 1997).

A oxidação de lipídeos da membrana celular parece afetar a fluidez desta estrutura (MEAD, 1976; McELHANEY, 1985). O aumento da fluidez da membrana provocado pelo ataque de EROs afeta os processos dependentes da integridade da membrana, como transporte de nutrientes, atividade da ATPase e prevenção ao desbalanceamento osmótico (LARSEN *et al.*, 1974; KASHKNET, 1985; FARR *et al.*, 1988; DILLS *et al.*, 1990).

A modificação das bases nitrogenadas é uma das lesões oxidativas mais perigosas, pois frequentemente está associada à ocorrência de mutações e perdas da integridade do DNA. Podem ser observadas também, durante a oxidação do DNA, a formação de sítios com perda de bases nitrogenadas, além de quebras da fita simples (HALLIWELL & ARUOMA, 1993).

Para o cultivo de células de mamíferos em reatores de larga escala, recomenda-se um rigoroso controle do nível de oxigênio dissolvido. No caso de cultivos em frascos agitados do tipo *spinner*, operados em batelada, o oxigênio dissolvido através da aeração superficial com agitação é, geralmente, suficiente para manter as células até os níveis usuais de concentração celular.

Em um estudo do cultivo de hibridomas submetidos a concentrações de oxigênio entre 0 e 100% da saturação do ar, foi observado que as células apresentaram viabilidade maior em concentrações menores de oxigênio. Além disso, foi observado que, em concentrações de oxigênio menores que 1%, há um aumento significativo das taxas específicas de consumo de glicose e de glutamina, com diminuição da taxa específica de respiração (OZTURK & PALSSON, 1990).

Em outro estudo, em que foram avaliadas diferentes linhagens celulares (CHO, BHK e hibridoma), foi verificado que, variando-se a concentração celular de 1 a $20 \cdot 10^6$ células/mL, a taxa específica de consumo de O_2 se mantém inalterada. No entanto, foi observado que a mesma diminui aproximadamente 10% para cada redução de $1^\circ C$ na temperatura de cultivo das células (JORJANI & OZTURK, 1999).

TONSO (2000) estudou a influência da concentração de oxigênio dissolvido sobre a produção de FVIII no cultivo de células BHK e observou que, na faixa de 1 a 50% de oxigênio dissolvido, concentrações maiores levaram a maiores valores de concentração de produto e de velocidade específica de produção. No entanto, o autor verificou que, em concentrações de oxigênio dissolvido maiores que 50%, há decréscimo da produção. Foi observado que níveis de oxigênio dissolvido abaixo de 1% levam à diminuição da viabilidade celular. Concluiu-se que a concentração crítica de oxigênio para o cultivo das células BHK empregadas é de 1-10% da saturação do ar, semelhante ao que se observa para a maioria dos microorganismos. Além disso, foi observado que o consumo de glicose aumenta quando há limitação de oxigênio.

2.5 - MEIOS DE CULTIVO

O meio de cultivo é um dos principais fatores que afetam o crescimento e manutenção das células em cultura, pois deve proporcionar pH e osmolaridade adequados, além de fornecer os nutrientes requeridos pelas células. Estes nutrientes

podem ser substâncias definidas adicionadas ao meio de cultivo, resultando em um meio quimicamente definido, ou podem ser oriundos da suplementação do meio com soro sanguíneo, obtendo-se um meio complexo e quimicamente indefinido (MORAES *et al.*, 2008).

Muitos meios de cultivo já foram propostos, sendo os mais utilizados para o cultivo de linhagens contínuas de células de mamíferos o meio mínimo essencial de Eagle - MEM (EAGLE, 1959), o meio de Eagle modificado por Dubelcco - DMEM (DUBELCCO & FREEMAN, 1959), o meio de Eagle modificado por Glasgow - GMEM, o meio RPMI 1640 (MOORE *et al.*, 1967), o meio CMRL 1066 (PARKER *et al.*, 1957) e o meio F12 de Ham (HAM, 1965), suplementados ou não com soro ou com proteínas (BUTLER, 2004; MORAES *et al.*, 2008). Esses meios de cultivo são comumente denominados “meios clássicos” para o cultivo de células de mamíferos.

Os meios de cultivo devem conter as substâncias necessárias para promover o crescimento celular, o metabolismo celular e as funções fisiológicas. Em geral, os meios devem possuir sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água, além de substâncias específicas para determinadas linhagens celulares (MORAES *et al.*, 2008).

2.5.1 – Soro Animal

As primeiras estratégias para o cultivo de células de mamíferos foram baseadas na utilização de fluidos biológicos (plasma, linfa e soro) e extratos de tecidos. Atualmente, muitas vezes, ainda adiciona-se soro ao meio de cultivo de células de mamíferos, que é normalmente obtido de bezerros e fetos bovinos. Além de soro bovino, utiliza-se também soro equino e soro humano com menor frequência (MORAES *et al.*, 2008).

Os soros animais fornecem aos meios de cultivo fatores de crescimento, hormônios, proteínas de adesão e de transporte. Embora seja reconhecida a importância da utilização de soros animais como suplementos de alguns meios de cultivo de células de mamíferos, os soros apresentam desvantagens como elevada concentração protéica, composição química desconhecida, variação entre os diferentes lotes produzidos, possibilidade de apresentar agentes patogênicos e alto custo. A elevada concentração protéica dificulta a purificação do produto de interesse, enquanto a variação de lote pra lote dificulta a obtenção de processos reprodutíveis de cultivo de células de mamíferos para produção de biofármacos (LUBINIECKI, 1998; LIU & CHANG, 2006).

Outro fator importante em relação à utilização de soro é o aspecto ético, pois muitos fetos bovinos são abatidos para a produção de soro (HERNÁNDEZ & FISCHER, 2007). Por isso, há grande interesse no desenvolvimento de processos de cultivo de células de mamíferos para produção de biofármacos que empreguem meios de cultivo quimicamente definidos e livres de soro (LUBINIECKI, 1998).

2.5.2 – Vitaminas

As vitaminas são utilizadas nos meios de cultivo em pequenas quantidades e atuam como co-fatores enzimáticos no metabolismo celular. Alguns meios possuem apenas as vitaminas do complexo B, sendo as outras vitaminas requeridas obtidas através da suplementação do meio com soro ou com extrato de levedura. O meio de cultivo MEM possui apenas vitaminas solúveis em água (as do complexo B, colina, ácido fólico, inositol e nicotinamida), mas não contém biotina. Contudo, a biotina está presente na maioria dos meios complexos, inclusive nas formulações livres de soro (FRESHNEY, 2005).

Em cultivos livres de soro, tanto vitaminas hidrossolúveis quanto lipossolúveis devem ser fornecidas, em especial, a biotina, o ácido fólico, a niacina, o ácido pantotênico, a tiamina, o ácido ascórbico e as vitaminas B₁₂, A, D, E e K. A vitamina A tem ação sobre o crescimento e diferenciação celular, enquanto a vitamina D regula o transporte de íons cálcio e atua como hormônio. A vitamina E é um agente antioxidante, enquanto a vitamina K é requerida na gama-carboxilação e no correto processamento das proteínas. O ácido ascórbico é importante para a síntese de colágeno, além de ter ação antioxidante (MORAES *et al.*, 2008). A limitação de vitaminas, como ocorre, por exemplo, pela precipitação de ácido fólico em soluções estoque concentradas, geralmente leva a um menor crescimento celular (FRESHNEY, 2005).

2.5.3 – Sais

Os principais íons utilizados na composição de meios de cultivo são: Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺², Cl⁻, SO₄⁻², PO₄⁻³ e HCO₃⁻. Estes íons são os maiores responsáveis pela osmolaridade do meio de cultivo, além de atuarem como co-fatores enzimáticos.

Na⁺, K⁺, Ca⁺² e Cl⁻ regulam o potencial da membrana, enquanto SO₄⁻², PO₄⁻³ e HCO₃⁻ são requeridos pela matriz celular como precursores de macromoléculas e reguladores de cargas intracelulares. O HCO₃⁻ também atua na ligação do ferro à transferrina e no tamponamento do meio de cultura. O Ca⁺² pode influenciar a proliferação, adesão ou diferenciação das células (FRESHNEY, 2005).

Cátions divalentes, especialmente o Ca⁺², são necessários para a maioria das células cultivadas aderidas (FRESHNEY, 2005). Em geral, as concentrações de Ca⁺² e Mg⁺² devem ser reduzidas nos cultivos de células em suspensão para prevenir a adesão e agregação celular. Células CHO são facilmente adaptadas ao cultivo em suspensão em meios com baixas concentrações de Ca⁺² e Mg⁺². O meio de cultivo

MEM, com baixa concentração de cálcio e elevada concentração de fosfato, foi o primeiro meio empregado para cultivo em suspensão (MORAES *et al.*, 2008).

Outros metais que podem ser adicionados aos meios de cultivo em baixas concentrações são ferro, manganês, selênio, vanádio, zinco, cobre e molibdênio, principalmente quando o meio não é suplementado com soro (MORAES *et al.*, 2008).

2.5.4 – Glicose

A glicose está presente na grande maioria dos meios de cultivo como uma fonte de carbono e de energia, geralmente em concentrações de 5 a 25 mM. A mesma é metabolizada, em geral, pela glicólise, para formar piruvato, que é convertido em lactato ou acetil coenzima A. Em alguns meios de cultivo a glicose é substituída por galactose ou frutose.

2.5.5 – Aminoácidos

Os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas, nucleotídeos e lipídeos, além de serem utilizados como fonte de energia para o crescimento de células animais (MORAES *et al.*, 2008). A concentração de aminoácidos presentes no meio de cultivo geralmente limita a concentração celular máxima obtida e pode influenciar a taxa de crescimento e a viabilidade celular. A glutamina, a metionina e a serina destacam-se como aminoácidos limitantes do crescimento celular (FRESHNEY, 2005).

2.5.6 - Outros Suplementos

Proteínas, peptídeos, nucleosídeos, intermediários do ciclo do ácido cítrico, piruvato e outros compostos podem estar presentes na composição de meios de cultivo. Estes constituintes podem ser necessários especialmente quando as quantidades de soro são reduzidas ou quando este não é utilizado como suplemento (FRESHNEY, 2005).

2.6 - METABOLISMO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

O profundo entendimento do metabolismo celular é necessário para melhorar o desempenho dos processos de cultivo de células de mamíferos para a produção industrial de biofármacos. Este conhecimento permite determinar quais são os principais substratos e metabólitos que devem ser monitorados e controlados no meio de cultivo para aumentar o crescimento e produtividade celular (CRUZ *et al.*, 1999a).

As linhagens celulares imortalizadas podem continuar em cultivo até que ocorra a depleção de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos tóxicos. Para a obtenção de energia, as células animais precisam de uma fonte de carboidrato (geralmente glicose) e o aminoácido glutamina. Devido à transformação, as células em cultura apresentam um metabolismo modificado em relação às células no organismo de origem. Assim, as taxas de consumo de glicose e glutamina são muito elevadas, excedendo as necessidades celulares (AMABLE & BUTLER, 2008).

Nos bioprocessos baseados no cultivo de células de animais, ações que proporcionem melhoramentos no metabolismo celular podem levar a um aumento no crescimento celular, viabilidade e produtividade, reduzindo os custos do processo (BERNAL *et al.*, 2009). Estas informações podem ser cruciais, por exemplo, para o

desenvolvimento de processos de batelada alimentada com estratégias de alimentação racional para aumentar a produção de biofármacos.

De acordo com CRUZ *et al.* (2000a), o acúmulo de amônio e lactato (principais produtos provenientes do metabolismo da glutamina e da glicose) leva à diminuição do crescimento celular, além de influenciar o metabolismo celular e a produtividade. Diferentes estratégias para controlar o metabolismo e reduzir a formação destes metabólitos foram estudadas, tais como manter baixas concentrações de glicose e glutamina para obter um metabolismo celular energeticamente mais eficiente (CRUZ *et al.*, 1999a) ou adaptar as células ao crescimento em meio com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, como galactose e glutamato (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

CRUZ *et al.* (1999a) estudaram os mecanismos que regulam o metabolismo e a formação de produto em células BHK na produção de anticorpos. Para isto, avaliaram cultivos com diferentes concentrações de glicose e glutamina no meio de cultivo.

O piruvato e o α -cetogluturato são moléculas importantes no direcionamento do fluxo metabólico intracelular. O piruvato participa de várias reações como intermediário no metabolismo de alguns aminoácidos, receptor de grupo amônio e, principalmente, como o composto de ligação entre a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). O piruvato formado pela glicólise é direcionado não somente ao TCA para gerar poder redutor, como também é o precursor da formação de alanina ou lactato pela ação da alanina aminotransferase (AlaAT) ou da lactato desidrogenase (LDH), respectivamente. Por outro lado, o α -cetogluturato tem um papel importante na conexão do metabolismo de aminoácidos com o TCA, estando também conectado ao piruvato através da alanina aminotransferase (BERNAL *et al.*, 2009).

2.6.1 – Glicose

A glicose está presente na grande maioria dos meios de cultivo e é metabolizada, em geral, pela glicólise, formando piruvato, que é convertido em lactato ou acetil CoA (Figuras 2 e 3). O acúmulo de lactato no meio mostra que o TCA não funciona adequadamente *in vitro*, como ocorre no organismo vivo. O lactato pode ser inibitório em concentrações a partir de 20 mM (FRESHNEY, 2005).

MILLER *et al.* (1989) realizaram vários experimentos em que foram avaliadas diferentes concentrações de glicose no meio de alimentação. Foi observado que, quando há um aumento da concentração de glicose de 0,1 para 8,4 mM, sua velocidade específica de consumo aumenta 67%. Quando se utilizam concentrações menores de glicose, esta é metabolizada de forma mais eficiente e proporciona menores quantidades de lactato (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Células CHO apresentaram velocidade específica de consumo de glicose em cultivo contínuo, sob condições limitantes, da ordem de $17,5 \cdot 10^{-6}$ nmol cel⁻¹ h⁻¹ e rendimento de glicose a lactato de 0,2 mol mol⁻¹ (ALTAMIRANO *et al.*, 2001). Experimentos com cultivo em batelada, em que as células foram expostas a concentrações iniciais de glicose elevadas, mostraram velocidade específica de consumo de glicose de $300 \cdot 10^{-6}$ nmol cel⁻¹ h⁻¹ e rendimento de glicose a lactato de 1,95 mol mol⁻¹ (ALTAMIRANO *et al.*, 2000). Estes resultados mostram que o metabolismo é mais eficiente em condições de limitação de glicose, com menor formação de lactato.

O mesmo comportamento é observado em células BHK. Cultivos de células BHK com diferentes concentrações iniciais de glicose mostraram que, em concentração maior, a velocidade específica de consumo de glicose foi maior do que nos cultivos com concentração inicial menor de glicose. Nestes experimentos, observou-se que, quando há maior quantidade inicial de glicose, a glicose consumida é convertida a piruvato, que, por sua vez, é convertido a lactato e não é metabolizado pelo TCA. No entanto, quando a concentração inicial de glicose é menor, uma fração

maior da glicose é convertida a piruvato e menos piruvato é convertido a lactato, sendo uma parte maior do piruvato direcionada ao TCA (CRUZ *et al.*, 1999a; ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

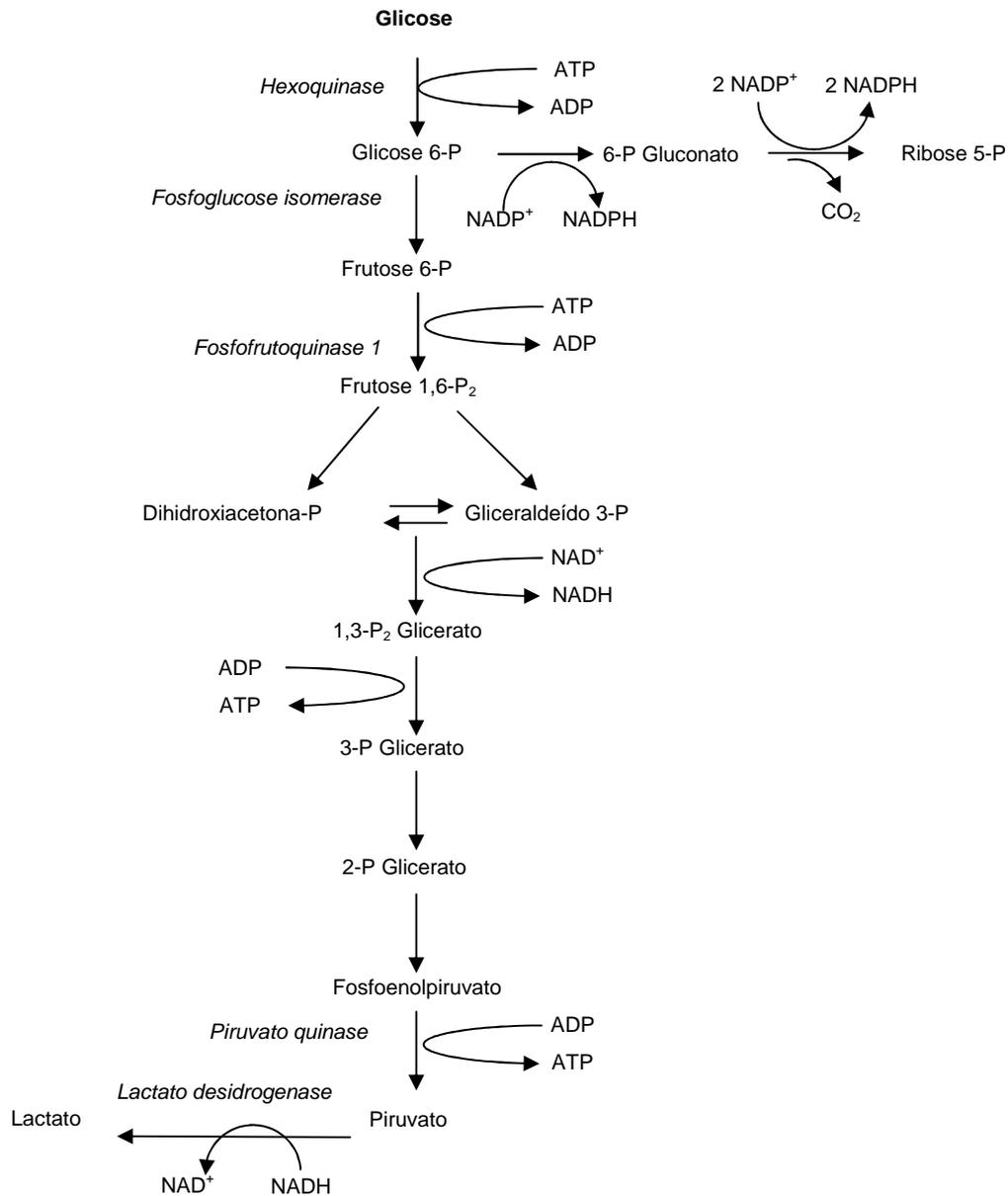


Figura 2: Esquema da via glicolítica e do ciclo das pentoses fosfato. ADP - adenosina difosfato; ATP - adenosina trifosfato; NAD⁺ - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida); NADP - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH - nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida); P - fosfato. Adaptado de ALTAMIRANO *et al.*

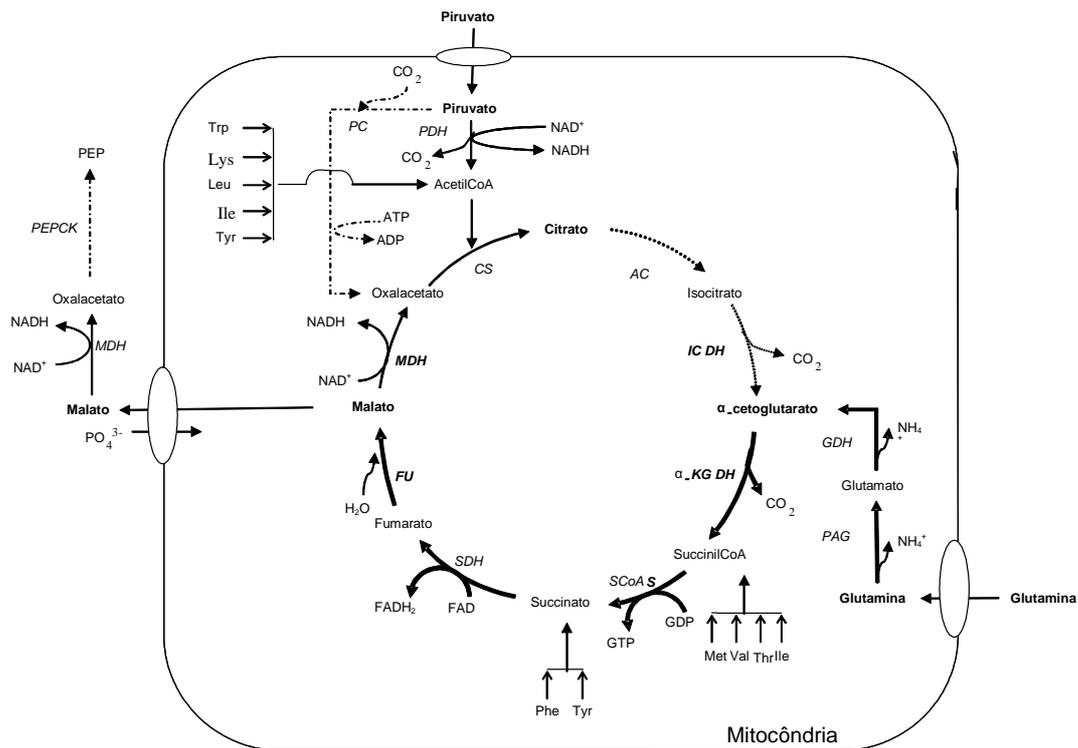


Figura 3: Esquema do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e principais reações a ele associadas. (—) via ativa, (.....) via com baixa atividade, (- - -) via inativa. AC - aconitase; AcCoA - acetil coenzima A; ADP - adenosina difosfato; α -KG DH - α -cetoglutarato desidrogenase; ATP - adenosina trifosfato; FAD - flavina adenina dinucleotídeo (oxidada); FADH - flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); FU - fumarato desidrogenase; GDH - glutamato desidrogenase; GDP - guanidina difosfato; GTP - guanidina trifosfato; ICDH - isocitrato desidrogenase; MDH - malato desidrogenase; NAD - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida); PAG - glutaminase ativada por fosfato; PC - piruvato carboxilase; PDH - piruvato desidrogenase; PEP - fosfoenolpiruvato; PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase; SDH - succinato desidrogenase; SCoA - succinil coenzima A; SCoAS - succinil coenzima A sintetase. Adaptado de ALTAMIRANO *et al.* (2008).

O baixo fluxo de piruvato ao TCA pode ser explicado pelo decréscimo da atividade de algumas enzimas (piruvato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, piruvato carboxilase e enzima málica II) que leva à conversão do piruvato acumulado a lactato pelo aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase, que representa uma via alternativa de geração de energia em processos celulares (AMABLE & BUTLER, 2008).

De acordo com ALTAMIRANO *et al.* (2008), o metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro* encontra-se altamente desregulado e, na presença de concentrações de glicose não limitantes, as células consomem glicose a uma velocidade muito maior que a requerida para manter o crescimento celular. Em concentração mínima não limitante, entre 0,5 e 1,0 mM, a velocidade específica de consumo de glicose aumenta proporcionalmente com o incremento de sua concentração no meio até alcançar uma taxa de consumo específico máximo de saturação. O aumento no valor deste consumo específico é acompanhado por um aumento no rendimento de glicose em lactato, cujo valor pode variar de cerca de 1 até 2 mol mol⁻¹ ou acima, devido à produção de lactato derivado da glutamina, considerando-se que uma das rotas de metabolização da glutamina leva à formação de piruvato e este pode ser convertido a lactato pela ação da lactato desidrogenase (AMABLE & BUTLER, 2008).

A produção de lactato leva a alterações no pH do meio de cultivo, afetando o crescimento celular devido ao aumento na osmolaridade do meio e aos efeitos sobre o metabolismo. A produção de lactato também afeta a formação de produto (OZTURK *et al.*, 1992). GLACKEN (1988) observou efeitos negativos sobre a produtividade celular para concentrações de lactato acima de 20 mM. Sendo assim, os processos de cultivo celular devem ter o pH controlado afim de evitar o efeito negativo da acidificação do meio proveniente da produção de lactato (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Nos sistemas de cultivo com pH controlado, somente se observa os efeitos do lactato no crescimento celular em concentrações muito elevadas (a partir de 40 mM). No entanto, nos sistemas sem controle de pH, o lactato se acumula, modificando o pH, o que causa efeitos mais prejudiciais ao cultivo (OZTURK *et al.*, 1992; ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

2.6.2 – Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades básicas das proteínas. Todas as proteínas são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos com apenas algumas exceções. Cada aminoácido é constituído de um átomo central de carbono ligado a um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral diferenciada. Dentre estes aminoácidos, existem 20 tipos de cadeias laterais que variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio, caráter hidrófobo e reatividade química (BERG *et al.*, 2008).

No cultivo de células, os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas, nucleotídeos e lipídeos, além de serem utilizados como fonte de energia para o crescimento das células de mamíferos (MORAES *et al.*, 2008). Assim, os aminoácidos podem ter diferentes destinos metabólicos, sendo precursores para a produção de proteínas ou fontes de carbono e nitrogênio (BERNAL *et al.*, 2009).

As células de mamíferos, diferentemente das células procariontas, não são capazes de sintetizar as cadeias de carbono ramificadas ou as estruturas na forma de anel presentes em alguns aminoácidos. Estes aminoácidos são ditos essenciais, enquanto os outros são não essenciais. Os aminoácidos classificados como essenciais são fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina. Os aminoácidos não essenciais são alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glicina, glutamato, glutamina, prolina, serina e tirosina (BERG *et al.*, 2008). No entanto, esta classificação pode variar em função da disponibilidade de aminoácidos em cada cultivo celular

As vias de síntese dos aminoácidos não essenciais são consideradas simples. Na síntese da maioria dos aminoácidos, ocorre uma reação de transaminação. A glutamato desidrogenase catalisa a aminação redutora do α -cetoglutarato a glutamato. Alanina e aspartato são sintetizados por transaminação de piruvato e oxaloacetato, respectivamente. A glutamina é sintetizada a partir de glutamato e NH_4^+ , sendo a

asparagina sintetizada de forma semelhante. Prolina e arginina são derivadas do glutamato. A serina é formada a partir do 3-fosfoglicerato e é precursora de glicina e cisteína. A tirosina é sintetizada por hidroxilação da fenilalamina. As vias de biossíntese de aminoácidos essenciais são mais complexas (BERG *et al.*, 2008).

As células de mamíferos, quando cultivadas *in vitro*, apresentam diferentes perfis de consumo de aminoácidos, que variam para cada linhagem celular em particular (GEAUGEY *et al.*, 1989; SANFELIU *et al.*, 1996). Os requerimentos de aminoácidos pelas células são maiores do que apenas o necessário para a síntese de proteínas celulares. Uma fração dos aminoácidos disponíveis é utilizada como fonte de energia metabólica e, para isso, a amina é removida, gerando amônio, e o esqueleto carbonado é transformado em acetil CoA, acetoacetil CoA, piruvato ou um dos intermediários do TCA (BERG *et al.*, 2008). Assim, destacam-se alguns aminoácidos como glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina e metionina que são usados para produção de energia (DREWS *et al.*, 1995; FERRANCE *et al.*, 1997).

Através da transformação em piruvato, os aminoácidos com 3 carbonos (alanina, serina e cisteína) são direcionados ao TCA (Figura 4). A transaminação da alanina produz diretamente piruvato (alanina + α -cetogluturato \rightarrow piruvato + glutamato). Outra reação simples é a desaminação da serina a piruvato pela serina desidratase (serina \rightarrow piruvato + NH_4^+). Já a cisteína pode ser transformada em piruvato por várias vias. A glicina, a treonina e o triptofano também podem ser convertidos a piruvato. A glicina pode ser transformada em serina pela adição enzimática de uma hidroximetila ou pode ser clivada gerando CO_2 , NH_4^+ e uma unidade monocarbonada. A treonina pode gerar o intermediário 2-amino-3-cetobutirato e, então, ir a piruvato. Quanto ao triptofano, 3 de seus carbonos podem gerar alanina, que pode ser transformada em piruvato (BERG *et al.*, 2008).

O aspartato e a asparagina podem entrar no TCA através de sua transformação a oxaloacetato. O aspartato é diretamente transaminado a oxaloacetato (aspartato + α -cetogluturato \rightarrow oxaloacetato + glutamato). A asparagina é hidrolisada

pela asparaginase a NH_4^+ e aspartato, que é, então, transaminado a oxaloacetato. O aspartato também pode ser transformado em fumarato e entrar no TCA por esta via.

Aminoácidos como glutamina, prolina, arginina e histidina podem ser transformados a glutamato, que a seguir sofre desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase, originando α -cetogluturato. A glutamina é hidrolisada pela glutaminase, gerando glutamato e NH_4^+ . A prolina e a arginina são convertidas a semi-aldeído glutâmico que é, então, oxidado a glutamato. A histidina gera o intermediário 4-imidazolona-5-propionato, que é hidrolisado ao derivado N-formimino do glutamato e, depois, convertido a glutamato (BERG *et al*, 2008).

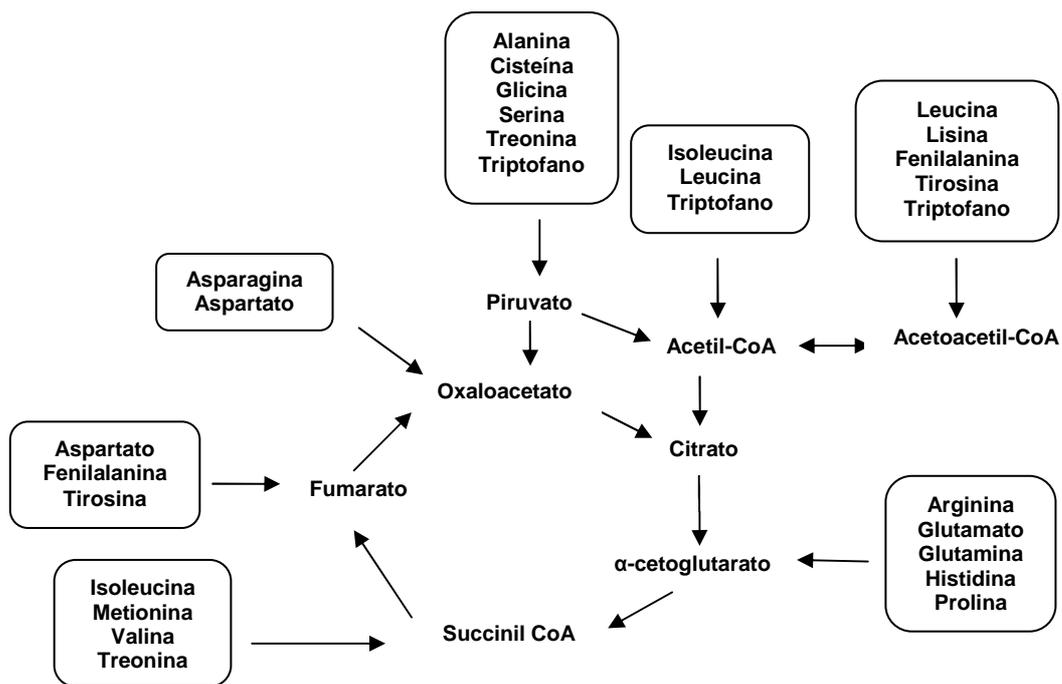


Figura 4: Destino dos esqueletos carbonados dos aminoácidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Adaptado de COX & NELSON, (2006).

A metionina, a isoleucina e a valina entram no TCA através da conversão a succinil CoA e são degradadas através do intermediário metilmalonil CoA. Os aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) podem originar acetil CoA, acetoacetato ou propionil CoA. Seus α -cetoácidos derivados sofrem descaboxilação oxidativa. Os anéis dos aminoácidos aromáticos são degradados por oxigenases e originam acetoacetato, fumarato e piruvato. Quatro dos carbonos da fenilalanina e da tirosina são convertidos a fumarato e quatro emergem em acetoacetato. O triptofano gera uma alanina e acetoacetil CoA (BERG *et al.*, 2008).

No cultivo de células de mamíferos, alguns aminoácidos são consumidos muito rapidamente, como é o caso de valina, isoleucina, leucina, lisina e cisteína. A cisteína tem papel importante na conformação das proteínas e em sua atividade biológica, unindo as cadeias peptídicas através de pontes dissulfeto. Outros aminoácidos são consumidos em proporções menores: treonina, arginina, fenilalanina, serina, histidina, metionina e glicina (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Há outros aminoácidos que podem ser produzidos ou secretados pelas células: alanina, prolina, aspartato, asparagina e glutamato. A alanina é produzida em grandes quantidades. Esta alta produção de alanina no cultivo se relaciona com um alto metabolismo da glutamina, visto que até 40% da glutamina consumida pode ser dirigida para a formação de alanina como produto final (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

A prolina é sintetizada diretamente em decorrência do acúmulo intracelular do glutamato, enquanto que a asparagina é formada pela amidação do aspartato pela via da asparagina sintetase. Geralmente, o aumento da concentração de glutamato no meio de cultivo ocorre quando o crescimento celular pára e, como consequência, o acúmulo intracelular de glutamato não pode ser processado mediante outras reações metabólicas (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

2.6.3 – Glutamina

A glutamina é a principal fonte de energia, carbono e nitrogênio para células de mamíferos (AMABLE & BUTLER, 2008). Todas as células de mamíferos utilizam, além da glicose, L-glutamina como fonte de energia proveniente do carbono. A glutamina é também a principal fonte de geração de amônio, que pode chegar a níveis de concentração inibitórios no meio de cultivo para o crescimento celular. Em geral, o amônio alcança níveis deletérios entre aproximadamente 2 a 4 mM. Além de seu importante papel como fonte de energia, a glutamina é requerida como fonte de nitrogênio na síntese de pirimidinas, purinas, açúcares aminados, NAD e asparagina (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

A glutamina pode sofrer degradação espontânea a ácido pirrolidina carboxílico e amônio. A taxa de degradação aumenta com a temperatura. A 37°C, aproximadamente 20% da glutamina é convertida depois de 2 dias, enquanto que, a 4°C, menos de 20% é degradada, mesmo depois de 65 dias.

O TCA, dentre outras funções no metabolismo central, fornece diversos precursores empregados em rotas anabólicas e provê a maior parte da energia metabólica. O piruvato é a ligação entre o TCA e a glicólise, sendo transportado do citosol até a mitocôndria para ser, então, transformado em acetil coenzima A por ação da piruvato desidrogenase (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

A glutamina é o principal precursor do α -cetoglutarato que alimenta o TCA a nível interno. O metabolismo da glutamina, de forma análoga à glicólise, é denominado glutaminólise. A glutamina é desaminada duas vezes (gera duas moléculas de amônio livres a partir de uma molécula de glutamina). Inicialmente, a glutamina gera o glutamato, via glutaminase, e, em seguida, o α -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase. A glutamina fornece os intermediários necessários para manter o TCA, o que mostra o quanto este composto é importante como fonte de carbono e energia (REITZER *et al.*, 1979; ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Quando a glutamina está em alta concentração no meio de cultivo, há um uso ineficiente desta e um acúmulo de amônio. Experimentos realizados com uma linhagem de hibridoma mostraram um aumento da velocidade específica de consumo de glutamina quando a concentração de glutamina empregada foi maior na alimentação de um cultivo contínuo (MILLER *et al.*, 1989). Resultados similares foram obtidos para células BHK (CRUZ *et al.*, 1999b).

Quando os níveis de glicose são limitantes e a glutamina se encontra em excesso, o metabolismo celular é capaz de adaptar-se a esta situação de escassez energética e biossintética, através do aumento da velocidade de consumo de glutamina. Com isso, há aumento da produção de amônio e do consumo de oxigênio (MARTINELLE *et al.*, 1998). Da mesma forma, em condições de limitação de glutamina, há aumento do consumo de glicose (MILLER *et al.*, 1989). No entanto, estes comportamentos variam para diferentes linhagens celulares (VRIEZEN *et al.*, 1997).

Em relação aos consumos integrados de glicose e glutamina, pode-se afirmar que o metabolismo celular apresenta certa flexibilidade, o que permite que haja uma adaptação de acordo com as condições de cultivo encontradas. Estas observações refletem o que ocorre, em especial, nos cultivos em batelada e em batelada alimentada, pois as células são submetidas a variações nas concentrações de glicose e glutamina e nas velocidades de consumo destes substratos (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Em geral, observam-se efeitos inibitórios do amônio no metabolismo celular em concentrações a partir de 2 a 4 mM (YANG & BUTLER, 2000). Algumas células são capazes de se adaptar ao cultivo com concentrações elevadas de amônio. Estas células aumentam a porcentagem de glutamina metabolizada pela via da alanina aminotransferase, o que leva à maior formação de alanina, diminuindo a geração de amônio livre (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

Foram reportados diferentes efeitos das concentrações de amônio sobre a produtividade celular. Em alguns estudos houve diminuição da produtividade específica em altos níveis de amônio, enquanto em outros a velocidade específica de produção diminuiu ou não foi afetada. O efeito dos níveis de amônio sobre a produtividade parece ser dependente da linhagem celular empregada (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

3- OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi determinar condições de cultivo de células BHK adequadas para a obtenção de um processo de alta produtividade de FVIII humano recombinante.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

Identificar e caracterizar o cenário envolvido (países, empresas, inventores, tecnologia) na produção de FVIII;

Selecionar um meio livre de soro animal para o cultivo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII visando à obtenção do produto com qualidade e menor custo;

Determinar a melhor temperatura para a produção de FVIII a partir do cultivo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII;

Avaliar o metabolismo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII com base no consumo e produção de aminoácidos e outras substâncias.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - LINHAGEM CELULAR

Foi utilizada uma linhagem recombinante de células BHK (*Baby hamster kidney cells* – células de rim de hamster neonato) (ATCC CRL-8544) produtora de FVIII, derivada da linhagem BHK-21(C-13), ATCC CCL 10. A linhagem foi fornecida pela ATCC (*American Type Culture Collection*).

Para a construção desta linhagem celular, as células BHK-21 foram co-transfectadas com vetores de expressão (pAML3P.8c1 e pSVEneoBa16) contendo uma sequência de DNA codificadora de FVIII, uma segunda sequência de DNA codificadora de um marcador amplificável (proteína DHFR (dihidrofolato redutase) que se liga ao metotrexato) e uma terceira sequência de um marcador seletivo (neomicina fosfotransferase). As células transfectadas foram cultivadas inicialmente em meio não seletivo. Em seguida, as células foram selecionadas em meio contendo G418 (geneticina) e, posteriormente, foram cultivadas em meio contendo metotrexato (inibidor de DHFR) e deficiente de hipoxantina, glicina e timidina. O vetor de expressão contém um gene de DHFR com um promotor SV40 (derivado de Simian Virus 40) que confere a habilidade de amplificação gênica (CAPON *et al.*, 1990).

4.2 - MEIOS DE CULTIVO

Durante os experimentos foram utilizados diferentes meios de cultivo:

4.2.1 - Mistura DMEM/Ham's F12

Foi utilizada a mistura dos meios de cultivo comerciais DMEM (Cultilab) e Ham's F12 (Cultilab) na proporção de 1:1 (Tabela 1). A mistura foi preparada utilizando-se

água ultrapura (Milli-Q Synthesis, Millipore) para dissolução dos meios que foram fornecidos em pó, com adição de glicose (Sigma) e bicarbonato de sódio (Sigma) na concentração final de 4,50 e 2,44 g/L, respectivamente. O pH foi corrigido para 7,2, utilizando-se HCl 3M.

Após o preparo, o meio foi esterilizado por filtração, com pressão positiva, utilizando-se membrana com tamanho de poro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar dentro de área limpa de classificação ISO 8. O meio foi incubado em estufa a 37°C durante 24h para avaliação da esterilidade e, em seguida, foi armazenado em geladeira a 4°C por um prazo máximo de 1 mês.

Tabela 1: Composição do meio basal DMEM/Ham's F12 (1:1). Fonte: CASTILHO *et al.*, (2006).

Componentes	Concentração (mg/L)	Componentes	Concentração (mg/L)
CaCl ₂ H ₂ O	154,55	biotina	0,0365
CuSO ₄ H ₂ O	0,0025	pantetonato de cálcio	2,24
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,834	cloreto de colina	15,96
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,1	ácido fólico	15,96
KCl	342,5	inositol	21,6
KH ₂ PO ₄	83	nicotinamida	2
MgCl 6H ₂ O	123	niacinamida	0,0185
MgSO ₄ 7H ₂ O	200	piridoxal HCl	2
NaCl	6999,5	piridoxina HCl	0,31
Na ₂ HPO ₄	124,5	riboflavina	0,39
NaHCO ₃	2438	tiamina HCl	0,37
valina	52,85	vitamina B12	0,68
alanina	4,5	glicose	1400
arginina HCl	147,5	piruvato de sódio	110
asparagina H ₂ O	15,01	vermelho de fenol	8,15
ácido aspártico	13	hipoxantina	2
cisteína	48,7	ácido tióico	0,1
glutamina	365	ácido lipóico	0,042
ácido glutâmico	7,35	putrescina HCl	0,161
glicina	18,79	timidina	0,73
histidina HCl	32,5	ácido linoleico	0,042
isoleucina	54,47	leucina	59
lisina	91,25	metionina	17,24
fenilalanina	34,5	prolina	34,5
serina	26,25	treonina	53,45
triptofano	9,02	tirosina	55,89

4.2.2 - Mistura DMEM/Ham's F12 suplementada com soro fetal bovino (SFB)

À mistura dos meios de cultivo comerciais DMEM (Cultilab) e Ham's F12 (Cultilab) na proporção de 1:1, preparada conforme o item anterior, foi adicionado SFB (Cultilab) na concentração de 0,5% a 10% (v/v) nas diferentes etapas de adaptação ao cultivo sem soro. Nos ensaios visando à comparação de meios de cultivo, a concentração de SFB foi fixada em 1% (v/v).

4.2.3 - GMEM – S

O meio GMEM-S (*Glasgow's Modified Eagle's Medium*), fornecido em pó pela empresa *SAFC Biosciences*, foi diluído em água ultrapura (Milli-Q Synthesis, Millipore) e adicionado de glutamina e bicarbonato de sódio, de modo que as concentrações destes componentes fossem de 0,365 g/L e de 2,45 g/L, respectivamente.

4.2.4 - BD Animal Component Free

O meio *BD Animal Component Free* (BD ACF) foi fornecido pela empresa *BD Biosciences* na forma líquida e estéril, pronto para uso. Este meio é livre de componentes de origem animal, porém é suplementado com 0,3% (m/v) de peptona de soja (*soytone*), não sendo, portanto, considerado quimicamente definido.

4.2.5 - *BD Cell Quantum Yield*

O meio *BD Cell Quantum Yield* (BD CQY) foi fornecido pela empresa *BD Biosciences* na forma líquida e estéril, pronto para uso. Este é um meio quimicamente definido, livre de proteínas e de quaisquer componentes de origem animal, cuja composição não é informada pelo fabricante.

4.3 – DESCONGELAMENTO

Para o descongelamento e revitalização de células criopreservadas em tanque de nitrogênio líquido (-196°C), criotubos contendo as células criopreservadas foram retirados do tanque e submergidos em um banho termostático pré-aquecido a 37°C até que não houvesse cristais de gelo visíveis. O conteúdo foi então ressuspensionado em 20mL de meio de cultivo (DMEM/F12 livre de SFB) pré-equilibrado à temperatura de 37°C e, em seguida, centrifugado a 200g durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas e centrifugadas novamente. Após a segunda centrifugação, o meio foi descartado e as células sedimentadas no fundo do tubo foram ressuspensionadas em 10mL de meio de cultivo a 37°C e colocadas em frascos agitados do tipo *spinner* de 125mL (Techne, EUA), contendo 40mL de meio pré-aquecido a 37°C. Os *spinners* foram mantidos sob velocidade de rotação de 40rpm, em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% (v/v) de CO₂. As células foram condicionadas em cultivo por 2 semanas antes dos experimentos.

4.4 – CRIOPRESERVAÇÃO

Para a criopreservação das células, células mantidas em cultivo foram centrifugadas a 200g por 3 minutos e ressuspensas de forma suave em meio de congelamento, previamente refrigerado a 4°C, na concentração de $2-4 \times 10^7$ cel mL⁻¹. Imediatamente após a ressuspensão, as células foram distribuídas em criotubos com capacidade de 1,8 mL (Corning ou TPP). Os criotubos foram mantidos em *ultrafreezer* (-80°C) por 24 horas em recipiente contendo isopropanol, para se obter um resfriamento lento. Os mesmos foram estocados nestas condições por um período máximo de 1 semana, sendo em seguida transferidos para estocagem em nitrogênio líquido (-196°C).

O meio de congelamento foi preparado a partir de uma mistura de 40% (v/v) de meio de cultivo fresco, 40% (v/v) de meio de cultivo condicionado (do próprio cultivo), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, D4540) e 10% (v/v) de uma solução de metilcelulose (Sigma, M7027) 1% (m/v), preparada em água ultrapura (Milli-Q Synthesis, Millipore). O DMSO e a solução de metilcelulose foram adicionados ao volume final de meio de cultivo novo e, em seguida, filtrados utilizando-se filtros de seringa (Millipore) com tamanho de poro de 0,22µm. O meio condicionado foi centrifugado e adicionado somente no momento do congelamento.

4.5 - AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE MEIOS DE CULTIVO

Foram estudados três meios comerciais isentos de soro animal (GMEM-S, *BD Animal Component Free* e *BD Cell Quantum Yield*, da empresa Biosciences), assim como a mistura dos meios de cultivo comerciais DMEM (Cultilab) e Ham's F12 (Cultilab) na proporção de 1:1. Para fins de comparação, foi avaliada também a mistura DMEM/Ham's F12 suplementada com 1% (v/v) de SFB.

Em outra etapa do trabalho, o meio *BD Animal Component Free* foi avaliado suplementado com alguns aminoácidos para comparação com o mesmo meio sem suplementação.

4.6 – ENSAIOS DE CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Os ensaios foram realizados por 168h em duplicata em frascos agitados do tipo *spinner* de 125mL, com 60mL de meio de cultivo, a 40rpm sob atmosfera de 5% de CO₂, a 33°C, 35°C ou 37°C. Amostras foram retiradas diariamente para determinação da concentração e viabilidade celular, da concentração dos substratos glicose e glutamina, dos outros aminoácidos, dos metabólitos tóxicos lactato e amônio e do produto FVIII.

4.7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

4.7.1 - Contagem de Células Totais

A quantificação de células totais nos cultivos foi realizada em câmara de *Neubauer* através do método de contagem de núcleos corados com cristal violeta. Para este método, foi retirada amostra de 500µL dos cultivos em suspensão, centrifugada a 200g por 3 minutos, ressuspensa em 500µL de solução de cristal violeta e agitada em agitador de tubos (*vortex*).

A solução de cristal violeta provoca um choque osmótico, desintegrando a membrana plasmática e corando apenas os núcleos celulares de violeta (CASTILHO, 2001), os quais foram contados com auxílio de microscópio óptico (Nikon, TS-100F).

A solução de cristal violeta, preparada com água destilada, é constituída da mistura de cristal violeta (Sigma) 0,05% (m/v), ácido cítrico (Sigma) 2,1% (m/v) e Triton X-100 (Vetec, Brasil) 0,1% (v/v). Após a dissolução dos componentes, sob agitação magnética, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m para a remoção de possíveis precipitados (PINTO, 2007).

4.7.2 - Contagem de Células Não-Viáveis

A quantificação de células não viáveis foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão do corante azul de trypan.

Para este método, foi utilizada amostra de 160 μ L dos cultivos em suspensão, à qual foram adicionados 40 μ L de solução de azul de trypan. Em seguida, a suspensão resultante foi visualizada em microscópio óptico (Nikon, TS-100F).

Células não-viáveis têm a permeabilidade seletiva da membrana plasmática comprometida e tornam-se permeáveis ao corante azul, que se incorpora à região intracelular. Desta forma, as células não-viáveis adquirem coloração azul, sendo facilmente identificadas ao microscópio, enquanto as células viáveis mantêm um aspecto claro e brilhante (PINTO, 2007). Devido à possível formação de grumos contendo grande quantidade de células viáveis que não seriam visualizadas na câmara de *Neubauer*, apenas as células não viáveis são quantificadas desta forma, assumindo-se que as mesmas se desprendem dos grumos (CASTILHO, 2001).

A solução corante é constituída da mistura de azul de trypan (Sigma) 0,5% (m/v) em solução salina 0,9% (m/v) tamponada com tampão fosfato 0,1M (PBS), pH 7,1 – 7,3. Após a dissolução dos componentes, sob agitação magnética, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 μ m para a remoção de possíveis precipitados (PINTO, 2007).

4.7.3 - Determinação de Células Viáveis e Viabilidade Celular

A determinação da concentração de células viáveis é dada pela diferença entre a concentração de células totais e a concentração de células não viáveis, e a viabilidade celular pela razão entre a concentração de células viáveis e a concentração de células totais.

4.8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, LACTATO E GLUTAMINA

As análises das concentrações de glicose, lactato e glutamina foram realizadas utilizando-se o analisador bioquímico YSI-2700 (*Yellow Springs Instruments*, EUA), com as respectivas membranas de detecção enzimática.

Neste método, as enzimas estão imobilizadas em membranas separadas, colocadas sobre eletrodos. A glicose, a glutamina e/ou o lactato da amostra se difundem através da membrana específica e reagem com as enzimas glicose oxidase, lactato oxidase e ácido glutâmico oxidase, respectivamente, produzindo peróxido de hidrogênio. Para a dosagem de glutamina, o glutamato também é analisado através do emprego de uma membrana que possui a enzima glutamato oxidase imobilizada. O peróxido de hidrogênio é reduzido eletroquimicamente no anodo de prata do eletrodo produzindo um sinal elétrico, o qual é proporcional à concentração de cada substrato.

Para esta quantificação e demais análises até o item 4.12, foi utilizado o sobrenadante resultante da centrifugação para contagem de células totais.

4.9 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO

A concentração de amônio foi avaliada através de um método colorimétrico baseado na reação de amônio com fenol na presença de hipoclorito de sódio (FAWCETT & SCOTT, 1960).

Para esta análise foram utilizadas microplacas não adsorvidas. Em cada poço da microplaca foram adicionados 125µL de solução de fenolnitroprussiato (*phenol nitroprusside solution* - Sigma Nr. 640-1), 125µL de solução alcalina de hipoclorito (Sigma Nr. 640-3) e 5µL de amostra. Após a adição de todas as soluções, as microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 min e, então, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 570 nm.

Para a curva padrão, foram utilizadas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ preparadas com água ultrapura (Milli-Q Synthesis, Millipore), cujas concentrações variaram de 0-5,0mM. Para a análise dos meios que contêm vermelho de fenol, as soluções da curva padrão foram preparadas com 8,1mg/L deste reagente.

4.10 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

As análises das concentrações de aminoácidos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nestas análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (modelo Proeminence). Foram empregadas duas fases móveis (A e B). A fase móvel A é constituída de 98% de acetato de sódio (Sigma) 0,085M (pH 5,2) e 2% de acetonitrila (Merck). A fase móvel B é constituída de 70% acetonitrila e 30% de acetato de sódio 0,085M (pH 5,2). Utilizou-se coluna de fase reversa C18 250 x 4mm - 5µm (Restek), detecção a 254nm e temperatura da coluna de 46°C.

Os padrões individuais de cada aminoácido (Sigma) foram pesados e dissolvidos em HCl 0,1N, de modo a ficarem na concentração de 1mM. 100µL de cada solução individual de aminoácidos foram adicionados para compor a mistura padrão de aminoácidos. 100µL dos padrões individuais, amostras, mistura padrão e HCl 0,1N (ensaio em branco) foram aliqüotados e secos em concentrador centrífugo Eppendorf (*Concentrator Plus 2231*). Após estarem secos, foram adicionados 20µL de solução secante (metanol (Merck), água ultrapura e trietilamina (Sigma), na proporção 2:1:1). Uma nova secagem foi realizada e, então, adicionaram-se 20µL de solução derivatizante (metanol, água, trietilamina e fenilisotiocianato (Sigma), na proporção 7:1:1:1). Após um tempo de reação de 20 min, uma nova secagem foi realizada em concentrador centrífugo. Após a secagem, o material seco restante foi ressuspensão em 1mL de fase móvel A e 40µL desta solução foram injetados no cromatógrafo.

4.11 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FVIII

A determinação da concentração de FVIII foi realizada de forma semi-quantitativa através do ensaio *immunoblot*. O método consiste em reter as proteínas presentes nas amostras em um suporte sólido (membrana de nitrocelulose), passando-se as mesmas por um aparelho que restringe a área de retenção a poços (*slots*). Após o bloqueio da membrana, adicionou-se um anticorpo primário (imunoglobulina de ovelha anti-FVIII humano – *Biodesign International*, K95005S, Lote: 6G20508), que reconhece apenas a proteína de interesse, e, em seguida, um anticorpo secundário (imunoglobulina anti-anticorpos de ovelha produzida em camundongo - Sigma, A5187, Lote: 066K6007) conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina) que catalisa uma reação colorimétrica para revelação da amostra.

A intensidade da cor das bandas foi quantificada a partir da imagem obtida através de digitalização (*scanning*) da membrana, sendo analisada através do

programa computacional *ImageQuant* versão 5.2 1999 (*Molecular Dynamics*), obtendo-se os valores de densitometria das bandas.

Para cada grupo de amostras analisadas nos diferentes poços em duplicata, foram adicionadas, também em duplicata, amostras de concentração conhecida (62,5, 12,5, 2,5, 0,5, 0,1 e 0 ng/mL) de FVIII comercial usado como padrão (*Octapharma*, Octavi SDO Optimum, Lote: 6b0731631). A partir da densitometria das amostras de concentração conhecida, foi gerada uma curva padrão que permitiu a determinação da concentração das amostras dos ensaios.

4.12 - DOSAGEM DA ATIVIDADE DE FVIII

A determinação da atividade de FVIII foi realizada através do ensaio de coagulometria baseado no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Este método é baseado na observação do tempo necessário para formação do coágulo de fibrina (CAPON *et al.*, 1990). Neste ensaio, foram adicionados 40µL da amostra, 40µL de plasma deficiente de FVIII (Deficient VIII, Stago) e 40µL de cefalina (CK Prest, Stago) a uma cubeta específica. Em seguida, esta solução foi incubada em coagulômetro por 2 min a 37°C. Depois, adicionou-se 40µL de solução CaCl₂ 0,025M (Stago) e mediu-se o tempo até a ocorrência da coagulação no coagulômetro (Dade Behring BFTII). A curva padrão para atividade de FVIII foi obtida pela diluição de plasma normal. Uma unidade internacional (UI) de atividade de FVIII é definida como a atividade presente em 1mL de plasma humano normal (CAPON *et al.*, 1990).

4.13 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FVIII

A estabilidade térmica do FVIII foi analisada a 33°C e a 37°C. Para isto, rFVIII comercial (*American Diagnostic INC.*, 408R, Lote:030409) foi diluído em meio *BD Animal Component Free* e aliqüotado. Parte das aliqüotas foi mantida a 33°C e parte a 37°C. A atividade de FVIII foi dosada a 0h, 24h, 48h e 72h.

4.14 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR, METABOLISMO E FORMAÇÃO DE PRODUTO

Os experimentos foram realizados em duplicata e foram determinados, na fase exponencial, os seguintes parâmetros: taxa específica de crescimento celular (μ); variação entre a concentração inicial de células viáveis e X_{max} (ΔX); taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}); variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}); fator de conversão de glicose em células ($Y_{x/gl c}$); fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{lac/gl c}$); taxa específica de consumo de glutamina (q_{gln}); variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}); fator de conversão de glutamina em células ($Y_{x/gln}$); fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$); taxa específica de consumo ou formação de aminoácidos (q_{aa}), concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$); fator de conversão de glicose em produto ($Y_{P/gl c}$), fator de conversão de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$); fator de conversão de célula em produto ($Y_{P/X}$) e taxa específica de formação de produto (q_p) (AUGUSTO *et al.*, 2008).

A seguir, são mostradas as equações utilizadas para o cálculo dos parâmetros listados acima:

- Variação da concentração de células viáveis - Equação 1:

$$\Delta X = X_{max} - X_i \quad (1)$$

Sendo:

X_i e X_{max} = concentrações de células viáveis nos pontos inicial e máximo da fase de crescimento exponencial nos tempos inicial (t_i) e final (t_f), respectivamente.

- Variação da concentração de glicose – Equação 2:

$$\Delta S_{glc} = - (glc_f - glc_i) \quad (2)$$

Sendo:

glc_i e glc_f = concentrações de glicose nos pontos inicial e final da fase exponencial do crescimento.

- Fator de conversão de glicose em células - Equação 3:

$$Y_{x/glc} = \frac{\Delta X}{\Delta S_{glc}} \quad (3)$$

Sendo:

ΔX = variação da concentração de células viáveis na fase exponencial.

ΔS_{glc} = variação da concentração de glicose na fase exponencial.

- Fator de conversão de glicose em lactato – Equação 4:

$$Y_{lac/glc} = \frac{lac_f - lac_i}{\Delta S_{glc}} \quad (4)$$

Sendo:

lac_i e lac_f = concentrações de lactato nos pontos inicial e final da fase exponencial de crescimento nos tempos t_i e t_f , respectivamente.

ΔS_{glc} = variação da concentração de glicose na fase exponencial.

- Variação da concentração de glutamina – Equação 5:

$$\Delta S_{gln} = - (gln_f - gln_i) \quad (5)$$

Sendo:

gln_i e gln_f = concentrações de glutamina nos pontos inicial e final da fase exponencial do crescimento nos tempos t_i e t_f , respectivamente.

- Fator de conversão de glutamina em células – Equação 6:

$$Y_{x/gln} = \frac{\Delta X}{\Delta S_{gln}} \quad (6)$$

Sendo:

ΔX = variação da concentração de células viáveis na fase exponencial.

ΔS_{gln} = variação da concentração de glutamina na fase exponencial.

- Fator de conversão de glutamina em amônio – Equação 7:

$$Y_{Am/gln} = \frac{Am_f - Am_i}{\Delta S_{gln}} \quad (7)$$

Sendo:

Am_i e Am_f = concentrações de amônio nos pontos inicial e final da fase exponencial de crescimento nos tempos t_i e t_f , respectivamente.

ΔS_{gln} = variação da concentração de glutamina na fase exponencial.

- Fator de conversão de glicose em produto – Equação 8:

$$Y_{P/glc} = \frac{\Delta FVIII}{\Delta S_{glc}} \quad (8)$$

Sendo:

$\Delta FVIII$ = variação da concentração de FVIII na fase exponencial.

ΔS_{glc} = variação da concentração de glicose na fase exponencial.

- Fator de conversão de glutamina em produto – Equação 9:

$$Y_{P/gln} = \frac{\Delta FVIII}{\Delta S_{gln}} \quad (9)$$

Sendo:

$\Delta FVIII$ = variação da concentração de FVIII.

ΔS_{gln} = variação da concentração de glutamina na fase exponencial.

- Fator de conversão de célula em produto – Equação 10:

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta FVIII}{\Delta X} \quad (10)$$

Sendo:

$\Delta FVIII$ = variação da concentração de FVIII na fase exponencial.

ΔX = variação da concentração de células viáveis na fase exponencial.

- Taxa específica de crescimento celular (μ):

As taxas específicas de crescimento celular foram calculadas pela regressão exponencial dos pontos de células viáveis (X_v) na fase exponencial em função do tempo.

- Taxas específicas de consumo de glicose, consumo de glutamina, formação de produto, formação de lactato, formação de amônio, consumo ou formação de aminoácidos :

As taxas específicas de consumo de glicose, consumo de glutamina, formação de produto, formação de lactato, formação de amônio e consumo ou formação de aminoácidos foram calculadas a partir da inclinação da reta obtida plotando-se as concentrações das substâncias consumidas ou produzidas em função da integral de células viáveis ($ICV = X_m \cdot \Delta t$) (ANEXO I) (ALTAMIRANO *et al.*, 2006a).

A determinação do valor para integral de células viáveis foi realizada através do cálculo da área sobre a curva de células viáveis por tempo. O valores para cada tempo de cultivo corresponderam a soma dos valores acumulados dos tempos anteriores.

4.15 – MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DOS DOCUMENTOS DE PATENTE RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE FVIII

Foi feito um estudo de monitoramento tecnológico da produção de FVIII através da análise de documentos de patentes (ANEXO II). Para a seleção das patentes da área de produção de FVIII, foi realizada a busca na base de dados DERWENT para a Classificação Internacional de Patentes “C07K 014/755”, referente aos pedidos de patente relacionados à proteína FVIII.

Após a busca feita na base DERWENT, os dados obtidos foram submetidos à análise bibliométrica utilizando o programa “Microsoft Excel” para avaliação da evolução tecnológica na área de produção de FVIII. Os dados foram indexados em planilhas com as seguintes informações: número do pedido de patente, país de

origem, ano de publicação, título, resumo, depositante, inventores, dentre outros. Com base nestas informações foram selecionados os documentos especificamente relacionados à produção de rFVIII e estes foram classificados quanto à principal área de aplicação.

Os documentos considerados como especificamente da área de produção de rFVIII foram pesquisados na base ESPACENET para a obtenção do documento completo.

O acesso às bases de dados foi feito no período de setembro a novembro de 2011, através do endereço eletrônico:

http://apps.isiknowledge.com/DIIDW_GeneralSearch_input.do?highlighted_tab=DIIDW&product=DIIDW&last_prod=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&SID=3AC@GBiJnefa9N3opJ@.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DOS DOCUMENTOS DE PATENTE RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE FVIII

Através da pesquisa realizada na base de dados DERWENT para a CIP “C07K 014/755”, foram encontrados 396 documentos de patentes. A CIP “C07K 014/755” engloba os documentos de patentes relacionados à proteína FVIII. Sendo assim, estavam incluídos neste grupo de 396 documentos, além das patentes relativas ao rFVIII, patentes que englobam plasma, animais transgênicos que produzem FVIII, FVIII modificado com ação trombolítica ou para atuar na angiogênese para tratar pacientes com câncer, isquemia, dentre outros. Além disso, estavam incluídas patentes de caráter muito amplo relativas a diferentes proteínas, inclusive FVIII. Também foram encontradas patentes sobre outras proteínas que participam do sistema de coagulação sanguínea, tendo em vista que estas foram equivocadamente classificadas como “C07K 014/755”.

Desta forma, os resumos das patentes foram analisados e os documentos que não se referiam, especificamente, à produção, purificação e composição de rFVIII não foram considerados na análise subsequente. Parte dos documentos da área de purificação e de composição incluía também FVIII obtido a partir de plasma, porém, estes documentos foram selecionados, pois tais conhecimentos são relevantes para a produção de rFVIII. Após esta seleção, 262 documentos de patente foram considerados para a análise, por se enquadrarem no tema de produção de rFVIII (ANEXO III). Estes documentos foram avaliados quanto aos requerentes, inventores, principal área de estudo, ano de publicação, país de origem e se foram depositados ou não no Brasil.

Os dados obtidos foram analisados e resumidos, como será apresentado a seguir.

5.1.1 - Origem dos Depositantes

A Figura 5 apresenta o número de documentos de patentes segundo o país de origem do depositante. Foi observada uma predominância de patentes dos Estados Unidos (122 publicações), com uma participação de 46,56%, seguido da Alemanha (30 publicações ou 11,45%).

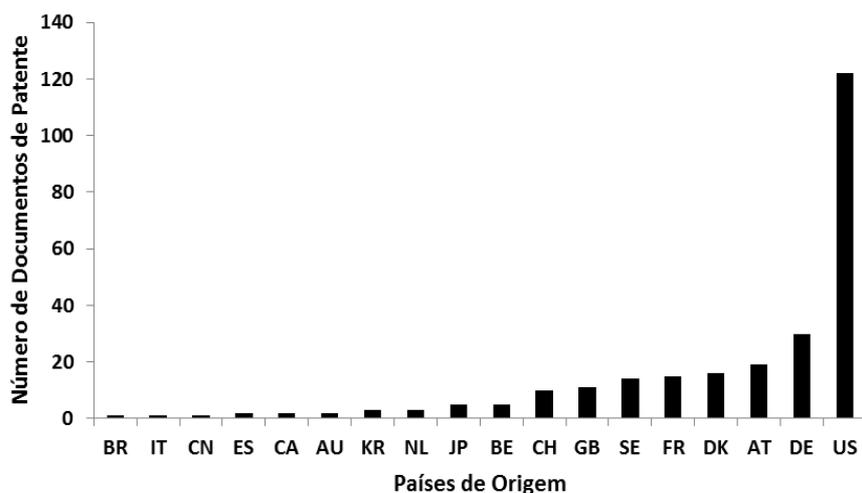


Figura 5 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo o país de origem dos requerentes (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755). (BR – Brasil, IT – Itália, CN – China, ES – Espanha, CA – Canadá, AU – Austrália, KR – República da Coreia, NL – Holanda, JP - Japão, BE - Bélgica, CH - Suíça, GB – Reino Unido/Grã-Bretanha, SE – Suécia, FR – França, DK – Dinamarca, AT – Áustria, DE – Alemanha, US – Estados Unidos).

Através deste estudo, pode-se perceber que os Estados Unidos e alguns países da Europa têm grande interesse na tecnologia de produção de FVIII. Além disso, este estudo indica que o interesse na tecnologia associada à produção de biofármacos é bastante difundido entre os países, com uma alta dispersão de atores.

Dentre os pedidos de patente analisados, os Estados Unidos foram o primeiro país a depositar um pedido de patente na área de produção FVIII através da tecnologia de DNA recombinante, através da patente EP160457 (1985) da empresa

Genentech. No entanto, países como Suécia e Holanda também fizeram depósitos logo no início da evolução da tecnologia aplicada à produção de FVIII.

De acordo com a busca efetuada, foi encontrado apenas um documento de depositantes do Brasil. Foi o pedido de patente de número BR200805767, da Universidade de São Paulo em parceria com a fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, que se refere a uma nova molécula de rFVIII com o domínio B reduzido. Os requerentes fizeram o depósito deste pedido de patente na Europa (EP2180009), Canada (CA2679041) e Estados Unidos (US2010172891).

Do total de documentos analisados, apenas 11,45% (30 publicações) foram depositados no Brasil. Ou seja, apenas uma pequena parcela dos requerentes teve interesse em proteger sua invenção no Brasil. Com isso, evidencia-se que o Brasil não tem uma participação efetiva no setor de produção de rFVIII e, por isso, até o momento, não representa uma ameaça para os fabricantes de rFVIII.

5.1.2 - Principais Requerentes

A Figura 6 mostra os principais requerentes de patentes da área de produção de rFVIII.

Dentre as empresas farmacêuticas que mais investem em biotecnologia, estão a Merck, a Bayer, Amgen, Biogen Idec, Celgene, Cephalon, Genentech, Genzyme, Sanofi-Aventis, Novartis, Ascenta Therapeutics, Millennium Pharmaceuticals, Novo Nordisk, Serono, Sepracor e Shire Pharmaceuticals, pois competem nos segmentos de produtos patenteados (FARDELONE & BRANCHI, 2006).

Em relação à produção de rFVIII, a Figura 6 mostra que o principal requerente foi a empresa Baxter com 8,77% do total de documentos analisados. O segundo maior requerente foi a Bayer com 6,87% dos pedidos de patente, seguida da Immuno AG e da Nordisk, ambas com 5,72% dos pedidos de patentes. Desta forma, as empresas

que mais apresentaram pedidos de patente foram a Baxter, Bayer, Immuno AG e a Nordisk.

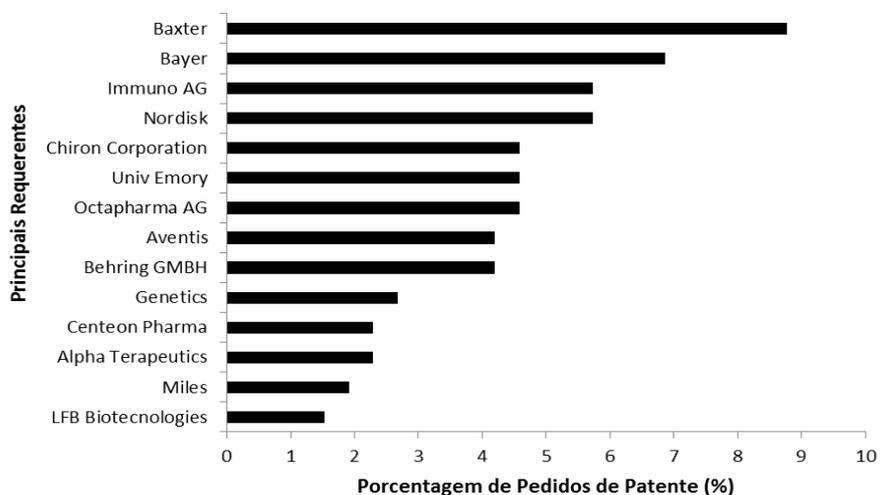


Figura 6 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo a empresa requerente (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

De acordo com as informações coletadas nas bases de dados, pode-se observar na Figura 7 que 88,17% do total dos depositantes de patentes relacionadas à produção de rFVIII são empresas, enquanto apenas 11,83% são universidades, correspondendo a 31 patentes publicadas pelas universidades (em parceria ou não com empresas) das 262 patentes de FVIII registradas nos diferentes escritórios do mundo.

De acordo com essas informações, conclui-se que a maior parte das patentes analisadas são originadas nas empresas, embora, em muitos casos haja parcerias entre as universidades e as empresas, mesmo que a patente tenha sido requerida em nome apenas da empresa.

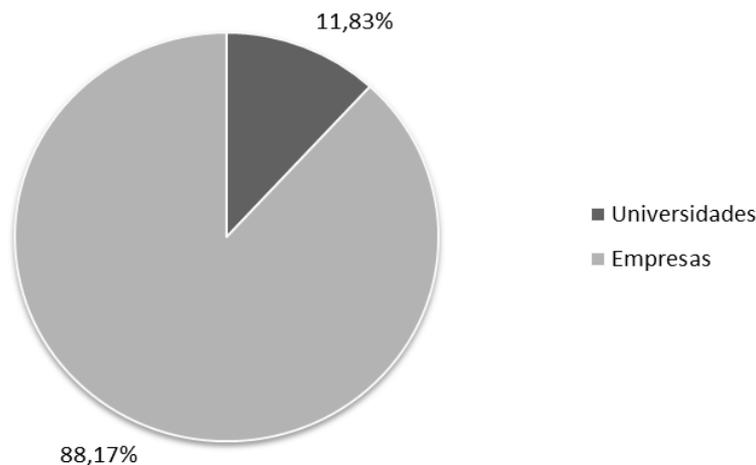


Figura 7 - Perfil dos requerentes (universidades e empresas) das patentes relacionadas à produção de FVIII (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

5.1.3 - Principais Inventores

A Figura 8 mostra os diferentes inventores responsáveis pelas patentes na área de produção de FVIII. Os principais inventores foram Lollar, J. S., Turecek, P. e Rasmussen M. E. com 5,2%, 4,8% e 4,0% das publicações, respectivamente. Estes inventores focaram seus estudos no melhoramento das moléculas de FVIII.

Os trabalhos de Turecek, P. também abordaram novas composições contendo FVIII, enquanto que os documentos de Lollar, J. S. também se referem à biologia molecular e os de Rasmussen, M. E., ao cultivo celular. O inventor que apresentou a maior parte de seus pedidos de patentes na área de cultivo foi Sham Y. Chan.

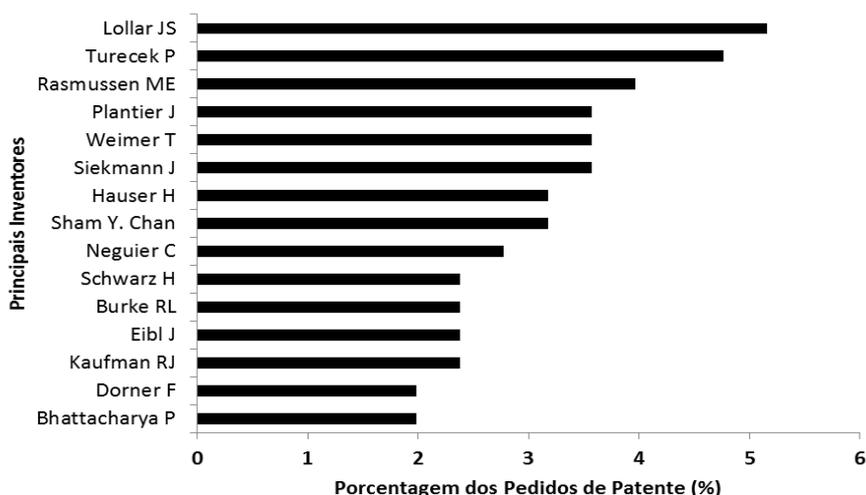


Figura 8 - Principais inventores dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

5.1.4 - Evolução Temporal dos Pedidos de Patente

A Figura 9 apresenta a evolução do número de pedidos de patente de FVIII publicados ao longo do tempo, através do número de patentes por ano, no período de 1983 a 2011. O primeiro documento de patente referente especificamente ao rFVIII é de 1985, sendo os outros 2 documentos anteriores a esta data referentes à purificação de FVIII. Observou-se que, nos anos de 1997 e 2009, obteve-se o maior número de publicações de documentos de patente de FVIII, com 22 e 19 publicações, respectivamente.

Nota-se um aumento significativo no número de publicações a partir de 1991, sendo possível observar dois períodos distintos em função do número de documentos publicados. O primeiro período entre 1983 a 1990, caracterizado por um volume muito pequeno de publicações, e o segundo período entre 1991 e 2011, com um volume maior de publicações de patentes, apesar da queda observada em 2011. A queda no número de publicações em 2011 não é representativa para o presente estudo, pois o

levantamento foi realizado em outubro, limitando o número de publicações ao período de 10 meses no ano de 2011.

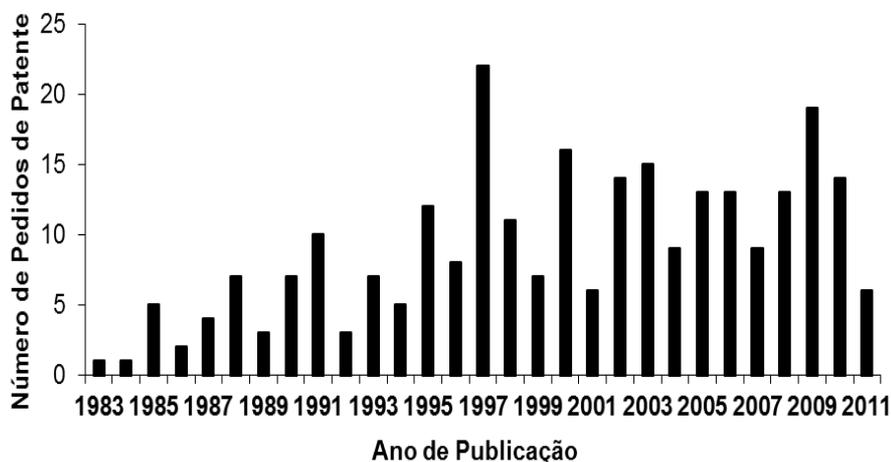


Figura 9 - Distribuição dos documentos de patente relacionados à produção de FVIII segundo a data de publicação (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

Em função das leis do sistema de patentes, o período de sigilo (18 meses no Brasil e em muitos países) que precede a publicação é considerado um dos fatores limitantes do uso da estatística para a análise de tendências tecnológicas. No entanto, no presente estudo, este fator não mostra maior relevância porque a análise foi feita com base na data de publicação e não a de depósito.

O aumento do número de publicações na área de produção de FVIII a partir de 1991 pode indicar um aumento no interesse do desenvolvimento de tecnologias na produção de biofármacos, refletindo uma mudança na indústria farmacêutica, que passou a investir mais na área de biotecnologia. Além disso, os avanços na área da tecnologia do DNA recombinante e a descoberta do vírus HIV durante a década de 1980 aumentaram o interesse na obtenção de rFVIII, em função das desvantagens dos produtos obtidos a partir do plasma.

5.1.5 – Principais Áreas Tecnológicas Abordadas

Os documentos foram avaliados e classificados quanto às áreas tecnológicas envolvidas (Figura 10).

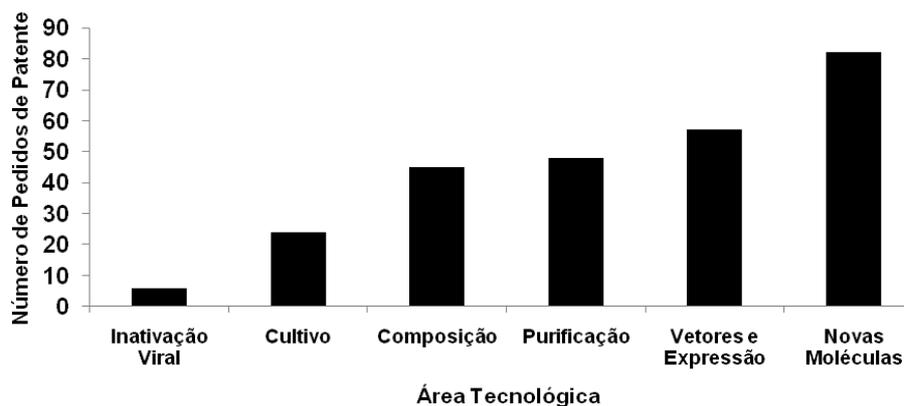


Figura 10 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII segundo a principal área tecnológica de aplicação (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

A Figura 10 mostra que a maioria dos documentos se refere à obtenção de novas moléculas de FVIII (82 publicações). O grande número de invenções nesta área evidencia a necessidade de modificações na estrutura do FVIII com o objetivo de melhorar a estabilidade da molécula, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tendo em vista que o FVIII degrada facilmente, o que acarreta em uma meia vida curta. As modificações nas moléculas de FVIII têm como objetivo manter e/ou aumentar sua atividade, sem aumentar a formação de anticorpos anti-FVIII.

Também há um grande número de publicações que envolvem o uso de técnicas de biologia molecular (57) e processos de purificação de FVIII (48). Vale ressaltar que parte das invenções sobre purificação de FVIII também se referem ao FVIII derivado de plasma. Contudo, independentemente da origem do FVIII, tratando-se de um

produto administrado por via intravenosa e de elevado valor agregado, os processos de purificação são de extrema importância para a obtenção de um produto seguro e eficaz. Os documentos avaliados que abordam, principalmente, a área de biologia molecular, se referem a vetores, modificações nas células para aumentar a expressão proteica e diminuir a morte celular, dentre outros.

Em relação aos documentos que abordam especificamente o cultivo de células para a produção de FVIII, foram encontradas 24 publicações. Destes, a grande maioria se refere a novos meios de cultivo (80%) (Figura 11). Apenas 8% se referem a métodos de adaptação/seleção das células ao cultivo em meio livre de soro e 12% se referem a condições de cultivo, incluindo temperaturas de cultivo na faixa de 28 - 39,5°C.

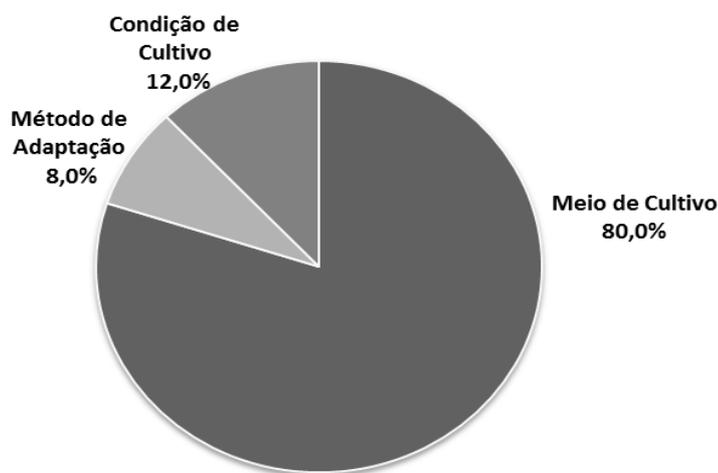


Figura 11 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII da área de cultivo celular segundo a matéria objeto de proteção (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

Conforme pode ser observado na Figura 12, do total de documentos da área de cultivo celular, a maioria (57,7%) empregou células CHO para a produção de FVIII,

enquanto 23,1% dos pedidos de patente empregaram células BHK. Outros tipos celulares também foram empregados, totalizando (19,2%).

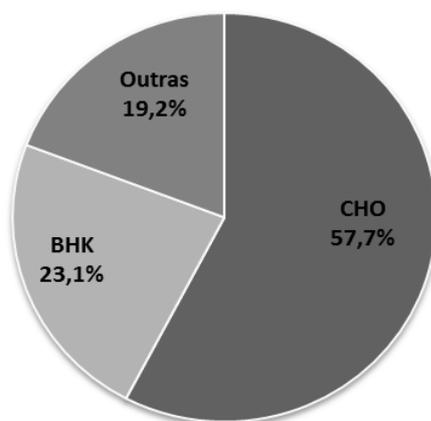


Figura 12 - Distribuição dos documentos de patentes relacionados à produção de FVIII da área de cultivo celular segundo a célula empregada (bases de dados: EPO, DERWENT, OMPI e INPI, classificação internacional de patentes: C07K 014/755).

Os documentos de patente que se referem a novos meios de cultivo têm como objetivo, em geral, um meio que permita o cultivo das células na ausência de soro, leve a uma maior produtividade e aumente a estabilidade do FVIII. Sendo assim, foram encontrados meios de cultivo contendo metais divalentes, agentes complexantes, fosfolipídeos, inibidores de protease, dentre outros.

Quanto aos documentos de patente relacionados às condições de cultivo, todos abordaram a temperatura de cultivo para a obtenção de rFVIII, mas não eram especificamente sobre células BHK. Estes documentos mostram a importância do estudo da temperatura para a obtenção de proteínas recombinantes, em especial o rFVIII, por se tratar de uma molécula instável.

Assim, com base nas informações obtidas a partir das bases de dados de patentes e dos artigos citados anteriormente, conclui-se que, mesmo considerando-se

os dados disponibilizados, novos estudos são necessários com o objetivo de avaliar quais os melhores meios de cultivo e temperatura para o cultivo de células BHK produtoras de rFVIII.

Vale ressaltar que o sistema de patentes classifica as invenções de acordo com sua natureza ou função. Então, é possível avaliar as áreas tecnológicas envolvidas na produção de FVIII usando a CIP como referência, conforme foi feito neste trabalho de monitoramento tecnológico.

De acordo com as análises acima, pode-se observar que o uso da CIP como fonte de informação é extremamente relevante para a avaliação desta área tecnológica, tendo em vista que existe uma classificação específica para “FVIII”. Contudo, com o objetivo de ampliar a busca, considerando-se que o objetivo é a produção de rFVIII a partir do cultivo de células de mamíferos, outras classificações poderiam ser incluídas na pesquisa, dependendo do foco do estudo, tais como: A61K 38/37 – Preparações medicinais com FVIII; C12N 5/10 – Células modificadas pela introdução de material genético; C12N 15/12 – Genes que codificam proteínas animais; C12N 15/52 – Genes que codificam enzimas e proenzimas; C12N 17/85 – Vetores para células animais.

5.2 – SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO ISENTOS DE SORO

Inicialmente, as células BHK (ATCC CRL-8544) cresciam aderidas e em meio DMEM/F12 com 10% de SFB. Entretanto, em função do cultivo de células animais em suspensão apresentar vantagens tais como condições homogêneas de cultivo, facilidade de controle das variáveis e maior facilidade para a ampliação de escala, as células foram adaptadas ao crescimento em suspensão.

Visando aos dois objetivos (eliminação do soro e adaptação à suspensão), após o descongelamento, as células oriundas de um criotubo foram cultivadas diretamente

em *spinner*, em meio composto da mistura DMEM/F12 (1:1) suplementada com 10% de soro. A proporção de soro no meio de cultivo foi diminuída gradualmente até que este componente fosse totalmente eliminado.

Quando a quantidade de soro atingiu 3% no meio de cultivo, as células começaram a formar grumos. Observou-se que, a partir deste percentual, ao se diminuir a proporção de soro, a formação de grumos aumentava. Entretanto, mantendo-se o cultivo por uma ou duas semanas na mesma proporção de soro, os grumos diminuían e, quando a viabilidade permanecia acima de 80% por mais de uma semana, uma nova proporção de soro menor podia ser empregada.

O meio de cultivo com a nova proporção de soro foi trocado a cada 3 dias, em média, mantendo-se 30% de meio condicionado (meio em que as células estavam sendo cultivadas) com o objetivo de manter fatores de crescimento e outras substâncias excretadas pelas células que podem favorecer o crescimento celular.

A Tabela 2 mostra as viabilidades celulares obtidas para as diferentes concentrações de SFB a cada três dias de cultivo durante o processo de adaptação ao cultivo livre de SFB, a partir da concentração de 3% (v/v) de SFB. Ao final do processo de adaptação, que durou cerca de três meses, as células passaram a ser cultivadas em meio DMEM/F12 totalmente livre de SFB.

Após a adaptação ao cultivo em suspensão e em meio livre de soro, foram avaliados três meios comerciais isentos de soro (*GMEM-S*, fornecido pela empresa SAFC-Sigma, *BD Animal Component Free* e *BD Cell Quantum Yield*, ambos da empresa BD Biosciences), assim como a mistura (1:1) dos meios clássicos DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Para fins de comparação, foi avaliada também a mistura DMEM/Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).

Para a comparação dos meios de cultivo, os experimentos foram conduzidos a 37°C e monitorados, diariamente, durante 168 h. As figuras apresentadas a seguir mostram os perfis de crescimento e viabilidade celular, assim como o consumo de glicose e glutamina e a formação de lactato e amônio nos diferentes meios.

Tabela 2: Variação da viabilidade celular em função da concentração de soro fetal bovino (SFB) durante o processo de adaptação de células BHK ao cultivo em suspensão e livre de SFB em meio DMEM/F12.

Tempo de Cultivo (dias)	SFB (%)	Viabilidade (%)
1	3	90
4	2,5	92
7	2,5	91
10	2	66
13	2	91
16	2	90
19	1,5	90
22	1	70
25	1	87
28	0,5	88
31	0,5	89
34	0,5	89
37	0,25	85
40	0,25	82
43	0,25	76
46	0,25	87
49	0	81
52	0	78
55	0	92
58	0	82
61	0	91
64	0	92

Nas Figuras 13 e 14 podem-se observar os resultados para os meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB .

De acordo com as Figuras 13 e 14, observa-se que o meio DMEM/F12 propiciou concentração celular máxima (X_{max}) de $1,5 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹, enquanto que o mesmo meio suplementado com 1% de soro forneceu X_{max} de $2,0 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹. Para o meio DMEM/F12, a taxa específica de crescimento (μ) obtida foi de 0,011 h⁻¹ e, para o meio suplementado com soro, o valor de μ foi de 0,015 h⁻¹.

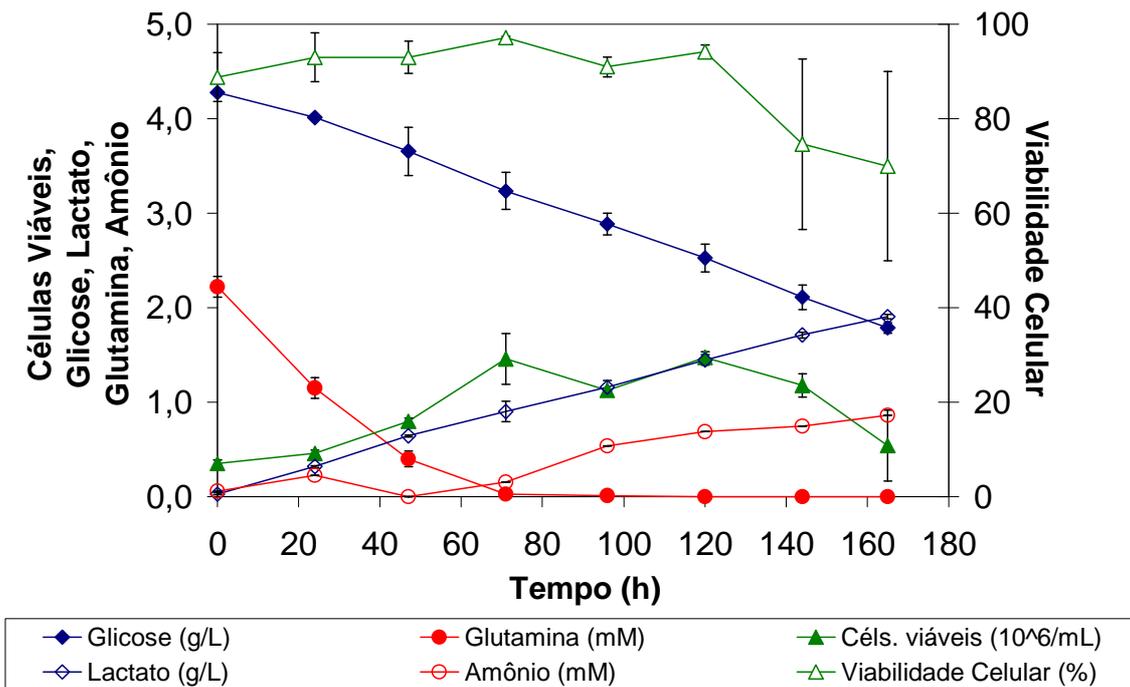


Figura 13: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12), a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

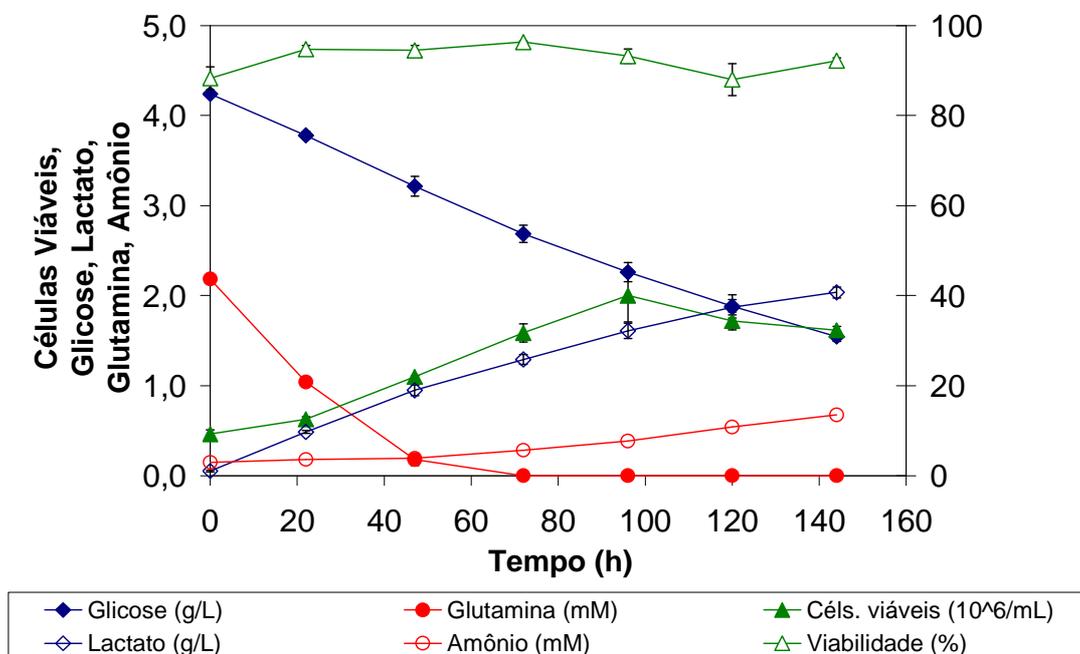


Figura 14: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB), a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

O crescimento celular obtido para o cultivo em DMEM/F12 e em DMEM/F12/SFB (suplementado com 1% de soro) obtido neste trabalho foi maior que o obtido por CRUZ *et al.* (2000b), que obtiveram $1,1 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹ no cultivo de células BHK em batelada em meio DMEM suplementado com 5% de SFB. No entanto, para o cultivo em batelada alimentada, com o mesmo meio de cultivo, CRUZ *et al.* (2000b) relataram concentrações celulares superiores (X_{max} de $2,5 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹).

Na Figura 15, observa-se que o meio GMEM-S apresentou desempenho pior que os dois avaliados anteriormente, pois o crescimento celular foi muito baixo, resultando em X_{max} de $1,1 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹. Este meio propiciou μ de $0,006$ h⁻¹.

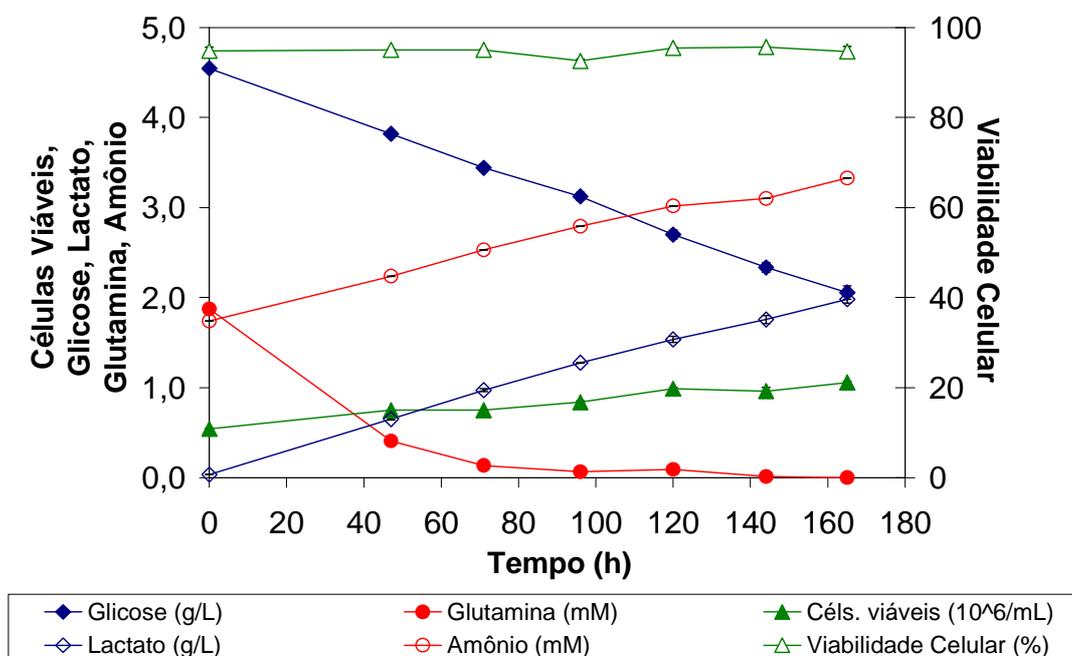


Figura 15: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio GMEM-S, a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

Da mesma forma, o meio *BD Cell Quantum Yield* (Figura 16) não apresentou crescimento celular satisfatório (X_{max} de $1,2 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹ e μ de $0,010$ h⁻¹). O baixo desempenho deste meio é justificado pelo fato de este meio ser normalmente utilizado

suplementado com soro, sendo indicado como um meio basal livre de proteínas que requer suplementação adicional.

O meio *BD Animal Component Free* (Figura 17) permitiu um expressivo crescimento celular, propiciando X_{max} igual a $5,9 \cdot 10^6$ cel mL⁻¹. O valor de μ obtido foi de 0,030 h⁻¹, portanto na faixa esperada para células animais (PELLEGRINI *et al.*, 2008).

Os dados relacionados à taxa específica de crescimento (μ), concentração celular máxima (X_{max}), taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}), fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{lac/glc}$), taxa específica de consumo de glutamina (q_{gln}), fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) e concentração máxima de produto (FVIII_{max}) nos diferentes meios encontram-se compilados na Tabela 3.

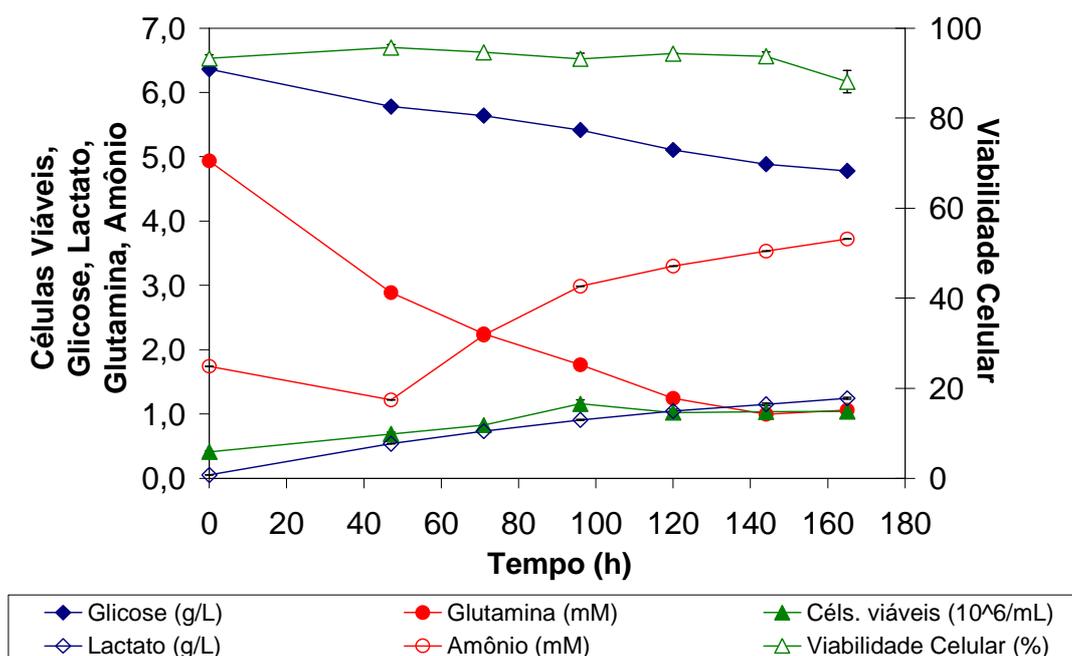


Figura 16: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio *BD Cell Quantum Yield*, a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

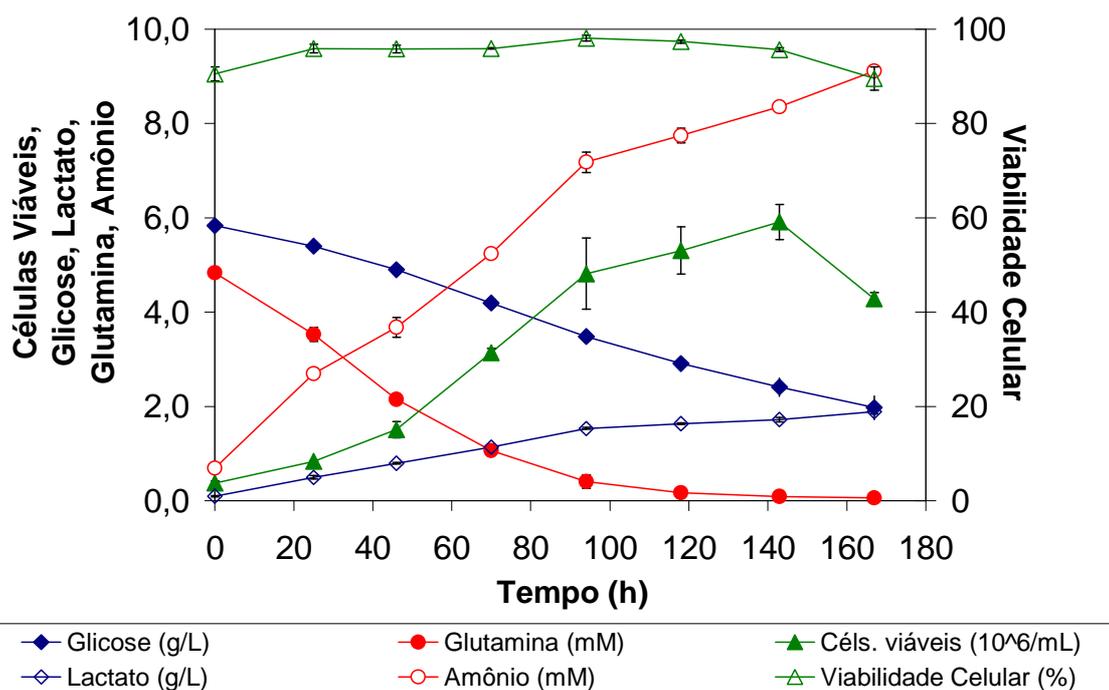


Figura 17: Cinética de crescimento celular, de consumo de glicose e glutamina e de produção de lactato e amônio em meio *BD Animal Component Free*, a 37°C. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

Tabela 3: Taxa específica de crescimento (μ), concentração celular máxima (X_{\max}), taxa específica de consumo de glicose (q_{glc}), fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$), taxa específica de consumo de glutamina (q_{gln}), fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{\text{Am}/\text{gln}}$) e concentração máxima de produto (FVIII_{\max}) nos meios analisados para o cultivo a 37°C de células BHK produtoras de FVIII.

Meio de Cultivo	μ h^{-1}	X_{\max} 10^6 cel mL^{-1}	q_{glc} $\text{pmol cel}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ mol mol^{-1}	q_{gln} $\text{pmol cel}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$Y_{\text{Am}/\text{gln}}$ mol mol^{-1}	FVIII_{\max} ng mL^{-1}
DMEM/F12	0,011	1,47	-2,33	1,51	-0,58	0,31	1,81
DMEM/F12/SFB	0,015	2,00	-1,82	1,16	-0,43	0,11	2,38
GMEM-S	0,006	1,06	-2,47	1,56	-0,07	0,85	1,48
<i>Cell Quantum Yield</i>	0,010	1,16	-1,30	1,51	-1,10	0,51	1,66
<i>Animal Component Free</i>	0,030	5,91	-0,94	0,95	-0,26	1,40	3,53

Através dos dados apresentados na Tabela 3, pode-se observar que, dentre os meios estudados, o meio *BD Animal Component Free* foi o que apresentou valores mais satisfatórios de X_{\max} e μ . Adicionalmente, para este meio, q_{glc} e q_{gln} foram menores do que para os outros meios analisados.

O valor de $Y_{lac/glc}$ foi menor para o meio *BD Animal Component Free* do que para os outros meios. Mesmo com um elevado crescimento celular e alto consumo global de glicose, este meio de cultivo levou a uma concentração final de lactato similar aos outros meios. Isto pode ter ocorrido devido à possível presença de outros açúcares como manose, frutose e galactose no meio *BD Animal Component Free*, cuja composição não é revelada pelo fabricante. Estes açúcares poderiam estar substituindo a glicose e levando a uma menor formação de lactato.

Outro substrato importante para o cultivo de células animais é a glutamina. Por isso, o perfil de consumo de glutamina foi avaliado, assim como a formação de amônio, que é um metabólito tóxico derivado do metabolismo da glutamina.

Observou-se que a formação de amônio foi significativamente mais elevada para o meio *BD Animal Component Free*, embora a concentração inicial de glutamina neste meio seja apenas cerca de duas vezes superior aos meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB.

CRUZ *et al.* (1999a), em seu estudo com células BHK, encontraram valores para $Y_{Am/gln}$ em torno de $1,1 \text{ mmol mmol}^{-1}$. O meio *BD Animal Component Free* apresentou $Y_{Am/gln}$ de $1,4 \text{ mmol mmol}^{-1}$, portanto maior do que o encontrado na literatura. Valores elevados de fator de conversão de glutamina em amônio podem significar que uma grande proporção de glutamina está sendo direcionada ao TCA através da glutamato desidrogenase, levando a um metabolismo mais eficiente da glutamina (com maior geração de energia).

Dessa forma, a maior produção de amônio neste meio pode estar relacionada ao maior consumo da glutamina pela via da glutamato desidrogenase ou, também, a uma maior concentração inicial de aminoácidos aminogênicos como asparagina, por exemplo, que está numa concentração aproximadamente sete vezes maior no meio *BD Animal Component Free* do que nos meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB.

Além disso, associando-se os dados sobre o consumo de glutamina e o crescimento celular, observa-se que o crescimento das células pára ou diminui muito

quando a glutamina se esgota no meio. Com isso, conclui-se que a glutamina é um substrato essencial em todos os meios analisados e seu esgotamento representa um fator limitante do crescimento celular.

Quanto à formação de FVIII, os meios que apresentaram as maiores concentrações de FVIII foram DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*. Além do expressivo crescimento celular e menores q_{glc} e q_{gln} observados no cultivo conduzido em *BD Animal Component Free*, este foi acompanhado da mais significativa formação de produto dentre os meios de cultivo avaliados (Figura 18).

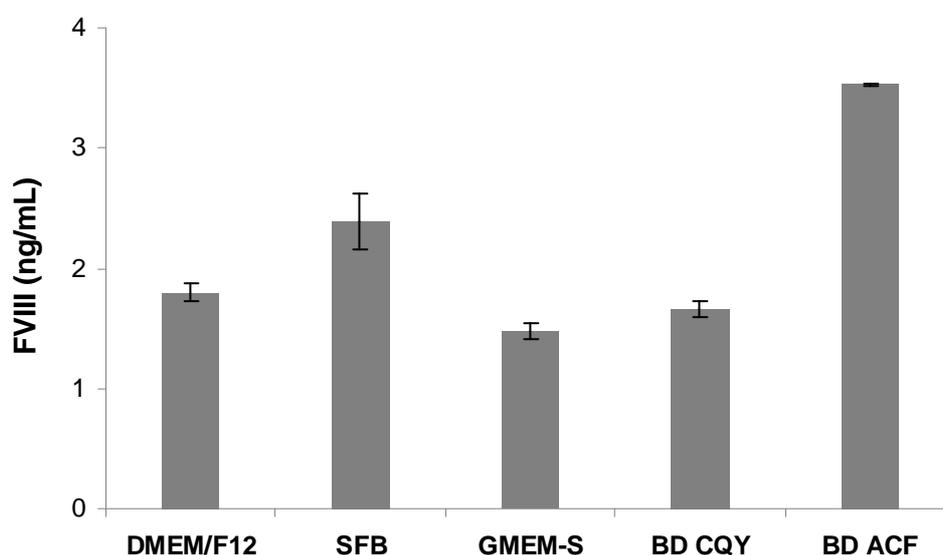


Figura 18: Concentração máxima de FVIII obtida nos cultivos, a 37°C, com os diferentes meios de cultivo analisados.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a concentração máxima de FVIII foi maior no meio *BD Animal Component Free* ($3,53 \text{ ng mL}^{-1}$), seguida do meio suplementado com soro ($2,38 \text{ ng mL}^{-1}$). Os meios GMEM-S, *BD Cell Quantum Yield* e DMEM/F12 apresentaram menor produção de FVIII ($1,48 \text{ ng mL}^{-1}$, $1,66 \text{ ng mL}^{-1}$ e $1,81 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente). Observa-se, portanto, que o meio suplementado com soro propiciou concentração máxima de produto de apenas 68% do valor obtido no meio *BD Animal Component Free*, enquanto nos demais meios a concentração máxima de

produto obtida foi aproximadamente igual à metade daquela obtida no melhor meio de cultivo.

Com base nos resultados apresentados, foram escolhidos os 3 meios com melhor desempenho para a etapa de avaliação da temperatura de cultivo: DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*.

5.3 – AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE CULTIVO

Utilizando-se os três meios selecionados anteriormente, foram avaliados cultivos celulares nas temperaturas de 33°C, 35°C e 37°C quanto ao crescimento celular, viabilidade celular, consumo de glicose e glutamina e formação de lactato, amônio e produto.

5.3.1 – Crescimento Celular

As Figuras 19, 20 e 21 mostram a cinética de crescimento celular nas diferentes temperaturas, nos meios DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*.

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam uma avaliação comparativa dos cultivos em diferentes temperaturas nos meios DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*, respectivamente.

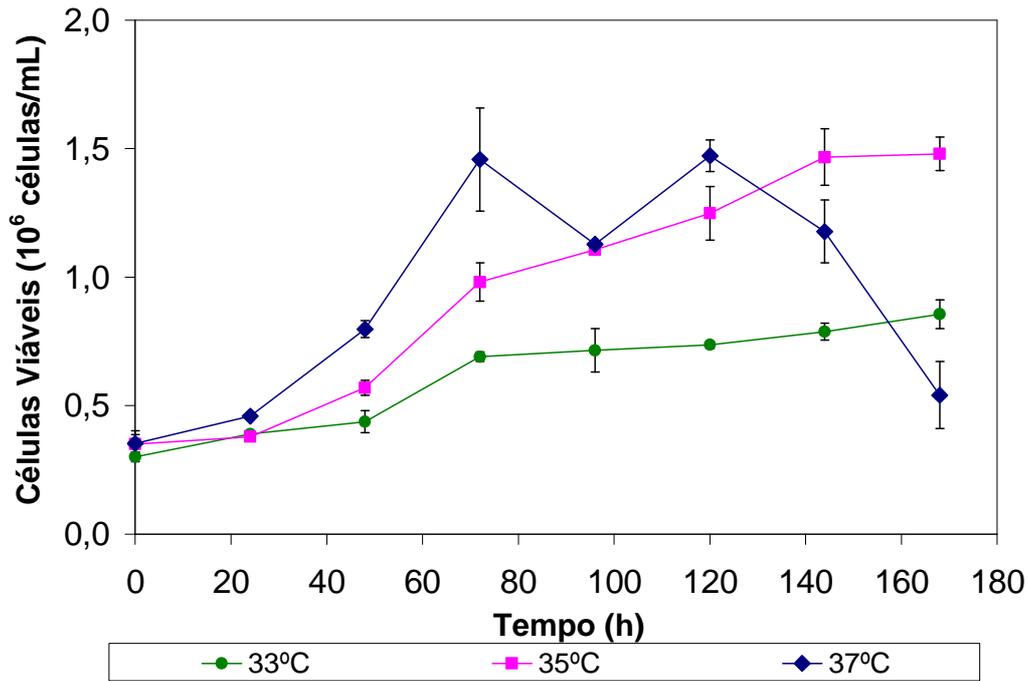


Figura 19: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

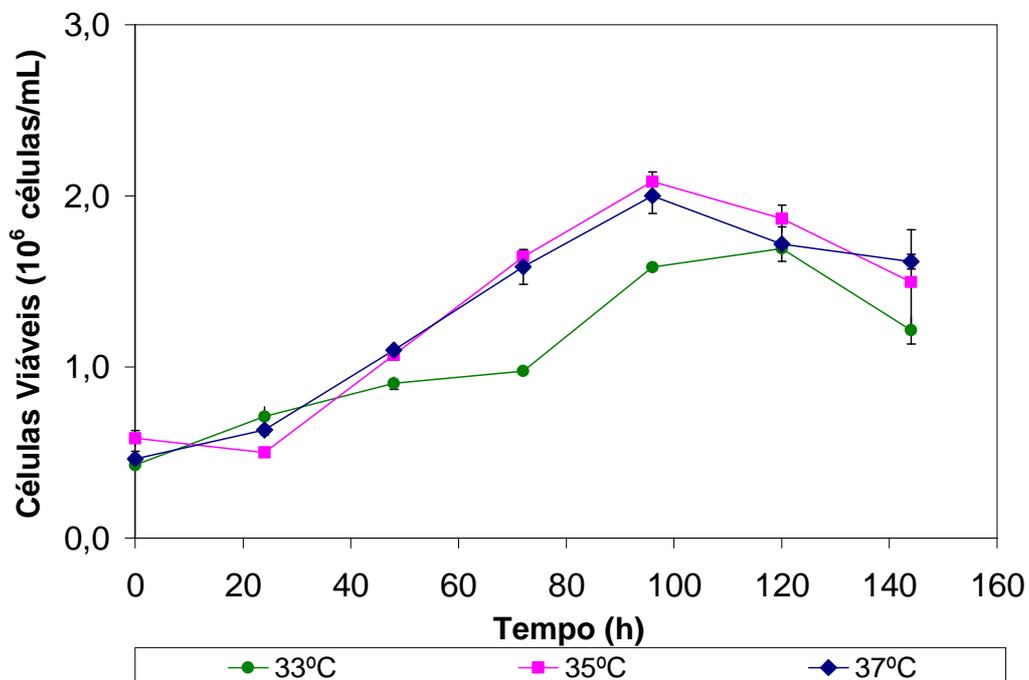


Figura 20: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

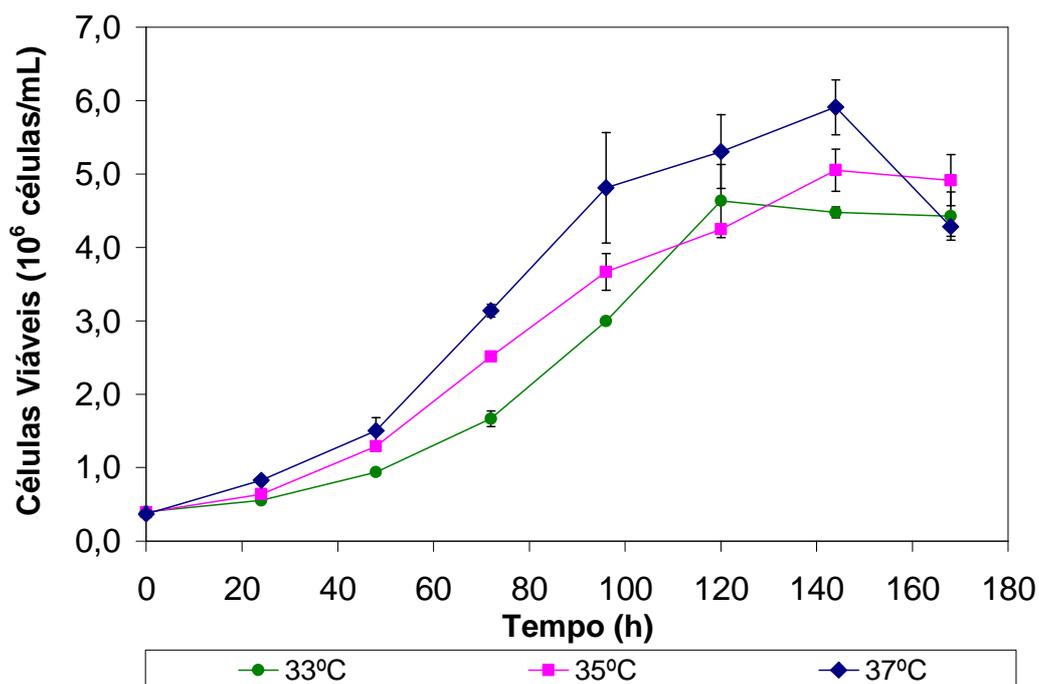


Figura 21: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a cinética de crescimento celular no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

Tabela 4: Concentração celular máxima (X_{max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).

Temperatura	33°C	35°C	37°C
X_{max} (10^6 cel mL ⁻¹)	0,856 ± 0,033	1,479 ± 0,020	1,473 ± 0,269
ΔX (10^6 cel mL ⁻¹)	0,555 ± 0,057	1,129 ± 0,130	1,119 ± 0,095
μ (h ⁻¹)	0,007 ± 0,0001	0,008 ± 0,0013	0,011 ± 0,0001

Tabela 5: Concentração celular máxima (X_{max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).

Temperatura	33°C	35°C	37°C
X_{max} (10^6 cel mL ⁻¹)	1,692 ± 0,021	2,082 ± 0,058	2,000 ± 0,085
ΔX (10^6 cel mL ⁻¹)	1,266 ± 0,021	1,499 ± 0,105	1,538 ± 0,160
μ (h ⁻¹)	0,011 ± 0,0001	0,014 ± 0,0001	0,015 ± 0,0007

Tabela 6: Concentração celular máxima (X_{\max}), variação entre a concentração de inóculo e X_{\max} (ΔX) e taxa específica de crescimento (μ) dos cultivos em diferentes temperaturas no meio *BD Animal Component Free*.

Temperatura	33°C	35°C	37°C
X_{\max} (10^6 cel mL ⁻¹)	4,633 ± 0,073	5,051 ± 0,283	5,910 ± 0,504
ΔX (10^6 cel mL ⁻¹)	4,232 ± 0,285	4,660 ± 0,281	5,539 ± 0,371
μ (h ⁻¹)	0,018 ± 0,0005	0,021 ± 0,0016	0,030 ± 0,0015

Através da análise do crescimento celular no meio DMEM/F12, observou-se μ de 0,011 h⁻¹ a 37°C, de 0,008 h⁻¹ a 35°C e de 0,007 h⁻¹ a 33°C. Dentre as três temperaturas analisadas, o maior valor de μ foi obtido a 37°C (Tabela 4). Os valores de μ obtidos nos cultivos conduzidos em DMEM/F12/SFB apresentaram pouca variação, no entanto, μ foi maior a 37°C (Tabela 5).

Quando se utilizou o meio *BD Animal Component Free*, obteve-se μ de 0,030 h⁻¹ a 37°C, de 0,021 h⁻¹ a 35°C e de 0,018 h⁻¹, a 33°C. Dentre as três temperaturas analisadas, como nos outros meios, o valor máximo de μ foi obtido a 37°C (Tabela 6).

Observou-se, para o cultivo conduzido em *BD Animal Component Free*, um perfil de crescimento celular típico apresentado pelas células de mamíferos cultivadas *in vitro*, onde ocorre crescimento exponencial no início do cultivo, quando todos os substratos estão disponíveis, depois a velocidade de crescimento se iguala à velocidade de morte celular em função de um ou mais substratos se esgotarem ou ainda subprodutos tóxicos alcançarem concentrações inibitórias e, finalmente, inicia-se a morte celular devido a condições desfavoráveis, tais como escassez de substratos, alta concentração de subprodutos, mudanças no pH, na osmolaridade, etc (ALTAMIRANO, 2000).

De acordo com os resultados, pode-se observar que, em geral, os melhores crescimentos celulares e os maiores valores de μ foram obtidos a 37°C. Esta é a tendência observada para células animais, ou seja, visando o crescimento celular, a temperatura ideal é 37°C. TONSO (2000) avaliou diferentes temperaturas para o

cultivo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII e também observou que a velocidade específica de crescimento aumentou com a temperatura, até atingir um valor máximo a 37°C.

WEIDEMANN *et al.* (1994) estudaram o cultivo de células BHK-21 recombinantes produtoras de antitrombina III em diferentes temperaturas no intervalo de 30 a 37°C. Este estudo mostrou que houve diminuição das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de glicose e de produção de lactato em temperaturas menores, porém a X_{max} e a produtividade não foram afetadas.

5.3.2 – Consumo de Glicose e Formação de Lactato

Para diferentes linhagens celulares de mamíferos estabelecidas, sabe-se que a glicose é convertida a lactato com um alto rendimento (1 a 2 mol mol⁻¹) e que apenas uma pequena fração de seu esqueleto carbônico é metabolizada por meio do TCA e do ciclo das pentoses fosfato, o que resulta na perda da maioria da energia metabólica disponível (ALTAMIRANO, 2000). Isto ocorre em função de o fluxo entre a glicólise e o TCA ser baixo em células cultivadas *in vitro* e, assim, a maior parte da glicose é degradada pela via da glicólise seguida da oxidação a piruvato e, finalmente, a lactato. Com isso, apenas 2 mols de ATP são gerados pra cada mol de glicose, em vez de 36 mols de ATP, como ocorre nas células normais *in vivo*. Este comportamento é atribuído em parte à perda da atividade de algumas enzimas que conectam a glicólise ao TCA, tais como piruvato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e piruvato carboxilase (IRANI *et al.*, 1999a; QUEK *et al.*, 2010).

O metabolismo de células animais é muito complexo e flexível. Normalmente, observa-se uma alta desregulação do metabolismo quando as células são cultivadas *in vitro*, com velocidades de consumo dos principais substratos, como glicose e

glutamina, muito mais altas do que seria necessário, trazendo limitações para o cultivo (ALTAMIRANO *et al.*, 2008).

O crescimento e a viabilidade celular não são prejudicados apenas pelo progressivo esgotamento dos nutrientes, mas também pelo efeito negativo decorrente do acúmulo de metabólitos tóxicos, como lactato e amônio. Estes metabólitos tóxicos afetam o pH intracelular e extracelular. O aumento dos níveis de lactato também diminui o crescimento celular devido ao aumento da osmolaridade. Segundo alguns estudos, um aumento da concentração de lactato de 0 a 60 mM leva a um decréscimo de até 40% da produtividade específica (CRUZ *et al.*, 2000a).

O consumo de glicose e a formação de lactato foram avaliados nas diferentes temperaturas de cultivo para os 3 meios analisados (Figuras 22, 23 e 24).

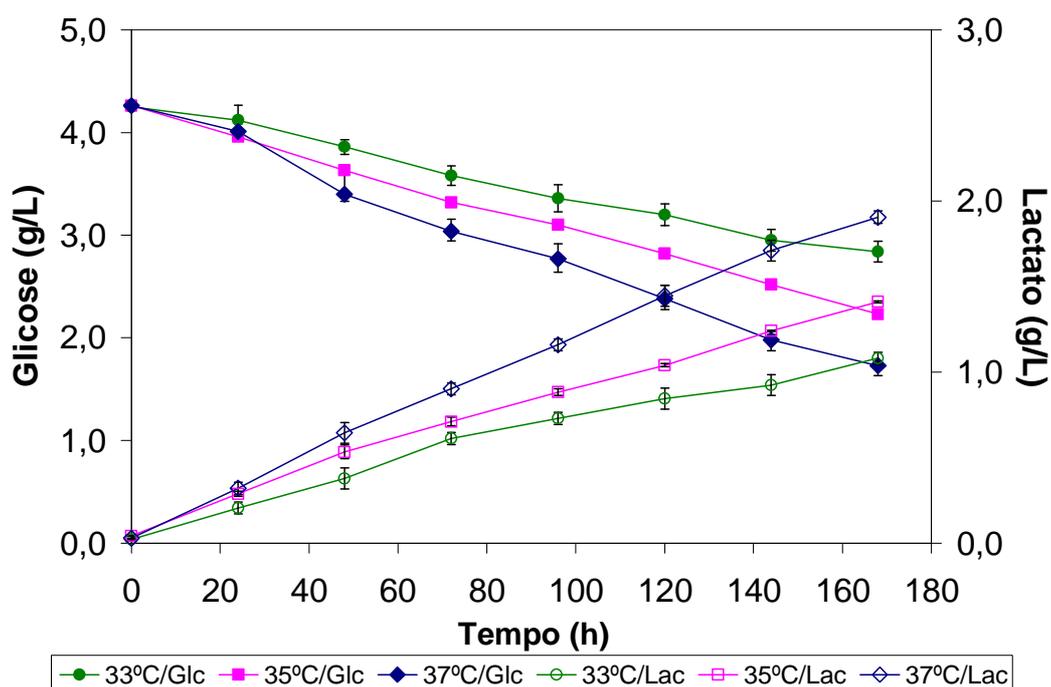


Figura 22: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

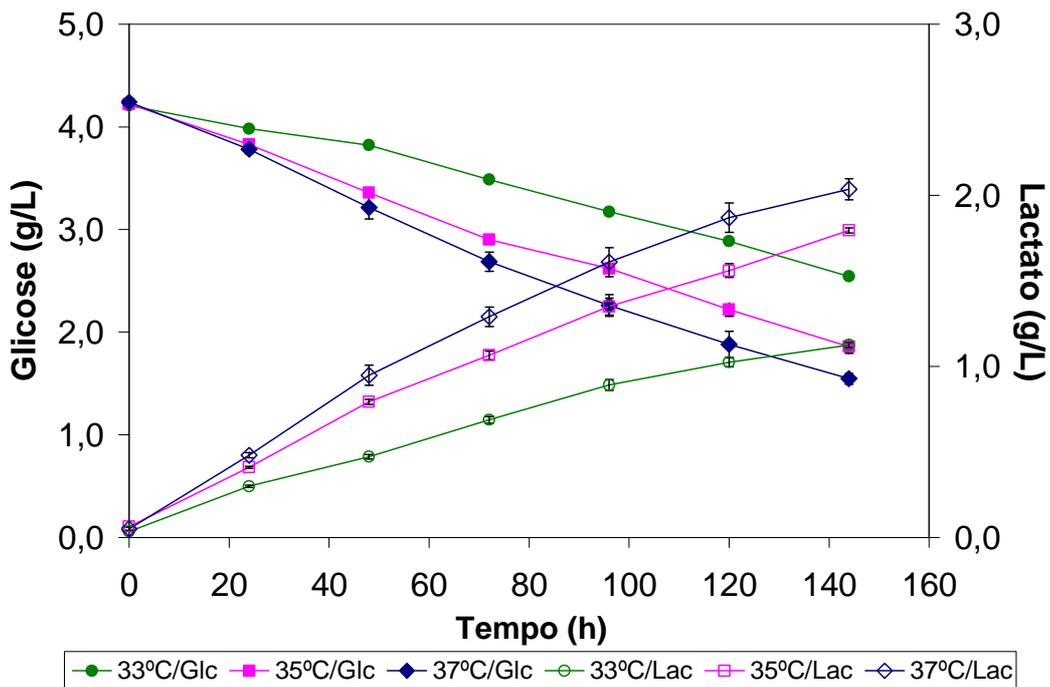


Figura 23: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro indicam 2 experimentos independentes.

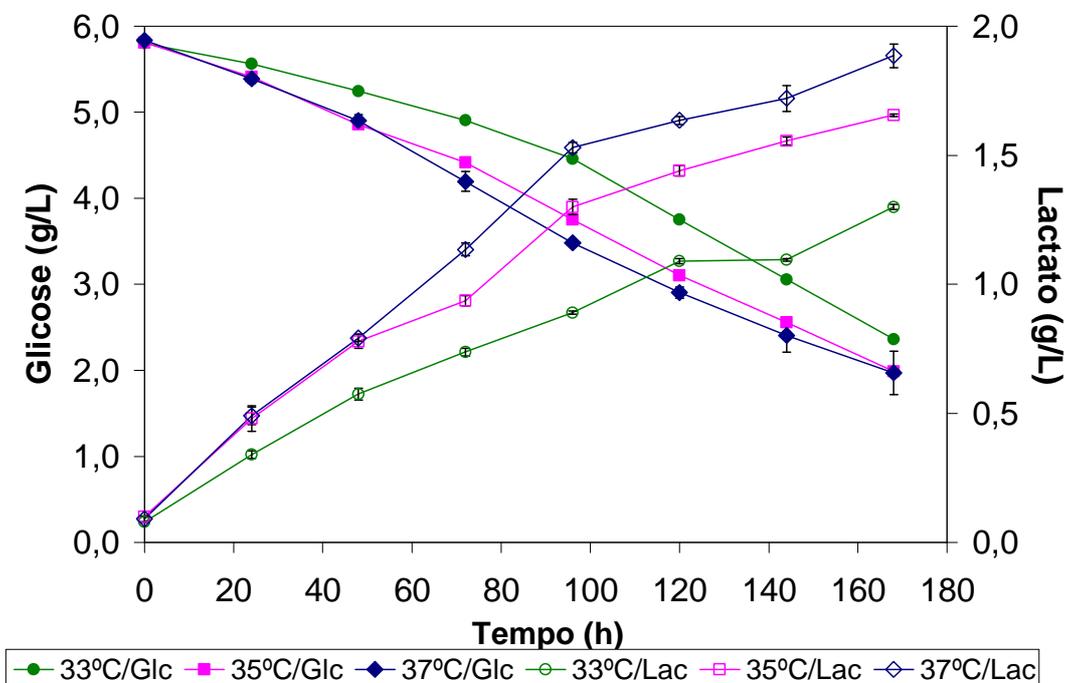


Figura 24: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glicose e formação de lactato no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam uma comparação do consumo de glicose e formação de lactato dos cultivos em diferentes temperaturas nos meios DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*, respectivamente.

Tabela 7: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/\text{glc}}$) e de glicose em lactato ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).

Temperatura	33°C	35°C	37°C
ΔS_{glc} (g L ⁻¹)	1,410 ± 0,075	2,030 ± 0,005	2,530 ± 0,040
$Y_{X/\text{glc}}$ (cel ng ⁻¹)	0,607 ± 0,036	0,729 ± 0,002	0,582 ± 0,010
q_{glc} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-2,444 ± 0,076	-1,500 ± 0,019	-2,335 ± 0,031
q_{lac} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	2,592 ± 0,168	2,112 ± 0,173	2,604 ± 0,180
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ (mol mol ⁻¹)	1,504 ± 0,066	1,348 ± 0,012	1,484 ± 0,026

Tabela 8: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/\text{glc}}$) e de glicose em lactato ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).

Temperatura	33°C	35°C	37°C
ΔS_{glc} (g L ⁻¹)	1,320 ± 0,020	1,600 ± 0,065	1,980 ± 0,046
$Y_{X/\text{glc}}$ (cel ng ⁻¹)	1,282 ± 0,012	1,302 ± 0,032	1,009 ± 0,013
q_{glc} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-1,337 ± 0,019	-1,627 ± 0,036	-1,819 ± 0,065
q_{lac} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	1,661 ± 0,067	2,129 ± 0,140	2,239 ± 0,046
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ (mol mol ⁻¹)	1,650 ± 0,001	2,165 ± 0,013	2,004 ± 0,006

Tabela 9: Variação da concentração de glicose (ΔS_{glc}), fatores de conversão de glicose em células ($Y_{X/\text{glc}}$) e de glicose em lactato ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) e taxas específicas de consumo de glicose (q_{glc}) e formação de lactato (q_{lac}) dos cultivos em diferentes temperaturas no meio *BD Animal Component Free*.

Temperatura	33°C	35°C	37°C
ΔS_{glc} (g L ⁻¹)	2,050 ± 0,020	3,255 ± 0,010	3,430 ± 0,255
$Y_{X/\text{glc}}$ (cel ng ⁻¹)	2,260 ± 0,008	1,552 ± 0,003	1,723 ± 0,102
q_{glc} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-1,104 ± 0,012	-1,056 ± 0,011	-0,936 ± 0,005
q_{lac} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	0,672 ± 0,022	0,840 ± 0,017	0,912 ± 0,009
$Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ (mol mol ⁻¹)	0,709 ± 0,001	0,814 ± 0,000	0,949 ± 0,016

Para todos os meios, foram observados maiores valores de consumo de glicose (ΔS_{glc}) para as maiores temperaturas de cultivo. O fator de conversão de glicose em célula ($Y_{X/\text{glc}}$) foi calculado e cada meio apresentou um perfil diferente quanto à temperatura em que este fator foi maior, mas, a 37°C, os valores de $Y_{X/\text{glc}}$ foram menores para todos os meios. O meio *BD Animal Component Free* apresentou os maiores valores, sendo o maior valor a 33°C, mesmo com o menor crescimento celular nesta temperatura. Isto mostra que o consumo de glicose foi mais eficiente a 33°C.

Além disso, vale ressaltar que, no meio *BD Animal Component Free*, os valores de $Y_{X/\text{glc}}$ foram maiores que nos outros meios analisados, embora o meio apresente maior quantidade de glicose inicial. A concentração celular obtida foi consideravelmente mais alta, tendo propiciado um fator de rendimento mais elevado, mesmo tendo o consumo de glicose sido maior neste meio. Uma possível explicação para a glicose a elevada concentração celular alcançada e para o metabolismo mais equilibrado neste meio poderia ser uma eventual presença de outros açúcares em sua composição, que não é revelada pelo fabricante.

Foi observado para todos os meios analisados que a produção de lactato é maior em temperaturas de cultivo maiores. Estes resultados são esperados em função da formação de lactato estar relacionada ao consumo de glicose, ou seja, quanto maior o consumo de glicose, em geral, maior a formação de lactato. Desta forma, verifica-se que diminuir a temperatura de cultivo tem como vantagem a diminuição da formação deste metabólito tóxico para as células.

Foi calculado também o valor de $Y_{\text{lac}/\text{glc}}$ para os 3 meios nas diferentes temperaturas (Tabelas 7 - 9), embora uma fração da concentração de lactato possa ser formada a partir da glutamina, ou de outros aminoácidos, tais como serina, glicina, alanina e cisteína, via intermediários do TCA (SLIVAC, *et al.*, 2008). Em função da elevada conversão de glicose em lactato observada para a maioria dos cultivos, pode-se concluir que a maior parte do piruvato gerado a partir da glicose vai a lactato e apenas uma pequena fração da glicose é utilizada no TCA e no ciclo das pentoses

para a síntese de metabólitos intermediários essenciais ao crescimento celular, assim como descrito na literatura (ALTAMIRANO, 2000).

ALTAMIRANO *et al.* (2006a), ao avaliar o cultivo de células CHO em meio com diferentes suplementos, tais como vitaminas e aminoácidos, observaram que os valores de $Y_{lac/glc}$ não variaram muito (entre 1,8 e 2,1 mol mol⁻¹), mesmo com a variação dos nutrientes presentes nos meios de cultivo e diferenças na produtividade e no crescimento celular, o que confirma o uso ineficiente da glicose no cultivo *in vitro* de células de mamíferos.

Os valores de $Y_{lac/glc}$ obtidos neste trabalho foram menores do que os apresentados por ALTAMIRANO *et al.* (2006a), em especial, nos cultivos conduzidos em meio *BD Animal Component Free*, que variaram entre 0,71 e 0,95 mol mol⁻¹ nas diferentes temperaturas avaliadas, o que mostra que o metabolismo da glicose foi mais equilibrado neste meio de cultivo.

De acordo com KURANO (1990), para as células CHO, valores acima de 18 mM (1,6 g L⁻¹) de lactato se tornam inibitórios para o crescimento celular. Valores acima de 1,6 g L⁻¹ de lactato foram obtidos em todos os experimentos conduzidos a 37°C e, similarmente ao observado pelo autor, o crescimento celular começou a diminuir quando as concentrações de lactato chegaram nesta faixa de concentração. Adicionalmente, foi demonstrado por KURANO (1990) que o efeito do lactato sobre o crescimento celular se deve ao seu caráter ácido, que pode diminuir o pH, e ao aumento da osmolaridade do meio.

CRUZ *et al.* (1999a) avaliaram as mudanças no metabolismo de células BHK através da manipulação de nutrientes (glicose e glutamina) em cultivos contínuos e observaram que, em baixas concentrações de glicose, a formação de lactato a partir de glicose diminuiu muito, da mesma forma que a conversão de glicose em células aumentou.

ALTAMIRANO *et al.* (2006b) analisaram o consumo de lactato no cultivo de células CHO em presença de glicose e galactose. Os resultados mostraram que a

glicose é completamente consumida, com concomitante formação de lactato. No entanto, após o esgotamento da glicose, as células passam a consumir galactose e a metabolizar o lactato gerado, diminuindo a concentração deste metabólito tóxico para as células e mantendo o crescimento celular.

5.3.3 – Consumo de Glutamina e Formação de Amônio

Outro substrato importante para o cultivo de células animais é a glutamina. Por isso, o perfil de consumo de glutamina foi avaliado para os 3 meios analisados nas diferentes temperaturas (Figuras 25, 26 e 27). Também foi avaliada a formação de amônio, visto que esta substância é um metabólito tóxico derivado do metabolismo e, também, da degradação térmica da glutamina.

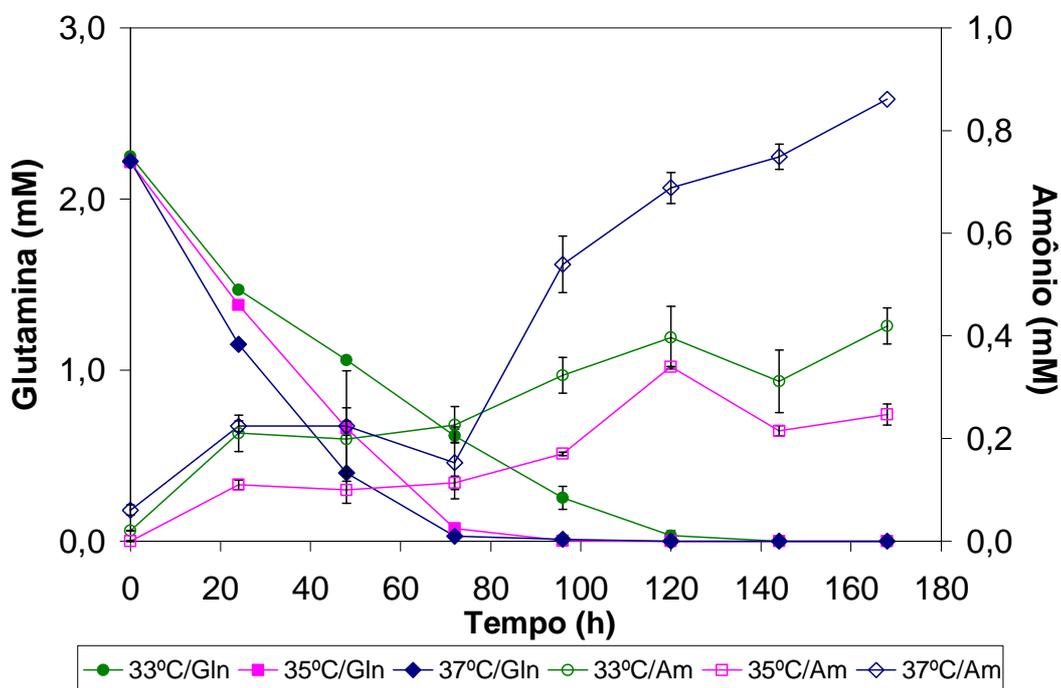


Figura 25: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio na mistura (1:1) nos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

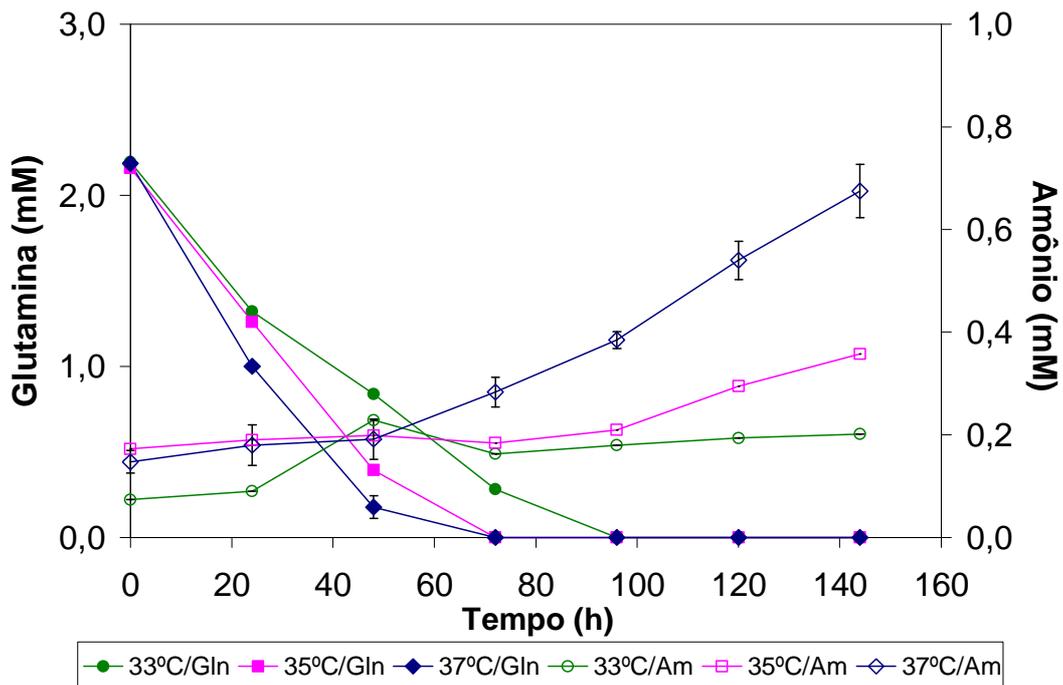


Figura 26: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio na mistura (1:1) nos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB). Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

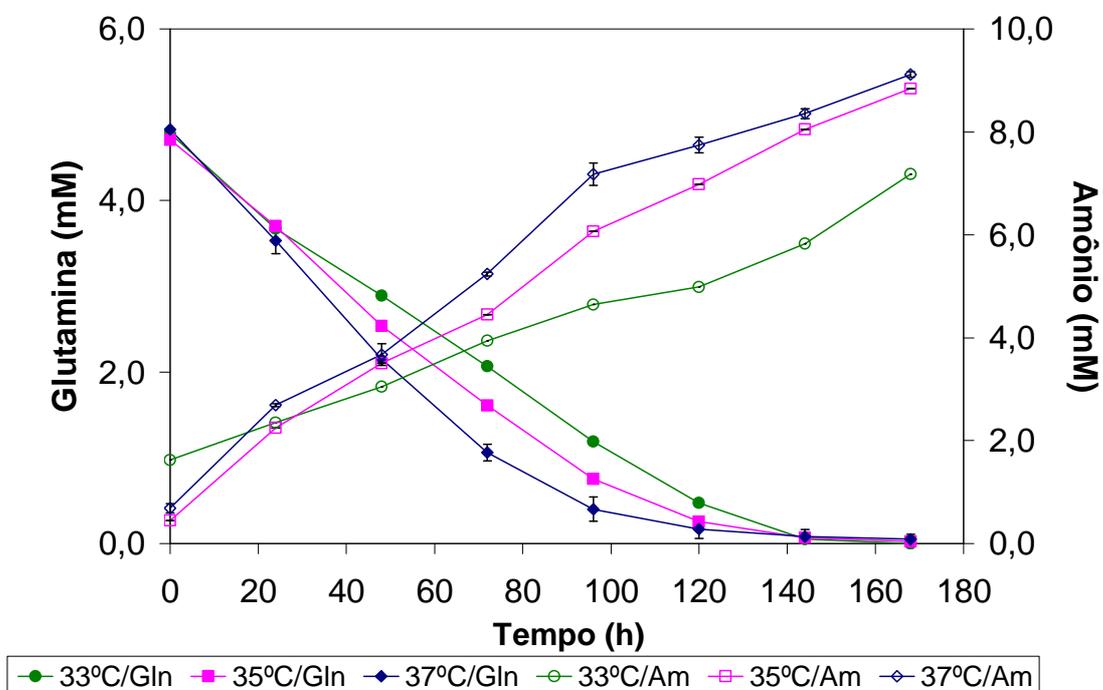


Figura 27: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamina e formação de amônio no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

A glutamina também é usada pela célula para formação de biomassa e produção de outros aminoácidos. O catabolismo da glutamina ocorre na matriz mitocondrial via glutaminase por meio de sua conversão a glutamato e liberação de uma molécula de amônio (CRUZ *et al.*, 1999a). O glutamato é convertido a α -cetogluturato (metabólito do TCA) através de 2 vias:

- Via da glutamato desidrogenase, gerando outra molécula de amônio;
- Via da glutamato aminotransferase, transferindo o grupo amino para o piruvato ou oxaloacetato, com a formação de alanina ou aspartato.

Nas células cultivadas *in vitro* com elevadas concentrações iniciais de glutamina, a segunda via é normalmente a predominante. No entanto, quando as concentrações de glutamina são menores que 1 mM, a primeira via se torna a preferencial, levando a um metabolismo da glutamina energeticamente mais eficiente (CRUZ *et al.*, 2000b), porém com maior formação de amônio.

Como já mencionado anteriormente, um problema associado ao elevado consumo de glutamina durante o cultivo de células de mamíferos é a geração de amônio. O acúmulo de amônio afeta o gradiente eletroquímico celular, levando à acidificação do citoplasma e ao aumento do gasto de energia para manter o pH celular. O amônio também pode induzir a apoptose em células em cultivo (CRUZ *et al.*, 2000a). Além disso, BUTLER & SPIER (1984) avaliaram os efeitos da utilização de glutamina e da produção de amônio no crescimento de células BHK e observaram que concentrações acima de 2 mM de amônio são tóxicas para as células e afetam negativamente a formação de produto.

As Tabelas 10, 11 e 12 apresentam uma avaliação comparativa do consumo de glutamina e formação de amônio nos cultivos em diferentes temperaturas nos meios DMEM/F12, DMEM/F12/SFB e *BD Animal Component Free*, respectivamente.

Tabela 10: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{x/\text{gln}}$) e de glutamina em amônio ($Y_{\text{Am}/\text{gln}}$) e taxas específicas de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).

<i>Temperatura</i>	33°C	35°C	37°C
ΔS_{gln} (mmol L ⁻¹)	2,215 ± 0,010	2,215 ± 0,005	2,215 ± 0,110
q_{gln} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-0,672 ± 0,026	-0,552 ± 0,016	-0,576 ± 0,000
q_{Am} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	0,072 ± 0,003	0,048 ± 0,001	0,192 ± 0,013
$Y_{x/\text{gln}}$ (cel mmol ⁻¹)	0,386 ± 0,002	0,669 ± 0,002	0,665 ± 0,033
$Y_{\text{Am}/\text{gln}}$ (mol mol ⁻¹)	0,097 ± 0,000	0,111 ± 0,000	0,311 ± 0,006

Tabela 11: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{x/\text{gln}}$) e de glutamina em amônio ($Y_{\text{Am}/\text{gln}}$) e taxas específicas de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).

<i>Temperatura</i>	33°C	35°C	37°C
ΔS_{gln} (mmol L ⁻¹)	2,185 ± 0,005	2,185 ± 0,010	2,185 ± 0,004
q_{gln} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-0,456 ± 0,005	-0,528 ± 0,005	-0,432 ± 0,024
q_{Am} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	0,024 ± 0,003	0,024 ± 0,001	0,048 ± 0,005
$Y_{x/\text{gln}}$ (cel mmol ⁻¹)	0,771 ± 0,002	0,964 ± 0,004	0,915 ± 0,001
$Y_{\text{Am}/\text{gln}}$ (mol mol ⁻¹)	0,021 ± 0,000	0,029 ± 0,000	0,109 ± 0,033

Tabela 12: Variação da concentração de glutamina (ΔS_{gln}), fatores de conversão de glutamina em células ($Y_{x/\text{gln}}$) e de glutamina em amônio ($Y_{\text{Am}/\text{gln}}$) e taxas específicas de consumo de glutamina (q_{gln}) e formação de amônio (q_{Am}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio *BD Animal Component Free*.

<i>Temperatura</i>	33°C	35°C	37°C
ΔS_{gln} (mmol L ⁻¹)	4,304 ± 0,000	4,634 ± 0,010	4,747 ± 0,000
q_{gln} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	-0,360 ± 0,001	-0,336 ± 0,014	-0,264 ± 0,002
q_{Am} (pmol cel ⁻¹ d ⁻¹)	0,432 ± 0,014	0,384 ± 0,010	0,360 ± 0,032
$Y_{x/\text{gln}}$ (cel mmol ⁻¹)	1,077 ± 0,006	1,090 ± 0,006	1,245 ± 0,014
$Y_{\text{Am}/\text{gln}}$ (mol mol ⁻¹)	0,780 ± 0,007	1,379 ± 0,009	1,405 ± 0,012

A glutamina foi praticamente esgotada em todos os experimentos. Avaliando-se os valores de coeficiente de conversão de glutamina em células viáveis ($Y_{x/\text{gln}}$),

observa-se que a conversão de glutamina em células foi maior para o meio *BD Animal Component Free*, contribuindo para que o maior crescimento celular observado em cultivos conduzidos neste meio de cultivo.

O completo esgotamento de glutamina nos cultivos analisados correspondeu ao término do crescimento celular. Ou seja, quando as concentrações de glutamina caíram a níveis nulos nos meios de cultivos analisados, observou-se que as células pararam de crescer, o que mostra que este substrato pode ser considerado como um fator limitante para o cultivo das células BHK analisadas.

De acordo com SLIVAC *et al.* (2008), para as células CCO (*channel catfish ovary*), a glutamina é considerada a principal fonte de energia para o metabolismo e crescimento celular, tendo em vista que em seus experimentos, com a depleção de glutamina, as células pararam de crescer, enquanto que, com a depleção de glicose, houve apenas uma diminuição na taxa de crescimento celular. Além de estimular o crescimento celular, a glutamina reduz o consumo de glicose (SLIVAC *et al.*, 2010).

Foram calculados os valores do fator de conversão de glutamina em amônio ($Y_{Am/gln}$) para os 3 meios nas diferentes temperaturas. De acordo com os valores de $Y_{Am/gln}$ apresentados e com as Figuras 25, 26 e 27, pode-se observar que houve maior conversão de glutamina em amônio em temperaturas mais elevadas. Estes resultados são esperados, visto que a produção de amônio está relacionada ao consumo de glutamina. Entretanto, observou-se que a formação de amônio foi significativamente mais elevada para o meio *BD Animal Component Free* (aproximadamente 10 vezes maior), embora a concentração inicial de glutamina neste meio fosse apenas cerca de duas vezes superior aos meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB.

Para evitar a produção de altos níveis de amônio, o glutamato pode ser utilizado como substituto da glutamina para a obtenção de α -cetoglutarato, com a vantagem de liberar menos amônio no meio (Figura 28). No entanto, nem todas as linhagens celulares se adaptam ao cultivo com esta substituição (HASSELL & BUTLER, 1990).



Figura 28: Reação de metabolização da glutamina e do glutamato. Fonte: COX & NELSON (2006).

ALTAMIRANO *et al.* (2006b) reportaram a substituição, com êxito, de glutamina por glutamato no cultivo de células CHO, tendo em vista que o glutamato é consumido de forma mais eficiente, produzindo menor acúmulo de amônio e aumentando a viabilidade celular.

CRUZ *et al.* (1999a) estudaram as mudanças no metabolismo de células BHK através da manipulação dos substratos glicose e glutamina em cultivos contínuos. Os autores observaram que nos cultivos conduzidos com baixas concentrações de glutamina, a conversão de glutamina em células aumentou, levando a um metabolismo de glutamina mais eficiente.

5.3.4 – Formação de Produto

No desenvolvimento de um processo eficiente de produção de biofármacos, busca-se maximizar a formação de produto, mantendo-se a qualidade do produto e minimizando o tempo e o custo do processo. Sabe-se que o cultivo a baixas temperaturas leva a uma elevada viabilidade celular, porém o efeito da diminuição da temperatura sobre a produtividade específica depende da linhagem celular e da proteína a ser obtida (FOGOLÍN *et al.*, 2005).

A seguir, são mostrados os dados referentes à concentração de FVIII obtida em cada meio em diferentes temperaturas (Figuras 29, 30 e 31). A concentração de FVIII foi avaliada em diferentes tempos de cultivo.

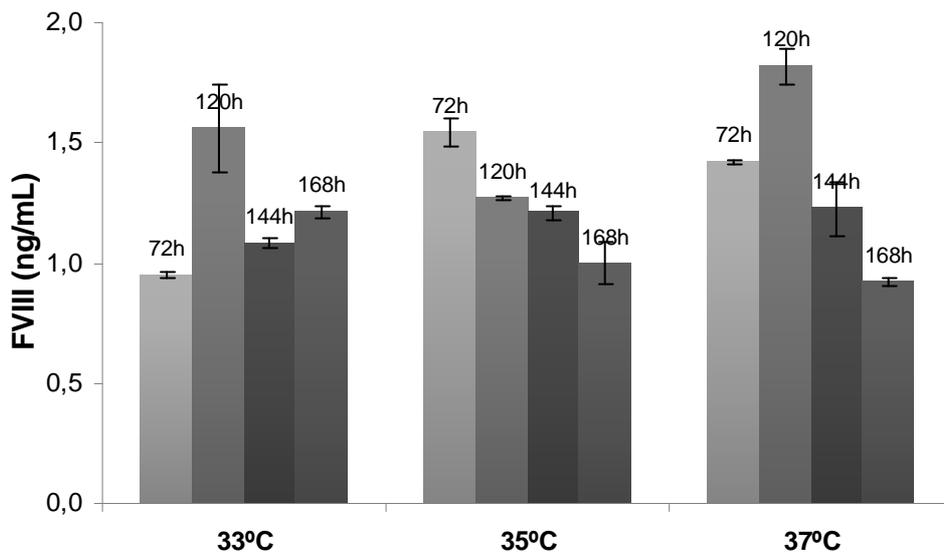


Figura 29: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12).

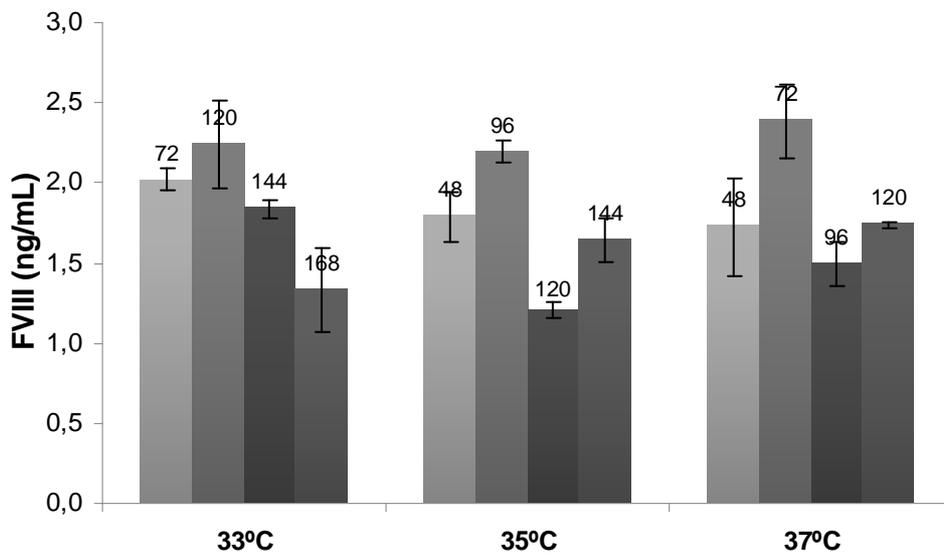


Figura 30: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII na mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB).

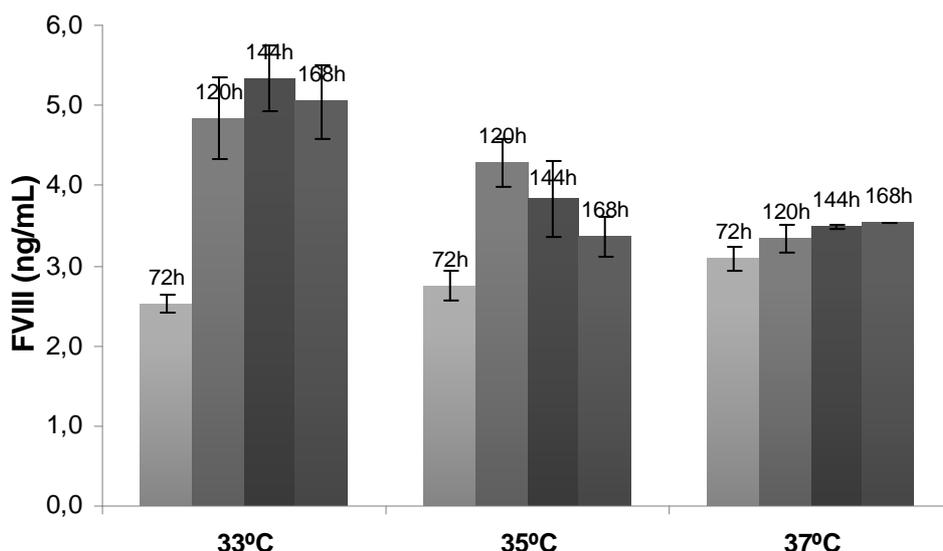


Figura 31: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a concentração de FVIII no meio *BD Animal Component Free*.

Os valores de concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) são apresentados nas Tabelas a seguir (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 13: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com a mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 (DMEM/F12) em diferentes temperaturas.

Temperatura	33°C	35°C	37°C
$FVIII_{max}$ (ng mL⁻¹)	1,56 ± 0,179	1,54 ± 0,059	1,81 ± 0,073
$Y_{P/glc}$ (ng μmol⁻¹)	0,20 ± 0,066	0,14 ± 0,002	0,17 ± 0,012
$Y_{P/gln}$ (ng μmol⁻¹)	0,70 ± 0,003	0,70 ± 0,002	0,82 ± 0,041
$Y_{P/X}$ (10⁻³ pg cel⁻¹)	2,81 ± 0,090	1,37 ± 0,046	1,62 ± 0,019

Tabela 14: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com a mistura (1:1) dos meios DMEM e Ham's F12 suplementada com 1% de SFB (DMEM/F12/SFB) em diferentes temperaturas.

Temperatura	33°C	35°C	37°C
$FVIII_{max}$ (ng mL⁻¹)	2,24 ± 0,272	2,20 ± 0,073	2,38 ± 0,227
$Y_{P/glc}$ (ng μmol⁻¹)	0,31 ± 0,016	0,25 ± 0,024	0,22 ± 0,013
$Y_{P/gln}$ (ng μmol⁻¹)	1,02 ± 0,002	1,02 ± 0,005	1,09 ± 0,002
$Y_{P/X}$ (10⁻³ pg cel⁻¹)	1,77 ± 0,144	1,47 ± 0,066	1,55 ± 0,019

Tabela 15: Concentração máxima de FVIII ($FVIII_{max}$), fatores de conversão de glicose em produto ($Y_{P/glc}$), de glutamina em produto ($Y_{P/gln}$) e de célula em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos experimentos com o meio *BD Animal Component Free* em diferentes temperaturas.

Temperatura	33°C	35°C	37°C
$FVIII_{max}$ (ng mL⁻¹)	5,34 ± 0,404	4,29 ± 0,296	3,53 ± 0,006
$Y_{P/glc}$ (ng mol⁻¹)	0,47 ± 0,009	0,24 ± 0,003	0,19 ± 0,061
$Y_{P/gln}$ (ng mol⁻¹)	1,24 ± 0,007	0,93 ± 0,005	0,74 ± 0,008
$Y_{P/X}$ (10⁻³ pg cel⁻¹)	1,26 ± 0,019	0,92 ± 0,011	0,64 ± 0,037

A partir da análise da Figura 29 e da Tabela 13, observa-se que a $FVIII_{max}$ obtida ao final do processo de cultivo a 37°C (1,81 ng mL⁻¹ – 120 h) em meio DMEM/F12 foi maior que a 35°C (1,54 ng mL⁻¹ – 72 h) e a 33°C (1,56 ng mL⁻¹ – 120 h). No entanto, outros parâmetros como $Y_{P/glc}$ e $Y_{P/X}$ foram mais satisfatórios para os cultivos em temperaturas menores, especialmente a 33°C.

Para o meio DMEM/F12/SFB (Figura 30 e Tabela 14), pode-se observar que a $FVIII_{max}$ obtida no processo de cultivo do meio DMEM/F12/SFB é maior a 37°C (2,38 ng mL⁻¹ – 96 h) do que nos outros cultivos conduzidos a 35°C (2,20 ng mL⁻¹ – 96 h) e a 33°C (2,24 ng mL⁻¹ – 96 h). Apesar de se ter menor crescimento celular e valor de μ inferior no cultivo a 33°C, esta temperatura levou a um valor de $Y_{P/X}$ mais elevado. Além disso, o valor de $Y_{P/glc}$ foi mais elevado para o cultivo a 33°C.

Pode-se observar que a concentração de $FVIII_{max}$ obtida no processo de cultivo foi maior a 33°C (5,34 ng mL⁻¹ – 144 h) e menor a 37°C (3,53 ng mL⁻¹ – 168 h) no meio *BD Animal Component Free*, enquanto o cultivo a 35°C apresentou um valor intermediário (4,29 ng mL⁻¹ – 120 h) (Figura 31 e Tabela 13). No cultivo a 33°C, assim como foi observado nos experimentos com DMEM/F12 suplementado ou não com SFB, o crescimento celular e o valor de μ foram inferiores. No entanto, nesta temperatura, o cultivo apresentou o maior valor de $Y_{P/X}$. Além disso, os valores de $Y_{P/glc}$ e $Y_{P/gln}$ foram 68% e 147% maiores que os obtidos a 37°C, respectivamente.

Para todos os meios analisados, a temperatura de 33°C apresentou os melhores valores de $Y_{P/glic}$ e $Y_{P/X}$. Além disso, apesar das menores concentrações celulares, no meio *BD Animal Component Free* a concentração de FVIII obtida foi maior a 33°C.

Poucas empresas produzem FVIII e, em geral, os dados são sigilosos e os métodos de quantificação empregados são variados, o que dificulta a comparação da produção de FVIII em células BHK com outros trabalhos. CHO *et al.* (2000) obtiveram a produtividade específica de FVIII de $0,45 \mu\text{U cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ a partir do cultivo de células BHK em meio livre de soro. Nos estudos de CHAN & HARRIS (1998) com meios suplementados com “Pluronic F-68”, cobre e outros metais, a produtividade específica de FVIII em cultivos contínuos de células BHK variou de $0,026$ a $0,104 \mu\text{U cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Em células BHK-21, obteve-se $10 \mu\text{UI cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o FVIII suíno com domínio B deletado (DOORISS *et al.*, 2009).

Como exemplo de produção de FVIII em outras linhagens celulares, pode-se citar CHEN *et al.* (1999), que obtiveram $0,09 \mu\text{UI mL}^{-1} \text{ cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o FVIII completo e de $0,4 \mu\text{UI mL}^{-1} \text{ cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para o FVIII com domínio B deletado em células COS-7 (CHEN *et al.*, 1999). Também foram reportados valores de $1,6 \text{ fg cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em células PA317, $0,9 \text{ fg cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em células NIH-3T3 e $39 \text{ fg cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em células DHF 1-85 (LYNCH *et al.*, 1993).

RASMUSSEN (1991) mostrou que a produção de rFVIII a partir do cultivo de células CHO é maior quando conduzido em temperaturas menores que 32°C e o tempo de residência do FVIII no meio de cultivo menor que 24h. Foi observado que estes dois efeitos combinados (temperatura e tempo de residência) podem levar a um aumento de 25 vezes na produção da cadeia pesada do FVIII. Isto pode estar relacionado à instabilidade do rFVIII em condições normais de cultivo, visto que, conforme demonstrado pelo autor, a 37°C, a cadeia pesada do FVIII forma agregados e perde a afinidade pela cadeia leve do FVIII. GIOVAGNOLI *et al.* (2009) observaram que houve um aumento de cerca de 22% na produtividade volumétrica de FVIII ao se diminuir a temperatura de cultivo de células CHO ou BHK de 37°C para 36°C.

Diferentes estudos mostraram que a redução da temperatura no cultivo de células pode levar a uma maior obtenção de produto devido a alterações no ciclo celular, retardamento do processo de apoptose, reorganização do citoesqueleto, variação na síntese de mRNA, dentre outros. No entanto, não há um consenso sobre o efeito da redução da temperatura no cultivo de células. Embora o metabolismo primário seja consideravelmente reduzido com a redução da temperatura, os níveis de produto obtidos têm variado de acordo com a célula e a proteína em questão (BECERRA *et al.*, 2012).

Considerando-se que a maioria dos estudos se refere a células CHO e não há um entendimento único entre os pesquisadores, o estudo da melhor temperatura de cultivo para a produção de biofármacos é fundamental.

Sabe-se que, sendo o FVIII a maior proteína atualmente em uso na forma recombinante, seu nível de produção é muito baixo quando comparado a outras proteínas (GABER *et al.*, 2000). A expressão de FVIII em células de mamíferos é cerca de 2 - 3 ordens de magnitude menor que a observada com outros genes, empregando vetores similares, sendo a produtividade de FVIII em linhagens celulares em média 0,1 - 4 pg cel⁻¹ dia⁻¹ em escala industrial (CHO *et al.* 2000).

A limitação da expressão do FVIII pode ser atribuída a três razões principais: a falta de um transporte adequado da molécula prematura entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi; os altos níveis de fator de von Willebrand requeridos para estabilização do produto; e a interação com a chaperona Bip (*immunoglobulin binding protein*), o que dificultaria a secreção, uma vez que, para que ocorra a liberação do FVIII da Bip, são necessárias elevadas concentrações intracelulares de ATP (BLOND-ELGUINDI *et al.*, 1993).

Devido ao baixo rendimento, o desenvolvimento de um processo eficiente em larga escala para produção de FVIII em células animais se torna difícil e demorado, devendo-se considerar também que a molécula apresenta uma baixíssima estabilidade, mesmo no corpo humano (BOEDEKER, 1992).

Desta forma, para o desenvolvimento de tecnologias viáveis do ponto de vista econômico e de processo para a produção de rFVIII, são necessários extensivos estudos visando a otimização dos passos para obtenção da linhagem celular produtora, do processo de cultivo e do processo de purificação. Somente a congregação de avanços nestas áreas permitirá superar as dificuldades inerentes associadas à dificuldade de expressão, à elevada massa molar e à instabilidade da proteína FVIII humano.

5.4 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE FVIII

Como as moléculas de FVIII são termolábeis (REVEL-VILK *et al.*, 2009; FAY & WAKABAYASHI, 2009), analisou-se a degradação térmica de FVIII a 33°C e a 37°C para avaliar se a maior concentração de FVIII obtida a 33°C se deve à maior produção ou à menor degradação térmica das moléculas de FVIII nesta temperatura.

A estabilidade *in vitro* do FVIII é afetada por alguns fatores, tais como temperatura, presença de íons metálicos, sais, lipídios ou outros excipientes, adsorção superficial, pH, agitação, exposição à luz, congelamento/descongelamento/liofilização e condições de armazenamento e embalagem (WANG *et al.*, 2003).

Concentrados de FVIII também sofrem degradação após serem diluídos devido à força iônica da solução e ao material do recipiente de estocagem. KESSLER *et al.* (2005) mostraram que há redução de aproximadamente 75% da atividade coagulante de rFVIII em 24h no organismo humano. Por exemplo, rFVIII (Kogenate-FS), quando diluído 10 vezes em solução salina, em temperatura ambiente, teve perda de 80% da atividade coagulante em 24h (REVEL-VILK *et al.*, 2009).

FAY & WAKABAYASHI (2009) analisaram a estabilidade de diferentes moléculas de rFVIII a 55°C e observaram uma perda em torno de 80% da atividade coagulante em 25 minutos.

No presente trabalho, para análise da estabilidade térmica, rFVIII comercial foi diluído em meio *BD Animal Component Free* e aliqotado em microtubos plásticos. Parte das alíquotas foi mantida a 33°C e parte a 37°C. Foi observado que, após 24h, aproximadamente 90% da atividade de FVIII foi perdida tanto nas amostras mantidas a 33°C quanto a 37°C (Tabela 16). Contudo, a degradação de FVIII foi 11% maior a 37°C, o que confirma a instabilidade térmica do FVIII. A formação aparente de FVIII a 37°C foi 33,2% menor do que a 33°C (Tabela 16), então esta diferença é parcialmente devido à degradação térmica. Assim, pode-se afirmar que a 33°C tanto a produção de FVIII é maior como a degradação térmica é menor.

Tabela 16: Concentração de FVIII em meio *BD Animal Component Free* em diferentes temperaturas após incubação de 24 horas.

Temperatura	Inicial	33°C (após 24h)	37°C (após 24h)
FVIII (UI mL⁻¹)	0,0616	0,0056	0,0050

Também foram mantidas alíquotas de FVIII a 33°C e 37°C durante 48h e 72h, no entanto, não foi detectada atividade coagulante nestas alíquotas. Ou seja, as alíquotas de FVIII não apresentaram atividade após incubação por estes períodos mais longos.

Cabe ressaltar que, levando-se em consideração a elevada instabilidade do FVIII, o modo de operação empregado nos experimentos (cultivo em batelada) não é adequado. Neste caso, o ideal para a produção de FVIII é o emprego do cultivo em perfusão que, embora seja mais complexo que os demais modos de operação, permite que sejam alcançadas maiores produtividades volumétricas em função do menor tempo de residência, ideal para a produção de moléculas lábeis. Além disso, o modo de operação em perfusão (cultivo contínuo com retenção de células) possibilita a otimização do processo através da manipulação da composição do meio de cultivo, estratégia de alimentação e remoção controlada de células (CHICO et al., 2008).

Sendo assim, os dados sobre a degradação térmica do FVIII corroboram para a escolha do cultivo em perfusão como o mais adequado para a produção de FVIII a partir do cultivo de células BHK, pois permite que a molécula de FVIII seja recuperada mais rapidamente do cultivo, evitando que haja a degradação da mesma.

5.5 – AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO

Sabendo-se que a maior produção de FVIII foi obtida nos cultivos em menores temperaturas no meio *BD Animal Component Free*, avaliou-se o consumo e a produção dos principais aminoácidos com o objetivo de se conhecer o que ocorre com o metabolismo dos aminoácidos nas diferentes temperaturas estudadas, levando-se em conta as diferenças observadas no crescimento celular e produtividade em cada condição.

CRUZ *et al.* (1999a), em seu estudo sobre as mudanças no metabolismo de células BHK por meio da manipulação dos substratos glicose e glutamina nos meios de cultivo, observaram que, quando os cultivos foram conduzidos com baixas concentrações iniciais de glicose e glutamina, a maioria dos aminoácidos teve seu consumo aumentado. Isto ocorre, provavelmente, para que sejam mantidos os níveis de intermediários metabólicos que diminuem quando há escassez de glicose e glutamina, visto que muitos aminoácidos (histidina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, leucina, isoleucina, arginina, triptofano e lisina) podem ser oxidados a piruvato, acetil-CoA e intermediários do TCA (MILLER *et al.*, 1989).

De acordo com ALTAMIRANO *et al.* (2000), um maior consumo de aminoácidos está associado ao aumento dos requerimentos para biossíntese ou à menor disponibilidade de glicose, dado que o catabolismo de aminoácidos leva à formação de intermediários do TCA e da glicólise. Desta forma, o aumento do consumo de

aminoácidos pode ser interpretado como uma alternativa para fornecer os intermediários metabólicos.

Alguns estudos mostram que os aminoácidos essenciais (arginina, cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, treonina e valina) são unicamente usados para biossíntese, visto que, através do cálculo das taxas de consumo destes aminoácidos, foi observado que toda a demanda estimada foi direcionada para a síntese de biomassa e o crescimento celular (QUEK *et al.*, 2010).

A sequência de aminoácidos presentes no FVIII humano está descrita abaixo (FAY & WAKABAYASHI, 2009), e as respectivas abreviaturas e frequência relativa estão mostradas na Tabela 17. A partir da quantidade de cada aminoácido na proteína, é possível inferir sobre a demanda dos aminoácidos para a síntese de FVIII.

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSWYKKTTFVFEFTVHLFNI AKPRPPW MGL
LGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHYVWQVL
KENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKPILLFAVFDGKSWHSE
TKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVWRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNT
HRQASLEISPIITFLTAQTLMDLGQFLLGCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDWRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYPALVLPAPDDRSYKSYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTHLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL
PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQ
RGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTEUIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCL
HEVAYWYILSIGAQTFDLSVFFSGYTFKHKMVYEDTTLTFPFSGETVFMENPGLWILGCHUSDFRHRG
MTALLKVVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD
WFAHRTPMPKIQNVSSDMLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFDSPGAI DSNNSLSEMTFRPQL
HSGDMVFTPE SGLQLRLNEKLGTTAATELKLDFKVSSTSNULISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPV
HYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKINVSSTESGRLFKGKRAHGP
ALLTKDNALFKVVISLTKTKTSMNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRML
MDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSG
QGSPKQLVSLGPEKSVGEQUFLSEKNKVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRHLFLTNLDNLHENU THHQE
KIOEEIEKKETLIQENWLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYEGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKK
HTAHFSKKGEEENLEGLG1TQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRII
VDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQAURSPLPIAKVSSFP SIRPI
YLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTY
KKVENTVLPKPDLPKTSKGVLELLPKVHIYQKDLFPETSNNGSPGHLELVEGSLLOGTGEGAIKWNEANRPG
KVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQUPKEEWSQEKSPKTAFAKKKDTILSLNACESNHAI
INEGQNKPEIEVTWASQGRTERLCSQNPVLRHQREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDPDIYDE
DENQSPRSPQKTRHYPIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKWFQEFDTGDSFTQPLYR
EHLGLLGPYIRAEVEDNIMNTFRNQASRPYSFYSSLISYEDQRQGAEPKRNFKPNETKTYFWKQVHHM
APTDFEDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLHPAHGRQVTVQEFALPPTIPDET
KSWYPTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMG
SNENIHSIHFSGHVF TVRKKEEYKALYULYPGVFETVMELPSKAGIWRVEVLIGEHLHAGMSTLFLV
YSUKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI
IHGIKTQGARQKFFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG
IKHNI FNPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNS CSMPLGMESECAISDAQIT
ASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVMNPKEWLQVDPQKTMKVTG VTTQGVK
SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL
LTRYLRISPQS WWHQIALRMEVLGCEAQDLY

Tabela 17: Composição de aminoácidos da sequência proteica do FVIII.

Aminoácido	Símbolo	Quantidade	Porcentagem (%)
Alanina	A Ala	110	4,72
Cisteína	C Cys	23	0,99
Aspartato	D Asp	120	5,15
Glutamato	E Glu	148	6,35
Fenilalanina	F Phe	105	4,50
Glicina	G Gly	130	5,57
Histidina	H His	75	3,22
Isoleucina	I Ile	109	4,67
Lisina	K Lys	158	6,78
Leucina	L Leu	218	9,35
Metionina	M Met	60	2,57
Asparagina	N Asn	125	5,36
Prolina	P Pro	128	5,49
Glutamina	Q Gln	109	4,67
Arginina	R Arg	101	4,33
Serina	S Ser	217	9,31
Treonina	T Thr	154	6,60
Valina	V Val	126	5,40
Triptofano	W Trp	37	1,59
Tirosina	Y Tyr	79	3,39
Total		2332	100,00

Foram analisados experimentalmente alguns destes aminoácidos com o objetivo de entender quais são os mais importantes para o cultivo das células BHK e a produção de FVIII nas condições estudadas. A Tabela 18 e a Figura 32 mostram as

taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) obtidas nos cultivos no meio *BD Animal Component Free* nas diferentes temperaturas. Os valores de q_{aa} também foram calculados para os meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB para o cultivo em diferentes temperaturas de cultivo e encontram-se descritos no ANEXO IV.

Tabela 18: Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio *BD Animal Component Free*.

q_{aa} (nmol cel ⁻¹ h ⁻¹)	33°C	35°C	37°C
Asparagina	-1,49 ± 0,015	-1,535 ± 0,075	-0,623 ± 0,005
Metionina	-0,330 ± 0,020	-0,370 ± 0,027	-0,180 ± 0,007
Valina	-0,896 ± 0,145	-0,579 ± 0,004	-0,432 ± 0,013
Aspartato	-5,340 ± 0,471	-2,935 ± 0,216	-1,515 ± 0,005
Serina	-5,025 ± 0,055	-4,095 ± 0,065	-2,695 ± 0,276
Glutamato	-5,870 ± 0,612	-3,395 ± 0,005	-2,850 ± 0,130
Leucina	-3,05 ± 0,075	-2,145 ± 0,055	-0,657 ± 0,000
Glicina	2,305 ± 0,005	1,250 ± 0,020	0,945 ± 0,065
Prolina	1,965 ± 0,085	1,465 ± 0,115	0,984 ± 0,076
Alanina	5,759 ± 0,677	6,054 ± 0,321	7,967 ± 0,119

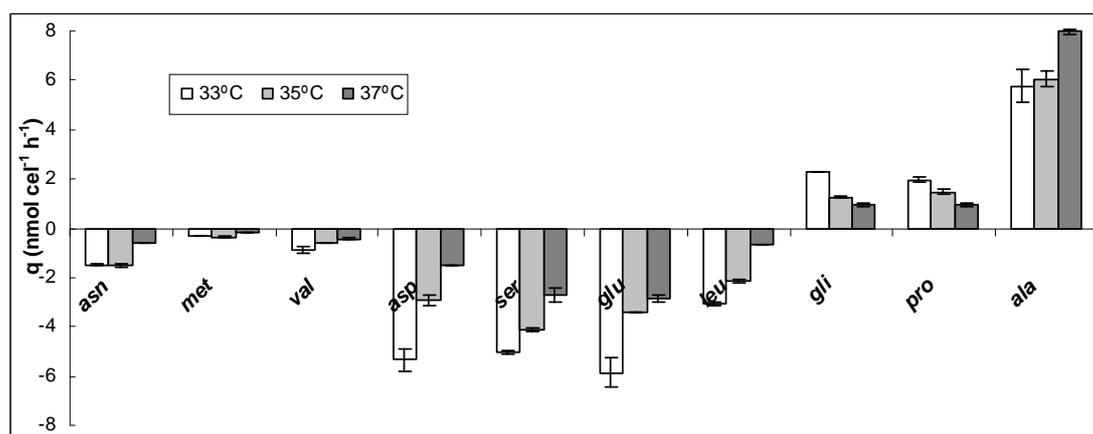


Figura 32: Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio *BD Animal Component Free*.

Os dados da Tabela 18 e da Figura 32 mostram que a demanda de cada aminoácido varia tanto em função do aminoácido em si quanto em função da temperatura de cultivo. Isto significa que há mudanças significativas no metabolismo celular quando a temperatura de cultivo é alterada. Assim como ocorreu no presente trabalho, nos experimentos conduzidos por CRUZ *et al* (1999a) com células BHK, a maioria dos aminoácidos analisados foram consumidos, mas alanina e prolina foram produzidas.

De uma forma geral, os cultivos conduzidos em menores temperaturas levaram a uma maior utilização de aminoácidos consumidos (Asn, Asp, Met, Val, Ser, Leu, Glu). Isto pode ser explicado pelo fato de em temperaturas menores ter ocorrido maior síntese proteica, justificando a maior demanda de aminoácidos. Além disso, a maioria dos aminoácidos analisados podem ser oxidados a acetil CoA e intermediários do TCA.

Acredita-se que em cultivos conduzidos em temperaturas moderadas (menores que 37°C) ocorra um prolongamento da fase G1 da divisão celular (BECERRA *et al.*, 2012). Esta fase é caracterizada por um metabolismo mais ativo e por uma maior expressão de genes relacionados à translação de proteínas, o que justifica uma maior produtividade proteica e maior consumo de aminoácidos nos cultivos conduzidos a 33°C.

A seguir, serão analisados o consumo e a produção destes aminoácidos separadamente, discutindo-se como se dá a variação da concentração ao longo do cultivo nas diferentes temperaturas estudadas.

5.5.1 – Consumo de Asparagina

A asparagina é convertida a aspartato através de uma reação de desaminação catalisada pela enzima asparaginase, contribuindo para a formação de amônio. No

entanto, de acordo com QUEK *et al.* (2010), a desaminação da asparagina pode ser considerada nula porque a demanda biossintética é muito maior do que a degradação.

A asparagina não foi totalmente consumida em nenhum dos cultivos (Figura 33). Desta forma, a concentração de asparagina empregada parece atender às demandas metabólicas e biossintéticas, não sendo um substrato limitante. No entanto, como a asparagina pode gerar amônio e está em excesso no final do cultivo, seria interessante avaliar se os cultivos poderiam ser conduzidos com menores concentrações deste aminoácido.

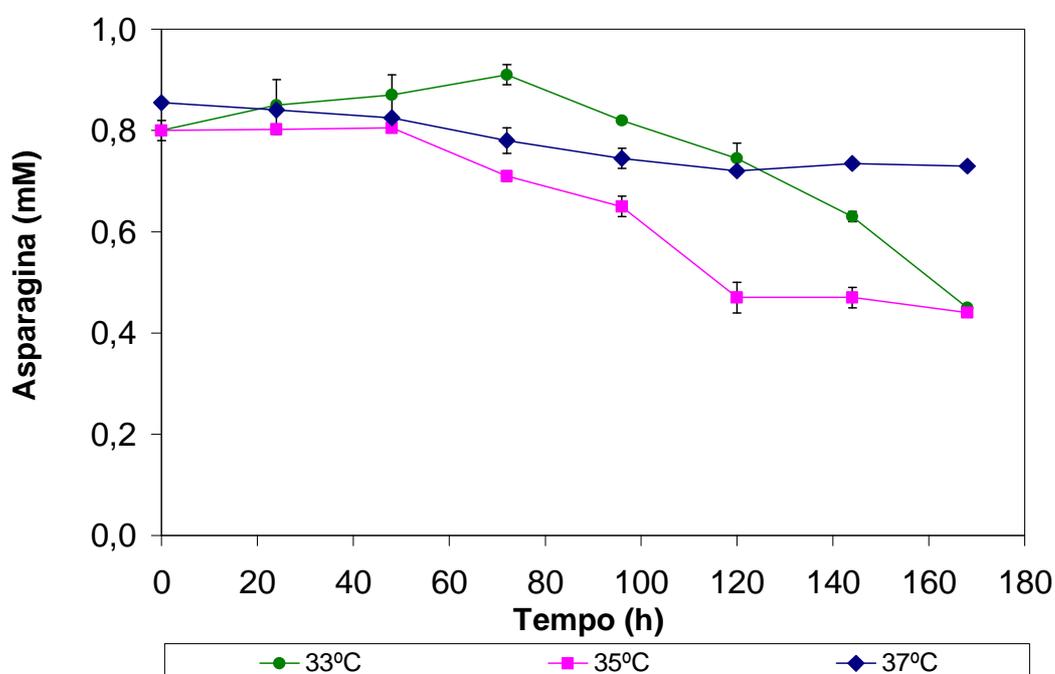


Figura 33: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de asparagina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

No cultivo a 37°C, a asparagina foi pouco consumida. No cultivo a 35°C este aminoácido começou a ser consumido em cerca de 48h, enquanto que, no cultivo a 33°C, o consumo se iniciou mais tardiamente, mas se igualou ao consumo do cultivo a 35°C no final. Este comportamento pode ser devido à maior demanda de asparagina

para a produção de FVIII e outras reações biossintéticas em comparação à demanda para o metabolismo celular, visto que o consumo de asparagina foi maior em temperaturas menores (33°C e 35°C), onde a produção de FVIII foi maior.

Outra explicação para o menor consumo de asparagina no cultivo a 37°C, assim como ocorreu com outros aminoácidos, é a possibilidade de ter havido preferência pelo consumo de substratos como glicose e glutamina para gerar intermediários do metabolismo celular nesta temperatura, e não de outros aminoácidos. Por outro lado, nos cultivos em temperaturas inferiores, as células utilizaram uma fração maior de aminoácidos como substratos para o metabolismo.

5.5.2 – Consumo de Serina

O principal destino metabólico da serina é a formação de piruvato catalisada pela serina desidratase. No entanto, ela também pode ser convertida em glicina, conforme reação descrita na Figura 34 (ALTAMIRANO, 2000; COX & NELSON, 2006).



Figura 34: Reação de formação de glicina a partir de serina. Fonte: COX & NELSON, 2006.

Como pode ser observado na Figura 35, a serina foi totalmente consumida nos cultivos em todas as temperaturas analisadas.

No cultivo a 37°C, a serina foi consumida mais rapidamente do que a 35°C e a 33°C. O consumo mais rápido de serina nos cultivos em maiores temperaturas está possivelmente relacionado ao esgotamento de glutamina (Figura 27). Isto ocorre porque a serina, além de ser requerida em processos de biossíntese, também pode

ser convertida a piruvato e glicina. No entanto, de acordo com QUEK *et al.* (2010), assim como ocorre com a asparagina, a desaminação da serina pode ser considerada nula em função da demanda biossintética ser muito maior do que a degradação. De fato, a serina é um aminoácido presente em grande quantidade no FVIII (9,3%) e em outras proteínas e, portanto, uma grande quantidade de serina é direcionada à produção proteica.

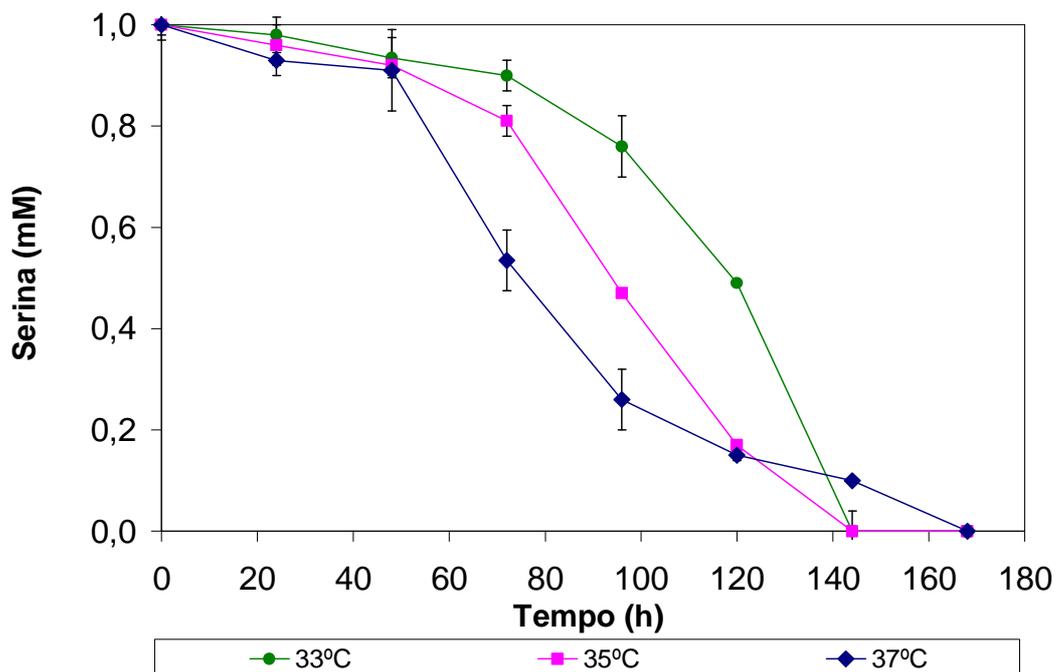


Figura 35: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de serina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.3 – Consumo de Valina

A valina é degradada por vias que formam succinil-CoA, um intermediário do TCA. A valina sofre transaminação e descarboxilação e, a seguir, uma série de reações de oxidação que convertem os quatro carbonos remanescentes em propionil-CoA, um precursor de succinil-CoA (COX & NELSON, 2006). Os consumos de valina

nos cultivos conduzidos nas diferentes temperaturas (Figura 36) foram semelhantes. No entanto, observou-se que nos cultivos a 33°C ($q_{aa} = - 0,90 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e 35°C ($q_{aa} = - 0,58 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$) o consumo foi um pouco maior do que a 37°C ($q_{aa} = - 0,43 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$), o que indica que a valina pode ter sido mais direcionada à síntese de FVIII, visto que nestas temperaturas a formação do produto foi maior.

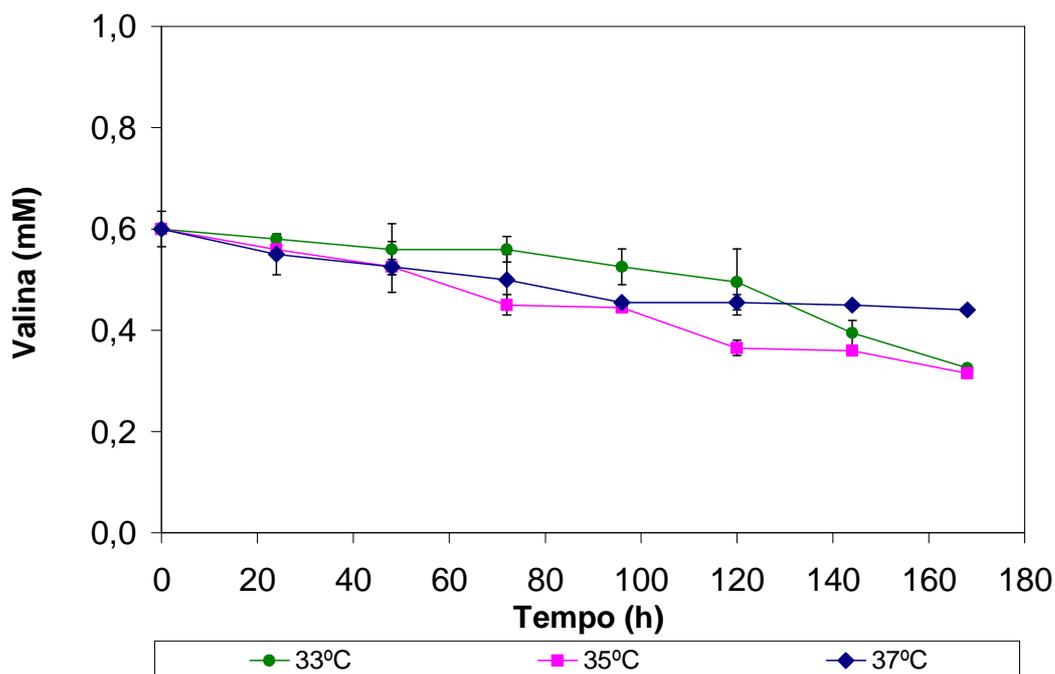


Figura 36: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de valina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.4 – Consumo de Metionina

A metionina, da mesma forma que a valina, forma succinil-CoA e, assim, pode entrar no TCA. A metionina doa um grupo metila e os três dos quatro átomos remanescentes de seu esqueleto carbônico são convertidos em propionil-CoA e, em seguida, em succinil-CoA (COX & NELSON, 2006).

A partir da Figura 37, pode-se observar que o consumo de metionina teve um perfil parecido com o consumo de valina em relação ao maior consumo a 33°C ($q_{aa} = -0,33 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e 35°C ($q_{aa} = -0,37 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$). A metionina foi completamente consumida a 33°C e 35°C, sendo consumida mais lentamente a 33°C. Apenas no cultivo a 37°C houve excesso deste aminoácido, com taxa específica de consumo ($q_{aa} = -0,18 \text{ nmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$), menor que nas outras temperaturas analisadas.

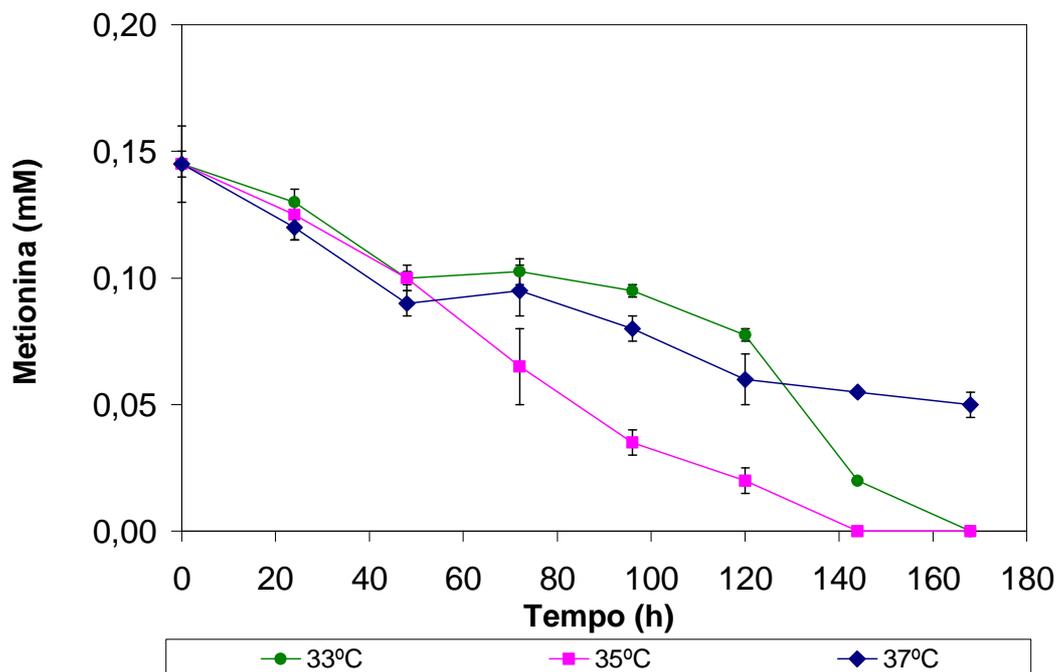


Figura 37: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de metionina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

Experimentos realizados por CRUZ *et al.* (1999a) com células BHK mostraram que o consumo de metionina foi maior nos cultivos conduzidos com menores concentrações de glicose e glutamina, embora em grau menor com baixas concentrações de glutamina. Os autores consideraram que a condição de baixa concentração de glicose e glutamina levou a um metabolismo mais equilibrado (melhor utilização dos substratos e menor formação de metabólitos tóxicos). Os experimentos realizados a 33°C também levaram a um metabolismo celular mais satisfatório e a um

maior consumo de metionina. Isto significa que, provavelmente, a metionina tenha sido metabolizada a succinil-CoA, sendo direcionada ao TCA nas condições de cultivo que favoreceram o estabelecimento de um metabolismo mais equilibrado.

5.5.5 – Consumo de Aspartato

A asparagina e o aspartato podem entrar no TCA através do oxaloacetato. A asparagina vai a aspartato através da hidrólise catalisada pela enzima asparaginase. O aspartato sofre uma reação de transaminação com o α -cetoglutarato, na qual são produzidos glutamato e oxaloacetato.

Diferentemente do que ocorreu para a asparagina, o aspartato foi totalmente consumido em todos os cultivos (Figura 38). A diferença entre os cultivos foi que a 33°C a concentração de aspartato diminuiu de forma mais lenta que em outras temperaturas. Este comportamento também foi observado para o consumo da asparagina nesta temperatura. A menor velocidade de consumo de aspartato a 33°C deve estar relacionada à menor taxa de crescimento celular nesta temperatura.

Um menor consumo de aspartato pode ser consequência da diminuição do metabolismo do glutamato via transaminação e um subsequente aumento do metabolismo via glutamato desidrogenase. Este comportamento foi observado em experimentos realizados por ALTAMIRANO *et al.* (2005) com células CHO cultivadas em meio com glutamato e sem glutamina, o que pode, de certa forma, ser comparável ao cultivo a 33°C pelo fato de ambas as condições levarem a um metabolismo mais equilibrado.

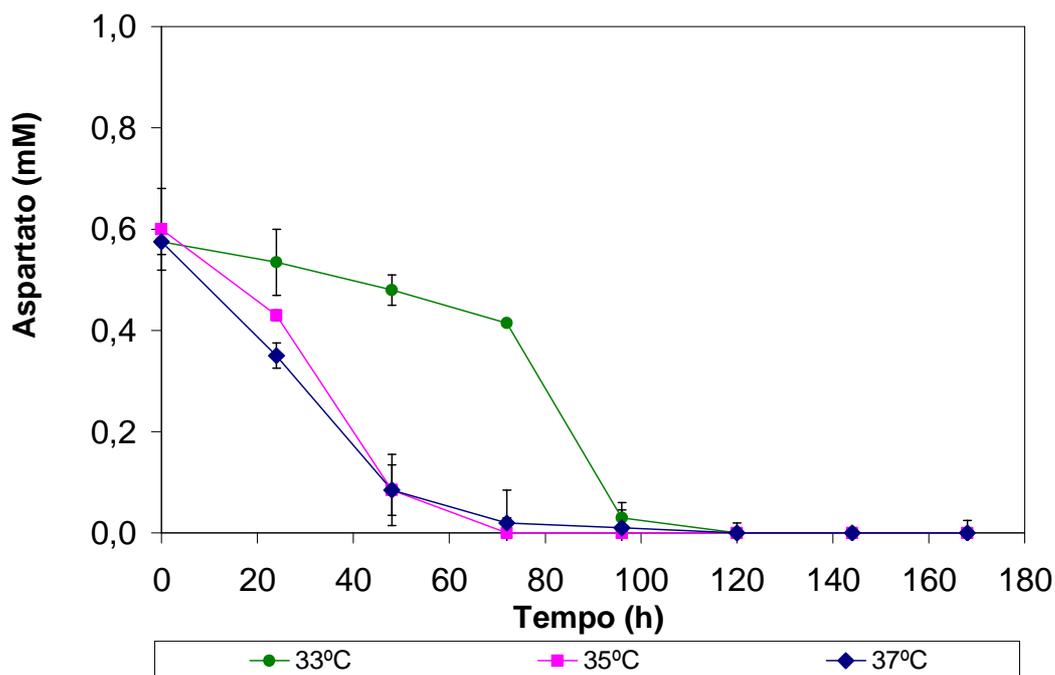


Figura 38: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de aspartato no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.6 – Consumo de Glutamato

A prolina e a glutamina podem ser convertidas a glutamato para, então, entrarem no TCA na forma de α -cetogluturato, pois a transaminação ou desaminação do glutamato produz α -cetogluturato. A arginina e a histidina também podem ser convertidas a glutamato, mas este processo ocorre por vias mais complexas (COX & NELSON, 2006).

Como pode ser observado na Figura 39, o glutamato foi completamente consumido em todos os cultivos. No entanto, observa-se que, inicialmente, ocorreu um pequeno aumento na concentração de glutamato e, depois, se deu a depleção de glutamato. Isto pode ter ocorrido em função de outros aminoácidos gerarem glutamato. Desta forma, no início, o glutamato era gerado e consumido. No entanto, com o

esgotamento de outros aminoácidos, como a glutamina, por exemplo, o glutamato passa a ser prioritariamente consumido sem ser repostado.

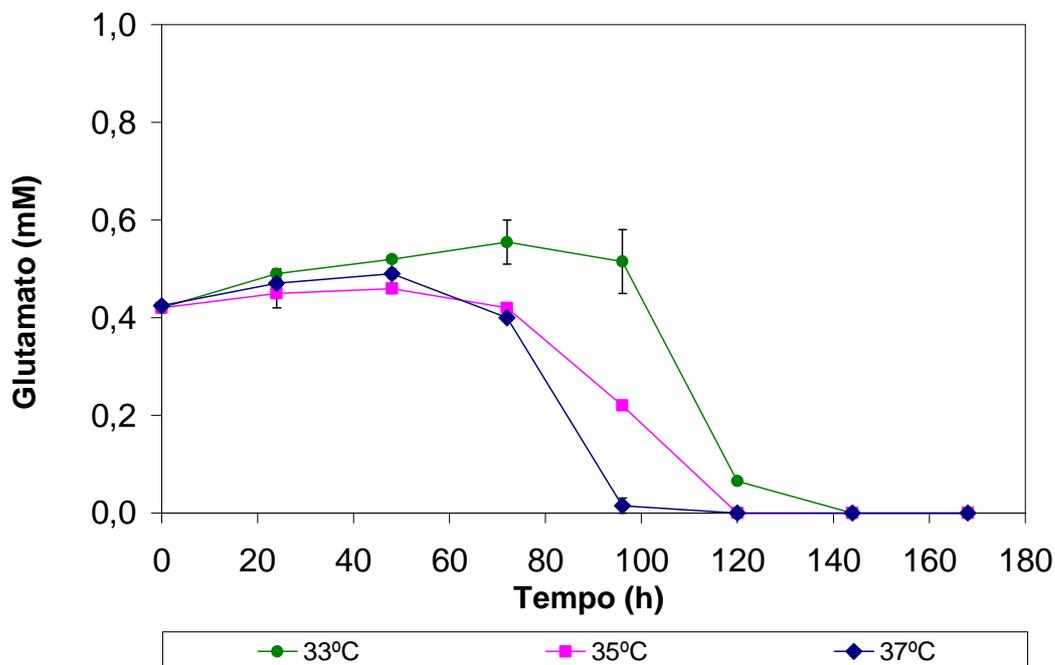


Figura 39: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de glutamato no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

O α -cetogluturato também pode ser convertido a glutamato através de uma reação catalisada pela enzima GDH (Figura 40). Esta enzima é diferente da NAD-GDH, que catalisa a reação inversa (formação de α -cetogluturato a partir de glutamato), e as duas enzimas estão sob diferentes tipos de regulação. A GDH é inibida pelo glutamato e tem elevada atividade durante o crescimento celular com glicose, enquanto que a NAD-GDH é inibida pela glicose (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998). Isto também explica o aumento inicial de glutamato e o esgotamento posterior, pois, inicialmente, com altos níveis de glicose, provavelmente a NAD-GDH estava inibida e a GDH estava ativa, o que levou à síntese de glutamato. Depois, com a diminuição da concentração de glicose e aumento da concentração de glutamato, a

reação inversa (síntese de α -cetoglutarato) prevaleceu, diminuindo a concentração de glutamato.



Figura 40: Síntese de glutamato catalisada pela enzima GDH.

O glutamato também pode ser sintetizado pela via da glutamato sintase, que consiste em duas etapas. Na primeira etapa, a glutamina é usada como doadora de um grupo amino para o α -cetoglutarato e o resultado é a formação de duas moléculas de glutamato. Na segunda etapa, a glutamina é regenerada e uma molécula de glutamato é usada nesta reação catalisada pela glutamina sintase. A soma das duas reações leva ao final à síntese de uma molécula de glutamato a partir de α -cetoglutarato, de forma similar à reação da Figura 40, porém na reação de regeneração da glutamina há gasto de energia (1 ATP é hidrolisado para cada molécula de glutamina formada). Esta rota é mais ativa em baixas concentrações de amônio porque a enzima glutamato sintase é inibida por amônio (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998). Assim, no início do cultivo, quando há menor concentração de amônio, pode haver formação de glutamato pela via da glutamato sintase, o que também pode ter contribuído para o aumento inicial da concentração de glutamato observado.

Da mesma forma como ocorreu com a glutamina, o glutamato foi consumido, na fase final do cultivo, mais lentamente a 33°C, provavelmente em função do menor crescimento celular em temperaturas inferiores. No cultivo a 37°C, o glutamato foi completamente consumido em 96h de cultivo, o que coincidiu com a diminuição da velocidade de crescimento celular (Figuras 21 e 39). O mesmo ocorreu para os

cultivos a 33°C e 35°C com 120h de cultivo. Isto mostra que o glutamato, assim como a glutamina, são possíveis substratos limitantes para o crescimento celular.

5.5.7 – Consumo de Leucina

A leucina, além de ser usada nas reações de biossíntese, pode ser convertida a acetoacetyl-CoA e, em seguida, a acetyl-CoA, entrando no TCA. A Figura 41 mostra que a leucina não foi consumida totalmente em nenhum dos cultivos, embora esteja presente em grande proporção (9,35%) na molécula de FVIII. Desta forma, conclui-se que a concentração de leucina empregada no meio poderia ser menor para o cultivo desta linhagem celular.

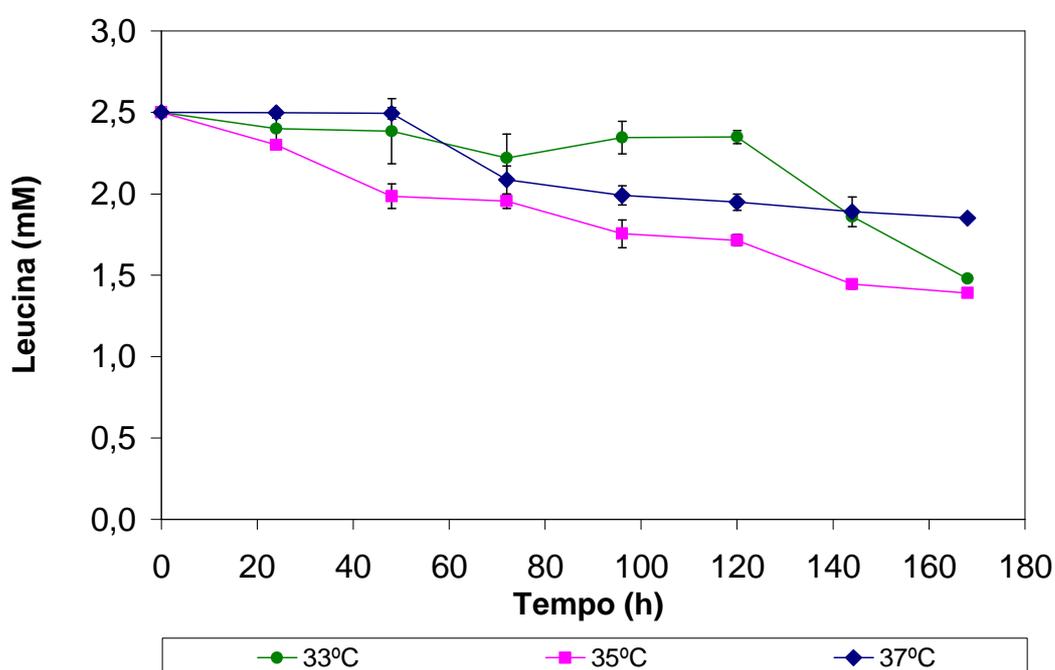


Figura 41: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o consumo de leucina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.8 – Produção de Glicina

A glicina pode ser sintetizada a partir de serina através da via da enzima serina-hidroximetil transferase ou da via da enzima glicina sintetase. Na primeira via, a glicina é produzida diretamente a partir de serina quando o átomo de carbono β da serina é transferido ao tetraidrofolato (ALTAMIRANO, 2000). Através da outra via, catalisada pela enzima glicina sintase, a glicina também pode ser sintetizada, havendo incorporação de amônio, conforme reação descrita na Figura 42. Acredita-se que a produção de aminoácidos como a glicina e a alanina nos cultivos *in vitro* de células de mamíferos tem o objetivo de captar amônio intracelular (GLAKEN *et al.*, 1988).

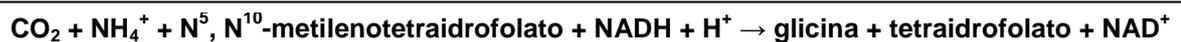


Figura 42: Reação de formação de glicina. Fonte: COX & NELSON, 2006.

A Figura 43 mostra a produção de glicina nas diferentes temperaturas de cultivo.

Estudos sobre a influência das concentrações de glicose e glutamina sobre o metabolismo de células BHK mostraram que, dependendo dos substratos disponíveis, a glicina pode ser consumida ou produzida (CRUZ *et al.*, 1999a).

O acúmulo de glicina inibe o crescimento de algumas linhagens celulares (ALTAMIRANO, 2000). Desta forma, também é possível atribuir a diminuição do crescimento celular nos cultivos analisados ao acúmulo de glicina, visto que, quando a concentração de glicina aumentou no meio, houve diminuição da velocidade de crescimento celular (Figura 21).

Como pode ser observado na Figura 43, o cultivo a 37°C foi o que apresentou maior produção de glicina. Nesta condição, houve maior consumo de serina e maior produção de amônio, o que justificaria uma maior produção de glicina (Figura 42). No entanto, a taxa específica de formação de glicina foi maior a 33°C ($q_{aa} = 2,31 \text{ nmol cel}^{-1}$

h^{-1}) do que a $37^{\circ}C$ ($q_{aa} = 0,95 \text{ nmol cel}^{-1} h^{-1}$), o que pode estar relacionado ao menor crescimento celular observado no cultivo a $33^{\circ}C$, considerando-se que a glicina inibe o crescimento celular.

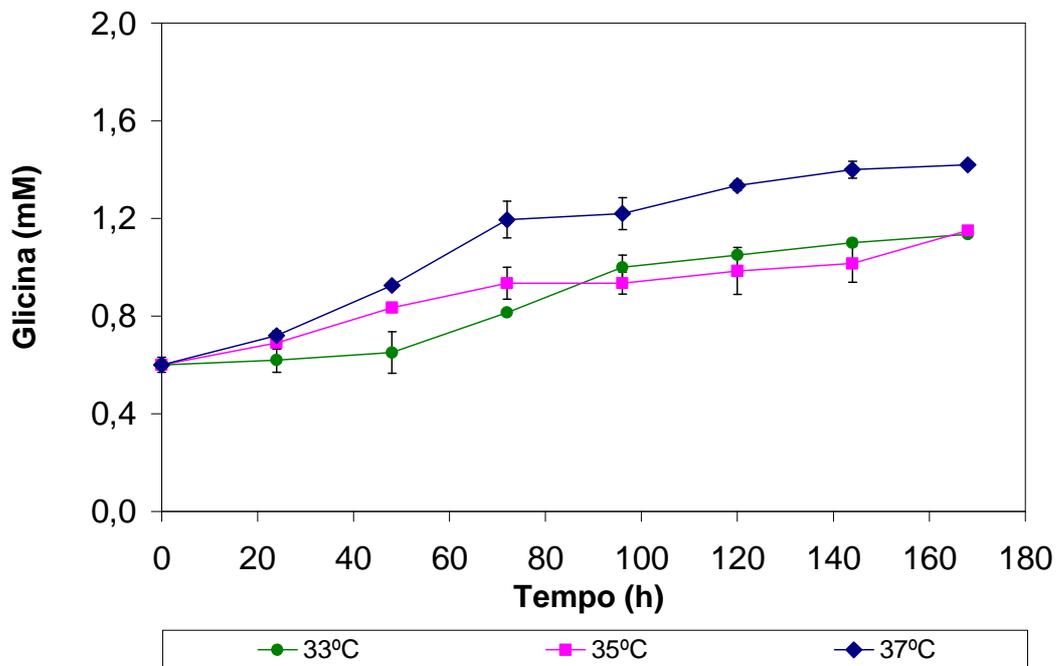


Figura 43: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o produção de glicina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.9 – Produção de Prolina

Nos estudos conduzidos em células CHO por ALTAMIRANO (2000), a prolina foi consumida. A prolina pode entrar no TCA na forma de α -cetoglutarato. Para isto, a estrutura cíclica da prolina é rompida por oxidação do carbono mais distante do grupo carboxila, criando uma base de Schiff, que é hidrolisada a glutamato γ -semi-aldeído. Este intermediário é oxidado e forma glutamato. Já nos estudos com células BHK cultivadas em meio suplementado com SFB realizados por CRUZ *et al.* (1999a), a

prolina foi produzida. A prolina é sintetizada a partir de glutamato, sendo produzida quando há acúmulo de glutamato.

No presente trabalho, a prolina foi produzida em todos os cultivos nas diferentes temperaturas (Figura 44). Este comportamento se deve, provavelmente, ao acúmulo inicial de glutamato que foi observado em todos os cultivos (Figura 39).

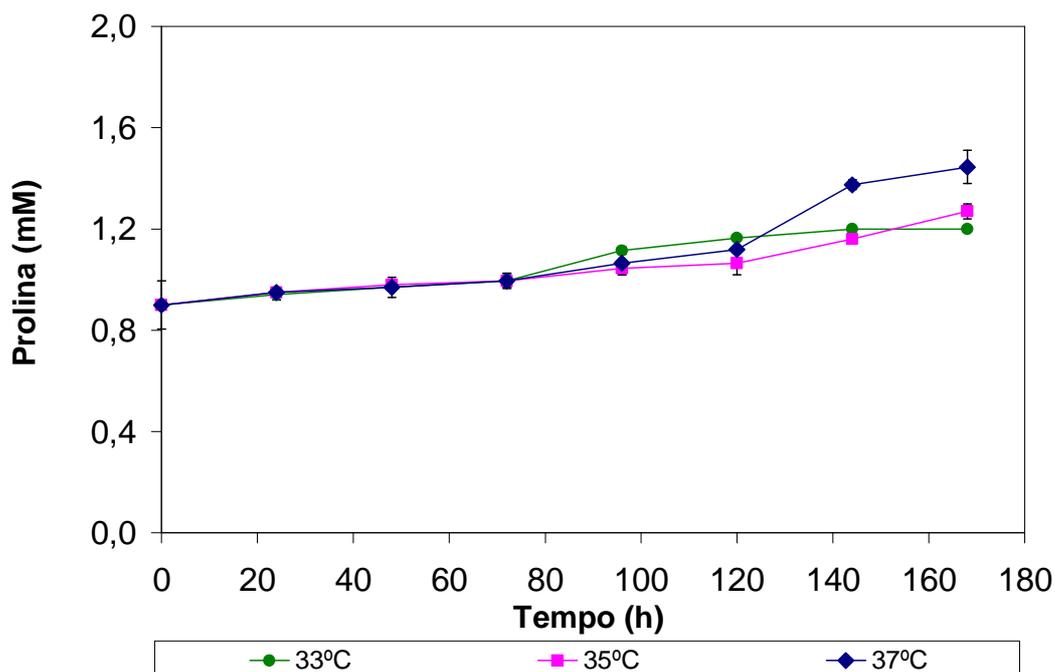


Figura 44: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a produção de prolina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

5.5.10 – Produção e Consumo de Alanina

Na Figura 45, pode ser observado que a alanina foi inicialmente produzida e, em seguida, consumida em todas as temperaturas de cultivo analisadas.

Este comportamento pode ser explicado com base no entendimento de como ocorre a interação do metabolismo da glicose e da glutamina por meio da metabolização do piruvato, como pode ser observado no esquema a seguir (Figura 46).

A alanina é formada através da transferência de um grupo amino para o piruvato. Este processo predomina quando há disponibilidade de glutamina (ALTAMIRANO, 2000). A alanina, contudo, pode também sofrer desaminação através da reação com α -cetoglutarato, formando glutamato e piruvato (COX & NELSON, 2006). Assim, a alanina está relacionada tanto ao metabolismo da glicose quanto ao da glutamina.

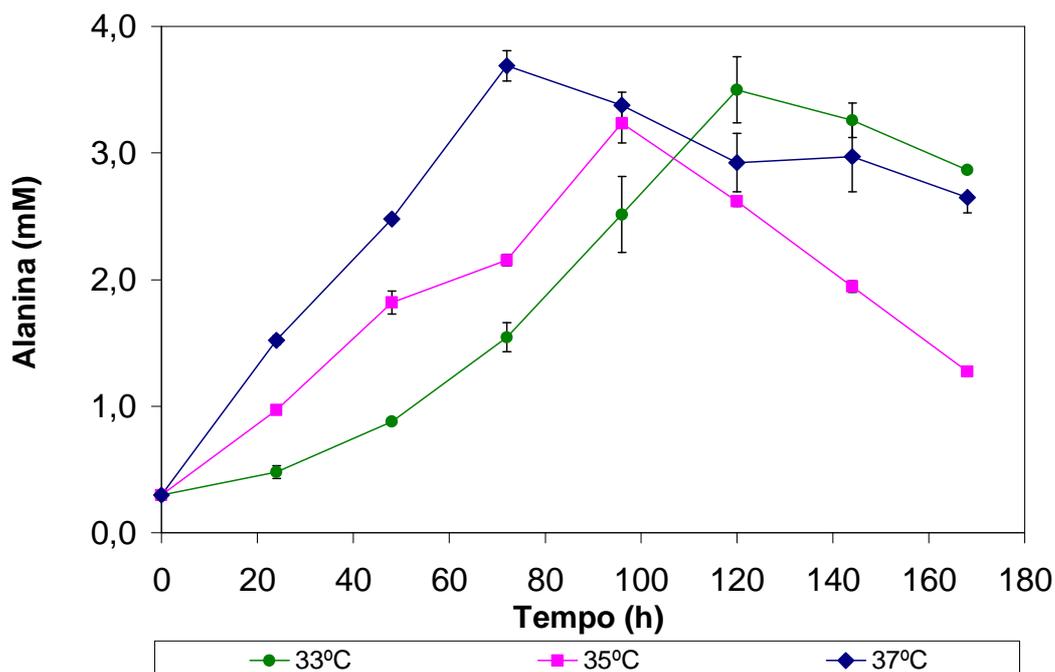


Figura 45: Efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre a produção e o consumo de alanina no meio *BD Animal Component Free*. Barras de erro obtidas a partir de 2 experimentos independentes.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que, inicialmente, a alanina é produzida por meio da aminação do piruvato. Por isso, observa-se um aumento dos níveis de alanina. A elevada produção de alanina observada no início do cultivo pode estar relacionada à alta concentração de glutamina neste meio de cultivo. No entanto, quando a concentração de glutamina diminui, a alanina começa a ser utilizada para a formação de glutamato, alimentando a via da glutaminólise. Quando os níveis de

glutamato diminuem (Figura 39), os níveis de alanina começam a diminuir (Figura 45). Além disso, vale ressaltar que a alanina também pode ser convertida a piruvato.

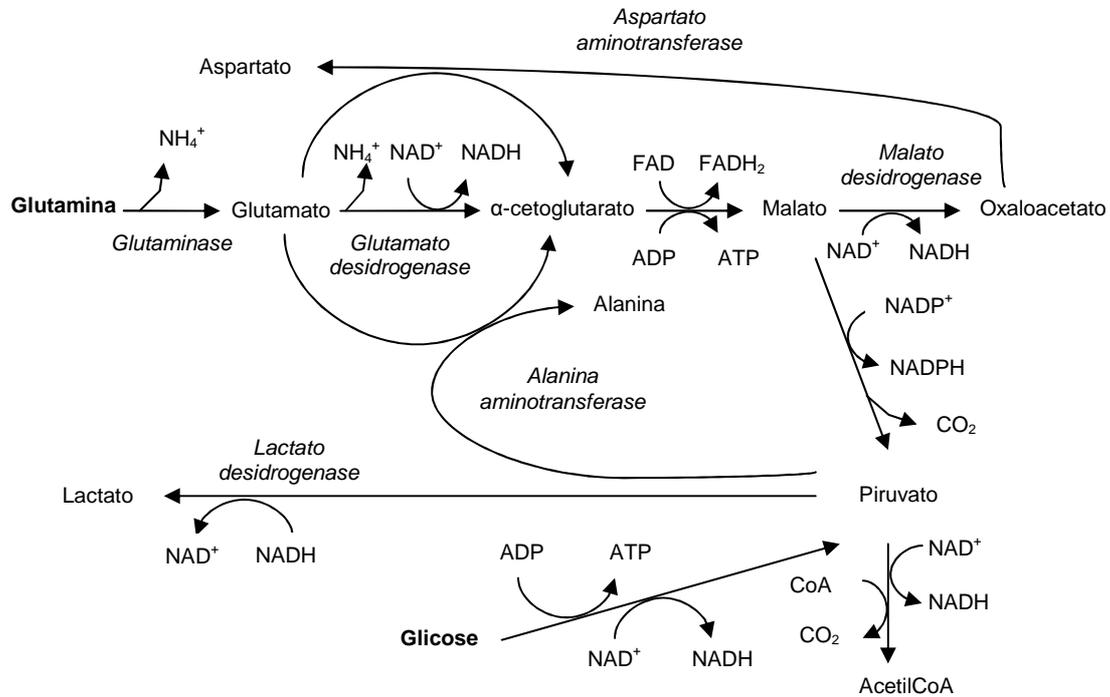


Figura 46: Esquema sobre a interação do metabolismo da glicose e da glutamina através do piruvato (glutaminólise). ATP - adenosina trifosfato; FADH - flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzida). Fonte: ALTAMIRANO, 2000.

Como pode ser visto na Figura 45, os níveis de alanina começam a diminuir primeiro nos cultivos realizados em maiores temperaturas (72h a 37°C, 96h a 35°C e 120h a 33°C). Isto é provavelmente devido ao fato de que, nos experimentos conduzidos a temperaturas mais elevadas, a velocidade de consumo de glutamina foi maior, antecipando a demanda de alanina. Isto explica também os elevados níveis de amônio que foram produzidos nestes cultivos (Figura 27). Parte da quantidade de amônio gerada pelas reações em que glutamina vai a glutamato (e este vai a α -cetoglutarato) é utilizada na formação de alanina. Contudo, quando a concentração de glutamina diminui, a alanina gerada passa a ser desaminada, aumentando os níveis de amônio.

Observou-se, ainda, que a produção de alanina foi menor nos cultivos em menores temperaturas, nos quais o consumo de glicose foi menor (Figura 24), demonstrando a interação do metabolismo da alanina com o da glicose. Ou seja, além do efeito decorrente do metabolismo da glutamina (maior consumo de glutamina em temperaturas mais altas, levando à maior formação de alanina), o menor consumo de glicose, provavelmente, também contribuiu para uma menor produção de alanina em temperaturas mais baixas. Isto porque, quando há maior consumo de glicose, há maior formação de piruvato pela via glicolítica e, conseqüentemente, maior produção de alanina.

Tendo em vista que o acúmulo de alanina pode inibir o crescimento celular (ALTAMIRANO, 2000), o consumo de alanina pelas células (Figura 45) pode representar uma alternativa interessante.

A glicose e a maioria dos aminoácidos não foram totalmente consumidos durante o cultivo celular, porém alguns substratos, tais como glutamina, glutamato, aspartato, metionina e serina se esgotaram ao final dos cultivos. Estes dados mostram que o cultivo das células analisadas é dependente de glutamina e de alguns outros aminoácidos. Portanto, estes resultados serviram como base para a proposição de uma formulação modificada do meio *BD Animal Component Free*, como será discutido a seguir, objetivando aprimorar ainda mais o crescimento celular e a formação de produto pelas células.

5.6 – PROPOSIÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO MODIFICADA DE MEIO DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FVIII NO MESMO

Com base nos dados analisados, observou-se que os aminoácidos glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina foram totalmente consumidos, o que pode ter afetado o crescimento celular e/ou produtividade dos cultivos celulares. Considerando-

se que o cultivo em meio *BD Animal Component Free* a 33°C levou à maior produção de FVIII dentre as condições avaliadas e que houve o esgotamento de alguns aminoácidos durante o cultivo, avaliou-se uma versão modificada do meio *BD Animal Component Free* a 33°C, suplementando-se o mesmo com tais aminoácidos desde o início do cultivo (33°C - A) e com 72h de cultivo (33°C - B).

ALTAMIRANO *et al.* (2006) avaliaram a suplementação com substratos específicos de um meio de cultivo livre de soro para o aumento do crescimento de células CHO e produção de t-PA. Os autores observaram que a suplementação com prolina, serina e asparagina levou a um aumento no crescimento celular, mas foi a asparagina que se mostrou essencial para o aumento da produtividade.

Dentre os aminoácidos considerados como possíveis limitantes do crescimento e produtividade celular, foram adicionadas as quantidades iniciais de cada um destes aminoácidos presentes no meio *BD Animal Component Free* (glutamina – 5 mM, glutamato – 0,4 mM, serina – 1 mM, aspartato – 0,6 mM e metionina – 0,15 mM). Desta forma, uma das condições avaliadas (33°C - A) teve a concentração destes aminoácidos em dobro desde o início do cultivo, enquanto que, na condição “33°C - B”, os aminoácidos foram adicionados com 72h de cultivo, quando parte daqueles presentes inicialmente já havia sido consumida.

Também foram repetidos os experimentos a 33°C (33°C - C) e a 37°C em meio *BD Animal Component Free* sem suplementação, para que fosse feita uma comparação. Além disso, visando analisar se o FVIII obtido neste meio de cultivo mantém sua atividade coagulante, avaliou-se a atividade de FVIII através de ensaio em coagulômetro.

A Figura 46 e a Tabela 19 mostram a produção de rFVIII obtida em cada condição durante o cultivo celular.

A 33°C, com o meio não suplementado (experimento 33°C - C), obteve-se a atividade máxima de FVIII (0,038 UI mL⁻¹), enquanto a 37°C a FVIII_{max} foi de 0,026 UI mL⁻¹. Ou seja, a atividade de FVIII obtida a 33°C foi maior do que a 37°C, confirmando

os resultados anteriores (Figura 31 e Tabela 15). Adicionalmente, a q_p em UI foi de 0,0077 $\mu\text{UI cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ a 33°C e de 0,0024 $\mu\text{UI cel}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ a 37°C. Estes dados confirmam que há maior produção de FVIII a 33°C e que a atividade coagulante é preservada nesta temperatura.

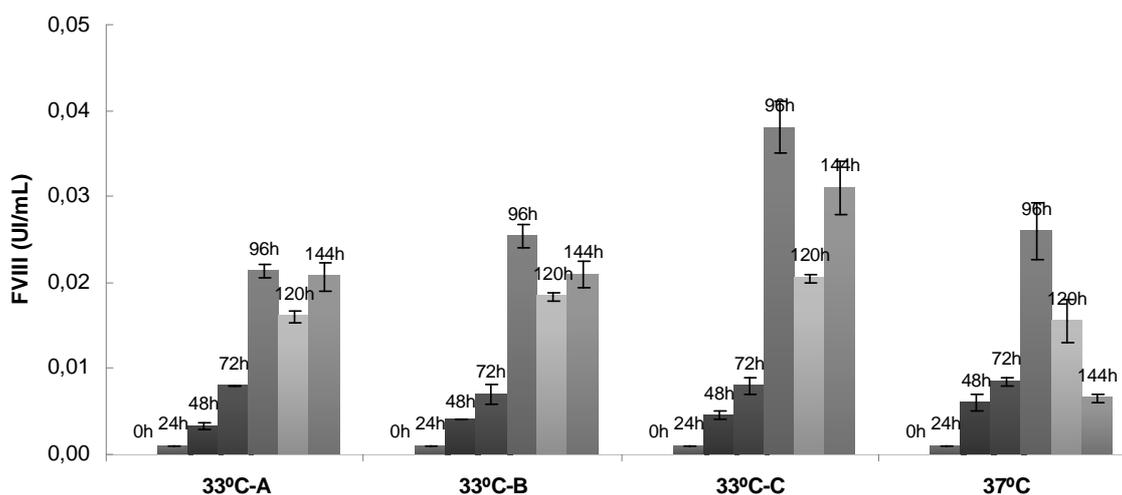


Figura 47 - Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a concentração de FVIII no meio *BD Animal Component Free* suplementado com os aminoácidos glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina. 33°C-A: suplementação no início do cultivo; 33°C-B: suplementação após 72h de cultivo; 33°C-C e 37°C: sem suplementação.

Tabela 19: Atividade máxima de FVIII ($FVIII_{max}$) e taxa específica de formação de produto (q_p), em termos de atividade coagulante, obtidas nos experimentos com o meio *BD Animal Component Free*.

Temperatura	33°C-A	33°C-B	33°C-C	37°C
$FVIII_{max}$ (UI mL ⁻¹)	0,021	0,025	0,038	0,026
q_p ($\mu\text{UI cel}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	0,0047	0,0055	0,0077	0,0024

Quanto à análise da suplementação do meio de cultivo com os aminoácidos que se esgotam ao longo do cultivo, na condição “33°C - A”, com suplementação desde o início do cultivo, a atividade máxima de FVIII foi de 0,021 UI mL⁻¹, enquanto na condição “33°C - B”, com suplementação em 72h, foi de 0,025 UI mL⁻¹ e, no meio sem suplementação (experimento 33°C - C), foi de 0,038 UI mL⁻¹. Estes dados mostram

que a atividade de FVIII obtida no cultivo sem suplementação de aminoácidos foi maior do que nos outros.

Da mesma forma, a q_p foi de $0,0077 \mu\text{UI cel}^{-1} \text{d}^{-1}$ no cultivo sem suplementação, de $0,0055 \mu\text{UI cel}^{-1} \text{dia}^{-1}$ no cultivo “33°C - B” e de $0,0047 \mu\text{UI cel}^{-1} \text{dia}^{-1}$ no cultivo “33°C - A”. Observou-se que a suplementação manteve praticamente inalterado o crescimento celular (Figura 48), mas afetou negativamente a produção de FVIII.

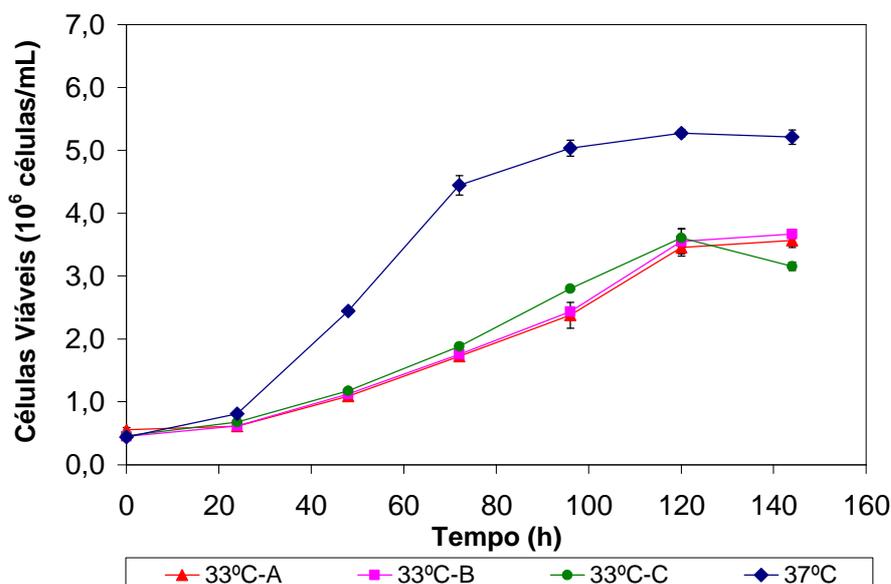


Figura 48: Efeito de condições de cultivo sobre a cinética de crescimento celular no meio *BD Animal Component Free* suplementado com os aminoácidos glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina. 33°C-A: suplementação no início do cultivo; 33°C-B: suplementação após 72h de cultivo; 33°C-C e 37°C: sem suplementação.

Novas concentrações e combinações dos aminoácidos, assim como diferentes tempos de cultivo para suplementação devem ser testados com o objetivo de avaliar quais, em que concentrações e quando os aminoácidos devem ser adicionados para buscar aumentar a produtividade do processo. Estas análises podem ser feitas através de um planejamento experimental, com diferentes quantidades de aminoácidos e momentos para adição dos mesmos durante o cultivo celular, visando a otimização do processo.

6 – CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram avaliados quatro meios de cultivo isentos de SFB, assim como o meio clássico DMEM/F12/SFB, para o cultivo em suspensão de células BHK produtoras de FVIII.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o meio comercial *BD Animal Component Free* foi o mais promissor, dentre os testados, pois, além de dispensar a adição de soro animal a cultivos de células BHK, foi capaz de promover o crescimento celular de forma mais eficaz que os demais e levou à maior produção de FVIII.

O meio DMEM/F12, após a adaptação das células ao cultivo neste meio, apesar de ter apresentado resultado inferior aos meios *BD Animal Component Free* e DMEM/F12/SFB, é um meio promissor para o cultivo de células animais, por ser livre de proteínas, o que facilita os processos de purificação do produto, e por apresentar custo inferior ao dos outros meios comerciais livres de soro. Embora a mistura dos meios DMEM e F12 seja tradicionalmente considerada um meio basal que requer necessariamente a suplementação com soro, o presente trabalho mostrou que é possível adaptar células BHK a este meio, sem nenhuma suplementação.

Em relação à temperatura de cultivo, a temperatura de 33°C, para o meio *BD Animal Component Free*, foi a que apresentou maior concentração de FVIII, com maiores coeficientes de rendimento de substrato em produto e de células em produto. Apesar do menor crescimento celular, nesta temperatura, o metabolismo mostrou-se mais equilibrado, uma vez que o consumo de glicose e glutamina foi mais lento, com menor formação de metabólitos tóxicos (lactato e amônio), e a síntese de produto foi mais elevada.

Em conclusão, pode-se afirmar que o cultivo com o meio *BD Component Animal Free* a 33°C foi o mais eficiente, pois apresentou maior produção de FVIII. No entanto, visando o baixo custo do processo, poder-se-ia utilizar o meio DMEM/F12,

recomendando-se uma análise econômica do processo para a tomada de decisão. Contudo, vale ressaltar que, para o cultivo neste meio, as células precisam passar por um processo relativamente demorado de adaptação.

Os dados sobre a estabilidade térmica do FVIII mostraram que há elevada degradação térmica de FVIII (90% em 24h) o que evidencia que o cultivo em perfusão é o mais adequado para a produção de FVIII a partir do cultivo de células BHK.

Com a análise do consumo e produção de aminoácidos, observou-se que a glutamina, glutamato, metionina, aspartato e serina foram totalmente consumidos. A depleção destes substratos pode ter contribuído para o decréscimo no crescimento celular e/ou produtividade. Estes resultados indicaram as necessidades específicas de aminoácidos desta linhagem celular.

A suplementação do meio *BD Component Animal Free* com a mesma quantidade inicial dos aminoácidos deste meio que se esgotaram durante o cultivo não levou ao aumento da produção de FVIII. No entanto, diferentes quantidades de aminoácidos podem ser adicionados a este meio para avaliar os efeitos sobre a produtividade. Os resultados deste trabalho são úteis para o desenvolvimento de um meio de cultivo que promova maior crescimento celular e maior formação de FVIII ativo a partir do cultivo de células BHK.

De uma forma geral, o presente trabalho permitiu ampliar o conhecimento sobre o metabolismo e o comportamento fisiológico de células BHK em diferentes temperaturas e meios de cultivo, contribuindo para identificar quais são os principais substratos e metabólitos que devem ser monitorados e controlados no meio de cultivo para aumentar o crescimento celular e a produção. Assim, com estas informações é possível sugerir novas estratégias de formulação de meio de cultivo, modo de condução e controle de processo visando o aumento da produção de FVIII.

Neste trabalho, também foi apresentada uma análise do monitoramento tecnológico dos pedidos de patentes relacionados à produção de FVIII. A análise forneceu uma visão do mercado e das tecnologias disponíveis, evidenciando os

principais países, empresas, inventores e áreas de concentração das invenções sobre a produção de FVIII, dentre outros. Também foram evidenciadas as inovações tecnológicas existentes no mundo e que não foram protegidas no Brasil. O uso destas tecnologias deve ser incentivado tendo em vista que estão em domínio público, podendo ser empregadas no Brasil. Além disso, este estudo mostrou a importância da propriedade intelectual como ferramenta para estimular o desenvolvimento econômico e social do Brasil.

7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, podem ser destacados:

- Temperaturas ainda menores podem ser avaliadas para investigar seu efeito sobre a produtividade de FVIII tendo em vista que a melhor temperatura, dentre as ora testadas, para o cultivo de células BHK recombinantes produtoras de FVIII foi 33°C. Além disso, visto que o crescimento celular foi melhor a 37°C, pode-se avaliar o cultivo conduzido em duas fases: inicialmente, a 37°C, para obtenção de maior concentração de biomassa e, depois, em temperatura inferior, para maximizar a formação de produto.

- Com base no conhecimento do metabolismo de alguns substratos e metabólitos tóxicos durante o cultivo, pode-se estudar diferentes formulações de meios de cultivo através da suplementação com alguns substratos e/ou remoção de metabólitos tóxicos durante o cultivo. Estas análises podem ser feitas através de um planejamento experimental, com diferentes quantidades e combinações de substratos, assim como o momento para adição dos mesmos durante o cultivo celular, sem que estes atinjam concentrações inibitórias, visando a otimização do processo.

- Além do meio de cultivo e da temperatura, outras variáveis, como pH e concentração de oxigênio dissolvido, podem ser estudadas em biorreatores. Adicionalmente, considerando-se o elevado grau de degradação do FVIII, deve-se avaliar o modo de operação do cultivo em perfusão em conjunto com as condições estabelecidas neste trabalho para analisar os prováveis ganhos na produtividade de FVIII.

- Considerando-se que o FVIII é uma proteína glicosilada e que seu padrão de glicosilação pode variar em função das condições de cultivo empregadas para sua obtenção, após o estabelecimento das melhores condições para o cultivo de células BHK produtoras de FVIII, visando a obtenção do produto com segurança e eficácia para os pacientes, a qualidade do produto deve ser avaliada a partir da análise da glicosilação da proteína.

Para isso, os padrões de glicosilação de FVIII obtidos em diferentes condições podem ser comparados com o padrão de glicosilação de FVIII recombinante comercial e com produtos derivados de plasma. As análises do padrão de glicosilação de FVIII podem ser realizadas a partir da liberação enzimática dos glicanos da proteína por digestão (individual ou sequencial) e posterior análise da estrutura, sequência e tipo de ligação dos glicanos através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa / MALDI – TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*).

- Os documentos selecionados neste trabalho para o monitoramento tecnológico de patentes da área de produção de FVIII podem ser reavaliados com o objetivo de obter informações adicionais sobre modo de operação, meios de cultivo, purificação, modificações na molécula, dentre outras associadas a esta tecnologia. Também podem ser incluídos novos documentos através de uma busca mais ampla, incluindo outras classificações internacionais ou termos para busca. Com isso, dependendo do foco do estudo, o maior número de dados relevantes para o correto monitoramento tecnológico pode levar a respostas interessantes para o desenvolvimento tecnológico e social do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, W. S., JEON, J. J., JEONG, Y. R., LEE., S, J., YOON, S. K., 2008, "Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells", *Biotechnology and Bioengineering*, v.101, n. 6, pp. 1234-1244.

ALTAMIRANO, C. G., 2000, *Análisis del metabolismo de células CHO recombinantes y desarrollo de estrategias de cultivo en medios definidos*, Tese de Doutorado – Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanha.

ALTAMIRANO, C., PAREDES, C., CAIRÓ, J. J., GÒDIA, F., 2000, "Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine", *Biotechnology Progress*, v. 16, pp. 69-75.

ALTAMIRANO, C., ILLANES, A., CASABLANCAS, A., GÁMEZ, X., CAIRÓ, J. J., GÒDIA, F., 2001, "Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture", *Biotechnology Progress*, v. 17, pp. 1032-1041.

ALTAMIRANO, C., ILLANES, A., BECERRA, S., CAIRÓ, J. J., GÒDIA, F., 2005, "Analysis of CHO cells metabolic behavior of CHO cells in the presence of glucose plus galactose". In: *Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering*, pp. 1-8, Costa Verde.

ALTAMIRANO, C., ILLANES, A., CANESSA, R., BECERRA, S., 2006a, "Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production", *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, pp. 61-68.

ALTAMIRANO, C., ILLANES, A., BECERRA, S., CAIRÓ, J. J., GÒDIA, F., 2006b, "Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose". *Journal of Biotechnology*, v. 125, pp. 547-556.

ALTAMIRANO, C., GODIA, F., CAIRÓ, J. J., 2008, "Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1^a ed., capítulo 4, São Paulo, Editora Roca.

AMABLE, P., BUTLER, M., 2008, "Cell metabolism and its control in culture", In: Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler, M. (eds), *Animal Cell Technology*, 1ª ed., capítulo 4, Andover (Inglaterra), Editora Taylor & Francis.

BALIN, A. K., GOODMAN, B. P., RASMUSSEN, H., CRISTOFALO, V. J., 1976, "The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells", *Journal of Cellular Physiology*, v. 89, pp. 235-250.

BECERRA, S., BERRIOS, J., OSSES, N., ALTAMIRANO, C., 2012, "Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity", *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, pp. 1-8.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., 2008, *Bioquímica*, 6ª ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara.

BERNAL, V., CARINHAS, N., YOKOMIZO, A. Y., CARRONDO, M. J. T., ALVES, P. M., 2009, "Cell density effect in the Baculovirus – insect cells system: a quantitative analyses of energetic metabolism", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, n. 1, pp. 162-180.

BIHOREAU, N., PAOLANTONACCI, P., BARDELLE, C., FONTAINE-AUPART, M. P., KRISHNAN, S., YON, J., ROMET-LEMONNE, J. L., 1991, "Structural and functional characterization of factor VIII, a new recombinant factor VIII lacking most of the B-domain", *Biochemical Journal*, v. 277, pp. 23–31.

BIHOREAU, N., PIN, S., DE KERSABIEC, A. M., VIDOT, F., FONTAINE-AUPART, M. P., 1994, "Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII", *European Journal of Biochemistry*, v. 222, pp. 41–48.

BLOND-ELGUINDI, S., CWIRLA, S. E., DOWER, W. J., LIPSHUTZ, R. J., SPRANG, S. R., SAMBROOK, J. F., GETHING, M. J., 1993, "Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP." *Cell*, v. 75, pp. 717-728.

BOEDEKER, B. G. D., 1992, "The Manufacturing of the Recombinant Factor VIII –Kogenate", *Transfusion Medicine Reviews*, v.4, n. 4, pp. 256-260.

BUTLER, M., 2004, *Animal Cell Culture Technology*, 1ª ed., Londres, Editora Taylor & Francis.

BUTLER, M. & SPIER, R. E., 1984, "The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier", *Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 3-4, pp. 187-196.

CAPON, D. J., LAWN, R. M., LEVINSON, A. D., VEHAR, G. A., WOOD, W. I., 1990, "Preparation of functional human factor VIII in mammalian cells using methotrexate based selection", Patente US4965199.

CASTILHO, L. R., 2001, *Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells*, Tese de Doutorado - Fortschritt-Berichte VDI, Düsseldorf, VDI Verlag, Alemanha.

CASTILHO, L. R., CAVALCANTI, J. M., OLIVEIRA, A. M., PACHECO, G. J., FREIRE, D. M. G., 2006, "Formulações de meios de cultivo isentos de soro animal quimicamente definidos e de meios de cultivo isentos de proteínas e de componentes de origem animal", Pedido de Patente INPI: PI 06016553.

COX, M. M. & NELSON, D. L., 2006, "Lehninger Princípios de Bioquímica", 4ª ed., São Paulo, Editora Sarvier.

CHAN, S. Y., HARRIS, K., 1998, "Preparation of recombinant factor VIII in a protein free medium", Patente EP0872487A2.

CHEN, C., FANG, X. D., ZHU, J., WU, X. F., ZHANG, Z. C., GU, J. X., WANG, Z. Y., CHI, C. W., 1999, "The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines.", *Thrombosis Research*, v.95, pp. 105-115.

CHICO, E., RODRÍGUEZ, G., FIGUEREDO, A., 2008, "Biorreatores para células animais", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1ª ed., capítulo 9, São Paulo, Editora Roca.

CHO, M. S., SHAM, Y., KELSEY, W., 2000, "Expression System for Factor VIII", Patente PCT WO0034505.

CHU, L. & ROBINSON, D. K., 2001, "Industrial choices for protein production by large scale cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 180-187.

CHUPPA, S., TSAI, Y. S., YOON, S., SHACKLEFORD, S., ROZALES, C., BHAT, R., TSAY, G., MATANGUIHAN, C., KONSTANTINOV, K., NAVEH, D., 1996,

“Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, n. 2, pp. 328-338.

COOPER, G. W., BURT, A. M., WILSON, J. N., 1958, “Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cell in continuous suspended culture”, *Nature*, v. 182, pp. 1508-1509.

CRUZ, H. J., MOREIRA, J. L., CARRONDO, M. J. T., 1999a, “Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 66, pp. 104-113.

CRUZ, H. J., FERREIRA, A. S., FREITAS, C. M., MOREIRA, J. L., CARRONDO, M. J., 1999b, “Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, pp. 579-585.

CRUZ, H. J., FREITAS, C. M., ALVES, P. M., MOREIRA, J. L., CARRONDO, M. J., 2000a, Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism and productivity of BHK cells”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, pp. 43-52.

CRUZ, H. J., MOREIRA, J. L., CARRONDO, M. J. T., 2000b, “Metabolic optimized BHK cells fed-batch cultures”, *Journal of Biotechnology*, v. 80, pp. 109-118.

DILLS, S. S., APPERSON, A., SCHMIDT, M. R., SAIER, M. H., 1990, “Carbohydrate transport in bacteria”, *Microbiological Reviews*, v. 44, pp. 385-418.

DONATH, M. S., LENTING, P. J., VAN MOURIK, J. A., MERTENS, K., 1995, “The role of cleavage of the light chain at positions Arg1689 and Arg1721 in subunit interaction and activation of human coagulation factor VIII”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, pp. 3648-3655.

DOMJAN, C. A. H., 2009, *Monitoramento Tecnológico sobre a Produção de Biodiesel a partir de Óleo Residual de Fritura*, Dissertação de Mestrado –Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil.

DOORISS, K. L., DENNING, G., GANGADHARAN, B., JAVAZON, E. H., MCCARTY, D. A., SPENCER, H. T., DOERING, C. B., 2009, “Comparison of factor VIII transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A.” *Human Gene Therapy*, v. 20, pp. 465-478.

DORNER, A. J., BOLE, D. G., KAUFMAN, R. J., 1987, "The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins", *Journal of Cell Biology*, v. 105, pp. 2665-2674.

DREWS, M., PAALME, T., VILU, R., 1995, "The growth and nutrient utilization of the insect-cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture", *Journal of Biotechnology*, v. 40, n. 3, pp.187-198.

DUBELCCO, R., FREEMAN, G., 1959, "Plaque production by the polyoma virus" *Virology*, v. 8, pp. 396-397.

EAGLE, H., 1959, "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures", *Science*, v. 130, pp. 432-437.

EATON, D., RODRIGUEZ, H., VEHAR, G. A., 1986, "Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation", *Biochemistry*, v. 25, pp. 505-512.

EATON, D. L., HASS, P. E., RIDDLE, L., MATHER, J., WIEBE, M., GREGORY, T., VEHAR, G. A., 1987, "Characterization of recombinant human factor VIII", *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, pp. 3285–3290.

FARR, S. B., D'ARI, R., TOUATI, D., 1988, "Oxygen-dependent mutagenesis in *Echerichia coli* lacking superoxide dismutase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, pp. 8268-8272.

FAY, P. J., 1993, "Factor VIII structure and function", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 70, pp. 63–67.

FAY, P. J. & WAKABAYASHI, H., 2009, "Recombinant factor VIII having increased stability", Patente US20090118184A1.

FERRANCE, J. P., GOEL, A., ATAAI, M. M., 1993. "Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, n. 6, pp. 697-707.

FOGOLÍN, M. B., FORNO, G., NIMTZ, M., CONRADT, H. S., ETCHEVERRIGARAY, M., KRATJE, R., 2005, "Temperature Reduction in Culture of

hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality”, *Biotechnology Progress*, v. 21, pp. 17-21.

FOLLSTAD, B. D., BALCARCEL, R. R., STEPHANOPOULOS, G., WANG, D.I.C., 1999, “Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, pp. 675-683.

FOX, S. R., PATEL, U. A., YAP, M. G., WANG, D. I., 2004, “Maximizing Interferon-gamma Production by Chinese Hamster Ovary Cells Through Temperature Shift Optimization: Experimental and Modeling”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 85, pp. 177-184.

FRANCHINI, M., TAGLIAFERRI, A., MENGOLI, C., CRUCIANI, M., 2011, “Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: a critical systematic review”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.01.002.

FRESHNEY, R. I., 2005, *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Techniques*, 5^a ed., New York, John Wiley & Sons.

GEAUGEY, V., DUVAL, D., GEAHEL, I., MARC, A., ENGASSER, J. M., 1989, “Influence of amino acids on hybridoma cell viability and antibody secretion”, *Cytotechnology*, v. 2, pp. 119-129.

GIOVAGNOLI, A., ROY, S., DUCROS, V., CHARLOT, V., STAUFFER, Y., 2009, “Cell Culture Processes”, Patente PCT WO09086309.

GITSCHIER, J., WOOD, I. W., GORALKA, T. M., WION, K. L., CHEN, E. Y., EATON, D. H., VEHAR, G. A., CAPON, D. J., LAWN, R. M., 1984, “Characterization of the human factor FVIII gene”, *Nature*, v. 312, pp. 326-330.

GLACKEN, M. W., 1988, “Catabolic control of mammalian cell culture”, *Nature Biotechnology*, v. 6, pp. 1041-1050.

HALLIWELL, B. & ARUOMA, O. I., 1993, *DNA and Free Radicals*, 1^a ed, London, Ellis Horwood.

HAM, R. G., 1965, "Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 53, pp. 288.

HASSELL, T., BUTLER, M., 1990, "Adaptation to non-ammoniogenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures", *Journal of Cell Science*, v. 96, pp. 501-508.

HERNÁNDEZ, Y. G., FISCHER, R. W., 2007, "Serum-free culturing of mammalian cells – adaptation to and cryopreservation in fully defined media", *ALTEX*, v. 24, n. 2, pp. 110-116.

HIRONAKA, T., FURUKAWA, K., ESMON, P. C., FOURNEL, M. A., SAWADA, S., KATO, M., MINAGA, T., KOBATA, A., 1992, "Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant Baby Hamster Kidney cells", *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 12, pp. 8012-8020.

HU, W. S., DODGE, T. C., FRAME, K. K., HIMES, V. B., 1987, "Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells", *Developments in Biological Standardization*, v. 66, pp. 279-290.

IMS HEALTH, 2011, "THE GLOBAL USE OF MEDICINES: OUTLOOK THROUGH 2015", IMS Forecasts & Reports.

IRANI, N., WIRTH, M., HEUVEL, J., WAGNER, R., 1987, "Improvement of the primary metabolism of cell culture by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 66, n. 4, pp. 239-246.

JACQUEMIN, M. G., SAINT-REMY, J. M., 1998, "Factor VIII immunogenicity", *Haemophilia*, v. 4, pp. 552-557.

JENKINS, N., HOVEY, A., 1993, "Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese Hamster Ovary Cells synthesizing a recombinant protein", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, n. 9, pp. 1029-1036.

JORJANI, P., OZTURK, S. S., 1999, "Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rates for different mammalian cell lines", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, n. 3, pp. 349-356.

KAUFMAN, R. J., WASLEY, L. C., DAVIES, M. V., WISE, R. J., ISRAEL, D. I., DORNER, A. J., 1989, "Effect of von Willebrand Factor Coexpression on the Synthesis and Secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells", *Molecular Cell Biology*, v. 9, pp. 1233-1242.

KELLY, K. M., BUTLER, R. D., FARACE, L., COHEN, A. R., MANNO, C. S., 1997, "Superior in vivo response of recombinant factor VIII concentrate in children with hemophilia A", *The Journal of Pediatrics*, v. 130, n. 4, pp. 537-540.

KESSLER, C. M., GILL, J. C., WHITE, G. C., SHAPIRO, A., ARKIN, S., ROTH, D. A., MENG, X., LUSHER, J. M., 2005, "B-domain deleted recombinant factor VIII preparations are bioequivalent to a monoclonal antibody purified plasma-derived factor VIII concentrate: a randomized, three-way crossover study", *Haemophilia*, v. 11, pp. 84-91.

KIM, D. Y., LEE, J. C., CHANG, H. N., OH, D. J., 2006, "Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 426-433.

KURANO, N., LEIST, C., MESSI, F., KURANO, S., FIECHTER, A., 1990, "Growth behavior of chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor", *Journal of Biotechnology*, v. 15, pp. 113-128.

LARSEN, S. H., ADLER, J., GARJUS, J. J., HOGG, R. W., 1974, "Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 71, pp. 1239-1243.

LEDFORD, H., 2007, "Biotechs go generic: the same but different", *Nature*, v. 449, pp. 274-276.

LÉO, P., GALESÍ, A. L. L., SUAZO, C. A. T., MORAES, A. M., 2008, "Células animais: conceitos básicos", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1ª ed., capítulo 5, São Paulo, Editora Roca.

LEYTE, A., VERBEET, M. P., BRODNIEWICZ-PROBA, T., VAN MOURIK, J. A., MERTENS, K., 1989, "The interaction between human blood coagulation factor VIII

and von Willebrand factor. Characterization of a high affinity binding site on factor VIII", *Biochemical Journal*, v. 257, pp. 679-683.

LIU, C. H., CHANG, T. A., 2006, "Rational development of serum-free medium for chinese hamster ovary cells", *Process Biochemistry*, v. 41, pp. 2314-2319.

LOLLAR, P., FAY, P. J., FASS, D. N., 1993, "Factor VIII and factor VIIIa", *Methods in Enzymology*, v. 222, pp. 128-143.

LUBINIECKI, A. S., 1998, "Historical reflections on cell culture engineering", *Cytotechnology*, v. 28, pp. 139-145.

LUDLAM, C. A., LOWE, G. D., MAYNE, E. E., 1995, "A pharmacokinetic study of an ion-exchange solvent-detergent-treated high-purity factor FVIII concentrate", *Transfusion Medicine*, v. 5, pp. 289-292.

LYNCH, C. M., ISRAEL, D. I., KAUFMAN, R. J., MILLER, A. D., 1993, "Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production", *Human Gene Therapy*, v. 4, pp. 259-272.

MACPHERSON, I. A.; STOCKER, M. G. P., 1962, "Polyoma transformation of hamster cell clones – an investigation of genetic factors affecting cell competence", *Virology*, v. 16, pp. 147-151.

MARTINELLE, K., DOVERSKOG, M., JACOBSSON, U., CHAPMAN, B. E., KUCHEL, P. W., HÄGGSTRÖM, L., 1998, "Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: Evidence from ¹H/¹⁵N NMR", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, pp. 508-517.

McELHANEY, R., 1985, "The effects of membrane lipids on permeability and transport in prokaryotes", In: Benga, G. (ed), *Structure and Properties of Cell Membranes*, Florida, CRC Press Inc. Boca Raton.

MEAD, J., 1976, "Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes", In: Pryor, W. A. (ed), *Free Radicals in Cell Biology*, New York, Academic Press Inc.

MELLADO, M. C. M., CASTILHO, L. R., 2008, "Proteínas recombinantes terapêuticas", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do*

Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica, 1ª ed., capítulo 16, São Paulo, Editora Roca.

MILLER, W. M., WILKE, C. R., BLANCH, H. W., 1989, "The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II. Glutamine pulse and step changes", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, pp. 487-499.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL., 2008, *Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2007*, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

MORAES, A. M., MENDONÇA, R. Z., SUAZO, C. A. T., 2008, "Meios de cultura para células animais", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*, 1ª ed., capítulo 5, São Paulo, Editora Roca.

MOORE, G. E., GERNER, R. E., FRANKLIN, H. A., 1967, "Culture of normal human leukocytes", *Journal of the American Medical Association*, v. 199, n. 8, pp. 519-524.

OLIVEIRA, L. G., 2010, *Estudo do Monitoramento Tecnológico de Patentes Farmacêuticas do Omeprazol e seus Derivados com uma Comparação do Perfil de Depósitos de Brasileiros e Estrangeiros no Mundo*, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil.

OLIVEIRA, L. G., SUSTER, R., PINTO, A. C., RIBEIRO, N. M., SILVA, R. B., 2005, "Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico", *Química Nova*, suplemento, v. 28, pp. S36-S40.

OSTHOFF, K. S., BAUER, M. K. A., VOGT, M., WESSELBORG, S., 1997, "Oxidative stress and signal transduction", *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 67, pp. 336-342.

OZTURK, S. S., PALSSON, B. O., 1990, "Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth metabolism and antibody production kinetics in continuous culture", *Biotechnology Progress*, v.6, n. 6, pp. 437-446.

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

PARKER, R. C., CASTOR, L. N., MCCULLOCH, E. A., 1957, "Altered cell strains in continuous culture", *New York Academy of Sciences*, v. 5, pp. 303-313.

PELLEGRINI, M. P., PINTO, R. C. V., CASTILHO, L. R., 2008, "Mecanismos de crescimento e morte de células animais *in vitro*", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1ª ed., capítulo 7, São Paulo, Editora Roca.

PICANCO, V. P., COVAS, D. T., BECKER, S., TONN, T., 2004, "Produção de fator FVIII por engenharia genética", *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. 32, pp. 81-83.

PINTO, R. C. V., 2007, *Separação de Células CHO Utilizando Hidrociclones*, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

PITTMAN, D. D., WANG, J. H., KAUFMAN, R. J., 1992, "Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII", *Biochemistry*, v. 31, pp. 3315-3325.

PITTMAN, D.D., ALDERMAN, E.M., TOMKINSON, K.N., WANG, J.H., GILES, A.R., KAUFMAN, R. J., 1993, "Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII", *Blood*, v. 81, pp. 2925-2935.

PITTMAN, D. D., MARQUETE, K. A., KAUFMAN, R. J., 1994, "Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function", *Blood*, v. 84, pp. 4214-4225.

QUEK, L. E., DIETMAIR, S., KROMER, J. O., NIELSEN, L. K., 2010, "Metabolic flux analysis in mammalian cell culture", *Metabolic Engineering*, v. 12, pp. 161–171.

RASMUSSEN, P. D., 1991, "Method of producing proteins with FVIII activity and/or FVIII derivatives", Patente PCT WO9100347.

REGAN, L. M., FAY, P.J., 1995, "Cleavage of factor VIII light chain is required for maximal generation of factor VIIIa activity", *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, pp. 8546–8552.

REITZER, L. J., WICE, B. M., KENNEL, D., 1979, "Evidence that glutamine, not sugar is the major source for cultured HeLa cells", *Journal of Biological Chemistry*, v. 254, pp. 2669-2676.

RESENDE, S. M., PEINHEIRO, K., CARAM, C., GENOVEZ, G., BARCA, D., 2009, "Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report", *Haemophilia*, v. 15, pp. 142-149.

REVEL-VILK, S., BLANCHETTE, V. S., SCHMUGGE, M., CLARK, D. S., LILLICRAP, D., RAND, M. L., 2009, "In vitro and in vivo stability of diluted recombinant factor VIII for continuous infusion use in haemophilia A", *Haemophilia*, v. 16, n. 1, pp. 72-79.

RODRIGUEZ, J., SPEARMAN, M., HUZEL, N., BUTLER, M., 2005, "Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions", *Biotechnology Progress*, v. 21, pp. 22-30.

SAENKO, E. L., SCANDELLA, D., 1997, "The acidic region of the factor VIII light chain and the C2-domain together form the high-affinity binding site for von Willebrand factor", *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, pp. 18007-18014.

SANDBERG, H., ALMSTEDT, A., BRANDT, J., GRAY, E., HOLMQUIST, L., OSWALDSSON, U., SEBRING, S., MIKAELSSON, M., 2001, "Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, rVIII SQ", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 85, pp. 93-100.

SANDBERG, H., LIND, P., SPIRA, J., 1991, "Characteristics of a new recombinant factor VIII derivative", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 65, pp. 942-947.

SANFELIU, A., CAIRÓ, J. J., CASAS, C., SOLÀ, C., GÒDIA, F., 1996, "Analysis of nutritional factors and physical conditions affecting growth and monoclonal antibody production of the hybridoma KB-26.5 cell line", *Biotechnology Progress*, v. 12, pp. 209-216.

SANFELIU, A., PAREDES, C., CAIRÓ, J. J., GÒDIA, F., 1997, "Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 6, pp. 421-428.

SLIVAC, I., SRCEK, V. G., RADOSEVIC, K., POROBIC, I., BILIC, K., KNIEWALD, Z., 2008, "Growth characteristics of channel catfish ovary cells – influence of glucose and glutamine", *Cytotechnology*, v. 57, pp. 237-278.

SLIVAC, I., BLAJIC, V., RADOSEVIC, K., KNIEWALD, Z., SRCEK, V. G., 2010, "Influence of different ammonium, lactate and glutamine concentrations on CCO cell growth", *Cytotechnology*, v. 62, pp. 585-594.

SOARES, J. M., CORREA, M. C. D. V., 2010, "Como pesquisar o perfil patentário de um fármaco: o caso efavirenz. Química Nova, v. 33, n. 5, pp. 1216-1219.

SOUKHAREV, S., HAMMOND, D., ANANYEVA, N. A., ANDERSON, J. A. M., HAUSER, C. A. E., PIPE, S., SAENKO, E. L., 2002, "Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems", *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 28, n. 2, pp. 234-249.

STEPHANOPOULOS, G., ARISTIDOU, A. A., NIELSEN, J., 1998. *Metabolic engineering. Principles and methodologies*, 1ª ed., New York, Academic Press.

STOYLOVA, S. S., LENTING, P. J., KEMBALL-COOK, G., HOLZENBURG, A., 1999, "Electron crystallography of human blood coagulation factor VIII bound to phospholipid monolayers", *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, pp. 36573–36578.

THIM, L., VANDAHL, B., KARLSSON, J., KLAUSEN, N. K., PEDERSEN, J., KROGH, T. N., KJALKE, M., PETERSEN, J. M., JOHNSEN, L. B., BOLT, G., NORBY, P. L., STEENSTRUP, T. D., 2010, "Purification and characterization of recombinant factor VIII (N8)", *Haemophilia*, v. 16, pp. 349–359.

TONSO, A., 2000, *Monitoramento e Operação de Cultivos de Células Animais em Sistemas de Perfusão*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

TONSO, A., 2008, "Monitoramento e controle de cultivos celulares", In: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Castilho, L. R. (eds), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 1ª ed., capítulo 10, São Paulo, Editora Roca.

TRIPLETT, D. A., 2000, "Coagulation and bleeding disorders: review and update". *Clinical Chemistry*, v. 46, pp. 1260-1269.

VEHAR, G. A., KEYT, B., EATON, D., RODRIGUEZ, H., O'BRIEN, D. P., ROTBLAT, F., OPPERMANN, H., KECK, R., WOOD, W. I., HARKINS, R. N., 1984, "Structure of human factor VIII", *Nature*, v. 312, pp. 337-342.

VRIEZEN, N., ROMEIN, B., LUYBEN KCHAM, VAN DIJKEN, J. P., 1997, "Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, pp. 272-286.

YANG, M., BUTLER, M., 2000, "Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, pp. 370-380.

YOON, S. K., HONG, J. K., CHOO, S. H., SONG, J. Y., PARK, H. W., LEE, G. M., 2006, "Adaptation of chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production", *Journal of Biotechnology*, v. 122, pp. 463-472.

WANG, W., WANG, Y. J., KELNER, D. N., 2003, "Coagulation factor FVIII: structure and stability", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 259, pp. 1-15.

WEIDEMAN, R., LUDWIG, A., KRETZMER, G., 1994, "Low temperature cultivation: a step toward process optimization", *Cytotechnology*, v. 15, n. 1-3, pp. 111-116.

WORLD FEDERATION OF HAEMOPHILIA, 2009, "Report on the Annual Global Survey 2008", *World Federation of Haemophilia*, pp. 1-34.

WORLD FEDERATION OF HAEMOPHILIA, 2011, "Report on the Annual Global Survey 2010", *World Federation of Haemophilia*, pp. 1-44.

ANEXO I

Ilustração dos cálculos aplicados para a obtenção dos valores das taxas específicas.

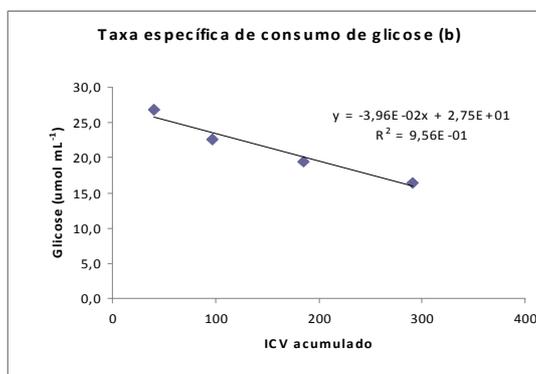
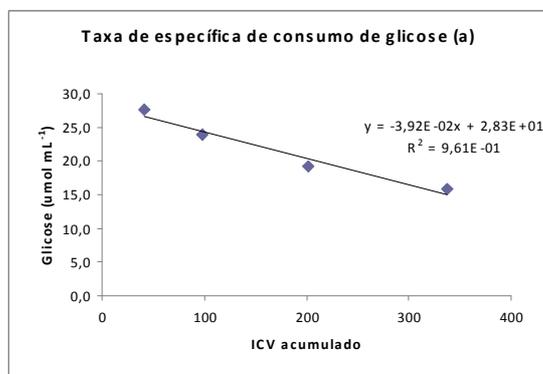
Exemplo dos cálculos das taxas específicas de consumo de glicose com dados obtidos a partir de 2 experimentos (a e b):

Dados do experimento a ($q_{glc} = -0,0392 \text{ pmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$):

Tempo (h)	Células viáveis ($10^9/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Glicose ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)
0	0,324			32,444
25	0,849	15	15	30,278
46	1,683	27	41	27,611
70	3,053	57	98	23,944
94	5,566	103	202	19,167
118	5,808	136	338	15,778
143	6,282	151	489	12,278
167	4,152	125	614	9,556

Dados do experimento b ($q_{glc} = -0,0396 \text{ pmol cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$):

Tempo (h)	Células viáveis ($10^9/\text{mL}$)	ICV ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	ICV acumulado ($\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$)	Glicose ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)
0	0,418			32,389
22	0,822	14	14	29,667
47	1,331	27	41	26,833
72	3,223	57	97	22,667
96	4,059	87	185	19,500
120	4,802	106	291	16,500
144	5,538	124	415	14,444
168	4,411	119	535	12,333



ANEXO II

MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DE PATENTES

O rFVIII já é produzido por diferentes empresas no mundo. Desta forma, empresas brasileiras poderiam se basear nas informações tecnológicas previamente disponibilizadas pelas empresas que já produzem rFVIII para produzirem o medicamento biossimilar. No entanto, tratando-se da produção de uma molécula complexa, como é o caso do FVIII e de outros biofármacos, a complexidade dos processos produtivos é muito superior à dos processos de produção de moléculas pequenas.

Esforços das esferas regulatória, industrial e científica são somados em todo o mundo para aprofundar os conhecimentos sobre a produção e os efeitos clínicos de biofármacos, estabelecendo os melhores procedimentos para sua obtenção e aplicação terapêutica com o objetivo de garantir a saúde dos pacientes. A legislação brasileira na área de produtos biológicos está baseada na legislação internacional, que tenta harmonizar a regulamentação para todos os países. Atualmente, a legislação brasileira na área de produtos biológicos, seguindo a tendência mundial, considera que os biológicos são diferentes uns dos outros e, portanto, é preciso que os técnicos da agência regulatória analisem os protocolos caso a caso.

Tendo em vista que muitos biofármacos comercializados atualmente já perderam, ou perderão em um futuro próximo, a proteção patentária, o mercado de biossimilares representa um atrativo econômico (LEDFOORD, 2007). Ademais, para 2016, a previsão é de que oito dos dez medicamentos mais vendidos no mundo sejam biológicos (IMS HEALTH, 2011).

De acordo com estudos do Instituto IMS for Healthcare Informatics, os gastos globais com biossimilares deverão ultrapassar US\$ 2 bilhões por ano até 2015,

enquanto que em 2010 os gastos foram de US\$ 311 milhões. Novos biossimilares são esperados para entrar no mercado a partir de 2014, o que levará ao aumento de gastos com esta classe de medicamentos. A expiração de patentes de alguns medicamentos (biofármacos e outros) refletirá em uma diminuição de gastos de US\$ 120 bilhões, compensando os US\$ 22 bilhões gastos para a fabricação dos biossimilares e genéricos destes medicamentos (IMS HEALTH, 2011).

O desenvolvimento de tecnologia demanda pessoal qualificado e grande investimento financeiro. Então, quando há interesse em pesquisar e/ou investir em uma nova área tecnológica, faz-se necessário avaliar e reduzir os riscos de novos empreendimentos. Um dos aspectos relevantes no desenvolvimento de processos para a produção de rFVIII é a seleção adequada dos documentos de referência sobre a área de interesse para uma tomada de decisão mais eficaz.

Para isso, as informações em artigos científicos, livros e, principalmente, em patentes são buscadas, pois estas estão diretamente relacionadas à inovação tecnológica. A pesquisa de patentes permite medir e monitorar os avanços tecnológicos em setores específicos, como, por exemplo, o de biofármacos.

O monitoramento tecnológico de patentes mostra um panorama do estado da técnica e do principal cenário que domina as inovações. As patentes são fontes ricas de informação e o monitoramento de patentes é uma ferramenta eficiente na recuperação e análise de informações importantes para subsidiarem as futuras tomadas de decisão em diferentes campos da sociedade (indústria, centros de pesquisa e governo) (DOMJAN, 2009).

A partir da pesquisa de documentos de patentes pode-se realizar o monitoramento tecnológico de uma determinada área de interesse, o que permite entender a dinâmica de diferentes ramos do conhecimento e sua tecnologia, produtos e processos. Os dados analisados permitem a geração tanto de estatísticas simples, como análises mais aprofundadas do conteúdo descrito nos documentos de patentes. Para isto, são necessários profissionais especialistas da área técnica de interesse

para a interpretação e extrapolação dos dados encontrados nas patentes (DOMJAN, 2009).

A análise de patentes na avaliação do fluxo do conhecimento tem especial destaque pelo papel da patente no sistema da inovação, pois representa a utilização da informação e conhecimento na elaboração e adequação de novos produtos e processos (DOMJAN, 2009).

Apenas 16% da informação tecnológica é divulgada de forma integral e 13% parcialmente em artigos científicos. A maioria da informação tecnológica (71%) encontra-se descrita unicamente em documentos de patentes e, mesmo assim, esta informação é pouco utilizada pelos pesquisadores e empresas (DOMJAN, 2009). Parte dos custos com P&D poderiam ser reduzidos se os bancos de patentes fossem mais utilizados (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A falta de conhecimento de temas relativos às patentes no Brasil por parte do setor produtivo, universidades e centros de pesquisas pode ser evidenciada pelo desinteresse em depositar pedidos de patente (SOARES & CORREA, 2010). As universidades e centros de pesquisa brasileiros produzem muitos artigos científicos, no entanto, a quantidade de pedidos de patente é consideravelmente inferior.

Contudo, para garantir a eficácia do sistema de patentes, é necessário que a comunidade científica e o setor produtivo conheçam a legislação e as regras que regem a propriedade intelectual, de modo a evitar a situação de violação de direitos, assim como para aprimorar o conhecimento acumulado que constitui incentivo a novas invenções e inovações no campo científico tecnológico (SOARES & CORREA, 2010).

- Os Bancos de Dados de Patentes

Nos documentos de patentes, encontram-se as informações mais recentes de diversas áreas de desenvolvimento. A patente, além de ser uma proteção legal e um

bem econômico, é também uma fonte de informação tecnológica que deve ser utilizada para solucionar problemas técnicos e para a realização de pesquisas.

A pesquisa em bancos de dados de patentes evita que esforços sejam colocados no desenvolvimento de tecnologias já existentes. O uso de informações de patentes permite identificar tecnologias emergentes ou alternativas, fornece embasamento para aplicações comerciais, permite a verificação da disponibilidade da tecnologia no Brasil e o monitoramento de tecnologias concorrentes (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Existem várias bases de dados que permitem a pesquisa de documentos de patente, sendo algumas de acesso gratuito. As principais bases são:

- Escritório Europeu de Patentes – EPO
- Escritório de Patentes do Japão – JPO
- Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos – USPTO
- Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI
- Organização Mundial da Propriedade Intelectual - OMPI ou WIPO
- Word Patent Index - DERWENT

- Escritório Europeu de Patentes

O EPO organiza e disponibiliza todas as patentes, principalmente as européias, por meio do endereço eletrônico www.ep.espacenet.com, além de outros documentos relacionados à propriedade industrial. A partir da internet é possível a pesquisa dos dados bibliográficos, reivindicações e relatório descritivo de patentes de diversos países. Algumas das patentes selecionadas podem ser vistas na sua forma integral, inclusive desenhos, com possibilidade de se obter suas patentes correspondentes.

- Escritório de Patentes do Japão

O Escritório Japonês de Patentes mantém o site (www.jpo.go.jp) e permite a pesquisa dos dados bibliográficos dos pedidos de patentes no Japão (<http://www19.ipdl.ncipi.go.jp/PA1/cgi-bin>), com a possibilidade de se obter cópia dos documentos originais japoneses.

- Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos

A Organização Americana de Marcas e Patentes, através do site <http://patft.uspto.gov/netahtml/> oferece a base do USPTO que contém todos os documentos de patentes americanas. As buscas de texto completo podem ser realizadas nos documentos publicados a partir de janeiro de 1976.

- Instituto Nacional de Propriedade Industrial

Na página eletrônica do INPI (www.inpi.gov.br) encontra-se disponível um banco de dados com todos os pedidos de patentes brasileiras publicadas a partir de agosto de 1992. É possível acessar as instalações do INPI para a realização de busca individual, em que o interessado faz a busca contando com a orientação de técnicos.

Além disso, pode ser realizada a busca feita por técnicos do INPI por solicitação do interessado, que receberá um relatório com levantamento completo do estado da técnica e com os documentos relativos à busca. Outra opção é a busca *on-line*, também realizada por profissionais do INPI, em bases de dados comerciais (não gratuitas) (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

- Organização Mundial de Propriedade Intelectual

A OMPI é uma agência especializada das Nações Unidas. Foi criada em 1967 com um mandato de seus Estados-Membros para promover a proteção da propriedade intelectual em todo o mundo por meio da cooperação entre os estados e em colaboração com outras organizações internacionais. Sua função é dedicar-se ao desenvolvimento de forma equilibrada e acessível da propriedade intelectual, formar um sistema que recompense a criatividade, estimule a inovação e contribua para o desenvolvimento econômico, salvaguardando o interesse público. A base da OMPI contém os documentos completos dos pedidos de patente depositados via PCT.

- DERWENT

A World Patent Index é uma base organizada pela Thomson Scientific® e permite o acesso a informações de mais de 40 milhões de documentos de patentes depositados em diversos países, com a indexação de dados de patentes a partir de 1963. Esta é uma base de acesso privado que engloba documentos de patentes publicados em todo o mundo. Está disponível no portal de Periódicos CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>) para consulta gratuita em universidades e institutos de pesquisa e desenvolvimento ou diretamente (OLIVEIRA, 2010).

A DERWENT utiliza a Classificação Internacional de Patentes (CIP), que permite a análise em termos de grupos e subgrupos da CIP, dependendo da especificidade desejada. A CIP é organizada em um sistema hierárquico de símbolos independentes para a classificação das patentes de acordo com as diferentes áreas tecnológicas às quais pertencem (OLIVEIRA, 2010).

A CIP é administrada pela OMPI e tem por objetivo dispor os documentos de patente de forma organizada e padronizada a fim de facilitar a busca das informações, divulgar seletivamente as informações a todos os usuários de informações contidas em documentos de patentes e investigar o estado da técnica em determinados campos da tecnologia (OLIVEIRA, 2010).

ANEXO III

Documentos de Patentes Referentes à Produção de FVIII:

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO2011069164		2011	Administering factor VIII comprises administering chimeric polypeptide comprising factor VIII portion and second portion (e.g. albumin) at specific dosing interval for e.g. on-demand treatment of bleeding e.g. intrathoracic hemorrhage
WO2011058284		2011	Obtaining liquid injectable composition of Factor H comprises supplying solid composition obtained by lyophilization of a volume of liquid formulation comprising Factor H, arginine and sodium citrate and adding volume of water
WO2011027151		2011	Cell culture medium, useful in the production of recombinant factor VIII, comprises calcium ions, a strong ligand (e.g. EDTA) and mammalian cells
WO2011020866		2011	Pharmaceutical preparation for therapy and prophylactic treatment of bleeding disorders comprises albumin-fused coagulation factors for the non-intravenous administration
WO2011012850		2011	Conjugating water soluble polymer e.g. starch to an oxidized carbohydrate moiety of a blood coagulation protein e.g. Von Willebrand factor, comprises contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer
WO2011005968		2011	New isolated nucleic acid molecule comprising nucleotide sequence having specific percentage homology to a specific nucleotide sequence and which encodes specific functional factor, useful for treating hemophilia e.g. hemophilia A
WO2010133834		2010	New modified peptide comprising Factor VIII-derived sequences having removal of hydrophobic amino acid, or insertion of charged amino acid at one/both terminus, useful for treating hemophilia in a subject
WO2010115866		2010	New coagulation factor molecule comprising an amino acid sequence identical to the mature portion of specific amino acid sequences, is useful for the treatment of hemophilia A
US2010113364		2010	Treating a bleeding disorder by administering a composition to a subject comprising a conjugate comprising a native Factor VIII modified with a water soluble polymer bound to it
US2010113365		2010	Administering pharmaceutical composition to subject suffering from bleeding disorder e.g. hemophilia, by determining dosage for subject, and administering composition comprising native factor VIII modified with water soluble polymer
WO2010014258		2010	New polymer conjugate, useful for treating any

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			conditions that can be remedied or prevented by administration of the particular conjugate
WO2010083536		2010	Protein conjugate having an endopeptidase-cleavable bioprotective moiety
WO2010102886		2010	New Factor VIII derivative useful for the treatment of Hemophilia A in human or animal body
WO2010094901		2010	Affinity support, useful for e.g. selective binding of a plasma protein and for the treatment or prevention of bleeding disorders, comprises a solid support material on which the nucleic aptamers are immobilized
US2010168391		2010	Pegylated Factor VIII (FVIII), useful for treating bleeding disorder associated with functional defects or deficiencies of FVIII
US2010105870		2010	Complexing protein e.g. factor VIII in dispersed medium, by altering conformational state of protein by contacting with mixture comprising ethanol, binding stabilizer to exposed hydrophobic domains and partially reversing alteration
WO2010045321		2010	Conjugating water soluble polymer (WSP) to blood coagulation factor, involves incubating blood coagulation factor with specific antibody and then with WSP, and releasing WSP-conjugated blood coagulation factor from antibody
BR200805767		2010	New recombinant human blood coagulation protein of factor VIII useful in preparation of medicine for treating hemophilia A, comprises reduced domain B
WO2010014708		2010	Conjugating a water soluble polymer to an oxidized carbohydrate moiety of Factor VIII for treating hemophilia, comprises contacting the oxidized carbohydrate moiety with an activated water soluble polymer
WO2010020690		2010	New recombinant human factor VIII or IX protein having a human-like glycosylation pattern but the protein is devoid of N-glycolylneuraminic acid, useful for treating factor VIII- and/or a factor IX-associated disorder
WO2009149303		2009	Treating von Willebrand Disease comprises administering to a subject a conjugate that has factor VIII (FVIII) procoagulant activity and is capable of correcting human FVIII deficiencies
WO2009158511		2009	New recombinant factor VIII molecule comprising a modified amino acid sequence having N-linked glycosylation site amino acid sequences useful in treating e.g. severe epistaxis, oral mucosal bleeding, hemarthrosis and hematoma
WO2009140598		2009	New targeted coagulation factor comprises coagulation factor linked with a domain that binds to a membrane protein on a blood cell, useful for treating hematological diseases
WO2009135888		2009	New complex comprising a target protein and a

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			binding molecule having a binding affinity for the target protein, useful for increasing the half-life of target proteins in the circulation of a human or animal
WO2009086296		2009	Filtering liquid protein mixture in therapeutic, by providing mixture at first pressure; passing mixture through sized filter to form filtrate at second pressure; and applying counter pressure to filtrate to ensure low pressure differential
WO2009156137		2009	New complex comprises factor VIII (FVIII) and von Willebrand factor (VWF), or one of its individual polypeptidic components, useful for treating bleeding or blood coagulation disorders, e.g. hemophilia A or von Willebrand disease
WO2009156430		2009	Purifying or enriching coagulation factor VIII (FVIII), by providing a fraction containing FVIII in an aqueous solution, contacting the fraction with a multimodal resin, washing, and eluting FVIII containing fractions
WO2009130208		2009	New nucleic acid regulatory element for enhancing liver-specific gene expression, and for treating hemophilia B
WO2009108806		2009	New B-domain truncated Factor VIII molecule with a modified circulatory half-life and is covalently conjugated with a hydrophilic polymer via an O-linked oligosaccharide, useful for treating a hemophilic disease
WO2009095646		2009	New composition comprises at least one Factor VIII polypeptides or its variant, useful for preventing or treating inhibitors of Factor VIII by tolerization in patients with hemophilia
WO2009086309		2009	Culturing heterologous protein-secreting mammalian cells in a cell culture supernatant by maintaining the cell culture supernatant at a specified temperature and pH
WO2009075772		2009	New composition comprises a human Factor VIII in a crystalline form, useful for designing drug candidates for the treatment of hemophilia based on the structural information
WO2009071886		2009	New Factor VIII peptide, useful for suppressing or preventing the production of factor VIII inhibitor antibodies in vivo and for treating hemophilia
WO2009062100		2009	Increasing the survival of a coagulation protein by inhibiting the interaction with a clearance receptor, comprises modifying a coagulation protein with a water soluble polymer, and administering to a mammal
WO2009058446		2009	New recombinant factor VIII comprises mutations that result in enhanced stability of both factor VIII and factor VIIIa, useful for treating an animal for hemophilia A
WO2009024620		2009	Isolating and purifying a target protein using chromatography by contacting a potentially prion protein (PrPSC)-contaminated sample

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			comprising a target protein with a multimodal chromatographic material and eluting the target protein
BR200900057		2009	Production method for concentrated von willebrand factor or complex of factor eight and von willebrand factor, involves preparing solution containing specific concentration and nanofiltering solution
WO2009030866		2009	Purification of Factor VIII or Von Willebrand factor of a solution, comprises obtaining plasma cryoprecipitate, adsorbing a factor on filtering membrane, and recovering using elution buffer
WO2009007451		2009	Purifying a coagulation Factor VIII protein containing one or more contaminants by contacting the Factor VIII protein with a multimodal or mixed mode resin containing ligands and eluting the Factor VIII protein
WO2008082669		2008	New polymer-biologically active agent conjugates useful for delivery of active agents selected from von Willebrand Factor or a Factor VIII for treating bleeding disorders
US2008300174		2008	New isolated nucleic acid encodes a recombinant Factor VIII heavy chain which exhibits enhanced secretion from a cell compared to wild type, useful for preparing a composition for treating hemophilia in a patient
WO2008135501		2008	Producing a Factor VIII polypeptide by culturing a mammalian cell expressing a Factor VIII polypeptide in a cell culture medium comprising a C2-domain ligand
WO2008151817		2008	New composition comprises von Willebrand factor (VWF) and factor VIII (FVIII), useful for treating von Willebrand disease (VWD) and/or hemophilia A
WO2008134310		2008	Stabilizing a liquid solution of recombinant protein for frozen storage, by providing a liquid solution of recombinant protein, adding a carbohydrate to the solution, and freezing the solution for storage
WO2008129422		2008	New demannosylated recombinant Factor VIII (FVIII), useful for treating hemophilia A or acquired hemophilia
WO2008129180		2008	Human factor VIII variants useful for treating hemophilia A have one or more amino acid substitutions in defined positions
WO2008102923		2008	Producing recombinant Factor VIII (FVIII) from mammalian host cells, by culturing cells in a culture medium supplemented with dextran sulfate, concentrating the culture medium, and purifying FVIII by immunological method
WO2008003707		2008	New peptide compounds are factor VIII ligands useful e.g. to produce, label, detect, diagnose, monitor, identify, isolate, purify, stabilize and/or enhance activity of factor VIII or VIII-like protein and treat hemophilia A

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO2008084237		2008	Increasing the protein stability of an aqueous composition comprising a protein by determining a pH at which the protein has stability, adding a displacement buffer, and adjusting the pH of the composition
WO2008077616		2008	New modified coagulation factor having at an internal region an insertion of a half-life enhancing polypeptide, useful for manufacturing a medicament for treating or preventing a blood coagulation disorder, preferably hemophilia A
WO2008008360		2008	Producing glycoprotein comprises culturing mammalian cells containing a gene encoding a glycoprotein of interest in a cell culture medium comprising manganese
WO2008005847		2008	Producing recombinant Factor VIII protein comprises introducing into a cell a nucleic acid molecule encoding Factor VIII protein and incubating the cell under conditions for producing Factor VIII protein
US2007232789		2007	New mutant factor VIII having procoagulant activity, useful for treating hemophilia
US2007232788		2007	New mutant factor VIII having procoagulant activity, useful for treating hemophilia
WO2007124106		2007	Application of anti-apoptotic genes expression in mammalian cells for perfusion culture
WO2007126808	BR200708832	2007	New proteinaceous construct comprising a Factor VIII molecule and a polyethylene glycol molecule bound to the FVIII molecule, useful in prolonging the in vivo-half life of FVIII in the blood of a mammal having a bleeding disorder
CN1970773		2007	Novel recombinant plasmid for expression of blood coagulation factor 8 in mammal cell
WO2007115724		2007	Increasing in vivo recovery of therapeutic polypeptide for treating bleeding disorders in humans or animals comprises fusing the therapeutic polypeptide directly or via a linker peptide to a recovery enhancing protein
WO2007109221		2007	Reducing aggregation of a protein in a protein formulation by adding methionine to the formulation, where the method results in reduced aggregation of the protein in the formulation
WO2007071850		2007	New deglycosylated factor VIII is an anti-factor VIII immune response inhibitor useful to as a medicament or to make medicament to treat hemophiliacs type A/B, and hemophiliacs associated with exogenous factor VIII
US7560107		2007	New modified porcine factor VIII protein and nucleic acid, useful for producing compositions for treating hemophiliacs, especially those undergoing bleeding episodes
WO2006120427	BR200611237	2006	New pyrimidine or triazine-based compounds useful as affinity adsorbent for the separation, removal, isolation, purification, characterization, identification and quantification of Factor VIII, von Willebrand's Factor

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO2006108590		2006	New modified recombinant clotting factor VIII variant, which is biologically active after thrombin activation with improved stability of its activated form was modified, useful for gene therapy, e.g. treating or preventing hemophilia A
WO2006103258		2006	Recombinant production of proteins comprises subjecting a suspension of the cells to a non-physiologically increased concentration of at least one ionic substance, e.g. amino acid, prior to harvest of protein
WO2006103298		2006	Blood coagulation factor VIII analog to treat hemophilia comprises amino acid substitution at specific positions of native factor VIII molecule resulting in N-glycan consensus sites, more cysteine residues and lower protein binding affinity
WO2006101441		2006	Purifying recombinant protein comprises suspending host cells expressing the protein in acetic acid and incubating the suspension, and separating and collecting the soluble fraction of the suspension containing the recombinant protein
WO2006084095		2006	Reducing immunogenicity of therapeutic agent e.g. peptide, protein, involves forming complex of therapeutic agent with binding agent such as serine compound, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidic acid
WO2006071801	BR200519562	2006	Proteinaceous construct useful for treating bleeding disorder comprises von Willebrand factor molecule and a physiologically acceptable polymer molecule bound to the factor molecule
WO2006063031		2006	Categorizing haplotype in factor VIII gene, involves amplifying regions of FVIII gene, determining haplotype of FVIII gene from DNA sequence within amplified regions, and categorizing haplotype as any one of H1-H6
WO2006053299	BR200517795	2006	Conjugate useful for treating hemophilia comprises a functional factor VIII polypeptide covalently attached at specific sites to biocompatible polymers
WO2006027111		2006	New modified blood coagulation Factor VIII with a reduced susceptibility to APC mediated cleavage and that can be activated by thrombin, useful for treating or preventing hemophilia A
WO2006039588		2006	Devices and methods for integrated continuous manufacturing of biological molecules
WO2006002195		2006	Complexing a protein e.g., antihemophilic (AHF) protein in dispersed medium, comprises altering conformational state of protein to expose hydrophobic domains, binding stabilizer to exposed hydrophobic domains
EP1712223		2006	Pharmaceutical preparation for treating hemophilia, comprises recombinant factor VIII lyophilized with a stabilizer comprising arginine, isoleucine and glutamic acid, to avoid the virus risk associated with the use albumin as stabilizer

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO2005121165	BR200511893	2005	Isolating proteins e.g. factor VIII and factor IX from solution involves contacting solid separation medium with solution to reversibly bound proteins to medium, and performing elution steps to selectively elute protein fractions
WO2005121163	BR200511906	2005	Large-scale isolation of protein(s) from protein solution obtained from blood, by applying protein solution with preset pH/ionic strength to adsorption column comprising adsorbent, and washing column to obtain protein(s) from adsorbent
WO2005055930		2005	Novel recombinant factor VIII comprising point mutation in or near calcium binding site of wild-type factor VIII and having specific activity higher than that of wild-type factor VIII, useful for treating animal for hemophilia A
WO2005046583		2005	Human factor VIII polypeptides comprising immunoreactivity reducing mutations, useful for treating hemophilia
WO2005040364		2005	Recombinant animal cell obtained by introducing a protein production gene and a gene encoding a production enhancer, useful for large scale production of proteins such as fibrinogen or factor VIII
WO2005047322		2005	New mutant factor VIII comprising amino acid substitutions at specific positions and having procoagulant activity, useful for treating hemophilia
WO2005040213	BR200415296	2005	New modified factor VIII cDNA comprises spliceable nucleotide sequences or nucleotide sequences which will be spliced during the export of the pre-mRNA from the nucleus, useful for gene therapy for treating hemophilia
WO2005040214	BR200415743	2005	Serum-derived factor VIII composition free of virus, useful for treating hemophilia, comprises that it has been passed through a nanometer filter and has a low content of highly multimeric von Willebrand factor
WO2005012354		2005	New stabilized factor VIII preparation useful for treating hemophilia comprises factor VIII and von Willebrand factor (vWF) whose biological half-life is extended as compared with that of native vWF
WO2005010046		2005	New mammalian host cell for enhanced expression of secreted, recombinant protein products (e.g. bikunin, Factor VIII or IL2SA) comprises a genetic material coding for the expression of the recombinant protein products
EP1502921		2005	New modified biologically active recombinant human factor VIII (FVIII) that enhances the affinity of the A2 domain to the A1 and/or A3 domain, useful in preparing a composition for treating hemophilia A
US20050227913		2005	Compositions and methods for less immunogenic protein formulations
US2005009148		2005	Preparing a biologically active factor VIII with

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			modified glycosylation by mutating a segment of factor VIII DNA and expressing in a host cell for posttranslational glycosylation
WO2004092355		2004	Preparing human endothelial cells expressing a (blood coagulation) protein, useful for (preparing a protein for) treating hemophilia, comprises contacting precursor cells in vitro with one or more growth factors and transforming the cells
WO2004075923	BR200407882	2004	Composition, useful for treating hemophilia-A patient, comprises several conjugates having one to three water-soluble polymers covalently attached to Factor VIII moiety
EP1454916		2004	New modified human factor VIII cDNA coding for a biologically active recombinant human factor VIII with improved stability, useful for manufacturing a pharmaceutical composition or medicament for treating hemophilia A
WO2004067566		2004	New Factor VIII polypeptides that are more stable than full-length Factor VIII, useful for clotting blood or for preventing or treating blood disorders, such as Hemophilia A
EP1444986		2004	New pharmaceutical preparation having a peptide with binding sites for the heparan sulphate proteoglycan and/or the low density lipoprotein receptor related protein, useful for treating blood clotting disorders
US2004137579		2004	Producing recombinant protein complex having human Factor VIII:C activity for treating hemophilia, comprises expressing in a eukaryotic host cell expression cassettes encoding a polypeptide homologous to human Factor VIII:C A and C domain
EP1424344		2004	New modified human factor VIII cDNA having mutations where the B domain is partially or completely deleted and replaced by a DNA linker segment, useful in gene therapy for treating hemophilia A
WO2004054607		2004	Storable pharmaceutical composition containing therapeutic protein, e.g. blood coagulant or immunoglobulin, is free of virus and of enzymes, free or bound, directed against the contained protein
EP1405863		2004	Von Willebrand factor concentrates containing Factor VIII:C, having elevated high molecular multimer content and low immunogenicity, useful for treating hemophilia A and von Willebrand syndrome
US6599724		2003	Stable Factor VIII compositions
WO2003040176		2003	Peptide and pseudopeptide mimics of factor VIII that prevent disorders due to the appearance of antibodies against factor VIII in hemophilic patients
WO2003093313		2003	Use of peptides derived from and antibodies generated against Factor VIII to inhibit Factor VIII interaction with Low Density Lipoprotein

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			Receptor Protein or to prevent or treat blood coagulation disorders (e.g. hemophilia A)
WO2003100053		2003	New nucleic acid sequence encoding a biologically active recombinant human factor VIII variant, useful for preparing a composition for treating hemophilia
WO2003087355		2003	New procoagulant-active FVIII protein comprising a modified human FVIII polypeptide, useful for preparing a composition for treating hemophilia
WO2003087161	BR200308860	2003	New modified human Factor VIII molecule being substantially non-immunogenic or less immunogenic than non-modified human Factor VIII, useful in preparing a composition for treating e.g., Gaucher's disease
WO2003080108		2003	Solid pharmaceutical composition produced by lyophilizing solution having factor VIII, surfactant, calcium chloride, sucrose, sodium chloride, trisodium citrate, buffer devoid of amino acids, and reconstituting in water
EP1348445		2003	Virus removal from solutions of proteins, specifically bulky proteins such as fibrinogen, by nanofiltration in presence of chaotropic agent, e.g. arginine, or polyethoxy-sorbitan ester
WO2003066681		2003	Composition comprising a highly purified rHA to stabilize the non-albumin protein (Factor VIII), and additional stabilizing agents, useful for treating hemophilia
EP1284290		2003	New modified factor VIII cDNA, useful for preparing a composition for human gene therapy
WO2003047507		2003	New human factor VIII variants, useful for treating uncontrolled bleeding due to factor VIII deficiency in hemophiliacs with(out) inhibitory antibodies, and in patients with acquired factor VIII deficiency
WO2003031464	BR200213207	2003	Remodeling a peptide, by removing a saccharyl subunit from the peptide to form truncated glycan, and adding or deleting glycosyl groups to a peptide and/or adding modifying group of a peptide to remodel the peptide
EP1283263		2003	New modified factor VIII cDNA, useful for preparing a composition for human gene therapy in the treatment of hemophilia
WO2003031598		2003	New factor VIII polypeptide or nucleic acid molecule characterized by high-level expression, useful for treating factor VIII deficiency, e.g. hemophilia A
WO2003006505		2003	Method of separating factor VIII useful in treatment of e.g. hemophilia A, comprises applying electric potential to a sample taken in a membrane-based electrophoresis apparatus
US6338964		2002	Process and medium for mammalian cell culture under low dissolved carbon dioxide concentration
WO2002096390		2002	New neutral cationic lipids useful for systemic

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			delivery of factor VIII gene
WO2002103024		2002	Stabilizing polypeptides (e.g. Factor VIII, Factor V or prothrombin) for treating hemophilia or increased risk of bleeding in a subject, comprises forming disulfide bond(s) by introducing cysteine(s) into the polypeptide
WO2002102850		2002	New nucleic acid comprising all or part of a gene encoding a procoagulant factor (e.g. Factor VIII) operably linked to a megakaryocyte/platelet specific regulatory region, useful in gene therapy, especially for treating hemophilia A
WO2002098454		2002	New recombinant modified functional polypeptide, useful as a medicament for treating or preventing hemophilia A or B, comprises multiple point-mutations responsible for T-cell activation reduction or elimination
WO2002096454		2002	New recombinant mammalian coagulation factor protein with reduced immunogenicity, for preventing or treating diseases, such as, hemophilia A or B, induced by lack or dysfunction of protein
WO2002090542		2002	New antigenic epitope of factor VIII (FVIII) polypeptide, useful for the manufacture of a medicament for treating and/or preventing an immune disorder in a mammal, e.g., hemophilia
WO2002087560	BR200207058	2002	Reducing transfusion-associated disease and adverse effects in plasma and enhancing purity of components of blood, involves adding preset amount of carboxylic acid or its salt to blood or plasma
WO2002086118		2002	New composition comprising a coagulation-effective amount of at least one substantially pure mammalian blood coagulation factor and phospholipid vesicles, useful for controlling bleeding in a mammal
EP1231220		2002	Novel Factor VIII (FVIII) cDNA useful for producing FVIII in hematopoietic cell lines, comprises non-FVIII intron inserted in at least one location, and comprises as promoter a cDNA that is suitable for expression in platelets
EP1233064		2002	Modified Factor VIII cDNA useful for production of Factor VIII includes cDNA as promoter suitable for expression in hematopoietic cell lines
WO2002060951		2002	New mutant factor VIII with reduced sulfate proteoglycan (HSPG)-dependent or receptor-independent clearance and procoagulant activity for treating hemophilia
ES2167180		2002	Preparation of therapeutic concentrates of antigenic factor VIII with neutralization of anti factor VIII anti-bodies using antigenic factor VIII
WO2002024723		2002	Modified factor VIII for treating patients having factor VIII deficiency, comprises an amino acid substitution at specified positions of a corresponding non-human factor VIII amino acid
CA2301959		2001	Novel short peptide, useful for identifying,

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			labelling and purifying factor VIII
EP1153608		2001	Stabilized preparation containing therapeutically active protein, e.g. blood coagulation factor, comprises stabilizing mixture of saccharide and aminoacid to prevent loss of activity during pasteurization
WO2001068109	BR200109131	2001	DNA encoding the amino acid sequence of POL1212, which is a modified porcine factor VIII lacking most of the B domain, useful for the treatment of patients having factor VIII deficiency e.g. patients with hemophilia
WO2001070968		2001	Recombinantly producing human blood coagulation factors VIII and IX for use in treating hemophilia
WO2001027303		2001	New recombinant adeno-associated virus vector, useful for treating hemophilia A, comprises heterologous nucleotide sequence encoding B-domain deleted human factor VIII operably linked with liver-preferred expression control element
WO2001011021		2001	New recombinant cell clone stable in serum and protein free medium is useful in the production of biomedical products such as blood factors
EP1048726		2000	Modified Factor VIII cDNA comprising a truncated Factor IX intron 1 sequence inserted at one or more locations, useful for efficient production of Factor VIII in host cells
WO2000071714		2000	Factor VIII mutants having increased half-life useful for treating hemophilia, comprise one or more amino acid substitutions in the A2 and/or C2 domain of factor VIII
WO2000071141		2000	A modified human factor VIII useful for treating hemophiliacs with immunity to human factor VIII comprises insertion of immunoreactivity reducing amino acid into the factor VIII sequence
EP1048736		2000	New DNA construct for the tissue specific expression of a blood coagulation factor which contains DNA coding for an amino acid sequence of a blood coagulation factor and a DNA coding
WO2000048635	BR200008405	2000	Factor VIII composition without albumin comprising a stabilizing agent, calcium salt, sodium chloride, buffering agent and bulking agent or hydroxyethyl starch, useful for treating hemophilia
WO2000040602		2000	New polypeptides which bind Factor VIII and/or Factor VIII-like polypeptides, useful for the detection and purification of human Factor VIII and/or Factor VIII-like polypeptides
US6100061		2000	Preparing stable recombinant cell clones, useful for production of proteins, particularly blood factors, on medium free of protein and serum
WO2000034505	BR9916069	2000	Producing cells expressing a protein having factor VIII procoagulant activity especially, human factor VIII in an industrial scale, involves expressing a vector comprising a sequence

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			coding for factor VIII in human cells
WO 0034462	BR9916095	2000	Human Hybrid host cell for mammalian gene expression
WO2000028021		2000	New modified form of factor VIII, useful for treating hemophilia, has altered binding to low density lipoprotein-related protein, resulting in extended in vivo half-life
WO2000027425		2000	Composition for treating blood coagulation disorders, particularly deficiency of von Willebrand factor, containing a receptor-binding competitor to extend protein half-life
EP1006182		2000	DNA sequence of portion of human Factor VIII C for treating and preventing the symptoms of hemophilia
WO2000012532		2000	Factor 8 homolog polypeptides and nucleic acids encoding them for treating coagulation related disorders such as hemophilia and stroke
US6037452		2000	Covalently bonded conjugates comprising poly(alkylene oxide) coupled with Factor VIII or Factor IX analogs used as coagulation factors
EP1012175	BR9812435	2000	Peptides with affinity for blood clotting factor 8
WO2000014117		2000	A composition for binding Factor VIII comprising a peptide
CA2264431		1999	Isolated nucleic acid encoding a canine factor VIII polypeptide for treating a disorder characterized by canine factor VIII deficiency, such as hemophilia A
JP11286453		1999	Viral inactivation method for protein-containing composition using UV irradiation - inhibits viral infection without substantial damage to the protein
WO9946299		1999	New improved purification of factor VIII polypeptide, useful for treating hemophilia A
WO9946274		1999	New porcine and modified human factor VIII proteins for treating hemophilia
WO9929848		1999	Genes and vectors exhibiting increased expression and novel splicing patterns, useful for expression of, e.g. beta-domain deleted factor VIII
WO9931138		1999	Removing viruses from factor VIII solution - by filtration on nanoporous hydrophilic filter
WO9925383		1999	Insoluble pharmaceutical conjugates
WO9837086		1998	Removal of viruses e.g. hepatitis A from protein solutions e.g. blood products - comprises pretreating to remove large proteins e.g. coagulation factors
EP872487	BR9801092	1998	Production of recombinant Factor VIII - comprising culturing mammalian host cells containing the Factor VIII gene
WO9838220		1998	Recovery of Willebrand factor-factor VIII complex - by cation exchange chromatography, useful for treating Willebrands disease and haemophilia
EP0265778		1998	Factor VIII-C analogs.

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO9838218		1998	Recovering high purity von Willebrand factor and its complex with factor VIII - by immunoaffinity chromatography, useful for treatment of phenotypic haemophilia and Willebrand disease
US5789203		1998	Production of recombinant factor VIII:C - as complex of A and C domain polypeptides
WO9831394	BR9806793	1998	Composition containing coagulation-defective tissue factor for treating, e.g. tumours - useful for, e.g. promoting coagulation in pro:thrombotic and tumour-associated vasculature, used with, e.g. factor 7 or anti-cancer agent
WO9825969		1998	Carrier-fixed recombinant von Willebrand factor derivative - useful for isolating proteins binding von Willebrand factor, e.g. factor VIII, in high yield
US5744446		1998	: Hybrid of human and animal factor VIII - containing porcine and murine amino acid sequences is useful in the treatment of haemophilia
WO9812207	BR9712077	1998	New synthetic eukaryotic gene(s) - in which non-preferred or less preferred codon(s) are replaced to provide high level expression in mammalian cell(s)
EP818204	BR9704407	1998	Stabilised albumin free lyophilised recombinant factor VIII composition - having low sugar content, containing glycine, histidine, sucrose, sodium chloride and calcium chloride
WO9749725		1997	New modified factor VIII molecules - having reducing immunogenicity
EP812858		1997	Pure, non-immunogenic Factor=VIII composition preparation - using 2-stage viral inactivation of Factor=VIII solution by treatment with phosphate and detergent followed by heating, used for treating haemophilia
WO9739761		1997	Viral inactivation of lyophilised blood proteins - involves forming a stable complex of the protein and a cyclodextrin
WO9743436		1997	Producing recombinant human proteins with addition of protease inhibitors - active against metal-dependent proteases or chymotrypsins, improves yield, homogeneity and harvest period, specifically for factor VIII
WO9740145		1997	Modified human pro-coagulant active factor VIII - can be administered to haemophiliacs, i.e. factor VIII replacement therapy
WO9739033		1997	Preparing high purity complex of factor VIII and von Willebrand factor - by immuno-affinity chromatography to eliminate non-complexed components, has uniform binding properties, good tolerance and stability, useful for therapy and diagnosis
WO9734930		1997	Stable complex of factor 8 and von Willebrand factor as high molecular weight multimers - for treatment of haemophilia and von Willebrand's syndrome, can be stored without added stabiliser

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			and have increased in vivo lifetime
EP796623	BR1100942	1997	Compositions for treating blood clotting disorders - contain purified clotting factors, e.g. prothrombin
WO9733994		1997	Vector for increased expression of intronless genes - comprises intronless gene with at least one near consensus splice sequence, a promoter and at least one viral cis-acting post-transcriptional regulatory element
EP808901		1997	Stable preparation containing mutant form of factor VIII - not recognised by inhibitory antibodies present in some plasmas, for treating haemophiliacs who produce such antibodies
WO9733178		1997	Testing factor VIII containing preparations - to show freedom from protein fragments and suitability for viral inactivation by pasteurisation
EP776969		1997	Production of proteins from pro-proteins - by proteolytic cleavage in presence of selective adsorbent
WO9717370		1997	Separating factor-VIII complex comprising von Willebrand factor from an impure protein fraction - comprises anion exchange chromatography of an aq. protein soln. eluting with calcium chloride
EP774261		1997	Composition for sustained elevation of Factor VIII levels - comprising von Willebrand factor (or a fraction containing it) with a prolonged half-life
WO9711957	BR9610695	1997	Improving in vivo function of polypeptide(s) - by immobilising with gp.-specific adsorbent and conjugating to biocompatible polymer such as polyethylene glycol
US5605884		1997	Aq. factor VIII solns. for haemophilia treatment - contg. sodium and/or potassium chloride, calcium chloride and histidine, have good stability
WO9703193		1997	New Factor VIII:C polypeptide analogues - having altered metal-binding properties, used for prevention and treatment of active Factor VIII:C deficiency
WO9703195		1997	Factor VIII:C analog modified adjacent to a non-activating Arg residue - used in the treatment of haemophiliacs, by improvement of haemostasis
WO9703194		1997	Factor VIII:C analogue with Arg 1689 substituted by Lys - useful for preventing and treating a Factor VIII:C deficiency, particularly haemophilia A
WO9703191		1997	Factor VIII:C analogue - modified to comprise Factor V A or C domain or subdomain, for increased stability or activity
US5595886		1997	DNA construct encoding protein complex with factor VIII:C activity - for prodn. of recombinant protein complex, useful for type-A haemophilia treatment
WO9749730		1997	Purificn. of Factor-VIII by affinity chromatography - on immobilised cellular von Willebrand factor,

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			giving high recovery yield and purity
WO9630041	BR9607922	1996	Protein formulation comprising coagulation factor VIII or factor IX in na aqueous solution
EP745672		1996	Culture medium contg. liposome like substance comprising at least 2 different lipid(s) - useful for increasing prodn. of recombinant Factor VIII in mammalian cell cultures
WO9615150		1996	Reducing degradation of recombinant coagulation factor VIII caused by metal-dependent protease(s) - by addn. of inhibitor e.g. complexing agent or cpd. related to natural substrate of protease with electronegative moiety
US 5576194		1996	Recombinant protein production
WO9615140		1996	Use of hydrophobic interaction chromatography to purify recombinant factor VIII - useful in treatment of haemophilia, produced with no redn. in activity, little or no nucleic acid contamination and free from similar mols. with structural deviations
EP711835		1996	Expression vector contg. di:cistronic unit encoding foreign protein and fusion protein comprising selection and amplification markers - provides high yields of pure foreign protein e.g. blood coagulation factors
WO9602572		1996	Factor VIII antigenic polypeptide fragments and epitope(s) - also inhibitors of factor VIII and anti-inhibitors, useful for e.g. preventing and treating immune disorders involving inhibition of factor VIII binding
EP690126		1996	New deletion mutant of factor VIII - useful for treating factor VIII deficiency, esp. haemophilia A
EP686694		1995	Virucidal treatment of aq. soln. of therapeutic protein - esp. coagulation factor or antibody, by adding azole cpd., pref. imidazole, giving high protein recovery
WO9526750	BR9507227	1995	Factor=VIII or Factor=IX formulation for treating haemophilic - by subcutaneous, intramuscular or intradermal admin., contg. bioavailability increasing additive, e.g. aminoacid or protein
WO9524427		1995	Novel purified hybrid human/animal factor VIII - with pro-coagulant activity and reduced immuno-reactivity
WO9518829		1995	Novel factor VIII derivative which maintains coagulation activity for an extended period - and has a functional A2 domain with an increased overall positive charge.
WO9518828		1995	Novel factor VIII derivative with resistance to enzymatic cleavage - and comprises a functional A2 domain where Glu720 and/or Tyr729 is deleted/substituted
WO9518827		1995	Novel factor VIII derivative used to treat haemophilia - and comprises a functional A2 domain containing a mutation at one or more Cys residues

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
WO9513301		1995	Crosslinked Factor VIII polypeptide which is stable - is prepd. using bis(sulphosuccinimydyl) suberate or disuccinimydyl suberate in the presence of polysorbate 80 to produce a coagulant with long lasting activity
WO9513300		1995	Factor VIII polypeptide(s) comprising a heavy chain shorter than native A1-A2 domain - are easier to produce recombinantly and retain coagulant activity, may be used to treat patients who have developed antibodies to C-terminal epitope(s) of Factor VIII
WO9512663		1995	Serum-free medium for prodn. of recombinant Factor VIII - contains a glucose or sucrose-based polysaccharide of mol.wt. 10000 to 450000 instead of human serum albumin
WO9512609		1995	Virus-inactivated factor=VIII-contg. fraction prepn. - from cryo-precipitate by membrane chromatography, giving pure, high activity factor=VIII for treating clotting disorders
WO9507713		1995	Treating Factor VIII deficiency to maintain a haemostatic condition - is used to treat haemophiliac that have developed Factor VIII inhibitors
WO9503332		1995	Activated and stabilised human Factor VIII protein with high specific activity and potency - prepd. by treatment with activating agent, removing agent and other proteins, and adjusting to mild acid conditions
EP629700		1994	Improved vector for effecting expression of protein in mammalian cells - with high productivity assured by establishing a minimum amplifiability index
WO9411503		1994	Nucleic acid encoding porcine factor VIII - used to obtain porcine and human-porcine chimeric factor VIII for treating haemophilia
WO9411013		1994	Chimeric blood coagulation factors - comprise factor V with at least 1 A3, C1 or C2 domain exon replaced with the homologous exon of factor VIII, or vice versa
EP600480		1994	Extracting factor VIII - von Willebrand factor complex from plasma - comprises stabilisation, selective absorption, extraction and purification, used for treatment of haemophilia A
WO9407510		1994	Factor VIII compsn contg nonionic surfactant stabiliser - used for treating haemophilia, having high stability during lyophilisation or storage without addn of albumin
WO9322337		1993	Factor VIII complex purificn. from protein fraction - by use of heparin-coupled chromatographic medium, elution with calcium chloride-histidine, adding glycine and sodium chloride and washing ppte
WO9322336		1993	New improved processes for prodn. of lyophilised factor VIII complex - comprises adding arginine as stabiliser to factor VIII,

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			lyophilising and contacting with solvent to reconstitute the complex
EP567448	BR9301641	1993	High purity virus free factor 8 compsn. prodn. - by chromatographic purificn. surfactant and heat treatments, effectively inactivating virus without mush loss of coagulant activity
WO9320093		1993	Hybrid human and porcine factor VIII - having high coagulant activity, used for treating patients with factor VIII deficiency partic. haemophilia
WO9315105		1993	High purity anti-haemophilia factor VIII from plasma or cryo-precipitate - by chromatography on anion exchanger and eluting with increasing salt gradient
WO9310143		1993	Recovery of purified and stabilised protein having factor-VIII activity - by contacting sample with at least one protease inhibiting or removing agent to remove or inhibit de-stabilising protease impurity
EP561034	BR9203322	1993	Modified eukaryotic cytoplasmic DNA virus prodn. - involves direct molecular cloning of modified DNA molecule contg. cytoplasmic DNA virus genome
WO9216557		1992	Recombinant human factor VIII derivs. and their DNA - for treatment of haemophilia A, with heavy and light chains linked by metal ion bond
EP508194		1992	New stabilised Factor VIII solns. with high specific activity - contain aminoacid and opt. detergent or organic polymer
EP466199		1992	New polypeptide fragments of factor 8C - useful in therapy to enhance clotting capability and with MABS for diagnostic assays
EP441695		1991	Factor VIII prepn. and analogues - with polycationic and/or polyanionic polymer prepd. by cell culture
WO9109122	BR9007921	1991	Recombinant human factor VIII deriv. deoxyribonucleic acid - encoding protein comprising two chains linked by segment of B domain
wo1988005825		1991	A method for producing factor VIII in haig yield
WO9107490		1991	New recombinant protein complexes having factor VIIIIC activity - used to produce antibodies, to isolate von Willebrand factor in diagnostic assays and to treat haemophilia
WO9107438		1991	Isolating factor 8 in high yield - by gel filtration of blood plasma without cryo-precipitation
EP416983		1991	Prepn. of factor VIII-von=willebrand factor complex concentrate - by pre-purifying whole plasma with barium chloride and aluminium hydroxide then purifying by chromatography on anion exchange resin
EP412466		1991	Treating factor 8 contg. plasma fraction to remove degrading enzymes - by treatment with specific adsorbent, before recovering stable factor 8 in high yield

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
EP411810		1991	Factor VIII complex purificn. by heparin affinity chromatography - involves eluting with aq. calcium chloride soln. to recover intact complex with high specific activity
WO9100347		1991	Proteins with factor-VIII activity - produced by in vitro culturing below 32 deg. celsius for short periods
EP408029		1991	Fractionating plasma protein following freeze-thaw treatment - by sequence of alcohol pptn., anion exchanger and affinity chromatography steps
WO9014886		1990	Protein sepn. medium esp. for factor VIII purificn. - comprises water-insol. matrix carrying poly-amine gps.
EP399321		1990	Prodn. of highly purified anti:haemophilic factor - by PEG precipitation gel filtration and heat-treating virus inactivation steps
JP2255698		1990	Prepn. of blood coagulant factor 8 - comprises gel filtration of aq. soln. contg. the coagulant using insoluble porous gel
EP383645		1990	High purity anti:haemophilia factor prodn. - by ion exchange chromatography to remove Willebrand factor and plasma contaminants, using elution with high ionic strength buffer
EP367713		1990	Antidote for blood anticoagulants - comprises Factor VIII, fragments which retain activity or material which increases concn. blood
WO8912065		1990	Sepn. of plasma proteins, esp. factor-VIII - by chromatography on moderately ionic anion-exchange resin
WO9002175		1990	A method for producing polypeptides by culturing eukaryotic cells in the presence of protease inhibitors
EP0306068		1989	Process for producing recombinant human factor VIII:C and transformant to be used therefor
EP321835		1989	Anti-haemophilic factor concentrate prodn. from cryo-precipitate - includes viral inactivation with chemical agent and gel filtration to remove agent and concentrate factor
EP303540		1989	New factor VIII deletion analogue - useful as blood clotting agent
WO8809813		1988	Proteins having Factor VIII activity - comprising deletion mutant proteins of Factor VIII in which central region has been deleted
EP286323		1988	Ultra-purification process for polypeptide - by contact with an immobilised antibody, elution, passing through an affinity region and elution
EP0254076		1988	Improved recombinant protein production
EP270516		1988	Factor 8 fraction of high specific activity prodn. - from cryo-ppte. by removing protein impurities, pptn. of factor 8, dissolving ppte., lyophilisation and heat inactivation of viruses
WO8800831		1988	New DNA sequences encoding modified factor VIII:C - with deletion of DNA encoding

Documento de Patente	Pedido no Brasil	Ano de Publicação	Título
			maturation polypeptide, useful for high yield transformation
WO8800210		1988	Coagulation active complex prodn. - by reacting light chain and heavy chain fragments of Factor VIII in the presence of a complex promoting agent
WO198808035		1988	Improved Method for producinn Factoe VIII:c-Type Proteins
WO8704187		1987	Method for Producing Factor VIII:c Type Proteins
WO8707144		1987	New deletion and replacement variants of factor 8:c - resistant to proteolysis but retaining pro-coagulant activity, and new DNA coding sequences
EP232112		1987	Recombinant protein complex having human Factor VIII-C activity - obtd. by co-expressing genes encoding polypeptides from the A domain and C domain
EP221566		1987	Purificn. and concn. of antihæmophilic factor from cryo-pptes. - comprises addn. of calcium ion to improve PPTN of fibrinogen and fibronectin contaminants opt. with addn. of polyethylene glycol
WO8606101		1986	Protein having pro-coagulant activity - obtd. from truncated version of DNA sequence which expresses complete human factor VIII-C
EP197901		1986	New fragments of human factor VIII for treating hæmophilia - with higher specific activity and longer in vivo half life
EP0157556		1985	Recombinant factor VIII-C
EP160457		1985	New recombinant functional human factor VIII or deriv. - useful for treating hæmophilia and obtd. as pure prod. by recombinant DNA technology
EP152746		1985	Monoclonal antibodies to factor eight C - for isolating factor eight C complex from plasma and polypeptide fragments
EP150735		1985	Prodn. or human factor viii C or its precursors of sub-units - by using recombinant DNA techniques with Factor VIII C gene expressed in host
WO8501961		1985	Prodn. of human and porcine factor VIIIc - by using recombinant dna techniques for their cellular prodn
EP123945		1984	Coagulant polypeptide(s) obtd. from human factor VIII:C - and monoclonal antibodies useful in their recovery by immuno-adsorption
WO8302114		1983	Ultra-purification of Factor VIII from plasma - by adsorption on agarose bound to monoclonal antibody and on amino-hexyl-agarose

ANEXO IV

Perfil de Consumo e Produção de Aminoácidos nos Cultivos de Células BHK Produtoras de FVIII em Diferentes Temperaturas nos Meios DMEM/F12 e DMEM/F12/SFB

Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio DMEM/F12.

q_{aa} ($\mu\text{mol cel}^{-1} \text{h}^{-1}$)	33°C	35°C	37°C
Asparagina	-0,71	-0,67	-0,32
Metionina	-0,52	-0,49	-0,19
Valina	-0,99	-0,48	-0,37
Aspartato	-0,71	-0,31	-0,18
Serina	-2,33	-2,05	-4,46
Glutamato	-0,46	-0,92	-0,26
Leucina	-1,82	-1,76	-3,20
Glicina	0,78	0,49	0,43
Prolina	1,82	1,59	0,88

Taxas específicas de consumo e formação dos aminoácidos analisados (q_{aa}) nos cultivos em diferentes temperaturas no meio DMEM/F12/SFB.

q_{aa} ($\mu\text{mol cel}^{-1} \text{h}^{-1}$)	33°C	35°C	37°C
Asparagina	-0,38	-0,37	-0,50
Metionina	-0,24	-0,18	-0,47
Valina	-1,14	-0,32	-0,97
Aspartato	-0,38	-0,37	-0,31
Serina	-1,49	-1,00	-2,32
Glutamato	-0,52	-0,45	-0,50
Leucina	-1,25	-1,27	-1,81
Glicina	1,51	0,37	0,37
Prolina	1,12	1,00	0,60