



CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS PARA A
PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS F_c DE ANTICORPOS

Luiz Yamauchi Junior

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

Orientadores: Leda dos Reis Castilho
Brandon James DeKosky

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS PARA A
PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS F_c DE ANTICORPOS

Luiz Yamauchi Junior

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

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Brandon James DeKosky

Aprovada por: Prof^a. Leda dos Reis Castilho

Prof. Brandon James DeKosky

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves

Prof. André Macedo Vale

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2020

Yamauchi Junior, Luiz

Cultivo de Células Animais para a Produção de Fragmentos Fc de Anticorpos/ Luiz Yamauchi Junior. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XVI, 80 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Brandon James DeKosky

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 70-80.

1. Células animais. 2. Fragmento Fc. 3. Anticorpos. 4. Transfecção. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, que sempre me mostrou os melhores caminhos e os melhores desafios para vencer constantemente.

À minha família, que, mesmo distante, me apoia incondicionalmente e sempre me apoiou. Meu pai Luiz, minha mãe Sônia, Henrique, Mariana e Eva. Sem vocês não sou nada, não conseguiria ir a lugar algum.

À COPPE e PEQ, bem como à toda equipe de professores e funcionários, pela oportunidade de realizar um mestrado em uma das melhores, se não a melhor, instituição em termos de estrutura e qualidade para pós-graduação no Brasil. Pressões à parte, a contínua busca pela excelência dos alunos e professores é algo que qualquer instituição de ensino do mundo deveria se espelhar.

Ao órgão fomentador CNPq, pelo fornecimento da bolsa de mestrado, e aos prof. Leda e Brandon, por viabilizar esse projeto nos aspectos financeiros e técnicos.

Aos companheiros de pós-graduação, que de uma forma ou outra me ajudaram a crescer e me manter focado para esse momento. Em especial, Thiago, José Roberto, Tetsuo, Renato, Pedro, Milena, Guilherme, Cyntia, Eduardo, João Victor e muitos outros.

Aos meus orientadores, Prof^a. Leda e Prof. Brandon, além de considerá-los profissionais excepcionais, os vejo como verdadeiras estrelas em suas áreas. Em especial à professora Leda, que me acompanhou com tanta paciência e compreensão, sem nunca perder o sorriso e a didática, mesmo em épocas mais corridas e conturbadas. Sua excelência em praticamente todas as esferas da sua vida é impressionante e fico feliz que pude acompanhar de perto sua nova empreitada como mãe da querida Laurinha.

Aos meus amigos, os quais não nomearei, mas que sabem que me ajudaram, antes ou durante o mestrado. Cada um me fez crescer e espero que saibam disso.

Por fim, um agradecimento enorme e emocionado aos meus colegas e companheiros do LECC, que me ensinaram muito em várias esferas do conhecimento e passaram mais tempo comigo nesses últimos anos que boa parte dos meus amigos, tornando-se também meus queridos amigos. Agradeço a cada um por ter passado por minha vida, Alexandre, Túlio, Matheus, Maycou, Nathália, Renata, Luiz Fernando, Ioná, Federico, Pedro, Wallace, Sanclayver, Thay, Lucas, Bruce, Juvissan e Jasper. Um agradecimento à parte para o Rimenys, que me ensinou demais.

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”.*
Guimarães Rosa

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

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS PARA A PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS Fc DE ANTICORPOS

Luiz Yamauchi Junior

Fevereiro/2020

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Brandon James DeKosky

Programa: Engenharia Química

Este trabalho investigou a geração de populações estáveis de células HEK293-3F6 recombinantes produtoras do fragmento cristalizável (Fc) de anticorpos humanos e o cultivo celular destas populações, utilizando para a transfecção distintas construções gênicas que diferiam entre si em relação ao peptídeo sinal, a mutações com impacto na formação de dímeros ou na atividade biológica e em relação ao *linker* empregado. Foram geradas 14 populações celulares estáveis produtoras de diferentes proteínas Fc por meio de transfecção com lipídeos catiônicos, tendo-se verificado que o reagente Lipofectamine 3000 foi mais eficaz do que o reagente Mirus TransIT-2020. Dos quatro peptídeos sinal testados, PS1 e PS2 mostraram-se os mais eficientes na expressão das proteínas Fc secretadas por células HEK293, em experimentos realizados em batelada em tubos ventilados. A mutação para evitar a dimerização das subunidades do fragmento Fc não foi bem-sucedida, havendo a incidência de dímeros na presença desta mutação. As populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9, que se acredita serem mais promissoras, foram estudadas em maiores detalhes. No cultivo da população HEK.Fc1 em pseudoperfusão em pequena escala, foi observada a maior $X_{v_{max}}$ encontrada na literatura para células HEK293 nessas condições ($62 \cdot 10^6$ cél/mL). No cultivo em batelada em biorreator de tanque agitado, a população celular HEK.Fc1 apresentou o melhor desempenho em termos de crescimento celular e expressão proteica.

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

CELL CULTURE OF MAMMALIAN CELLS FOR
Fc ANTIBODY FRAGMENT PRODUCTION

Luiz Yamauchi Junior

February/2020

Advisors: Leda dos Reis Castilho
Brandon James DeKosky

Department: Chemical Engineering

This work assessed the generation of Fc antibody fragment producing HEK293-3F6 recombinant cell populations and their cell culture, using for transfection different genic constructs that differ from each other in relation to signal peptide, mutations on dimer formation and biological activity, and linker type. 14 stable Fc protein producing cell populations were generated through transfection with cationic lipids, it was observed that Lipofectamine 3000 reagent was more effective than Mirus TransIT-2020 reagent. Among four signal peptides tested, PS1 and PS2 were the most efficient for Fc fragment secretion by HEK293 cells in batch experiments in vented tubes. It was observed by SDS-PAGE analysis that the monomerization mutation was unsuccessful in avoiding dimer expression. HEK.Fc1 and HEK.Fc9 cell populations, which were believed to be the most promising, were chosen to be studied with more details. In pseudo-perfusion culture of HEK.Fc1 cell population in vented tubes it was recorded the highest viable cell density for HEK293 cells in the literature ($62 \cdot 10^6$ cell/mL). In stirred tank bioreactor batch culture, HEK.Fc1 showed the best performances in cell growth and protein expression.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Anticorpos monoclonais e seus derivados	3
2.1.1 Fragmento Fc	5
2.1.2 Aplicação de mAbs e derivados.....	8
2.1.3 Mercado de mAbs e seus derivados.....	10
2.2 Geração de células animais recombinantes.....	11
2.2.1 Linhagens de células animais.....	13
2.2.2 Transfecção transiente	15
2.2.3 Transfecção estável.....	16
2.3 Cultivo de células animais.....	18
2.3.1 Metabolismo de células animais.....	20
2.3.2 Modos de operação	22
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo global.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
4.1 Linhagem celular	31
4.2 Manutenção das células.....	31
4.2.1 Meio de cultivo	31
4.2.2 Condições de cultivo.....	31
4.2.3 Bancos celulares	32
4.3 Geração de células recombinantes produtoras de proteínas Fc	33
4.3.1 Construções plasmidiais.....	33
4.3.2 Transfecção	34

4.3.3	Geração de populações celulares estáveis	35
4.4	Cultivo das populações celulares estáveis produtoras das proteínas Fc.....	36
4.4.1	Cultivo em tubos ventilados em modo batelada	37
4.4.2	Cultivo em tubos ventilados em modo pseudoperfusão.....	38
4.4.3	Cultivo em biorreator de tanque agitado no modo batelada	38
4.5	Ensaio analítico	39
4.5.1	Concentração e viabilidade celular	39
4.5.2	Concentrações de glicose e lactato	39
4.5.3	Quantificação dos fragmentos Fc	40
4.5.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação por azul de Coomassie	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	Geração de células animais recombinantes produtoras de proteínas Fc.....	42
5.1.1	Comparação entre reagentes de transfecção Lipofectamine 3000 e Mirus TransIT-2020	45
5.2	Estudo cinético em tubos ventilados em modo batelada.....	48
5.3	Cultivo das populações celulares mais promissoras em modo pseudoperfusão	56
5.4	Cultivo em biorreator de tanque agitado em modo batelada	62
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	68
6.1	Conclusões.....	68
6.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Representações esquemáticas de uma imunoglobulina G. (a) Denominações das regiões do anticorpo com base em fragmentos (Fab e Fc), conservação entre anticorpos (região constante e variável) e tipo das cadeias (leve e pesada); (b) Composição dos domínios e partes que compõem o anticorpo: domínios variáveis da cadeia leve (VL) e pesada (VH) e domínios constantes das cadeias leve (CL) e pesada (CH1, CH2, CH3).....4
- Figura 2.2** – Proteínas de fusão Fc. (a) Representação da formação de uma proteína de fusão a partir do domínio extracelular (ECD) de um receptor transmembrana com o fragmento Fc de um anticorpo IgG1.....6
- Figura 2.3** – Número de aprovações de produtos biofarmacêuticos.....10
- Figura 2.4** – Lipofecção: a) lipossomas compostos por dupla camada de lipídeos catiônicos arranjados em formato esférico; b) complexação das lipossomas com as moléculas de DNA; c) endocitose da lipossoma, que é digerido para a liberação do DNA; e d) alternativamente, as lipossomas podem se fundir à membrana, liberando o DNA em seu interior.....13
- Figura 2.5** – Diagrama esquemático dos tipos de transfecção. (a) Transfecção estável. O DNA exógeno (vermelho) entra na membrana celular e no núcleo, se integrando no genoma da célula hospedeira. A expressão ocorre a partir do DNA genômico. (b) Transfecção transiente. O DNA exógeno entra no núcleo e é expresso sem ser integrado ao genoma. Alternativamente, mRNA (azul escuro) pode ser transfectado e diretamente traduzido em proteína no citoplasma. Adaptado de KIM e EBERWINE (2010).....17
- Figura 2.6** – Curva típica de crescimento celular de células animais, com as quatro fases: (A) fase lag, (B) fase de crescimento exponencial, (C) fase estacionária, (D) fase de morte.....18
- Figura 2.7** – Representação esquemática dos modos de operação para cultivo de células animais. (A) Batelada; (B) Batelada alimentada; (C) Contínuo; e (D) Perfusão..22
- Figura 2.8** – Representação esquemática do perfil de um cultivo em perfusão (linha contínua) em comparação com um cultivo em batelada alimentada (linha tracejada): (A) concentração de células viáveis; (B) concentração de produto; e (C) quantidade de produto produzido por litro de meio utilizado.....27
- Figura 4.1** – Representação esquemática da disposição das modificações nas 14 construções plasmidiais (Fc1 a Fc14). Legenda: Peptídeo sinal (PS), dimerização (Dim), monomerização (Mon), presença de mutação (Mut), ausência de mutação (Wt) e *linker* (Link).....34
- Figura 5.1** – Placa de 24 poços profundos para cultivo de células animais utilizada na transfecção em duplicata com os plasmídeos Fc2, Fc4, Fc5, Fc6 e Fc8 com os reagentes Lipofectamine 3000 (indicado pela letra L) e Mirus TransIT-2020 (letra M) e nas primeiras semanas de seleção com antibiótico sulfato de G418.....42

Figura 5.2 – Perfil de concentração celular e viabilidade de células transfectadas com os plasmídeos Fc2 (a), Fc4 (b), Fc5 (c), Fc6 (d), Fc8 (e) e o controle negativo (f), todas em placa de poços fundos, exceto Fc4, para o qual foram usados tubos ventilados.....43

Figura 5.3 – *Spot blot* das amostras de sobrenadante da seleção com sulfato de G418 para geração de populações estáveis de células HEK293 transfectadas com as construções Fc2, Fc4, Fc5, Fc6, Fc8 com os reagentes de transfecção Lipofectamine 3000 (indicado como “Lip.”) e Mirus TransIT-2020 (indicado como “Mir.”).....45

Figura 5.4 – Perfis de concentração de células viáveis (Xv) e viabilidade celular nos estudos cinéticos de cultivo das populações celulares estáveis, realizados em batelada em tubos ventilados por 9 dias, divididos em dois grupos para facilitar visualização da influência das construções plasmidiais: (A) populações HEK.Fc1-8; e (B) populações HEK.Fc1/3/9-14.....48

Figura 5.5 – Perfis de concentração de glicose e lactato nos estudos cinéticos de cultivo das populações celulares estáveis, realizados em batelada em tubos ventilados por 9 dias, divididos em dois grupos: (A) populações HEK.Fc1-8; e (B) populações HEK.Fc1/3/9-14.....50

Figura 5.6 – Produção de proteínas Fc secretadas pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1-14 durante os 9 dias de estudo cinético de produção em batelada em tubos ventilados.....51

Figura 5.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) das proteínas no sobrenadante das populações celulares estáveis HEK.Fc1-8 (esquerda) e HEK.Fc1/3/9-14 (direita) do 7º dia de cultivo em batelada em tubos ventilados, em condições não-redutoras, com revelação por azul de Coomassie.....53

Figura 5.8 – Perfis de concentração de células viáveis (Xv) e viabilidade das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e da linhagem hospedeira HEK293 em batelada (Bat.) e pseudoperfusão (PP), além da taxa de troca de meio, em volume de meio trocado pelo volume total de líquido por dia.....56

Figura 5.9 – Perfis de concentração de glicose (A) e lactato (B) das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e da linhagem hospedeira HEK293 em batelada (Bat.) e pseudoperfusão (PP).....59

Figura 5.10 – Quantificação da produção de proteínas Fc pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e pela linhagem hospedeira HEK293 pseudoperfusão em tubos ventilados, com início da troca diária de meio a partir do dia 4.....60

Figura 5.11 – Imagens do cultivo em biorreator de tanque agitado em batelada utilizando o biorreator Applikon ez-Control (esquerda). À direita, a foto mostra em maior detalhe a suspensão de células no interior do vaso do biorreator.....62

Figura 5.12 – Perfis de concentração de células viáveis (Xv) e viabilidade das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em batelada em biorreator de tanque agitado e em tubos ventilados.....62

Figura 5.13 – Perfis de concentração de concentração de glicose (A) e lactato (B) das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 no cultivo em batelada em biorreator de tanque agitado e em tubos ventilados.....64

Figura 5.14 – Quantificação da produção de proteínas Fc pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em cultivo em batelada em biorreator de tanque agitado.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Proteínas de fusão contendo fragmento Fc aprovadas para tratamento terapêutico pela agência de regulação americana FDA, ordenados cronologicamente por data de aprovação.....	9
Tabela 2.2 – Linhagens celulares animais comumente usadas na indústria biofarmacêutica.....	14
Tabela 2.3 – Principais equipamentos de retenção celular e suas propriedades.....	28
Tabela 5.1 – Concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$), taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação das populações celulares estáveis e da linhagem hospedeira no cultivo em batelada em tubos ventilados.....	47
Tabela 5.2 – Resumo dos parâmetros de crescimento celular e expressão de proteínas Fc secretadas pelas populações celulares estáveis consideradas prioritárias, que contêm as sequências para dimerização, mutação e <i>linker</i> 1.....	54
Tabela 5.3 – Resumo dos parâmetros de crescimento celular e expressão de proteínas Fc das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 no cultivo em batelada em tubo ventilado e em biorreator de tanque agitado.....	67

LISTA DE SÍMBOLOS

μ_{exp}	Taxa específica de crescimento celular na fase exponencial
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ADCP	Fagocitose celular dependente de anticorpo (do inglês <i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>)
Alfa-Gal	Galactose- α -1,3-galactose
ATF	Sistema de filtração tangencial alternante (do inglês <i>alternating tangential flow</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento.
C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}	Domínios constantes da cadeia pesada
CHO	<i>Células Chinese Hamster Ovary</i>
C_L	Domínio constante da cadeia leve
CTLA4	Proteína T-linfócito-associada citotóxica 4 (do inglês <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i>)
Da	Dalton
Dim	Dimerização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Oxigênio dissolvido
EMA	Agência europeia de medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
Fab	Fragmento de união ao antígeno (do inglês <i>fragment antigen-binding</i>)
Fc	Fragmento cristalizável
FcR	Receptores Fc, podendo ser das classes Fc γ R, Fc α R, Fc ϵ R, Fc δ R e Fc μ R
FcRn	Receptor neonatal Fc
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FIX	Fator IX de coagulação

FVIII	Fator VIII de coagulação
g	Grama: unidade de massa
g	Unidade de força centrífuga relativa
GFP	Proteína fluorescente verde (do inglês <i>green fluorescent protein</i>)
Glic	Glicose
Gln	Glutamina
GLP1	Peptídeo semelhante a glucagon 1 (do inglês <i>glucagon-like peptide-1</i>)
HCP	Proteínas da célula hospedeira (do inglês <i>host cell protein</i>)
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HRP	Enzima peroxidase de rábano (do inglês <i>Horseradish peroxidase</i>)
Ig	Imunoglobulina, podendo ser das classes M, G, D, A e E
IL	Interleucina
ILR1	Receptor de interleucina 1
Lact	Lactato
LECC	Laboratório de Engenharia em Cultivos Celulares
LFA3	Antígeno-3 associado à função linfocitária (do inglês <i>lymphocyte function-associated antigen 3</i>)
Link	<i>Linker</i>
mAbs	Anticorpos monoclonais (do inglês <i>Monoclonal Antibodies</i>)
MAC	Complexo de ataque à membrana (do inglês <i>membrane attack complex</i>)
MCB	Banco celular mestre (do inglês <i>Master Cell Bank</i>)
Mon	Monomerização
Mut	Mutação
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NK	Células <i>natural killer</i>
P	Concentração de um produto qualquer
PS	Peptídeo sinal
PSA	Persulfato de amônio
S	Concentração de um substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
q_P	Taxa específica de formação de produto
q_{Pexp}	Taxa específica de formação de produto na fase exponencial
t	Tempo de cultivo
TBS	Solução salina tamponada com Tris (do inglês <i>Tris-buffered saline</i>)
t_{Dexp}	Tempo de duplicação celular na fase exponencial
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFF	Sistema de filtração de fluxo tangencial (do inglês <i>tangential-flow filtration</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR2	Receptor do fator de necrose tumoral 2
TNSALP	Fosfatase alcalina não-tecido específica (do inglês <i>tissue non-specific alkaline phosphatase</i>)
TPBP	Proteína ligante do receptor de trombopoetina (do inglês <i>thrombopoietin receptor binding protein</i>)
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
V_H	Domínio variável da cadeia pesada
V_L	Domínio variável da cadeia leve
WCB	Banco celular de trabalho (do inglês <i>Working Cell Bank</i>)
Wt	Tipo selvagem/nativo: ausência de mutação (do inglês <i>wild type</i>)
X_v	Concentração de células viáveis
X_{Vmax}	Concentração máxima de células viáveis

1 INTRODUÇÃO

Os medicamento comumente denominado biofármacos são baseados em proteínas ou ácidos nucleicos, sendo produzidos por organismos engenheirados, sem que seja extraído diretamente de uma fonte biológica nativa. Atualmente, a maioria dos biofármacos é produzida por tecnologia do DNA recombinante em células animais cultivadas em biorreatores (WALSH, 2002). Com o amadurecimento das tecnologias envolvendo a produção de biofármacos, o número de novos produtos tem crescido rapidamente. Os anticorpos monoclonais e seus derivados são a principal e mais lucrativa classe de biofármacos, com 123 bilhões de dólares em volume de vendas em 2017 (WALSH, 2018).

O primeiro passo para geração de um novo produto biofarmacêutico é o desenho da sequência de DNA referente à proteína que se deseja produzir. Essa sequência deve ser incorporada à célula hospedeira, para que a mesma se torne capaz de produzir a proteína de forma adequada. A inserção do gene da proteína de interesse pode ocorrer em diferentes sítios do genoma nas células transfectadas. Logo, para se obter altas produtividades na produção da proteína de interesse, é necessária a seleção das subpopulações e, se possível, dos clones mais produtivos a partir da população de células transfectadas e que teve o DNA exógeno incorporado ao seu genoma (CASTAN et al., 2018).

O cultivo de células animais em biorreatores para a produção de proteínas complexas é a estratégia mais amplamente utilizada na indústria para se obter grandes quantidades de proteínas terapêuticas. A otimização do cultivo de células inclui melhorias na composição de meios e no controle de processos, além do cultivo em altas concentrações celulares, o que tem possibilitado atingir concentrações na ordem de gramas por litros, centenas de vezes superior ao produzido décadas atrás (WURM, 2004). Diferentes modos de operação podem ser utilizados, como batelada simples, batelada alimentada, modo contínuo e perfusão. Atualmente, na indústria biofarmacêutica, há uma forte tendência para o uso de cultivos em perfusão, que é uma variação do modo contínuo utilizando-se dispositivos para a retenção das células no biorreator e obtendo-se de forma contínua o produto em concentrações elevadas (LINDSKOG, 2018a).

O fragmento cristalizável (Fc) de imunoglobulinas pertence à região constante da cadeia pesada dos anticorpos. A principal utilização do fragmento de anticorpo Fc é em proteínas de fusão, que consistem no fragmento Fc diretamente ligado a uma molécula ou proteína de interesse com atividade biológica terapêutica (CHAMOW et al., 2014). As principais vantagens de se construir uma proteína de fusão contendo o fragmento Fc residem no aumento do tempo de meia-vida da molécula fusionada no corpo do paciente, seja por maior estabilidade da molécula ou por mecanismos que evitam sua eliminação pelo corpo, além de se poder utilizar da mesma estratégia de purificação que é utilizada para os mAbs (CZAJKOWSKY et al., 2012). Outra vantagem é a possibilidade de modulação das funções efetoras imunes pelo fragmento Fc, sendo possível promover ou diminuir a resposta imune associada à ligação com o receptor FcR (KELLNER et al., 2017).

As proteínas de fusão contendo o fragmento Fc de anticorpo, ou simplesmente proteínas de fusão Fc, representaram sozinhas vendas mundiais de U\$ 19,7 bilhões em 2017, tendo dois produtos entre os dez biofármacos mais vendidos: Enbrel® (Amgen/Pfizer) com U\$ 8,34 bilhões e Eylea® (Regeneron/Bayer) com U\$ 5,93 bilhões em vendas no mesmo ano (WALSH, 2018). O número de aprovações de proteínas de fusão Fc vem aumentando e as aplicações desta classe de biofármacos vêm se diversificando (WALSH, 2018).

Considerando o fragmento Fc como parte estruturante de uma importante classe de derivados de anticorpos, este estudo propõe a investigação da expressão de fragmentos Fc com modificações estruturais em células animais da linhagem HEK293 (*human embryonic kidney cells*). As células foram transfectadas com vetores contendo construções gênicas codificando a proteína Fc de IgG humana com modificações em relação ao peptídeo sinal usado, a mutações com impacto na atividade biológica ou na formação de dímeros, assim como variações em um “*linker*” presente na região N-terminal. Foram geradas populações celulares recombinantes estáveis expressando os 14 tipos de proteínas Fc. Essas populações foram caracterizadas em estudos cinéticos e o cultivo das populações mais promissoras foi em seguida investigado em diferentes modos de operação em diferentes escalas, buscando otimizar a produção das proteínas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anticorpos monoclonais e seus derivados

Os anticorpos são glicoproteínas da classe das imunoglobulinas, são naturalmente produzidas no organismo por linfócitos B em humanos ou outras espécies. Os anticorpos monoclonais (mAb, do inglês *monoclonal antibodies*) são anticorpos derivados de um clone de linfócito B e possuem a capacidade de se ligarem especificamente a um epítipo de um antígeno, podendo ser moléculas endógenas ou exógenas ao corpo, assim, induzindo a identificação e neutralização dos mesmos (MURPHY, 2014). Estima-se que existam mais de 1 bilhão de diferentes clones de linfócitos B produzindo anticorpos monoclonais no corpo humano, sendo que cada mAb possui maior afinidade para o reconhecimento de único antígeno (TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008).

Inicialmente produzidos a partir do soro policlonal de animais imunizados a baixos volumes e com pouca padronização, os anticorpos passaram a ser produzidos na forma monoclonal, de especificidade única, *in vitro*, em 1975, devido à tecnologia de hibridomas, que consiste na fusão de um linfócito B com uma célula tumoral, denominada mieloma, permitindo a propagação indefinida do linfócito em um sistema de cultivo *in vitro*, para a produção de um único tipo de anticorpo de especificidade única (monoclonal) (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). A técnica inicialmente permitia apenas a produção de mAbs de origem murina, que resultava em reações imunogênicas nos pacientes. Com técnicas de biologia molecular, foi possível produzir mAbs humanizados, com a substituição de partes do anticorpo murino por parte do humano, ou completamente humano, que reduziu o potencial imunogênico da administração em pacientes humanos (JAGSCHIES, 2018).

Anticorpos monoclonais e seus derivados são utilizados para tratamento de várias doenças, desde algumas com poucos milhares de pacientes no mundo, como a síndrome periódica associada a criopirina, até doenças que afetam milhões de pacientes, como asma e artrite (ECKER et al., 2015). O potencial terapêutico dos mAbs é extenso e continua a ser expandido. Seu uso em imunoprofilaxia e imunoterapia é aplicado a doenças infecciosas e para evitar rejeição de órgãos transplantados, e podem

ser usados também como carreadores de substâncias tóxicas a tumores ou na identificação e tratamento de neoplasmas. Sua aplicação inclui tratamento de diversos tipos de câncer, doenças autoimunes, artrite e doenças metabólicas (MAHMUDA et al., 2017).

A estrutura de anticorpos monoclonais do tipo IgG (massa molecular de aproximadamente 150 kDa) é comumente representada pela letra Y (Figura 2.1), pois a molécula é composta por duas cadeias pesadas idênticas (cerca de 50 kDa cada) e duas cadeias leves idênticas (cerca de 25 kDa cada). Além da IgG, existem outros tipos de imunoglobulinas (IgM, IgD, IgA e IgE). Os tipos são determinados pelos cinco isotipos de cadeias pesadas existentes, denominadas μ , δ , γ , α e ϵ , respectivamente. Existem dois isotipos de cadeia leves, denominadas λ e κ , contudo sem distinção funcional entre elas, podendo ser encontradas em qualquer subtipo de anticorpo. A maior parte dos anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico é do tipo IgG, que também é o mais comumente encontrado no corpo humano. IgGs podem, ainda, ser de diferentes subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4), sendo IgG1 a mais comum (MURPHY, 2014).

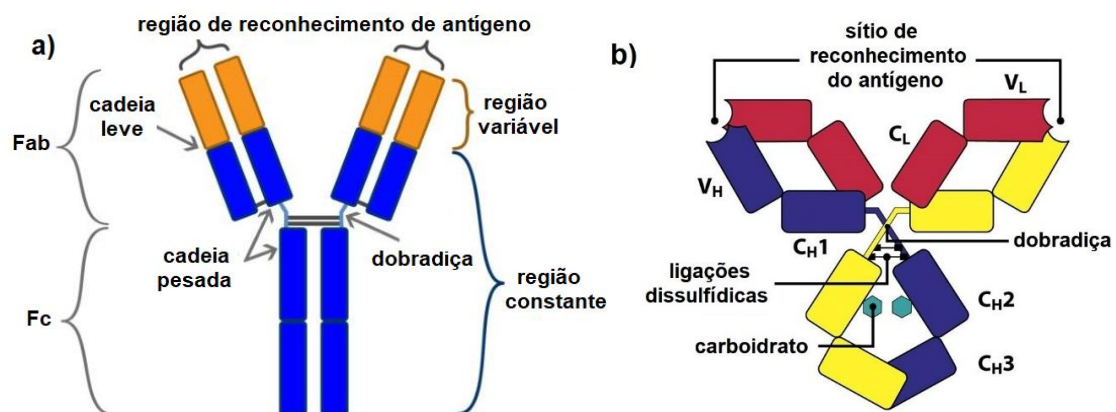


Figura 2.1 – Representações esquemáticas de uma imunoglobulina G. (a) Denominações das regiões do anticorpo com base em fragmentos (Fab e Fc), conservação entre anticorpos (região constante e variável) e tipo das cadeias (leve e pesada); (b) Composição dos domínios e partes que compõem o anticorpo: domínios variáveis da cadeia leve (V_L) e pesada (V_H) e domínios constantes das cadeias leve (C_L) e pesada (C_H1, C_H2, C_H3). Adaptado de MURPHY (2014).

Quando completamente enovelado, o anticorpo pode ser dividido em três fragmentos globulares funcionais de massa molecular aproximadamente igual: dois fragmentos Fab e um fragmento Fc, que são ligados por uma cadeia polipeptídica flexível, denominada de dobradiça (*hinge region*, em inglês) (MURPHY, 2014).

Cada fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *antigen binding fragment*) tem como função reconhecimento dos antígenos e é composto por uma cadeia leve completa pareada com o domínio variável V_H e o domínio C_H1 da cadeia pesada, sendo altamente variável entre os tipos anticorpos monoclonais, o que possibilita a identificação de diversas moléculas de forma específica. O fragmento cristalizável (Fc) interage com os receptores FcR das células do sistema imune e é composto pelos domínios constantes C_H2 e C_H3 da cadeia pesada. A região Fc é conservada entre anticorpos do mesmo subtipo e da mesma espécie, ou seja, sua composição varia entre diferentes subtipos e diferentes organismos (MURPHY, 2014). Os receptores Fc (FcR) são expressos na superfície de várias células do sistema imune e se ligam à região Fc de imunoglobulinas, possuindo especificidade para IgG (FcγR), IgA (FcaR), IgE (FceR), IgD (FcδR) ou IgM (FcμR) (KOENDERMAN, 2019).

2.1.1 Fragmento Fc

Os fragmentos Fab e Fc, de aproximadamente 50 kDa cada, podem ser utilizados para fins terapêuticos na forma fragmentos de anticorpo, proteínas de fusão ou conjugados anticorpo-fármaco, que são referidos coletivamente como produtos derivados de anticorpos monoclonais (ECKER et al., 2015).

As proteínas de fusão Fc são uma das principais categorias de derivados de mAbs e em amplo crescimento, consistindo do fragmento Fc de um anticorpo, em geral IgG, ligado a uma proteína ou a um peptídeo (Figura 2.2). A molécula fusionada pode ser qualquer molécula proteica de interesse, como um ligante que ativa um receptor celular, um peptídeo que reconhece um patógeno ou uma proteína que se liga a moléculas específicas para identificação (CZAJKOWSKY et al., 2012). Dos onze biofármacos aprovados que utilizam o fragmento Fc em sua estrutura, com exceção dos próprios anticorpos monoclonais completos, oito deles são fusionados com proteínas, dois com peptídeos e um com um peptídeo de direcionamento a um tecido específico (STROHL, 2018).

Segundo dados de 2018, além das 11 proteínas de fusão que utilizam o fragmento Fc, havia 23 proteínas de fusão Fc em fase I ou II de desenvolvimento clínico e 3 candidatos em fase III (STROHL, 2018). Não existem biofármacos comercializados que sejam compostos do fragmento Fc isolado, sem ser conjugado com outra molécula,

ao contrário do fragmento Fab, é a base de quatro biofármacos aprovados, compostos por essa porção do anticorpo isolada (STROHL, 2018).

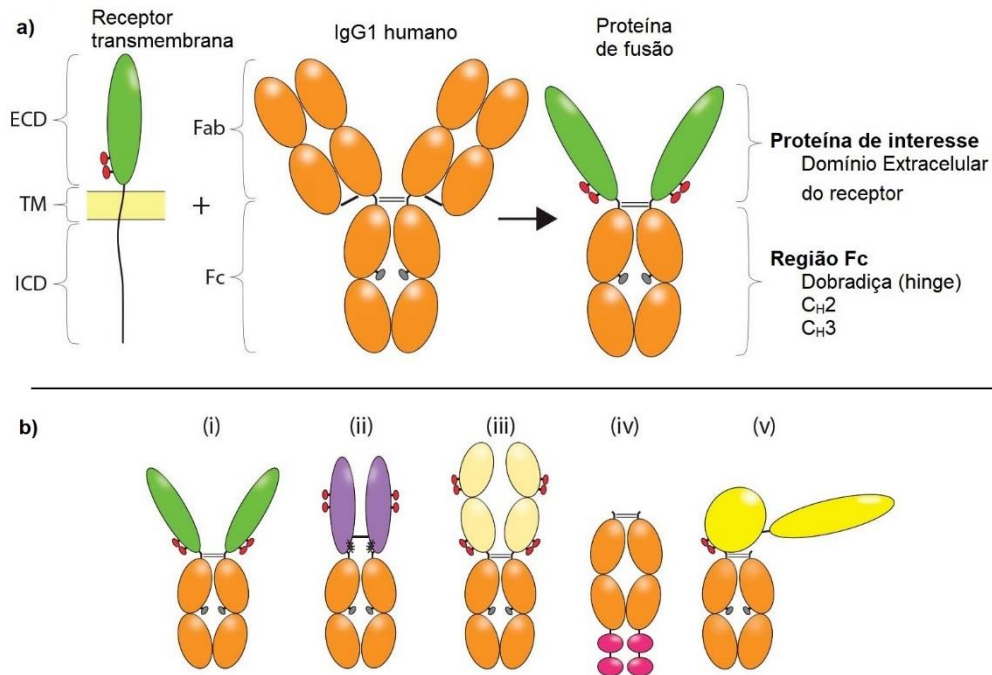


Figura 2.2 – Proteínas de fusão Fc. (a) Representação da formação de uma proteína de fusão a partir do domínio extracelular (ECD) de um receptor transmembrana com o fragmento Fc de um anticorpo IgG1. Legenda: domínio transmembrana (TM), domínio intracelular (ICD) e domínios constantes da cadeia pesada (C_{H2} e C_{H3}). (b) Representações de diferentes proteínas de fusão aprovadas para uso terapêutico: (i) Alefacept, (ii) Abatacept, (iii) Belatacept (iv) Romiplostim e (v) Eftrenonacog alfa. Adaptados de CHAMOW et al. (2014).

O uso do fragmento Fc em proteínas de fusão e outros derivados de mAbs traz benefícios biológicos e propriedades farmacológicas adicionais. A propriedade mais importante é o aumento do tempo de meia-vida da molécula na corrente sanguínea, que prolonga a sua atividade terapêutica. A interação do fragmento Fc com o receptor neonatal Fc (FcRn), presente em células do sistema imune, impede que as proteínas sejam destruídas por essas células, retornando-as de volta ao plasma, função chamada de reciclagem de anticorpos. Além disso, o alto tamanho molecular do fragmento Fc diminui a eliminação por via renal, que ocorre por filtração de partículas de baixo diâmetro nominal nos rins, tornando-se particularmente interessante no caso da fusão a peptídeos e proteínas de interesse pequenos, que seriam rapidamente eliminadas por filtração renal se administradas isoladamente no paciente (CZAJKOWSKY et al., 2012; RAJPAL et al., 2014).

No caso de produtos voltados para tumores, algumas funções efetoras mediadas pelo fragmento Fc são particularmente importantes para que os anticorpos e seus derivados promovam a morte das células cancerígenas, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) e a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) (KELLNER et al., 2017). Um aumento dessas funções pode ser alcançado por mudanças na glicosilação da região Fc, como diminuição ou eliminação de glicofornas fusosiladas, o que aumenta a ligação com o receptor FcγRIIIa, como é o caso do obinutuzumab (Gazyva®), indicado para o tratamento de leucemia linfocítica crônica, único mAb aprovado que utiliza essa estratégia (KELLNER et al., 2017). Para diminuir as funções imunes efetoras, as estratégias mais comuns são a substituição de aminoácidos da região Fc ou da dobradiça, reduzindo a sialilação dos glicanos ou reduzindo a ocupação dos sítios de glicosilação. Atualmente, um anticorpo monoclonal e duas proteínas de fusão aprovados utilizam modificações na região Fc com esse propósito, sendo que dois utilizam modificações na dobradiça (abatacept e belatacept) e um possui um fragmento Fc híbrido de IgG2/IgG4 (eculizumab) (STROHL, 2018).

O fragmento cristalizável Fc se enovela naturalmente de forma estável e independente. Essa propriedade é explorada para o aumento da estabilidade da molécula fusionada ao fragmento Fc em proteínas de fusão, como no caso dos medicamentos aprovados Aprolix® (Eftrenonacog alfa) e Eloctate® (Efmoroctocog alfa), nos quais a conjugação com o fragmento Fc aumenta a estabilidade dos fatores sanguíneos IX e VIII, respectivamente, moléculas conhecidamente instáveis (CZAJKOWSKY et al., 2012; JAFARI et al., 2017).

Do ponto de vista tecnológico, a presença da região Fc permite a utilização da efetiva e bem-estabelecida purificação por cromatografia de afinidade por proteína A, que é a estratégia mais utilizada para a purificação de anticorpos monoclonais e seus derivados (CZAJKOWSKY et al., 2012). A subclasse de imunoglobulina mais utilizada para anticorpos monoclonais ou fragmento Fc de proteínas de fusão é a IgG1, devido a características como alta neutralização, eficiente recrutamento de mecanismos efetores e longo tempo de meia-vida de residência no plasma (RAJPAL et al., 2014).

2.1.2 Aplicação de mAbs e derivados

Os anticorpos monoclonais e seus derivados possuem ampla aplicação terapêutica, inclusive, vários possuem como alvo mais de uma doença, sobretudo no caso de câncer, como linfomas, mielomas, melanomas e sarcomas, e de doenças autoimunes, como artrite, lupus, psoríase ou púrpura (GRILO e MANTALARIS, 2018).

No tratamento de câncer com biofármacos, o mecanismo de ação em geral envolve a inibição do crescimento e proliferação das células tumorais ou a ativação de mecanismos pró-apoptóticos das mesmas, em decorrência da ligação dos mAbs ou derivados a ligantes ou receptores dessas células. Outro mecanismo possível consiste em focar em eventos específicos que ocorrem no microambiente tumoral, como é o caso de alguns mAbs que se ligam a fatores que promovem o crescimento tumoral (HAFEEZ et al., 2018).

Ao se ligarem às células tumorais, os mAbs e derivados podem ativar os mecanismos efetores ADCC, ADCP e CDC do sistema imune para a destruição das mesmas. Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é o mecanismo pelo qual células efectoras, como as células NK (do inglês *natural killer*), são recrutadas pelo reconhecimento de receptores por anticorpos e liberam fatores citotóxicos nas células alvo, que provocam a lise celular. A fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) é intermediada pelos anticorpos, que se ligam a receptores nas células alvo, induzindo a fagocitose destas. A citotoxicidade dependente de complemento (CDC) promove a indução direta da lise da célula alvo por ativação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*), formando canais transmembrana que permitem o extravasamento da matriz celular (JIANG et al., 2011; KELLNER et al., 2017).

Em doenças autoimunes, os tratamentos convencionais se baseiam em medicamentos imunossupressores, que suprimem o sistema imune de forma não-específica, deixando os pacientes susceptíveis a efeitos adversos. O uso de biofármacos permite um tratamento mais específico e com menos efeitos colaterais. A principal estratégia é impedir que fatores e moléculas que promovem a apoptose celular se liguem aos receptores de células saudáveis, impedindo ou diminuindo a morte destas. A principal molécula alvo é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que tem papel central na ativação de respostas inflamatórias, sendo que os dois principais

biofármacos nesta área terapêutica em comercialização são da classe de anti-TNF, Humira® (adalimumab) e Enbrel® (etanercept) (HAFEEZ et al., 2018).

A conjugação de peptídeos de interesse ao fragmento Fc amplia a possibilidade de aplicações das proteínas de fusão para além dos mAbs, permitindo que outros antígenos e tecidos sejam focados ou ampliando o tempo de meia-vida de um biofármaco já conhecido. A Tabela 2.1 lista todas as proteínas de fusão que utilizam o fragmento Fc em sua estrutura aprovadas até 2017 pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) para fins terapêuticos nos Estados Unidos da América. Além do pequeno número de aprovações para essa classe de biofármacos em relação aos mAbs tradicionais, que representam a categoria majoritária, destaca-se a prevalência de aplicações a doenças autoimunes até 2010 e a diversificação de aplicações após esse ano (JAFARI et al., 2017; WALSH, 2018).

Tabela 2.1 – Proteínas de fusão contendo fragmento Fc aprovadas para tratamento terapêutico pela agência de regulação americana FDA, ordenados cronologicamente por data de aprovação. Não foram consideradas moléculas biossimilares que porventura tenham sido aprovadas. Adaptado de JAFARI et al. (2017) e WALSH (2018).

Nome	Nome comercial	Fabricante	Estrutura molecular	Aplicação clínica	Ano de aprovação (FDA)
Etanercept	Enbrel®	Amgen/Pfizer	TNFR2-Fc	Artrite reumatoide, psoríase	1998
Alefacept	Amevive®	Astellas Pharma	LFA3-Fc	Psoríase, rejeição de transplantes	2003
Abatacept	Orencia®	Bristol-Myers Squibb	CTLA4-Fc	Artrite reumatoide	2005
Rilonacept	Arcalyst®	Regeneron	IL1R-Fc	Síndrome periódica associada a criopirina	2008
Romiplostim	Nplate®	Amgen	TPBP-Fc	Púrpura trombocitopênica idiopática	2008
Belatacept	Nulojix®	Bristol-Myers Squibb	CTLA4-Fc	Rejeição de transplante	2011
Aflibercept	Eylea®	Regeneron/Bayer	VEGFR1-VEGFR2-Fc	Degeneração macular úmida Câncer colorretal	2011 2012
Efmoroctocog alfa	Eloctate®	Biogen/Sanofi	FVIII-Fc	Hemofilia A	2014
Eftrenonacog alfa	Alprolix®	Biogen/Sanofi	FIX-Fc	Hemofilia B	2014
Dulaglutide	Trulicity®	Eli Lilly	GLP1-Fc	Diabetes mellitus tipo 2	2014
Asfotase alfa	Strensiq®	Alexion	TNSALP-Fc - decaaspartato	Hipofosfatase infantil e juvenil	2015

2.1.3 Mercado de mAbs e seus derivados

Os anticorpos monoclonais e seus derivados são a principal e mais lucrativa classe de biofármacos, com 123,0 bilhões de dólares em volume de vendas em 2017. As proteínas derivadas de fragmento Fc de anticorpo sozinhas representaram vendas mundiais de U\$ 19,7 bilhões em 2017 (WALSH, 2018). Entre 2012 e 2017, o mercado de mAbs duplicou seu tamanho, sendo dominado por anticorpos monoclonais completamente humanos (54%), da subclasse IgG1 (79%), produzidos na linhagem celular CHO (60%) e tendo como principais aplicações as áreas de oncologia, dermatologia e reumatologia (GRILO e MANTALARIS, 2018).

Com o amadurecimento das tecnologias envolvendo a produção de biofármacos, as aprovações de novos produtos vêm se intensificando rapidamente (Figura 2.3). Os anticorpos monoclonais e seus derivados continuam como a principal classe e com maior número de aprovações nos últimos anos, representando 53% das aprovações no período de 2015 a 2018 (ECKER et al., 2015; WALSH, 2018).

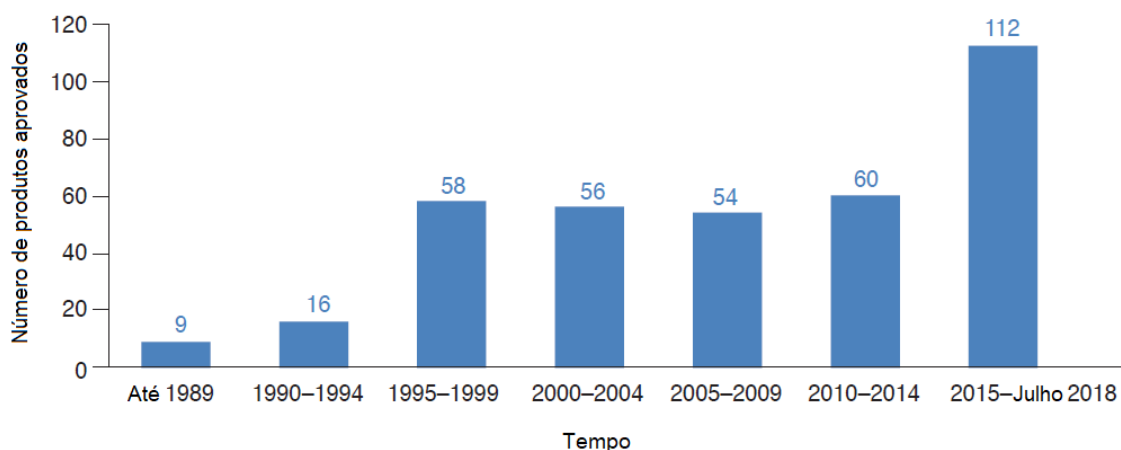


Figura 2.3 – Número de aprovações de produtos biofarmacêuticos. Adaptado de WALSH (2018).

Da perspectiva da tecnologia de produção, a semelhança estrutural entre os diferentes anticorpos monoclonais permite que a mesma estratégia de produção, purificação e caracterização sejam usadas, o que diminui o tempo de desenvolvimento. Em geral, essa abordagem pode também ser utilizada para alguns produtos derivados de anticorpo, sobretudo os que utilizam o fragmento Fc em sua composição. A especificidade de ligação ao antígeno permite que o produto seja facilmente

comprovado como o causador do efeito terapêutico e tenha efeitos adversos reduzidos (ECKER et al., 2015).

A expiração de patentes de biofármacos, sobretudo dos que estão entre os mais vendidos, alguns atingindo mais de U\$ 1 bilhão em vendas anualmente, fornece a oportunidade do desenvolvimento, por outras empresas dos chamados biossimilares e deve impulsionar ainda mais o número de aprovações nos próximos anos. Entre 2014 e 2018, foram aprovados 29 biossimilares, em comparação com 81 biofármacos genuinamente inovadores aprovados no mesmo período (WALSH, 2018). Dentre os biossimilares aprovados, dois referem-se ao segundo biofármaco mais vendido, o Enbrel® (etanercept), proteína de fusão que utiliza o fragmento Fc em sua estrutura e é usado no tratamento de artrite reumatoide e psoríase. Sua patente expirou em 2012 e dois biossimilares foram aprovados em 2016: Benepali® (Biogen/Samsung) e Erelzi® (Sandoz/Novartis) (WALSH, 2018).

A aprovação de biossimilares permite o acesso de mais pacientes ao tratamento a preços mais acessíveis e a diminuição do monopólio pelas empresas donas das patentes dos biofármacos inovadores. O mercado de biofármacos deve continuar em crescimento, com as aprovações mais rápidas e enormes investimentos em desenvolvimento de novos produtos (GRILO e MANTALARIS, 2018).

É esperado que economias emergentes, como China, Brasil, Rússia, Turquia, México, Índia e Arábia Saudita contribuam para o aumento do mercado de biossimilares, como forma de reduzir os altos gastos com os biofármacos inovadores, como indica o estabelecimento de normas regulatórias e de programas de incentivo governamental específicos para biossimilares nesses países (GRILO e MANTALARIS, 2018).

2.2 Geração de células animais recombinantes

Originalmente, proteínas com potencial terapêutico eram obtidas diretamente de fontes humanas, como a insulina do pâncreas ou albumina do plasma. Em seguida, outras tecnologias foram utilizadas para a obtenção dessas moléculas, sempre com algumas limitações inclusas, como baixa reprodutibilidade, dificuldade de escalonamento, baixa pureza ou risco de transmissão de patógenos (MIZUKAMI et al., 2018).

Atualmente, bactérias, leveduras e células animais são os principais sistemas de expressão de proteínas terapêuticas recombinantes. A principal diferença entre as proteínas expressas por esses diferentes sistemas é em relação às modificações pós-traducionais, modificações realizadas nas proteínas após a síntese da cadeia de aminoácidos. A glicosilação é a modificação mais frequente, visto que aproximadamente 70% das proteínas recombinantes terapêuticas são glicosiladas, tendo grande impacto na atividade biológica e, logo, na atividade terapêutica da molécula (MIZUKAMI et al., 2018).

As células animais são as que podem reproduzir com maior proximidade os padrões de glicosilação e outras modificações pós-traducionais dos humanos, tendo se tornado, assim, a principal plataforma de produção de proteínas terapêuticas na indústria (HAUSER, 2015).

Para que as células animais expressem as proteínas terapêuticas de interesse, é necessária a inserção da sequência de DNA em um vetor de expressão, geralmente um plasmídeo, para que o mesmo possa ser inserido nas células animais. Este processo é denominado transfecção e pode ser realizado por vários métodos e reagentes. Os métodos mais comumente usados são eletroporação, co-precipitação por fosfato de cálcio, utilização de polímeros catiônicos e lipofecção. Todos esses métodos permitem a integração aleatória do DNA por mecanismos de reparação celular, que incorporam a sequência no genoma da célula hospedeira (CARTER e SHIEH, 2015; HAUSER, 2015).

Na lipofecção (Figura 2.4), lipídeos catiônicos são adicionados à solução de plasmídeo. A sequência de DNA plasmidial, que possui carga negativa, interage com os lipídeos positivamente carregados, formando complexos lipossoma-plasmídeo. A natureza hidrofóbica dos complexos permite que estes interajam com os fosfolipídeos da membrana celular das células a serem transfectadas, mediando a entrada dos plasmídeos para o interior das células (JÄGER et al., 2015).

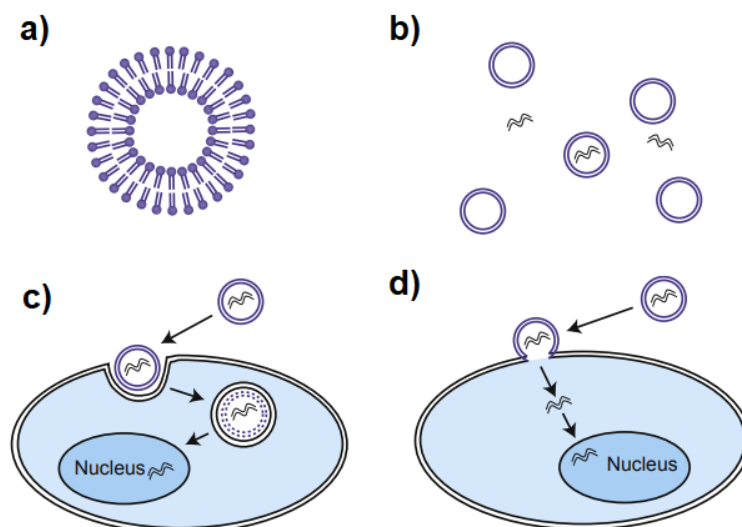


Figura 2.4 – Lipofecção: a) lipossomas compostos por dupla camada de lipídeos catiônicos arranjados em formato esférico; b) complexação das lipossomas com as moléculas de DNA; c) endocitose da lipossoma, que é digerido para a liberação do DNA; e d) alternativamente, as lipossomas podem se fundir à membrana, liberando o DNA em seu interior. Adaptado de CARTER e SHIEH (2015).

2.2.1 Linhagens de células animais

A escolha de uma linhagem celular hospedeira depende da proteína a ser produzida e de outros fatores. A célula hospedeira deve ser capaz de transcrever, traduzir, estruturar conformacionalmente e secretar as proteínas de interesse, além de realizar modificações pós-tradução, como a glicosilação, quando requeridas. Também é importante que a mesma cresça em suspensão, visando o estabelecimento de processos em larga escala mais eficientes, e em meio de cultivo livre de componentes de origem animal, como requerido hoje em dia pelas agências regulatórias (CARVALHO e CASTILHO, 2017). Além disso, da perspectiva de processo, as linhagens celulares devem apresentar robusto crescimento, tolerância a alguns metabólitos secretados no meio e resistência a tensões de cisalhamento (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008).

A Tabela 2.2 apresenta as várias linhagens celulares animais empregadas para a produção de proteínas recombinantes. Dentre estas, as células CHO, NS0 e Sp2/0 se destacam entre as principais produtoras de biofármacos aprovadas para uso terapêutico em humanos (GRILO e MANTALARIS, 2018).

Tabela 2.2 – Linhagens celulares animais comumente usadas na indústria biofarmacêutica. Adaptado de BOLLATI-FOGOLIN e COMINI (2008) e DUMONT et al. (2016).

Linhagem celular	Origem	Aplicações
BHK-21	Hamster	Expressão transiente e estável Produção de vacinas e fatores de coagulação
CHO.K1, CHO dhfr-	Hamster	Expressão transiente e estável Produção de anticorpos monoclonais, proteínas de fusão, hormônios e fatores de coagulação
Hibridomas, NS0, Sp2/0	Camundongo	Expressão estável Produção de anticorpos monoclonais
HEK293	Humano	Expressão transiente e estável Produção de vírus recombinantes
HT-1080	Humano	Expressão transiente e estável Produção de enzimas recombinantes
PER.C6 TM	Humano	Expressão estável Produção de vírus
Vero	Macaco	Produção de vírus

A linhagem de células CHO é principal plataforma de expressão de proteínas recombinantes na indústria, por meio da qual 60% dos biofármacos são produzidos atualmente, incluindo anticorpos monoclonais, enzimas, citocinas, proteínas de fusão, hormônios e fatores de coagulação (DUMONT et al., 2016; GRILO e MANTALARIS, 2018). O sucesso desta linhagem celular é explicado por ter sido uma das primeiras a apresentar a combinação de expressão eficiente de proteínas recombinantes, fácil cultivo em sistemas agitados e isentos de soro animal, aceitação regulatória e segurança por não ser um bom substrato para propagação de eventuais vírus contaminantes (CARVALHO e CASTILHO, 2017). Contudo, as células CHO são conhecidas pela sua flexibilidade genética e pela propensão a mutações, aberrações cromossômicas e alterações epigenéticas em casos de cultivo prolongado, podendo resultar em consideráveis variações em produtividade celular, crescimento celular, atividade metabólica e tipos de modificações pós-tradução ao longo de processos industriais longos (CASTAN et al., 2018; LINDSKOG et al., 2018).

Ainda que as linhagens celulares de origem murina expressem padrões muito próximos das modificações pós-tradução produzidas por humanos, pode haver certas diferenças. As células humanas perderam a habilidade de expressar os glicanos alfa-

Gal e Neu5Gc, que são expressados por células murinas, logo a presença destes poderia resultar em maior imunogenicidade em produtos produzidos em células murinas (MIZUKAMI et al., 2018).

As linhagens celulares humanas possuem habilidade de realizar as modificações pós-tradução adequadas para manutenção da atividade biológica e baixa imunogenicidade de glicoproteínas. As principais linhagens celulares humanas utilizadas na expressão de proteínas recombinantes são HEK293, HT-1080 e PER.C6, sendo que apenas a HEK293 é atualmente utilizada para produção industrial (DUMONT et al., 2016).

A linhagem celular HEK293, proveniente de células embrionárias de rim humano (*human embryonic kidney cells*, em inglês), é facilmente cultivada em suspensão em meios de cultivo livres de componentes de origem animal, possui crescimento robusto, apresenta facilidade para transfecção por vários métodos e é eficiente para a expressão de proteínas recombinantes. As células HEK293 são extensivamente utilizadas, a nível de pesquisa, para produção de vírus e para expressão transiente de proteínas, devido à sua facilidade de transfecção. Recentemente, cinco produtos para fins terapêuticos foram aprovados pelas agências reguladoras americana (FDA) e europeia (EMA), sendo três deles proteínas de fusão Fc: Eloctate[®] (efmoroctocog alfa), Alprolix[®] (eftrenonacog alfa) e Trulicity[®] (dulaglutide), todos em 2014 (DUMONT et al., 2016; LINDSKOG et al., 2018).

2.2.2 Transfecção transiente

Na transfecção transiente, os plasmídeos introduzidos no interior das células são responsáveis pela expressão da proteína de interesse durante um certo período, em geral da ordem de vários dias. Sem que haja pressão seletiva por um agente de seleção, como por exemplo um antibiótico, o DNA plasmidial não é integrado ao genoma da população transfectada, sendo gradualmente perdido (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008; KIM e EBERWINE, 2010).

A expressão transiente é interessante para a produção da proteína de interesse para caracterização da mesma em experimentos preliminares, com o objetivo de comparar condições de transfecção e/ou estrutura e funcionalidade da proteína

recombinantes, sem que seja necessário o longo procedimento de isolamento e caracterização de células transfectadas estáveis (DALTON e BARTON, 2014).

O emprego da transfecção transiente para expressão de maiores quantidades de proteínas tem crescido em popularidade nos últimos anos, sobretudo para caracterização de proteínas por métodos que necessitam de maiores quantidades, como cristalização. Ainda que possível, o escalonamento para produção industrial de proteínas por expressão transiente requer elevadas quantidades de DNA plasmidial e de reagentes de transfecção, que têm alto custo, por cada lote de produção, torna o processo economicamente desvantajoso (DALTON e BARTON, 2014).

2.2.3 Transfecção estável

A transfecção estável tem como objetivo promover a integração do DNA exógeno, referente à proteína de interesse, no genoma da célula hospedeira, permitindo a transmissão da informação a cada duplicação celular. A Figura 2.5 mostra a diferença entre as transfecções estável e transiente. No plasmídeo usado na transfecção estável, além do gene referente à proteína de interesse, é adicionado um gene de resistência a um antibiótico, que fornecerá à célula estavelmente transfectada a habilidade de sobreviver na presença do respectivo antibiótico permitindo que as células que não incorporaram os genes oriundos do plasmídeo sejam eliminada (KIM e EBERWINE, 2010).

Para garantir a permanência dos transgenes nas células transfectadas, é necessária a adição de um agente de seleção, no caso um antibiótico, a partir de aproximadamente 2 dias após a transfecção, o qual exercerá uma pressão seletiva para a manutenção apenas das células que tiverem integrado a sequência plasmidial em seu genoma, gerando uma população de células capazes de expressar o gene de resistência a antibiótico e a proteína de interesse a longo prazo (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008; KIM e EBERWINE, 2010).

Os agentes de seleção mais utilizados são os antibióticos aminoglicosídeos G418 sulfato e a higromicina, logo, os genes de resistência a esses dois antibióticos são responsáveis por expressar a neomicina fosfotransferase e a higromicina B fosfotransferase, enzimas responsáveis pela inativação dos respectivos antibióticos (DALTON e BARTON, 2014).

O período de seleção dura dias ou semanas e é a fase em que a maior parte das células, que não sofreram integração do transgene em uma região transcricionalmente ativa do seu genoma, morrem, período denominado "vale da morte". Apenas as células capazes de expressar o DNA exógeno a longo prazo sobrevivem e se multiplicam. Em geral, conduz-se uma transfecção controle (sem plasmídeo, denominada "mock") em paralelo, para que a morte desta cultura seja um indicativo de que as células das demais transfecções que tenham sobrevivido sejam transfectantes estáveis. Mesmo tendo o "mock", alguns grupos de pesquisa costumam manter as células transfectadas por períodos de 30 a 60 dias na presença do antibiótico para garantir que todas as células não transfectadas morram. A maioria dos vetores de expressão promove a integração aleatória dos plasmídeos no genoma, muitas vezes mais de uma cópia por célula. A expressão do gene de interesse não é somente definida pelos elementos regulatórios, como promotores e *enhancers*, incluídos na plasmídeo, mas sofre forte influência da posição cromossomal em que é integrado, afetando inclusive a estabilidade de expressão. Assim, torna-se necessário o isolamento dos clones mais produtivos para que obtenham linhagens celulares clonais (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008; HAUSER, 2015).

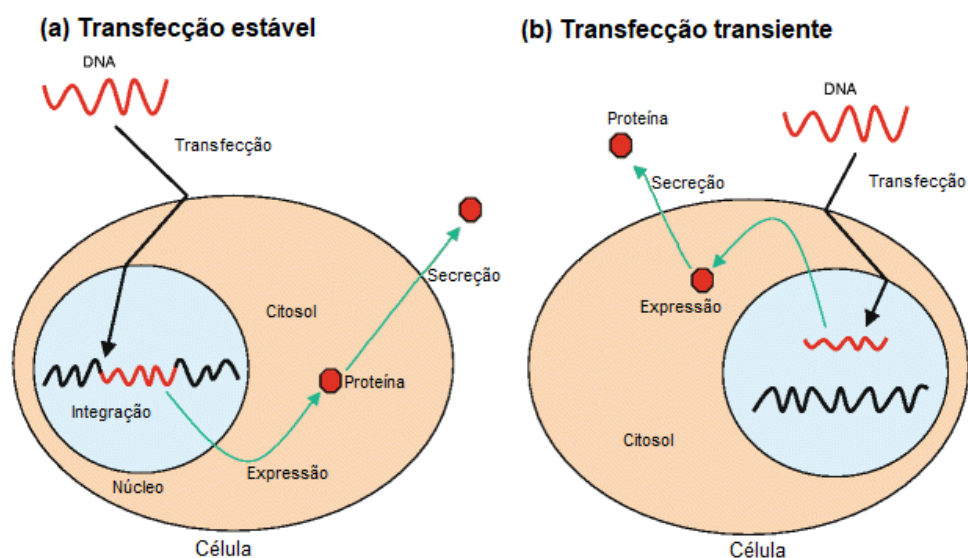


Figura 2.5 – Diagrama esquemático dos tipos de transfecção. (a) Transfecção estável. O DNA exógeno (vermelho) entra na membrana celular e no núcleo, se integrando no genoma da célula hospedeira. A expressão ocorre a partir do DNA genômico. (b) Transfecção transitente. O DNA exógeno entra no núcleo e é expresso sem ser integrado ao genoma. Alternativamente, mRNA (azul escuro) pode ser transfectado e diretamente traduzido em proteína no citoplasma. Adaptado de KIM e EBERWINE (2010).

2.3 Cultivo de células animais

De forma geral, o crescimento de uma célula *in vitro* passa por quatro fases (Figura 2.6): fase lag, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e fase de morte. Durante a fase lag, as células se adaptam ao novo ambiente antes de se duplicarem, podendo se estender em casos de alterações significativas nas condições de cultivo ou de baixa concentração inicial de inoculação, que pode ser explicada pela ausência de fatores de crescimento que as próprias células secretam para o meio de cultivo. Na fase de crescimento exponencial, as células estão se multiplicando ativamente e a concentração de células cresce exponencialmente. As duas últimas fases em geral ocorrem após a depleção de um substrato essencial ou acúmulo de um metabólito inibitório, de forma que a taxa de morte iguala e depois supera a taxa de duplicação celular (LÉO et al., 2008; LINDSKOG, 2015b).

Em processos industriais, evita-se alcançar a fase estacionária ou de morte, com o objetivo da manutenção de altas viabilidades celulares durante todo o processo, tipicamente acima de 90-95%. Cultivos com altas viabilidades não geram muitos detritos celulares, o que facilita a purificação das proteínas, diminuindo os custos dessa etapa (LINDSKOG, 2015b).

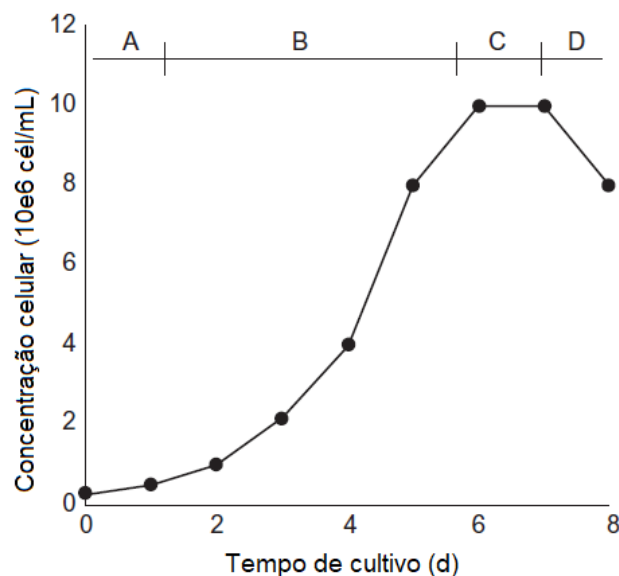


Figura 2.6 – Curva típica de crescimento celular de células animais, com as quatro fases: (A) fase lag, (B) fase de crescimento exponencial, (C) fase estacionária, (D) fase de morte. Adaptado de LINDSKOG (2015b).

Uma forma de monitorar a fase de crescimento celular, é através da taxa específica de crescimento celular (μ), expressa em h^{-1} ou d^{-1} . O tempo de duplicação na fase exponencial (t_{Dexp}) é calculado a partir de μ . A viabilidade celular também fornece informações sobre o estado do cultivo, representando a porcentagem de células viáveis, ou vivas, em relação a concentração total de células (vivas ou mortas).

O ciclo celular e tempo de duplicação não dependem somente da linhagem celular, mas também do meio de cultivo, das condições de cultivo e do histórico da linhagem até o momento do cultivo. Qualquer diferença na composição do meio, condições de cultivo, rotina de manutenção ou manuseio do operador pode resultar em impacto no crescimento celular e formação de produto (LINDSKOG, 2015b).

Em geral, o cultivo de células animais possui grandes diferenças em relação ao de outros tipos de células, como bactérias e leveduras, sobretudo em relação à baixa taxa de crescimento (com tempos de duplicação entre 18 e 28 horas), requerimento de meios de cultivo mais complexos e baixa produtividade, além da maior sensibilidade ao estresse hidrodinâmico, devido à falta de parede celular (MORAES et al., 2008; PÖRTNER, 2015).

O meio de cultivo é um dos aspectos cruciais no cultivo de células animais, as quais têm requerimentos nutricionais mais sofisticados que outros organismos. Meios que continham soro, principalmente o soro fetal bovino, em proporções de até 10% em volume para suprir os requerimentos nutricionais, foram progressivamente substituídos por composições de meio sem uso de soro, preferencialmente meios quimicamente definidos e isentos de componentes de origem animal. Essas medidas foram tomadas buscando maior controle regulatório e sanitário dos biofármacos produzidos (PÖRTNER, 2015).

Antigamente, a maioria das linhagens celulares era cultivada aderida a superfícies, o que limitava muito o escalonamento de processos. Na produção industrial atual, usam-se principalmente linhagens adaptadas ao crescimento em suspensão, cultivadas em biorreatores agitados (PÖRTNER, 2015). Os sistemas de cultivo para células animais buscam não causar danos às células e adicionalmente podem ser usadas substâncias que protegem as células do estresse hidrodinâmico, como o surfactante não-iônico Pluronic F68 (LANDAUER, 2014; PÖRTNER, 2015).

Para o cultivo de células animais em escala de bancada ou em escala industrial, são utilizados biorreatores, cuja principal função é prover contenção e promover

condições ambientais adequadas para o crescimento celular e formação do produto. Em geral, os biorreatores apresentam as seguintes características (CHICO et al., 2008; EIBL e EIBL, 2009):

- Ambiente controlado em relação a pH, temperatura, oxigênio dissolvido e concentração de CO₂;
- Agitação e aeração homogêneas, gerando baixas tensões hidrodinâmicas;
- Transferência de massa e calor efetiva;
- Capacidade de escalonamento;
- Possibilidade de monitoramento em linha e controle de variáveis do processo e parâmetros;
- Esterilidade e estabilidade;
- Facilidade de manuseio.

2.3.1 Metabolismo de células animais

Para a obtenção de energia, produção de macromoléculas úteis para as células e expressão de produtos, as células utilizam sua maquinaria enzimática para absorção e conversão de nutrientes presentes no meio de cultivo. O conjunto de reações e vias bioquímicas da célula é chamado de metabolismo e é extremamente complexo (AMABLE e BUTLER, 2008). Para a maioria das linhagens celulares, as principais fontes de energia, carbono e nitrogênio são a glicose e glutamina. Os principais subprodutos são lactato e amônia.

A glicose é uma fonte primordial de carbono e energia para as células animais, sendo consumida pela célula sobretudo pela via da glicólise, transformando-a em piruvato. O piruvato pode ser convertido em lactato ou utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico e subsequentemente fosforilação oxidativa, com geração de grande quantidade de ATP, que é a principal molécula de transferência de energia em organismos biológicos. Como alternativa à glicólise, a glicose pode ser utilizada na via das pentoses-fosfato para a produção de ribose-5-fosfato, um precursor para a síntese de nucleotídeos. (AMABLE e BUTLER, 2008; PÖRTNER, 2009).

A glutamina é a outra fonte primordial de energia, carbono e nitrogênio para as células animais. A glutamina é incorporada na célula pelo sistema de transporte de aminoácidos e é convertida em glutamato e subsequentemente em α -cetoglutarato,

utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico (AMABLE e BUTLER, 2008). A contribuição energética da glutamina depende da linhagem celular e das condições de cultivo, mas pode chegar a 70%. Em condições de limitação de glutamina, a célula prioriza a obtenção de energia pelo consumo de glicose. Da mesma forma, a célula prioriza a obtenção de energia a partir de glutamina quando a glicose se encontra em condições limitantes (PÖRTNER, 2009). O tempo de meia-vida da glutamina a 37°C e pH 7,2 é de apenas 7 dias, assim, normalmente, os meios de cultivos comercializados não incluem esse composto na sua composição, sendo necessária a sua suplementação no momento do uso do meio (LINDSKOG, 2018b).

Lactato é um dos principais subprodutos em cultivos de células animais, produzido sobretudo por meio da conversão de piruvato a lactato, em detrimento do ciclo do ácido tricarboxílico, sua acumulação no cultivo pode ser gerado inibição do crescimento celular e da expressão proteica. O lactato é produzido principalmente sob condições de excesso de glicose. Quando a concentração de glicose atinge níveis limitantes, a célula realiza a mudança da produção de lactato para o seu consumo, o que geralmente ocorre concomitantemente a uma redução da taxa específica de crescimento. O resultado são baixas concentrações de lactato nas etapas finais do cultivo. Para evitar excesso de lactato acumulado nas fases iniciais do cultivo, são empregadas estratégias como a limitação da concentração de glicose no meio de cultivo na faixa de 1-6 g/L, uso de fontes alternativas de carbono e engenharia metabólica das células (MULUKUTLA et al., 2012; LINDSKOG, 2018b).

Amônio (NH_4^+) é outro importante subproduto em cultivos de células animais. O amônio pode ser produzido na mitocôndria como produto do metabolismo da glutamina pelas enzimas glutaminase e glutamato desidrogenase ou ser resultado da decomposição espontânea da glutamina a 37°C no meio de cultivo. O transporte transmembrana de amônio por proteínas carreadoras como forma de compensar a sua difusão nas membranas pode resultar em acidificação ou alcalinização do citoplasma e da matriz mitocondrial, dependendo da origem intracelular ou extracelular do amônio. Os efeitos tóxicos do amônio nas células, que podem ser observados em concentrações a partir de 2 mM, incluem inibição enzimática, modificação do pH intracelular, perturbação dos gradientes iônicos nas células e aumento da secreção de alanina. O amônio interage com sítios regulatórios várias enzimas e sua elevada concentração pode resultar na ativação ou na inibição de várias vias enzimáticas, como o ciclo do ácido tricarboxílico, a glicólise, a glutaminólise e o ciclo das pentose fosfato (AMABLE e BUTLER, 2008).

O metabolismo de células animais *in vivo* é naturalmente altamente regulado, mas em células cultivadas *in vitro* o metabolismo torna-se altamente desregulado, levando a um consumo muito acelerado de nutrientes, que resulta em baixa eficiência energética e acúmulo de subprodutos, como lactato e amônio (AMABLE e BUTLER, 2008; LINDSKOG, 2018b).

2.3.2 Modos de operação

O cultivo de células animais pode ser realizado sob diferentes estratégias de fornecimento de nutrientes e de remoção do produto, conforme o modo de operação empregado. Os principais modos de operação para células animais são batelada, batelada alimentada, contínuo simples e contínuo com reciclo celular, mais conhecido como perfusão (Figura 2.7) (HA et al., 2019).

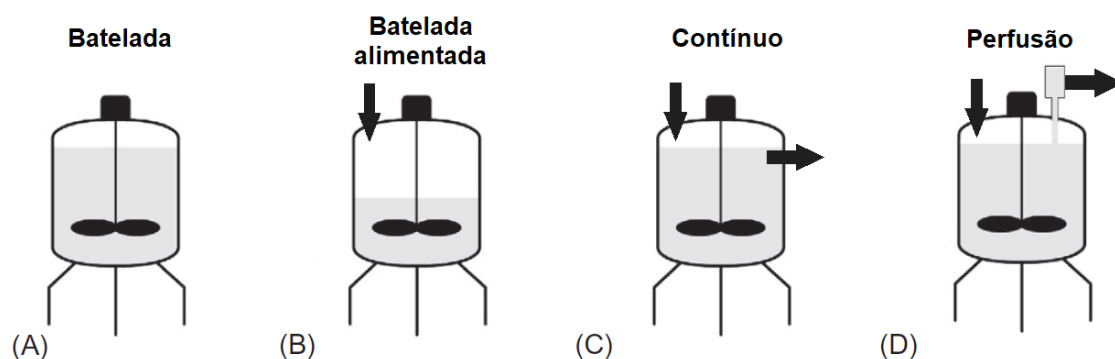


Figura 2.7 – Representação esquemática dos modos de operação para cultivo de células animais. (A) Batelada; (B) Batelada alimentada; (C) Contínuo; e (D) Perfusão. Adaptado de LINDSKOG (2018a).

Os modos batelada e batelada alimentada são processos descontínuos, em que o cultivo é interrompido após determinado tempo para a remoção do produto. Na batelada, o meio de cultivo é adicionado somente no início do cultivo, enquanto na batelada alimentada (*fed-batch* em inglês) uma solução concentrada de nutrientes é adicionada durante o processo para prolongar o cultivo e obter concentrações de células e produto mais elevadas. Como consequência, ocorre um aumento do volume de cultivo ao longo do processo. A estratégia de alimentação na batelada alimentada pode ser cuidadosamente planejada com o objetivo de diminuir efeitos metabólicos indesejados, como acumulação de lactato (ABU-ABSI et al., 2014).

Nos modos contínuos de operação, meio de cultivo novo é continuamente adicionado, enquanto o meio do biorreator é removido na mesma vazão, resultando na manutenção do volume do cultivo constante e obtenção contínua do produto. Além dos modos contínuo simples e perfusão, em escala laboratorial utiliza-se também a pseudoperfusão, que simula a perfusão, mas de forma intermitente, com trocas periódicas de meio de cultivo (CHOTTEAU, 2015).

O modo contínuo simples não utiliza mecanismo de retenção celular. As células são removidas com o meio coletado, gerando contínua diluição das células no biorreator. Enquanto a taxa de remoção de células é menor que a taxa de crescimento celular, é observado aumento na concentração de células. Contudo, conforme a concentração celular cresce e maiores vazões de alimentação se tornam necessárias, a perda de células se torna maior que o crescimento celular (em especial considerando o lento crescimento de células animais) e observa-se um decréscimo na concentração. Assim, o modo contínuo não permite alcançar altas concentrações de células e de produto, o que limita sua utilização industrial, sendo preterido em favor da perfusão, que, ao utilizar mecanismos de retenção celular, alcança altos valores de concentração celular e produtividade volumétrica (PÖRTNER, 2015).

Nas primeiras décadas da indústria farmacêutica, o modo batelada prevalecia, inicialmente pela simplicidade de operação. Em seguida, o modo de batelada alimentada se tornou o modo dominante, por conta da maior produtividade obtida, aliada à facilidade de implementação, visto que não necessitava de mudanças profundas no maquinário. Os modos de operação contínuos, que eram vistos como muito complexos, apenas eram utilizados com produtos que não poderiam ser produzidos de outras formas, em especial produtos lábeis. Atualmente, os modos contínuos, sobretudo a perfusão, vêm sendo cada vez mais empregados tanto para pesquisa quanto produção industrial, também para proteínas estáveis, como mAbs (LINDSKOG, 2018a; HA et al., 2019).

2.3.2.1 Batelada Simples

A operação em batelada é aquela em que todos os componentes do meio são adicionados ao biorreator no início do cultivo, juntamente com o inóculo. Os únicos materiais trocados com o exterior são gases, soluções de correção de pH e antiespumante (LINDSKOG, 2018a). As equações de balanços de massa para

células (1), substrato (2) e produto (3) para o modo de cultivo em batelada estão apresentadas a seguir (CHICO et al., 2008):

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_S X_v \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P X_v \quad (3)$$

As equações utilizam as variáveis concentração de células viáveis (X_v), tempo de cultivo (t), taxa específica de crescimento celular (μ), concentração de um substrato qualquer (S), taxa específica de consumo de um substrato qualquer (q_S), concentração de um produto qualquer (P) e taxa específica de formação de um produto qualquer (q_P).

A curva de crescimento de células em batelada possui as quatro distintas fases, conforme mostrado na Figura 2.6. A fase lag é dependente de vários fatores, como mudanças do ambiente de cultivo e a concentração inicial do inóculo, que, em geral, é de, no mínimo, 0,3 a 0,5 milhões de células viáveis por mL, para evitar uma fase lag prolongada (ABU-ABSI et al., 2014).

Nos processos em batelada, concentrações de nutrientes são altas no início do cultivo, levando a um metabolismo muito desregulado, com maior formação de alguns metabólitos tóxicos, como amônio e lactato. A acumulação de subprodutos e/ou a limitação de nutrientes essenciais são os principais motivos que levam à diminuição da taxa de crescimento celular e ao início da fase estacionária (ABU-ABSI et al., 2014; MAARTENS et al., 2014).

O processo é finalizado e toda a fase líquida é coletada ao fim da fase exponencial ou na fase estacionária, sempre antes de uma queda significativa da viabilidade celular, para que não haja liberação de contaminantes no meio de cultivo por parte de células mortas. De forma alternativa, parte das células utilizadas em uma batelada pode ser reutilizada como inóculo em outra batelada no mesmo biorreator, o que é denominado bateladas repetidas (LINDSKOG, 2018a).

Além de ser utilizada na produção industrial, sobretudo de produtos mais antigos, a batelada é utilizada como rotina na manutenção das células, para pesquisa e

desenvolvimento de processos, bem como para a produção de inóculo. Por conta da baixa concentração celular obtida, a batelada atinge baixas produtividades volumétricas, de modo que outros modos de operação tendem a dominar a produção industrial (LINDSKOG, 2018a).

2.3.2.2 Pseudoperfusão

A pseudoperfusão ou semiperfusão é um modo utilizado para simular a o modo de perfusão em sistemas de menor escala, como placas, tubos ventilados ou erlenmeyers, em que a renovação do meio de cultivo é realizada de forma intermitente e manual pelo operador. Na troca de meio, o cultivo celular é centrifugado, o sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em meio de cultivo novo. Assim, a etapa de centrifugação atua como o mecanismo de retenção celular. Pode-se descartar parte das células com o intuito de se efetuar uma remoção controlada de células, visando a evitar situações de limitação de oxigênio ou nutrientes e simulando a perda de células pelo dispositivo de retenção celular ou pela corrente de purga (“*bleed*”) nos processos de perfusão contínua (CHOTTEAU, 2015).

Contudo, há diferenças em relação à perfusão, como o controle das variáveis, como pH e concentração de oxigênio dissolvido, que variam em decorrência do sistema de cultivo e conforme a fase do cultivo ou entre as trocas de meio. A principal diferença entre os modos de operação é a concentração de nutrientes no meio de cultivo, ocorrendo forte variação ao longo do dia na pseudoperfusão, enquanto se observa maior estabilidade na perfusão, pois o meio de alimentação é constantemente adicionado no biorreator, o que não pode ser simulado em sistemas de menor escala (CHOTTEAU, 2015).

Ainda assim, cultivos semicontínuos em menor escala podem ser utilizadas como um ferramenta rápida e de menor custo para verificar o comportamento das células em cultivos de maior duração e sob maiores concentrações celulares, além de possibilitar a previsão do comportamento em biorreatores instrumentados, devido à similaridade de resultados obtidos em pseudoperfusão e perfusão (HENRY et al., 2008; CARVALHO e CASTILHO, 2017).

Dentre as opções de sistemas para cultivo em pequena escala, os tubos cilíndricos de fundo cônico de 50 mL com tampa com filtro para trocas gasosas com o exterior, ou

apenas tubos ventilados, são uma opção prática para o teste de diferentes condições ou diferentes tipos de células, pela facilidade de manuseio, facilidade de centrifugação direta para troca de meio e pequeno tamanho, podendo ser utilizados para verificação de dezenas de diferentes condições e sob altas concentrações celulares, com reprodutibilidade e comparabilidade com sistemas em maior escala (VILLIGER-OBERBEK et al., 2015; GOMEZ et al., 2017).

2.3.2.3 Perfusão

Perfusão é um processo contínuo de cultivo de células animais em que meio de cultivo novo é continuamente adicionado ao reator e o meio líquido do biorreator é retirado na mesma vazão, resultando em volume constante do cultivo. As células são retidas no biorreator pelo uso de um dispositivo de retenção, enquanto as moléculas de menor tamanho são removidas com o meio que é retirado do biorreator, ao qual se dá o nome de perfundido. O dispositivo de retenção celular pode permitir a retenção total ou parcial das células (LINDSKOG, 2018a).

Toda perfusão se inicia como um processo de batelada simples, até que se alcance a fase exponencial de crescimento celular. Então, se inicia a alimentação de meio de cultivo novo e remoção do perfundido, permitindo que a concentração de células aumente mais do que é observado na batelada simples ou alimentada. Para que se obtenha o desejado estado estacionário da concentração celular e alta viabilidade, é preciso que a taxa de crescimento celular seja a similar à soma das taxas de remoção de células e de morte celular. Para isso, pode-se utilizar a natural remoção de células pelo dispositivo de retenção celular ou realizar o chamado “*bleed*”, que é a remoção proposital controlada de células (ABU-ABSI et al., 2014; BIELSEN et al., 2018). A Figura 2.8 mostra o perfil da concentração de células e produto na perfusão em comparação com um cultivo em batelada alimentada.

A constante troca de meio de cultivo resulta em um estado estacionário metabólico, com uma concentração estável de nutrientes e de metabólitos tóxicos, que se mantêm em nível baixo. Isso resulta na possibilidade de manutenção de altas concentrações celulares, que variam entre 30 e 80 milhões cél/mL, por elevados períodos de tempo, em geral, entre 30 e 60 dias, podendo se estender por até 6 meses (LINDSKOG, 2018a).

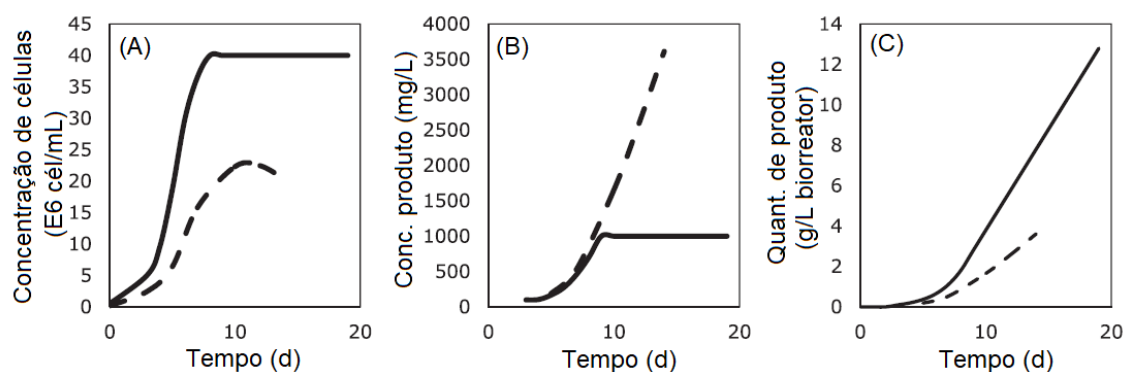


Figura 2.8 – Representação esquemática do perfil de um cultivo em perfusão (linha contínua) em comparação com um cultivo em batelada alimentada (linha tracejada): (A) concentração de células viáveis; (B) concentração de produto; e (C) quantidade de produto produzido por litro de meio utilizado. Adaptado de LINDSKOG (2018a).

Do ponto de vista econômico e de produtividade volumétrica, em comparação com os outros modos de operação, a perfusão é o que apresenta a maior produtividade volumétrica, devido às altas concentrações celulares obtidas sob altas vazões de troca de meio, possibilita a maior produtividade celular específica ao fornecer nutrientes de forma contínua sob baixos níveis de subprodutos tóxicos e diminui o tempo ocioso entre processos ao permitir o cultivo por longos períodos. Devido às maiores produtividades volumétricas, os processos em perfusão requerem menores escalas de biorreatores que outros processos, com volumes variando entre 500 a 2000 L (POLLOCK et al., 2013).

Os equipamentos de retenção celular utilizam diferentes princípios para a separação das células, podendo ser escolhidos conforme as características da célula, do produto e do maquinário pré-existente. Os principais tipos de equipamentos de retenção e suas propriedades estão resumidos na Tabela 2.3 (CHOTTEAU, 2015).

O princípio de filtração é utilizado nos filtros de malha rotatória, ATF e TFF, nos quais o perfundido permeia pela membrana enquanto as células são retidas pela membrana de poros menores que o tamanho das células. Os filtros de malha rotatória (*spin-filters* em inglês) têm formato cilíndrico e giram em torno do eixo central, fazendo com que o meio livre de células permeie pela membrana, sendo relativamente comum a ocorrência de incrustação e entupimento dos poros da membrana. Os sistemas TFF e ATF utilizam módulos de membranas de fibras ocas, nos quais o cultivo é bombeado de forma unidirecional ou alternado, respectivamente, propiciando fluxo tangencial às membranas e, assim, diminuindo a ocorrência de entupimentos. O sedimentador inclinado possui várias lamelas inclinadas, nas quais as células sedimentam pela ação

da gravidade, que deve ser superior que o arraste pelo meio que escoar em direção à parte superior, por onde é removido o perfundido (CHOTTEAU, 2015).

Tabela 2.3 – Principais equipamentos de retenção celular e suas propriedades. Adaptado de CHOTTEAU (2015) e LINDSKOG (2018a).

Propriedade	Filtro de malha rotatória	ATF ^a	TFF ^b	Sedimentador inclinado
Eficiência de separação	100%	100%	100%	85-99%
Potencial para utilização em altas concentrações celulares	Baixo	Alto	Alto	Baixo
Retenção de produto	Média	Baixa	Média	Nenhuma
Custo de operação	Baixo	Alto	Alto	Baixo
Facilidade de uso	Alta	Alta	Alta	Baixa
Risco operacional	Alto	Baixo	Baixo	Alto
Disponível em versão descartável	Não	Sim	Sim	Não
Tempo de residência das células fora do biorreator	0 min, se interno	1-2 min	1-2 min	10-20 min

a - Sistema de filtração tangencial alternante (*alternating tangential flow* em inglês)

b - Sistema de filtração com escoamento tangencial (*tangential filtration flow* em inglês)

Devido à troca contínua de meio e à retenção celular, são incorporados às equações de balanço de massa para as células, substrato e produto a seguir os termos diluição (D) e o fator de perda de células (α), que relaciona a concentração celular no perfundido ($X_{V,PERFUSATE}$) e do biorreator (X_v). Quando a retenção celular é total, o fator de perda de células é igual a zero.

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - \alpha D X_v \quad \alpha = \frac{X_{v,PERFUSATE}}{X_v}$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X_v + D(S_A - S)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p X_v - DP$$

As equações acima utilizam as seguintes variáveis: concentração de células viáveis (X_v), tempo de cultivo (t), taxa específica de crescimento (μ), taxa de diluição (D), que é a razão entre a vazão de alimentação e o volume do reator, fator de perda de células (α), concentração celular do perfundido ($X_{V,PERFUSATE}$), concentração de um substrato qualquer (S), taxa específica de consumo de um substrato qualquer (q_s), concentração

de um substrato qualquer na alimentação (S_A), concentração de um produto qualquer (P) e taxa específica de formação de um produto qualquer (q_P).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo global

O objetivo global do presente trabalho foi gerar populações celulares recombinantes estáveis expressando 14 construções gênicas de proteínas Fc em células animais da linhagem HEK293-3F6 e desenvolver um processo de cultivo celular para produção das variantes mais promissoras.

3.2 Objetivos específicos

O presente trabalho envolveu os seguintes objetivos específicos:

- Gerar populações estáveis de células HEK293 expressando as proteínas Fc;
- Caracterizar a cinética de crescimento das diferentes populações estáveis produtoras de proteínas Fc quanto ao crescimento celular, viabilidade, consumo de glicose e formação de lactato em batelada, considerando as modificações presentes em cada variante;
- Identificar a construção gênica mais promissora para a produção das proteínas Fc desejadas;
- Investigar o processo de produção de proteínas Fc em diferentes modos de cultivo e escalas.

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Linhagem celular

A linhagem de células de rim embrionário humano HEK293-3F6 (do inglês *human embryonic kidney 293 cells*) foi usada para geração de populações estáveis produtoras do fragmento Fc. A linhagem parental utilizada, adaptada ao cultivo em suspensão, fora adquirida pelo Laboratório de Cultivos Celulares (LECC), do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, do *National Research Council Canada* (NRC, Canadá), tendo sido adaptada ao meio quimicamente definido e isento de componentes de origem animal HEK-TF em trabalho anterior do grupo (ALVIM, 2019).

4.2 Manutenção das células

4.2.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo HEK TF (Xell AG, Bielefeld, Alemanha) foi utilizado para a manutenção celular e transfecção. O meio líquido foi preparado a partir do pó adquirido, solubilizado com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) e esterilizado por microfiltração em membranas de poros de 0,2 µm de polietersulfona (Sartopore, Sartorius AG, Alemanha). O meio é originalmente preparado sem adição de L-glutamina, a qual foi adicionada antes do uso na concentração final de 8 mM (Gibco, EUA). O meio de cultivo acondicionado em garrafas Schott de 1 L foi mantido em geladeira até o uso, quando era aquecido à temperatura de aproximadamente 37°C previamente à utilização.

4.2.2 Condições de cultivo

A manutenção das células em cultivo para preparação de inóculo e bancos celulares era realizada em tubos de 50 mL com tampas ventiladas (TubeSpin, TPP, Suíça) ou frascos erlenmeyer com tampa ventilada de volumes total de 125 mL a 1 L (Corning, EUA), sob agitação de 180 rpm em agitador de 5 cm de órbita (Innova 2300,

New Brunswick, EUA) posicionado em estufa (Thermo Electro Corp., EUA) a 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂.

As células eram diluídas em meio de cultivo fresco a cada 2-3 dias para uma concentração de células viáveis de 1·10⁶ cél/mL. Para tal, o volume excedente de suspensão celular e o remanescente era centrifugado a 300 g por 5 min. O sobrenadante era descartado e o meio novo era adicionado. Toda manipulação de células foi realizada em fluxo laminar.

4.2.3 Bancos celulares

As células HEK293-3F6 parentais do Laboratório de Cultivos Celulares (LECC) do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ foram utilizadas para a produção de um banco de trabalho (WCB), do qual foram retirados criotubos para realizar as transfecções para produção das proteínas recombinantes.

Para o descongelamento dos criotubos, que continham aproximadamente 1·10⁷ células viáveis cada em solução de 90% de meio HEK TF e 10% do criopreservante DMSO (Sigma-Aldrich, EUA), os mesmos foram rapidamente aquecidos a 37°C em banho-maria. A suspensão celular foi pipetada para tubos ventilados e centrifugada a 300 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado para remoção de DMSO, tóxico para as células, e o *pellet* contendo as células foi ressuspensionado em meio HEK TF novo.

Bancos celulares mestre e de trabalho das populações celulares recombinantes geradas foram produzidas e estocadas em nitrogênio líquido e freezer a -80°C, em criotubos contendo 1·10⁷ células viáveis por criotubo em solução de 90% de meio HEK TF e 10% do criopreservante DMSO.

4.3 Geração de células recombinantes produtoras de proteínas Fc

4.3.1 Construções plasmidiais

As 14 construções gênicas referentes às proteínas Fc utilizadas nesse trabalho haviam sido previamente desenhadas pelos coordenadores do projeto, tendo sido sintetizadas e subclonadas no vetor de expressão pCI-neo (Promega, EUA) na empresa GenScript (EUA). As sequências das 14 construções são confidenciais.

As 14 construções se diferem por uma combinação de 4 tipos de modificações propostas para otimizar a expressão ou secreção da proteína, ou a sua função biológica (Figura 4.1):

1. Tipos de peptídeos sinal (PS1, PS2, PS3 e PS4): peptídeos sinal são sequências peptídicas que precedem a sequência de aminoácidos da proteína e têm como função a indicação para sua secreção pela célula animal (STERN et al., 2007);
2. Presença (Mut) ou ausência (Wt) de uma mutação: alteração que visa otimizar a atividade biológica do fragmento Fc;
3. Monomerização (Mon) ou dimerização (Dim): presença ou ausência de uma alteração na sequência peptídica para impedir a dimerização das subunidades de Fc, formando uma proteína Fc monomérica, que poderia ter maior penetração em tecidos que a versão dimérica (WANG et al., 2017);
4. Tipos de linkers (Link1 e Link2): *linkers* são peptídeos que realizam a ligação entre duas moléculas, proteínas ou subunidades, podendo ser rígidos ou flexíveis (CHEN et al., 2013).

Além da sequência de DNA referente à proteína Fc e suas modificações, o vetor plasmidial pCI-neo também contém a sequência da enzima neomicina fosfotransferase, que confere resistência às células transfectadas contra o antibiótico sulfato de G418 (Sigma-Aldrich, EUA).

Fc1	PS1	Dim	Mut	Link1
Fc2	PS1	Dim	Mut	Link2
Fc3	PS1	Dim	Wt	Link1
Fc4	PS1	Dim	Wt	Link2
Fc5	PS1	Mon	Mut	Link1
Fc6	PS1	Mon	Mut	Link2
Fc7	PS1	Mon	Wt	Link1
Fc8	PS1	Mon	Wt	Link2
Fc9	PS2	Dim	Mut	Link1
Fc10	PS2	Dim	Wt	Link1
Fc11	PS3	Dim	Mut	Link1
Fc12	PS3	Dim	Wt	Link1
Fc13	PS4	Dim	Mut	Link1
Fc14	PS4	Dim	Wt	Link1

Figura 4.1 – Representação esquemática da disposição das modificações nas 14 construções plasmidiais (Fc1 a Fc14). Legenda: Peptídeo sinal (PS), dimerização (Dim), monomerização (Mon), presença de mutação (Mut), ausência de mutação (Wt) e *linker* (Link).

4.3.2 Transfecção

Para a transfecção com os 14 plasmídeos, células HEK293 parentais foram utilizadas com alta viabilidade celular, maior que 95%, e concentração de $1 \cdot 10^6$ células viáveis por mL de meio. O protocolo foi seguido conforme orientação dos fabricantes dos dois reagentes de transfecção utilizados, ambos lipídeos catiônicos, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e Mirus TransIT-2020 (Mirus Bio, EUA).

As construções plasmidiais Fc2, Fc5, Fc6 e Fc8 foram transfectadas em células HEK293 parentais em placas de 24 poços profundos, em duplicata e controle negativo (*mock*), com volume inicial de 2 mL da suspensão de células em cada poço. Após uma tentativa malsucedida de transfecção em placa, a construção Fc4 foi transfectada em HEK293 em tubos agitados com volume inicial de 5 mL de suspensão celular. As transfecções estáveis das construções Fc1, Fc3, Fc7 e Fc9 a Fc14 haviam sido realizadas previamente por outros integrantes do Laboratório de Engenharia em Cultivos Celulares (PEQ/COPPE/UFRJ) em placas de poços profundos utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine 3000, seguindo o mesmo protocolo descrito nas recomendações do fabricante.

Para transfecção com Lipofectamine 3000, para cada 1 mL de suspensão celular com $1 \cdot 10^6$ cél/mL, foram adicionados 25 μ L de meio opti-MEM (Gibco, EUA), 0,5 μ L de DNA plasmidial e 1 μ L do reagente P3000 em um microtubo estéril e 25 μ L de meio opti-MEM e 1 μ L reagente Lipofectamine 3000 a outro microtubo estéril, que foi misturado ao primeiro. Após 15 min de incubação para formação dos complexos lipídeo-plasmídeo, o líquido foi adicionado à suspensão celular, que foi cultivada sob agitação.

Para transfecção com Mirus TransIT-2020, para cada 1 mL de suspensão celular com $1 \cdot 10^6$ cél/mL, foram adicionados 25 μ L de meio opti-MEM, 0,5 μ L de DNA plasmidial e 1,5 μ L do reagente Mirus em um microtubo estéril. Após 20 min de incubação, o líquido foi adicionado à suspensão celular, que foi cultivada sob agitação.

4.3.3 Geração de populações celulares estáveis

A geração de populações celulares estáveis referentes às construções Fc2, Fc4, Fc5, Fc6 e Fc8 foi realizada por meio do cultivo das células transfectadas em meio contendo 100 μ g/mL do antibiótico de seleção sulfato de G418 (Sigma-Aldrich, EUA) por 60 dias, período utilizado para garantir a morte de todas as células que não houvessem incorporado em seu genoma o conteúdo do plasmídeo. A cada 3-4 dias, o meio de cultivo contendo o antibiótico, que era adicionado no mesmo dia, foi trocado pela centrifugação a 300 g por 5 min, eliminação do sobrenadante e ressupensão em meio novo. Amostras de 1 mL de sobrenadante eram coletadas semanalmente para verificação da expressão dos fragmentos Fc.

A concentração de antibiótico sulfato de G418 utilizada se refere à menor concentração capaz de gerar a morte das células hospedeiras em ensaios de curva de morte realizados no Laboratório de Engenharia em Cultivos Celulares (PEQ/COPPE/UFRJ) previamente por outros membros.

4.4 Cultivo das populações celulares estáveis produtoras das proteínas Fc

A viabilidade celular, em porcentagem de células viáveis, é calculada em relação à concentração total de células (vivas ou mortas), conforme a Equação 1.

$$Viabilidade = \frac{Xv}{Xt} \cdot 100 \quad (1)$$

onde: Xv: concentração de células viáveis;

Xt: concentração de células totais.

Para monitorar a fase de crescimento celular, foram calculados a taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}), expressa em h^{-1} ou d^{-1} , e o tempo de duplicação na fase exponencial (t_{Dexp}), calculado a partir de μ_{exp} e expressa em h^{-1} ou d^{-1} , conforme as Equações 2 e 3:

$$\mu_{exp} = \frac{dXv}{dt} \cdot \frac{1}{Xv} \quad (2)$$

$$t_{Dexp} = \frac{\ln 2}{\mu_{exp}} \quad (3)$$

onde: Xv: concentração de células viáveis;

t: tempo.

Para a obtenção da taxa específica de formação de produto (q_p), é necessário o cálculo da integral de células viáveis (ICV) em determinado n , expressa em $cél \cdot d/mL$ (Equação 4). A taxa específica de formação de produto na fase exponencial (q_{pexp}) é calculada na fase exponencial de crescimento e expressa em $pg/cél/d$ (Equação 5).

$$ICV_n = \sum_{i=1}^n \frac{(Xv_{n-1} + Xv_n)}{2} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (4)$$

$$q_{pexp} = \frac{P_n - P_{n-1}}{ICV_n - ICV_{n-1}} \quad (5)$$

onde: P: concentração de produto (fragmento Fc).

A produtividade geral é referente à quantidade de produto gerado por dia ao longo de todo o cultivo, sendo expresso em $\mu\text{g/d}$ e calculado conforme a Equação 6.

$$Produtividade\ geral = \frac{massa\ total\ de\ produto\ gerado}{tempo\ total\ de\ cultivo} \quad (6)$$

A produtividade volumétrica específica (Pve) leva em consideração o volume de meio de cultivo utilizado e é calculado pela divisão da massa total de produto gerado pelo tempo total do cultivo e pelo volume total de meio utilizado, sendo expresso em μg de produto por litro de meio de cultivo por dia (Equação 7).

$$Pve = \frac{P_{ac}}{t_{proc} \cdot V_{gasto}} \quad (7)$$

onde: P_{ac} : massa do produto acumulado ao longo do processo;

t_{proc} : tempo de processo de cultivo;

V_{gasto} : volume de meio de cultivo gasto.

4.4.1 Cultivo em tubos ventilados em modo batelada

Foram realizados estudos cinéticos de crescimento celular com as populações celulares estáveis geradas por transfecção para a avaliação do crescimento celular, consumo de nutrientes e expressão de proteínas Fc.

Para verificar o crescimento em batelada, cada população referente a uma das 14 construções plasmidiais foi cultivada em 15 mL de meio HEK TF novo com concentração de células viáveis inicial de $0,5 \cdot 10^6$ cél/mL, em duplicata experimental, em tubos cilíndricos de fundo cônicos de polipropileno agitados com tampa com filtro para trocas gasosas (TubeSpin, TPP, Suíça), neste trabalhos referidos apenas como tubos ventilados, que foram cultivados a 180 rpm, em *shaker* com órbita de 5 cm, 37°C e 5% de CO_2 até que a viabilidade celular atingisse 80%, valor inferior ao tolerado para o cultivo industrial de células. Amostragens de 0,3-0,6 mL eram realizadas diariamente para análises de células viáveis, viabilidade celular, concentração de glicose e lactato e quantificação de proteínas Fc.

4.4.2 Cultivo em tubos ventilados em modo pseudoperfusão

A partir dos resultados obtidos nos estudos cinéticos das populações recombinantes em batelada e de análises realizadas em paralelo no *Immune Engineering Laboratory* da *University of Kansas* (Lawrence, EUA), as populações celulares HEK.Fc1 e HEK.Fc9 foram escolhidas como as mais promissoras para a continuação do estudo e cultivadas em modo pseudoperfusão.

Para estes ensaios, as populações celulares foram cultivadas em tubos ventilados agitados, em triplicata experimental, nas mesmas condições do ensaio em batelada, e foram analisadas as mesmas variáveis. A partir do quarto dia de cultivo, quando as células estavam em fase exponencial de crescimento, foram realizadas trocas diárias de meio de cultivo a uma taxa de um volume de meio por dia, com substituição por meio de cultivo novo aquecido a 37°C. Para isso, os tubos ventilados eram centrifugados a 300 g por 5 min em temperatura ambiente, parte do sobrenadante (100-150 µL) era armazenado como amostra e o resto era descartado. Por fim, o *pellet* de células era ressuspenso em meio novo. O processo foi mantido em cultivo com troca diária de meio até que a viabilidade celular atingisse menos de 80%.

A taxa de troca de meio representa a fração do meio do volume de trabalho trocada diariamente, expressa em volume de meio de cultivo trocado por volume de trabalho por dia (vvd), sendo que 1 vvd = 100% de meio trocado.

4.4.3 Cultivo em biorreator de tanque agitado no modo batelada

Os ensaios em maior escala foram conduzidos com o cultivo das populações celulares HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em modo batelada em biorreator de tanque agitado (ez-Control, Applikon Biotechnology B. V., Holanda) com volume de trabalho de 1,5 L, utilizando o mesmo meio de cultivo, HEK TF suplementado com glutamina. O sistema do biorreator realizava o monitoramento em linha (*online*) de temperatura, pH, DO, agitação e injeção de gases.

Os valores desejados de temperatura, pH e oxigênio dissolvido (DO) foram ajustados para 37°C, 7,1 e 40% da saturação do ar, respectivamente. A agitação foi mantida entre 200 e 300 rpm, utilizando dois impelidores, um impelidor tipo Rushton localizado na parte inferior e uma hélice náutica na parte superior, ambos submersos. A

injeção de base para o cultivo da população HEK.Fc1 foi muito restrita, com pouca base carbonato de sódio adicionada, o que resultou em leve diminuição do pH. No cultivo de HEK.Fc9 esse problema foi corrigido, permitindo um melhor controle do pH por injeção da base. Não foi necessária a utilização de antiespumante para o controle da formação de espuma. O exaustor de ar era mantido a 20°C pela recirculação de água resfriada por um banho termostático de recirculação.

A propagação do inóculo foi realizada em frascos erlenmeyer agitados conforme indicado no item 4.2 e a inoculação foi realizada com concentração de $0,5 \cdot 10^6$ cél/mL. As amostragens foram realizadas entre uma e duas vezes por dia, com retirada de 10 mL de cultivo. Eram realizadas análises para concentração e viabilidade celular, concentração de glicose e lactato e concentração de proteínas Fc, além da análise externa (*offline*) de pH para correção do *offset*, caso necessário.

4.5 Ensaios analíticos

4.5.1 Concentração e viabilidade celular

A quantificação da concentração de células totais, células viáveis e da viabilidade celular foi realizada utilizando o contador automático de células Vi-CELL XR (Beckman Coulter, EUA), que utiliza a técnica da exclusão por azul de tripan, em que as células mortas são coradas pelo corante e distinguidas das viáveis. O equipamento passa a suspensão celular corada por um capilar, em que são tiradas 50 fotos para fins de análise digital de imagens pelo software. A viabilidade é resultado da razão entre células viáveis e células totais contadas. Por contagem, eram utilizados 0,5 mL de amostra diluída ou não do cultivo celular.

4.5.2 Concentrações de glicose e lactato

A concentração do nutriente glicose (Glc) e do metabólito lactato (Lac) foram quantificados por meio do analisador bioquímico YSI 2700 Select Analyser (YSI Inc., EUA), que utiliza membranas com enzimas imobilizadas para quantificação de metabólitos. Amostras de 20 μ L do sobrenadante diluído ou não, que eram coletados nos experimentos de cinética de crescimento celular, eram quantificadas diariamente.

4.5.3 Quantificação dos fragmentos Fc

As proteínas Fc foram quantificadas por *spot blot*, uma forma de imunoblot. Amostras de sobrenadante dos cultivos eram pipetadas (3 μ L) em uma membrana de nitrocelulose (Vita Scientific, EUA) formando “spots” circulares. Diluições de IgG do soro humano (I4506, Sigma-Aldrich, EUA) eram utilizadas como padrão na quantificação. Após secagem total da membrana, a mesma era incubada por 1 h em solução de TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) contendo 5% (m/v) de leite em pó desnatado para bloqueio de toda a superfície não utilizada da membrana. Em seguida, a membrana era incubada em solução de TBS com o anticorpo anti-Fc conjugado à enzima peroxidase (SAB3701282, Sigma-Aldrich, EUA) por 1 h. Após lavagem por 4 vezes, a membrana era revelada com o kit de revelação Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, EUA), que utiliza luminol para interagir com a enzima peroxidase. A detecção da quimiluminescência das amostras era realizada com o fotodocumentador FluorChem E (Cell Biosciences, EUA) após 3 min de exposição com luz ultravioleta.

A quantificação das amostras a partir das imagens do *spot blot* foi realizada por densitometria com o software ImageJ (versão 1.52a, National Institutes of Health, NIH, USA), utilizando diluições de um padrão de IgG do soro humano (I4506-50MG, Sigma-Aldrich, EUA) que serão indicadas junto aos respectivos resultados, também aplicado à membrana.

4.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação por azul de Coomassie

As massas moleculares das proteínas do sobrenadante do cultivo das populações celulares foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O preparo do gel de separação a 12% (m/v) de poliacrilamida, foi feito utilizando tampão Tris-HCl (1,5 M e pH 8,8), solução de acrilamida (30%)/bis-acrilamida (0,8%), SDS 10%, PSA 10% e TEMED (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha). O gel de empilhamento foi preparado da mesma forma, mas utilizando o tampão Tris-HCl (0,5 M e pH 6,8) e concentração de poliacrilamida de 0,8% (m/v).

O preparo da amostra foi consistiu na diluição (3:1) do sobrenadante em tampão de amostra concentrado (50% de solução Tris-HCl 0,5 M, 40% de glicerol, 8% de SDS

e 0,1% de azul de Bromofenol). O procedimento foi realizado em condições não-redutoras, sem adição de β -mercaptoetanol. O gel de empilhamento, localizado sobre o gel de separação, foi utilizado para a aplicação de 28 μ L de amostra por poço. A eletroforese foi realizada no equipamento Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, EUA) com marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA).

A revelação do gel foi feita com solução corante de azul de Coomassie (2,5 g Coomassie blue, 50% etanol e 10% ácido acético glacial) por 1 h, seguida da remoção do excesso de corante por três lavagens de 1 h cada com solução descorante (50% etanol e 10% ácido acético glacial). Em seguida, foram tiradas fotos dos géis em *scanner*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Geração de células animais recombinantes produtoras de proteínas Fc

Foi realizada a transfecção dos diferentes plasmídeos em células HEK293-3F6 com o objetivo de se obter células recombinantes estáveis produtoras dos fragmentos Fc. Diversos estudos já obtiveram sucesso na transfecção de células HEK293 para produção de fragmentos Fc (SUBEDI et al., 2015; WELLS e ROBINSON, 2018), proteínas de fusão Fc (SCHIRRMANN e BÜSSOW, 2010; SUEN et al., 2010; GRAF, 2018) ou imunoglobulinas inteiras (NAHREINI et al., 2003; BERNTZEN et al., 2005; ROSE et al., 2016).

Previamente ao presente trabalho, outros membros do Laboratório de Engenharia em Cultivos Celulares (LECC/COPPE/UFRJ) realizaram transfecções de todas as construções gênicas nas células HEK293-3F6 e efetuaram a seleção das populações estáveis por 60 dias na presença do agente de seleção, resultando na obtenção bem-sucedida de populações recombinantes estáveis para 9 das 14 construções gênicas: Fc1, Fc3, Fc7, Fc9, Fc10, Fc11, Fc12, Fc13 e Fc14. As populações referentes às outras construções gênicas não sobreviveram ao período de seleção.

No presente trabalho, foi realizada, adotando a mesma metodologia usada anteriormente e descrita no item 4.3, a transfecção dos plasmídeos restantes (Fc2, Fc4, Fc5, Fc6 e Fc8) nas células hospedeiras e a seleção de células estáveis por até 60 dias com sulfato de G418 utilizando placas de 24 poços profundos e comparando dois reagentes de transfecção, Lipofectamine 3000 e Mirus TransIT-2020 (Figura 5.1). A geração de populações estáveis de células transfectadas foi bem-sucedida para todas as construções gênicas testadas, com exceção das células transfectadas com Fc8 com o reagente Mirus TransIT-2020 e das células transfectadas com Fc4 com ambos reagentes, que não sobreviveram ao processo de seleção. Devido ao maior sucesso da utilização do reagente Lipofectamine 3000, as células transfectadas com o reagente Mirus TransIT-2020 foram criopreservadas após 48 dias de seleção, mantendo-se apenas as células transfectadas com o reagente Lipofectamine 3000 até o fim da seleção.



Figura 5.1 – Placa de 24 poços profundos para cultivo de células animais utilizada na transfecção em duplicata com os plasmídeos Fc2, Fc4, Fc5, Fc6 e Fc8 com os reagentes Lipofectamine 3000 (indicado pela letra L) e Mirus TransIT-2020 (letra M) e nas primeiras semanas de seleção com antibiótico sulfato de G418.

A transfecção com o plasmídeo Fc4, seguida de seleção com sulfato de G418, foi repetida em células HEK293 em tubos ventilados com 5 mL de volume de transfecção, resultando em populações recombinantes estáveis utilizando os dois reagentes de transfecção, que foram criopreservadas após o período de 60 de seleção.

Os perfis de concentração de células viáveis (Xv) e viabilidade das populações estáveis obtidas referentes às construções 2, 4, 5, 6, e 8 ao longo dos 60 dias de seleção estão mostrados na Figura 5.2, na qual as quedas sucessivas de Xv representam a diluição das células para $1 \cdot 10^6$ cél/mL em meio novo, realizada a cada passagem após a recuperação da viabilidade celular.

Durante a seleção das células transfectadas em placas de poços fundos, as células mortas tendiam a não sedimentar completamente após a centrifugação, diferentemente das células viáveis, que sedimentavam no fundo da placa formando um *pellet*. Esta constatação foi confirmada por observação em microscópio utilizando a técnica de exclusão por azul de tripan. Inevitavelmente, parte dos agregados de células mortas era removida com a retirada do sobrenadante, selecionando-se, de forma não-intencional, as células viáveis, o que permitiu obter valores de viabilidade relativamente altos (superiores a 50%) mesmo durante o “vale da morte” (Fig. 5.2, itens a, c, d, e).

A separação física preferencial entre células viáveis e não-viáveis na centrifugação não foi observada nas seleções dos transfectomas realizada em tubos ventilados, referentes à construção Fc4 (Fig. 5.2b), nas quais se observou valores de

viabilidade abaixo dos 40% por um longo período. Assim, pode-se concluir que as condições de centrifugação nos tubos ventilados propiciavam retenção de todas as células (vivas e mortas), enquanto as condições de centrifugação nas placas com poços de fundo piramidal propiciavam a retenção preferencial de células vivas, o que parece ser vantajoso para o processo de geração de células estáveis.

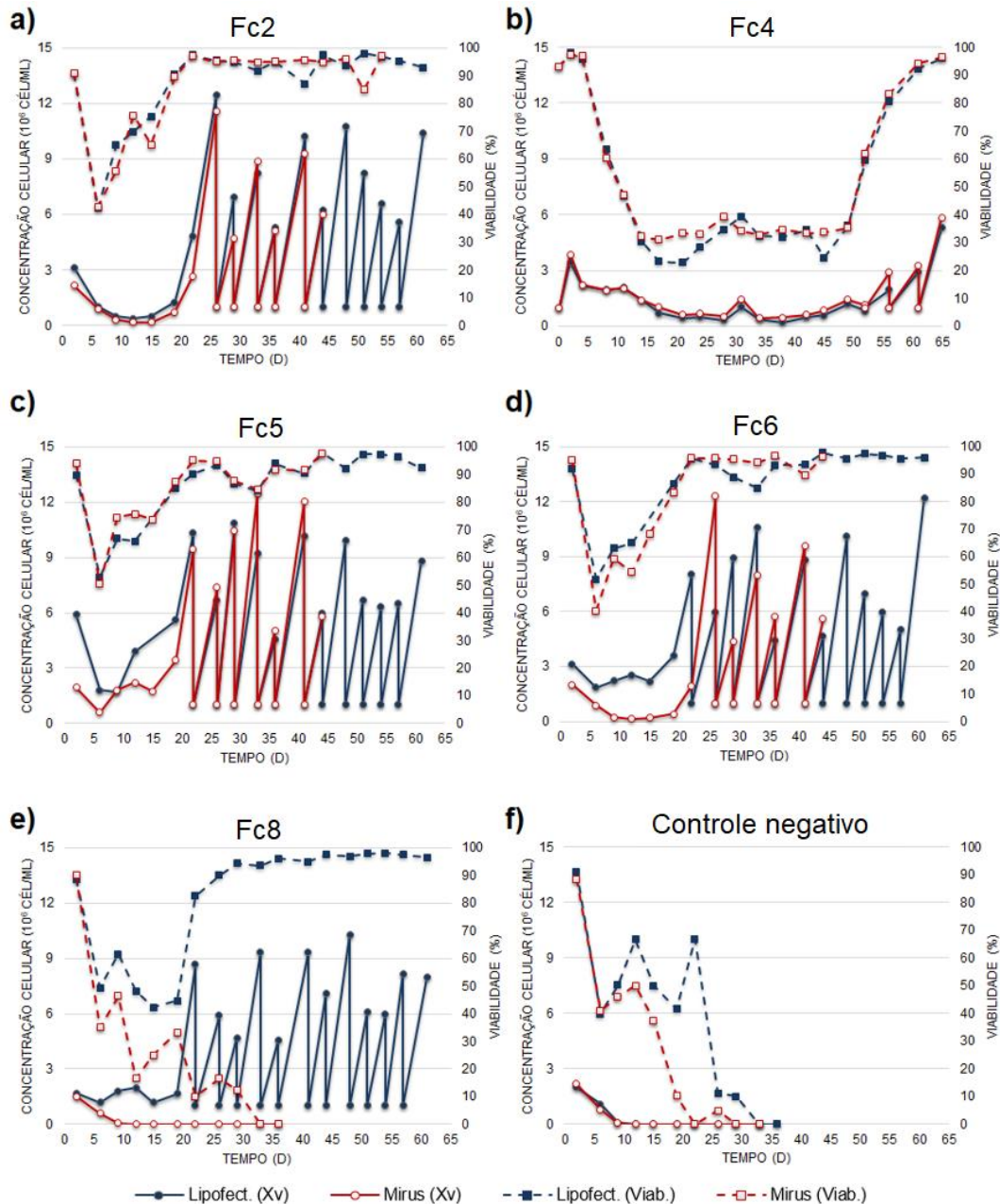


Figura 5.2 – Perfil de concentração celular e viabilidade de células transfectadas com os plasmídeos Fc2 (a), Fc4 (b), Fc5 (c), Fc6 (d), Fc8 (e) e o controle negativo (f) durante o período de seleção (a partir do segundo dia pós-transfecção) na presença do agente de seleção. Todas as transfecções foram realizadas em placa de poços fundos, exceto Fc4, para o qual foram usados tubos ventilados. A seleção das células transfectadas

com o reagente Mirus TransIT-2020 foi interrompida após o dia 48 para todas as condições, com exceção de Fc4.

Outra diferença observada entre os experimentos realizados em placas e tubos ventilados foi em relação ao período até a recuperação das células durante a seleção com antibióticos. Nas transfecções com as construções Fc2, Fc5, Fc6 e Fc8, realizadas em placa, a recuperação das células, indicada pelo aumento da viabilidade e pelo crescimento exponencial, foi observada entre os dias 20 e 25, enquanto para Fc4, realizada em tubos agitados, o mesmo foi verificado a partir do dia 55 da seleção. Para células em suspensão, o período de seleção normalmente dura entre 30 e 60 dias (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008; LOIGNON et al., 2008).

Sabe-se que as células podem ser induzidas à morte programada quando há presença de alguns fatores no meio de cultivo, como espécies reativas de oxigênio, proteases e fatores pró-apoptóticos, bem como quando há alterações das condições de pH e osmolalidade no meio, que podem ser ocasionadas por extravasamento do citosol de células mortas (PELLEGRINI et al., 2008; KRAMPE e AL-RUBEAI, 2010). Assim, a presença de células não-viáveis em maior quantidade nos tubos ventilados pode ter induzido inibição do crescimento celular ou morte das células viáveis pelo extravasamento desses fatores no meio de cultivo.

5.1.1 Comparação entre reagentes de transfecção Lipofectamine 3000 e Mirus TransIT-2020

As transfecções com os plasmídeos Fc utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamine 3000 e Mirus TransIT-2020 foram comparadas em relação à recuperação das células transfectadas.

Quanto à recuperação dos transfectomas durante o período de seleção com antibiótico G418, o reagente Lipofectamine 3000 resultou em recuperação mais rápida da concentração de células viáveis referentes às construções Fc5 e Fc6, o que pode ser evidenciado nos entre os dias 5 e 20 (Figura 5.2, itens c e d). Além disso, somente as células referentes ao plasmídeo Fc8 transfectadas com o reagente Lipofectamine 3000 sobreviveram ao período de seleção. Não foi observada diferença, para Fc2 e Fc4, entre os experimentos com os dois lipídeos em relação à recuperação do crescimento celular.

A morte de todas as células transfectadas com Fc8 utilizando Mirus TransIT-2020, bem como a morte de parte das células das outras condições, pode ser resultante da combinação de vários fatores: 1) a baixa taxa de células que tiveram cópias do plasmídeo inseridos em seu genoma, o que gera a morte das células não-transfectadas por citotoxicidade do antibiótico sulfato de G418; 2) a expressão transiente de uma proteína exógena, no caso o fragmento Fc, que desvia o maquinário celular para esta função, reduzindo energia e nutrientes gastos para manutenção da célula (BOLLATI-FOGOLIN e COMINI, 2008; KIM e EBERWINE, 2010); 3) a citotoxicidade dos lipídeos catiônicos sobre as células (NGUYEN et al., 2007); e 4) a presença de fatores e proteínas intracelulares no meio de cultivo, tais como proteases, lipases e fatores pró-apoptóticos, como consequência da lise de células mortas no processo (KRAMPE e AL-RUBEAI, 2010).

Quanto à produção de proteínas Fc durante o período de seleção, os resultados de imunoblot (Figura 5.3) confirmam a produção de todas as variantes (Fc2, Fc4, Fc5, Fc6 e Fc8) pelas células transfectadas por até 60 dias na presença do antibiótico, o que confirma que os genes relativos às proteínas Fc foram incorporados dor forma estável ao código genético das células HEK293. Por não se tratar de uma transfecção de inserção gênica sítio dirigida, o resultado é uma população de células heterogênea em relação ao número de cópias de DNA integradas e à localização do sítio de integração.

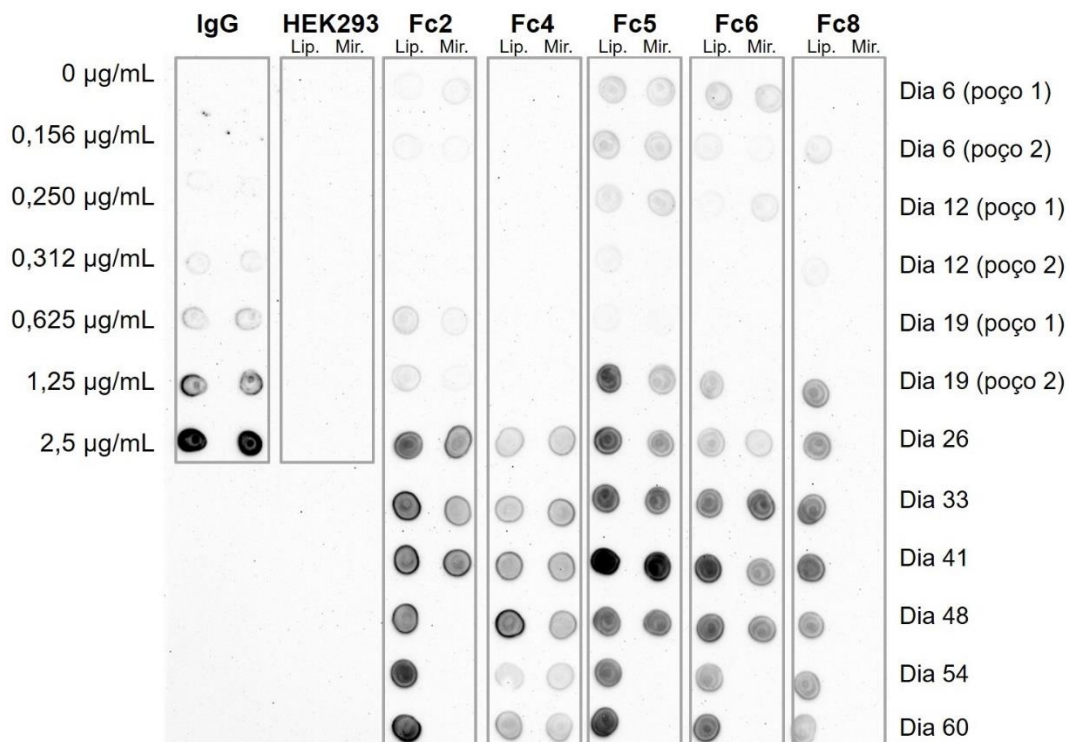


Figura 5.3 – *Spot blot* das amostras de sobrenadante da seleção com sulfato de G418 para geração de populações estáveis de células HEK293 transfectadas com as construções Fc2, Fc4, Fc5, Fc6, Fc8 com os reagentes de transfecção Lipofectamine 3000 (indicado como “Lip.”) e Mirus TransIT-2020 (indicado como “Mir.”). O controle negativo foi feito com células HEK293 transfectadas sem DNA (“*mock*”). IgG de soro humano utilizado como padrão para quantificação. As amostras dos dias 6 a 19 relativas às construções Fc2, Fc5, Fc6 e Fc8 são referentes às duplicatas biológicas da placa de poços profundos. Após este dia, as células dos poços foram reunidas em um tubo ventilado. A seleção das células transfectadas com Mirus TransIT-2020 foi interrompida após o dia 48 para todas as condições, exceto Fc4.

Não se pode afirmar qual reagente resultou nas células mais produtivas em relação à expressão de Fc a partir da quantificação realizada pelo imunoblot do sobrenadante das amostras, pois as concentrações de células não eram as mesmas no momento da obtenção dos sobrenadantes. Sabe-se que os transfectomas gerados com Mirus TransIT-2020 demoraram mais tempo para se recuperar, o que poderia resultar na diferença entre os sinais obtidos no *spot blot*.

Conforme revisão bibliográfica realizada, não há comparação entre os dois reagentes na transfecção de células HEK293 ou para a produção de fragmentos Fc descrita na literatura. Contudo, há comparações dos reagentes para outras linhagens celulares e produtos. Sarkar e colaboradores (2015) verificaram o dobro da eficiência de transfecção com o reagente Lipofectamine 3000 em células HeLa para a expressão de GFP, em relação ao reagente TransIT-2020. Tamm e colaboradores (2016) verificaram eficiência similar de transfecção para células-tronco embrionárias de camundongos transfectadas com os dois reagentes, tanto em cultivos em suspensão como aderente. Hsu e colaboradores (2018), que transfectaram fibroblastos humanos cultivados em microcarregadores com vários lipídeos catiônicos, observaram que Lipofectamine 3000 apresentou maior citotoxicidade e menor expressão da proteína de interesse do que o reagente Mirus TransIT-2020. Cheung e colaboradores (2018) observaram que o reagente TransIT-2020 foi o melhor em relação à expressão de GFP em células mesenquimais da medula óssea humana em comparação com vários lipídeos catiônicos, incluindo Lipofectamine 3000, além de não observarem diferença de citotoxicidade entre os reagentes testados. Sendo assim, considerando os resultados para outros tipos de células, não há um consenso sobre a superioridade de um ou outro lipídeo.

5.2 Estudo cinético em tubos ventilados em modo batelada

Os estudos cinéticos comparativos em batelada, realizados em tubos ventilados, comprovaram a produção de proteínas Fc em diferentes níveis pelas diferentes populações estáveis geradas a partir das 14 construções gênicas, que serão chamadas de populações estáveis HEK.Fc1-14. Os resultados de concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$), de taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (t_{Dexp}) estão mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$), taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação das populações celulares estáveis e da linhagem hospedeira no cultivo em batelada em tubos ventilados. Os desvios são referentes às duplicatas biológicas.

População celular estável	$X_{v_{max}}$ (10^6 cél/mL)	μ_{exp} (d^{-1})	t_{Dexp} (h)
HEK293-3F6	12,9 ± 0,0	0,661 ± 0,033	25,2 ± 1,3
HEK.Fc1	13,2 ± 0,9	0,551 ± 0,005	30,2 ± 0,3
HEK.Fc2	11,5 ± 0,0	0,605 ± 0,019	27,5 ± 0,8
HEK.Fc3	13,0 ± 0,3	0,532 ± 0,001	26,3 ± 0,0
HEK.Fc4	13,7 ± 0,6	0,572 ± 0,027	29,1 ± 1,4
HEK.Fc5	13,8 ± 0,8	0,558 ± 0,002	29,8 ± 0,1
HEK.Fc6	13,5 ± 0,7	0,570 ± 0,005	29,2 ± 0,2
HEK.Fc7	12,6 ± 0,1	0,532 ± 0,025	31,3 ± 1,5
HEK.Fc8	13,1 ± 0,2	0,588 ± 0,045	28,4 ± 2,2
HEK.Fc9	15,1 ± 0,1	0,589 ± 0,005	28,3 ± 0,2
HEK.Fc10	13,3 ± 0,9	0,598 ± 0,000	27,8 ± 0,0
HEK.Fc11	14,4 ± 0,2	0,580 ± 0,028	28,7 ± 1,4
HEK.Fc12	13,2 ± 0,1	0,600 ± 0,008	27,7 ± 0,4
HEK.Fc13	14,1 ± 0,4	0,620 ± 0,016	26,9 ± 0,7
HEK.Fc14	12,9 ± 0,6	0,579 ± 0,001	28,7 ± 0,0

Com o intuito de avaliar a influência das diferentes construções gênicas no cultivo celular e na expressão das proteínas Fc, as 14 populações foram separadas em dois grupos: 1º) construções que contêm o peptídeo sinal 1 (PS1), que incluem as populações celulares de HEK.Fc1-8; e 2º) construções que contêm a sequência para dimerização e o *linker* 1 (Link1), porém diferentes peptídeos sinal, que incluem as populações celulares HEK.Fc1/3/9-14.

De forma geral, todas as populações apresentaram perfis de crescimento celular similares (Figura 5.4), apresentando uma curva típica de cultivo em batelada (Figura 2.6)

com quatro fases de crescimento distintas. Foram observados tempos de duplicação semelhantes ou superiores em até 24,2%, como no caso da população celular HEK.Fc7, aos observados para a linhagem celular hospedeira. As concentrações máximas de células viáveis ($X_{v_{max}}$) de todas as populações foram entre 11 e 15 milhões cél/mL e as viabilidades celulares se mantiveram acima de 90% por 7 a 8 dias, decaindo rapidamente após a depleção de nutrientes. Assim, estes dados indicam que as diferenças nas construções gênicas codificando o fragmento Fc não resultaram em alterações nos padrões de crescimento celular ou consumo de nutrientes.

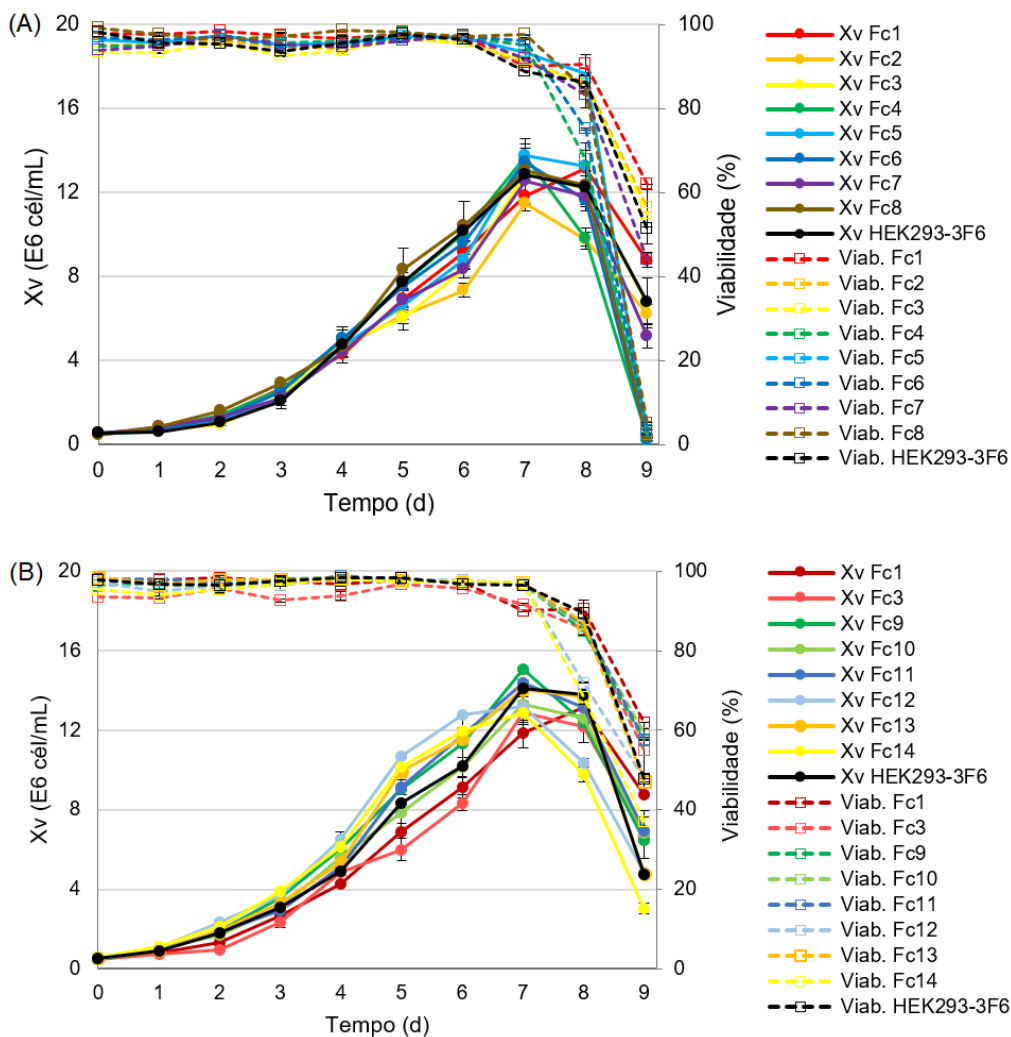


Figura 5.4 – Perfis de concentração de células viáveis (X_v) e viabilidade celular nos estudos cinéticos de cultivo das populações celulares estáveis, realizados em batelada em tubos ventilados por 9 dias, divididos em dois grupos para facilitar visualização da influência das construções plasmidiais: (A) populações HEK.Fc1-8; e (B) populações HEK.Fc1/3/9-14. Legenda: X_v (linha contínua e círculos preenchidos); viabilidade (linha tracejada e quadrados não preenchidos); linhagem HEK293-3F6 hospedeira não transfectadas (linhas pretas); barras de erro referentes às duplicatas biológicas.

Liste-Calleja e colaboradores (2014) obtiveram concentrações de células viáveis de $9,75 \cdot 10^6$ cél/mL em cultivo em meio comercial basal com suplemento quimicamente definido e $12,63 \cdot 10^6$ cél/mL em cultivo com 10% de soro fetal bovino em estudo de otimização de meios de cultivo para células HEK293 em frascos agitados. Alvim e colaboradores (2019a) obtiveram uma concentração máxima de $10,3 \cdot 10^6$ cél/mL no cultivo em batelada de células HEK293-3F6 produtoras de partículas pseudovirais de Zika em frascos agitados. Lorenzo e colaboradores (2019) obtiveram concentrações celulares máximas menores, entre 0,93 e 3,47 milhões de células por mL, no cultivo em suspensão de células HEK293-E2-CD154 para a produção de partículas virais em meios de cultivo comerciais livres de componentes de origem animal.

As populações produtoras de Fc1, Fc2, Fc5, Fc6 e Fc8 apresentaram abrupto declínio da concentração celular no 8º dia, indicando maior sensibilidade à depleção de nutrientes do meio de cultivo do que as outras populações. Tal comportamento não afeta seu uso, pois em processos industriais não se costuma estender o cultivo até viabilidades abaixo de 80%, por afetar a qualidade das proteínas expressas e contaminar, com material intracelular liberado de células mortas, o sobrenadante utilizado nas etapas de *downstream* com detritos celulares (LINDSKOG, 2015b).

Os resultados das concentrações de glicose e lactato na cinética em batelada para as 14 populações celulares (Figura 5.5) mostram que o perfil de consumo de glicose foi similar para todas, com depleção completa entre os dias 6 e 7. O perfil da concentração de lactato também foi similar, com produção de até 1,3 g/L (14,43 mM) até os dias 3-4. Concomitantemente com a diminuição da glicose no meio de cultivo, as células realizaram uma mudança em seu metabolismo, passando a consumir o lactato como fonte de energia e carbono até sua total depleção, nos dias 7-8. Este comportamento está de acordo com o observado na literatura e a total depleção de lactato é visto como positivo para a estabilidade da expressão proteica (MULUKUTLA et al., 2012; LISTE-CALLEJA et al., 2015; LINDSKOG, 2018b).

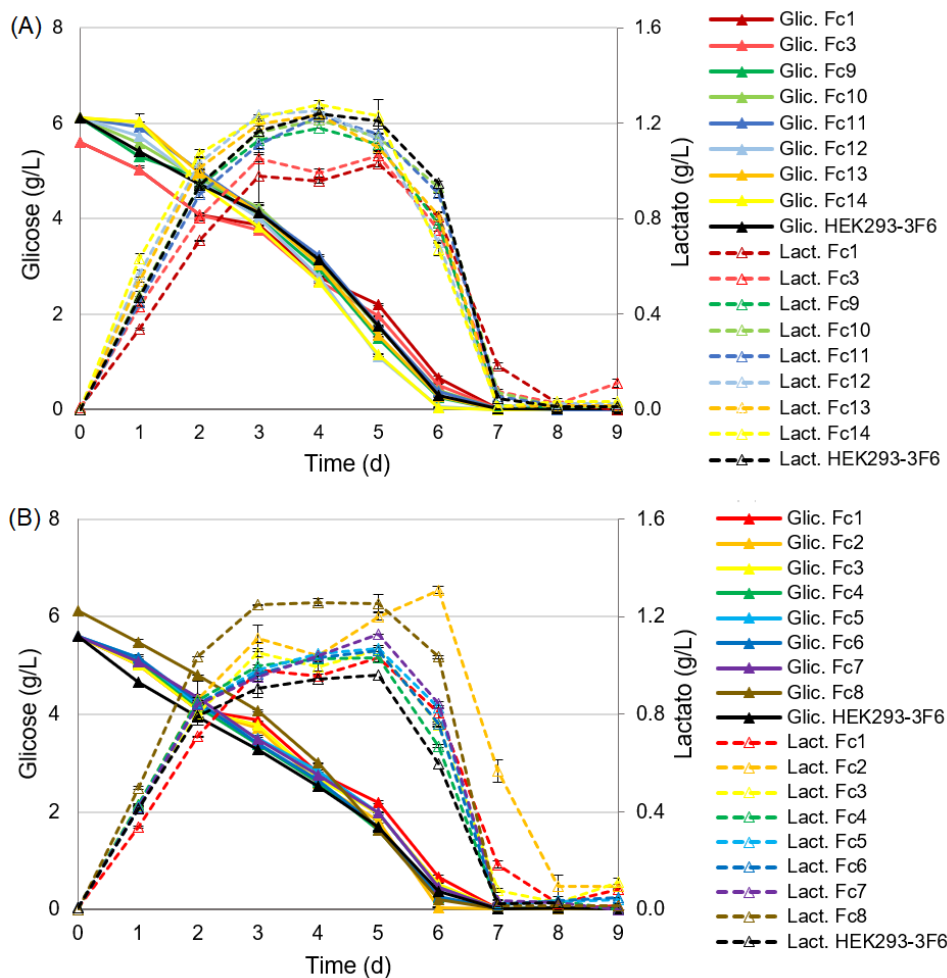


Figura 5.5 – Perfis de concentração de glicose e lactato nos estudos cinéticos de cultivo das populações celulares estáveis, realizados em batelada em tubos ventilados por 9 dias, divididos em dois grupos: (A) populações HEK.Fc1-8; e (B) populações HEK.Fc1/3/9-14. Legenda: concentração de glicose (linha contínua e triângulos preenchidos); concentração de lactato (linha tracejada e triângulos não preenchidos); linhagem HEK293-3F6 hospedeira não transfectadas (linhas pretas); barras de erro referentes às duplicatas biológicas.

Não foram observadas alterações significativas nos perfis de crescimento celular e consumo de nutrientes das populações transfectadas em relação à linhagem hospedeira HEK293-3F6 não transfectada, o que indica que a expressão de proteínas Fc não afetou o crescimento das populações de forma significativa. Por serem populações heterogêneas, é possível que algumas células, com maior produtividade celular, tenham tido seu metabolismo afetado em função da alta expressão celular, como é observado na maioria das transfecções de integração aleatória, mas sem que isso alterasse a população como um todo (SHI et al., 2014; HAUSER, 2015).

Quanto às proteínas Fc secretadas, foi possível verificar diferenças nos níveis de expressão. Os resultados de *spot blot* e da quantificação por densitometria estão

mostrados na Figura 5.6. A expressão foi verificada ao longo de todo o cultivo em todas as populações celulares, com perfil semelhante ao da concentração de células e maior expressão durante a fase exponencial.

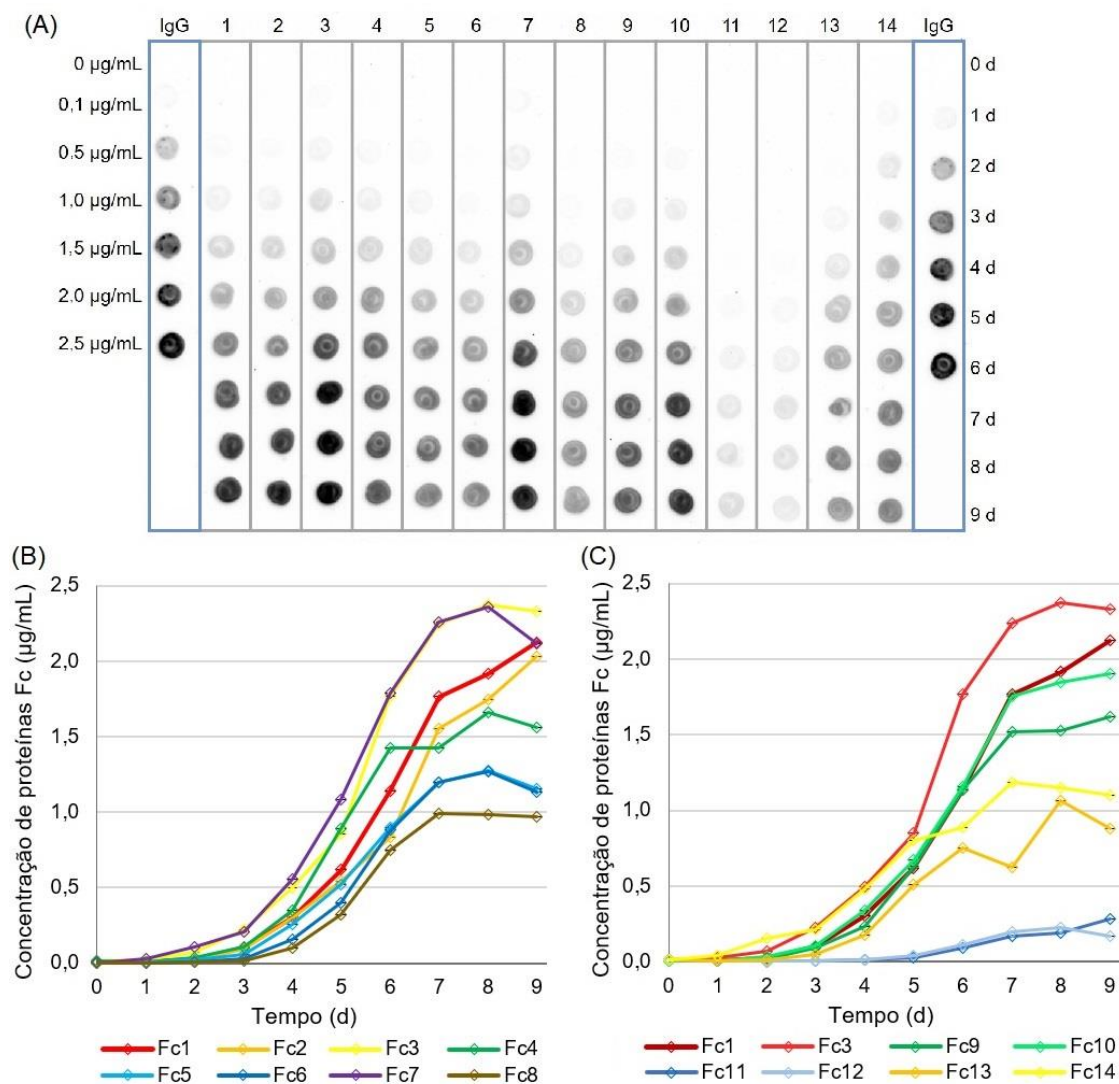


Figura 5.6 – Produção de proteínas Fc secretadas pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1-14 durante os 9 dias de estudo cinético de produção em batelada em tubos ventilados. (A) Imagem de revelação de um dos *spot blot* realizados: os números 1 a 14 são referentes às populações celulares HEK.Fc. Diferentes concentrações de IgG de soro humano foram utilizadas como padrão para quantificação (retângulo azul); (B) Perfil de produção de proteínas Fc nas populações HEK.Fc1-8; e (C) Perfil de produção de proteínas Fc nas populações HEK.Fc1/3/9-14. Os dados mostrados em (B) e (C) foram calculados por análise de imagem e densitometria a partir da imagem mostrada em (A).

No grupo de populações celulares transfectadas com a sequência referente ao peptídeo sinal 1 (Figura 5.6B), que incluem as populações HEK.Fc1-8, foram observados diferentes níveis de secreção de fragmento Fc, sendo que as populações HEK.Fc3 e HEK.Fc7 apresentaram as maiores produções. Os genes referentes às

proteína Fc3 e Fc7 compartilham as sequências para peptídeo sinal 1 (PS1), ausência de mutação com impacto na atividade biológica (Wt) e *linker* 1 (Link1), com diferença apenas na mutação para evitar a formação de dímeros. Assim, esses resultados podem indicar uma combinação de modificações gênicas promissora para a maior expressão desse tipo de proteína em células HEK293.

No grupo de populações celulares com diferentes peptídeos sinal (Figura 5.6C), referentes às populações HEK.Fc1/3/9-14, foi observada a menor expressão de proteínas Fc nas populações que contêm o peptídeo sinal 3 (PS3): HEK.Fc11 e HEK.Fc12. O nível de expressão de uma proteína está diretamente ligado com a seleção do peptídeo sinal, que sinaliza para a sua secreção pela célula (STERN et al., 2007; ATALLAH et al., 2017). Assim, pode-se concluir que PS3 é o menos efetivo para a expressão de proteínas em células HEK293 em comparação com os outros peptídeos sinal testados. São poucos os relatos de otimização de peptídeos sinal especificamente para células HEK293 (JÄGER et al., 2013; GÜLER-GANE et al., 2016; ROMÁN et al., 2016).

Analisando-se as proteínas do sobrenadante dos cultivos das populações estáveis por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 5.7), foi possível observar bandas referentes a todas as proteínas Fc, formando bandas de aproximadamente 50 kDa, em contraste com o sobrenadante da célula hospedeira não transfectada, que não apresentou esta banda. Por se tratar de populações heterogêneas e não-enriquecidas para células mais produtivas, a intensidade das bandas das proteínas Fc não é alta. A posição das bandas de fragmentos Fc da análise está de acordo os resultados da observados por SDS-PAGE em condições não-redutoras por Subedi e colaboradores (2015).

Contudo, não era esperada a observação de bandas na região de aproximadamente 50 kDa para as populações HEK.Fc5-8, que foram transfectadas com plasmídeos contendo uma alteração para que não fosse possível a formação das ligações dissulfídicas que unem as duas subunidades C_{H2}, responsáveis pela formação da proteína dimérica. Conforme observado na análise por SDS-PAGE de Ying e colaboradores (2012), que obtiveram proteínas Fc monoméricas com sucesso, estas deveriam formar bandas de aproximadamente 27 kDa.

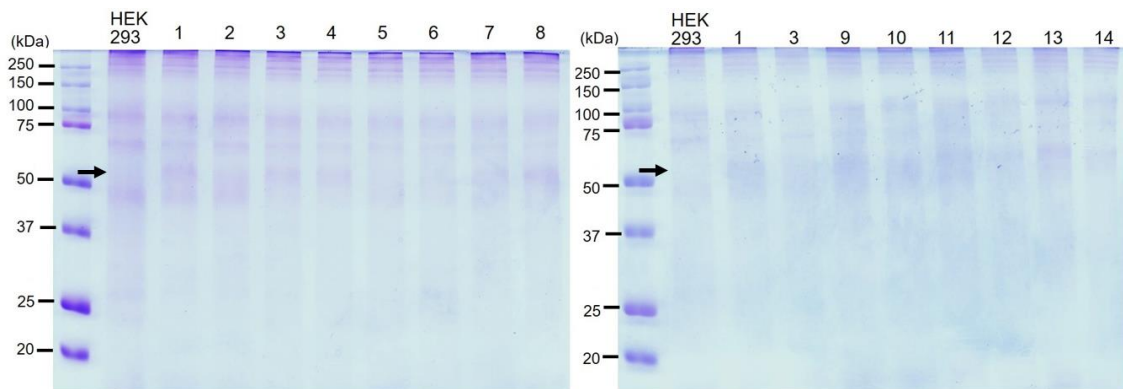


Figura 5.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) das proteínas no sobrenadante das populações celulares estáveis HEK.Fc1-8 (esquerda) e HEK.Fc1/3/9-14 (direita) do 7º dia de cultivo em batelada em tubos ventilados, em condições não-redutoras, com revelação por azul de Coomassie. Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, EUA) na primeira posição. Na segunda posição, como controle negativo, sobrenadante de HEK293-3F6 não transfectada, na qual a seta indica a falta da banda referente às proteínas Fc.

Portanto, pode-se concluir que a mutação contida nessas estruturas gênicas para promover a monomerização das proteínas Fc não foi bem-sucedida. Dados obtidos de forma paralela pelo *Immune Engineering Laboratory* da *University of Kansas* (Lawrence, Kansas, EUA) com proteínas Fc produzidas no LECC confirmam a formação de proteínas diméricas pelas populações celulares HEK.Fc5-8 (dados não mostrados). Assim, estas populações deixaram de ser prioritárias para a otimização de cultivo.

A produção de proteínas Fc monoméricas, compostas de apenas uma subunidade C_{H2} e uma subunidade C_{H3} , teria como principal vantagem a redução de seu tamanho molecular em relação aos anticorpos monoclonais completos e proteínas de fusão Fc, podendo ser utilizadas em proteínas de fusão para superar problemas como baixa penetração em tecidos e impedimento estérico na ligação a epítopos (WANG et al., 2017). O termo Fc monomérico não deve ser confundido com as chamadas proteínas de fusão Fc monoméricas, que se referem à proteína Fc dimérica ligada a uma única molécula efetora (YING et al., 2012).

Em outros experimentos realizados por membros do *Immune Engineering Laboratory* da *University of Kansas*, foi observado que o *linker 1* apresentou os melhores resultados relativos à ligação dos fragmentos Fc produzidos no LECC com outras moléculas de interesse. Além disso, em estudos de atividade biológica, os colegas da *University of Kansas* identificaram a mutação presente nas proteínas referentes às construções 1, 2, 5, 6, 9, 11 e 13 como mais promissora para utilização do que as

construções que continham a sequência nativa (Wt) da proteína IgG (dados não mostrados).

Assim, definiu-se como prioritário o desenvolvimento do processo de cultivo para as populações celulares referentes às construções plasmidiais que contêm as sequências para dimerização (Dim), mutação (Mut) e *linker* 1 (Link1), ou seja, as populações HEK.Fc1, HEK.Fc9, HEK.Fc11 e HEK.Fc13, que diferem entre si apenas pelas sequências dos peptídeos sinal, que são clivados na secreção proteica, resultando na expressão da mesma proteína. Por fim, a partir da análise dos resultados de cultivo e produção de proteínas Fc para essas quatro populações celulares (Tabela 5.2), as populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9 foram escolhidas para a continuação do estudo, com a realização do cultivo em modo pseudoperfusão em tubos ventilados, com o objetivo de simular o cultivo em perfusão. HEK.Fc1 foi escolhida pela maior expressão proteica e HEK.Fc9 pela maior concentração celular obtida e segunda maior expressão observada.

Tabela 5.2 – Resumo dos parâmetros de crescimento celular e expressão de proteínas Fc secretadas pelas populações celulares estáveis consideradas prioritárias, que contêm as sequências para dimerização, mutação e *linker* 1. Legenda: Concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$); taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}); tempo de duplicação na fase exponencial (t_{Dexp}); taxa específica de formação de produto na fase exponencial (q_{Pexp}); desvios referentes às duplicatas biológicas.

População celular estável	$X_{v_{max}}$ (10^6 cél/mL)	μ_{exp} (d^{-1})	t_{Dexp} (h)	Concentr. Fc máxima ($\mu g/mL$)	q_{Pexp} (pg/cél/d)
HEK.Fc1	13,2 $\pm 0,9$	0,551 $\pm 0,005$	30,2 $\pm 0,3$	2,12	0,057
HEK.Fc9	15,1 $\pm 0,1$	0,589 $\pm 0,005$	28,3 $\pm 0,2$	1,62	0,040
HEK.Fc11	14,4 $\pm 0,2$	0,580 $\pm 0,028$	28,7 $\pm 1,4$	0,28	0,002
HEK.Fc13	14,1 $\pm 0,4$	0,620 $\pm 0,016$	26,9 $\pm 0,7$	1,07	0,034

5.3 Cultivo das populações celulares mais promissoras em modo pseudoperfusão

Cultivos em modo pseudoperfusão foram realizados em tubos ventilados para caracterizar o comportamento das populações celulares prioritárias em altas viabilidades celulares, simulando em pequena escala um processo de perfusão intermitente, com o objetivo de escolher a melhor população para o cultivo em maior escala em biorreatores.

Os tubos com tampa ventilada agitados, ou apenas tubos ventilados, têm sido utilizados como modelo *scale-down* de cultivos, em geral até 20 mL de volume de trabalho (CARVALHO e CASTILHO, 2017; BIELSER et al., 2019). Vários trabalhos na literatura confirmam a similaridade entre o uso de pseudoperfusão em tubos ventilados com o cultivo em perfusão em biorreator (VILLIGER-OBERBEK et al., 2015; GOMES et al., 2017; BIELSER et al., 2018). Contudo, algumas diferenças podem ocorrer, como a diminuição de $X_{v_{max}}$ e da expressão de proteínas, por conta das diferenças no controle de pH, limitações de transferência de oxigênio e diferente estratégia de troca de meio (GOMES et al., 2017).

Por outro lado, tentativas de se obter modelos *scale-down* mais próximos de uma perfusão em pequena escala podem ser feitas com minibiorreatores instrumentados com o objetivo de superar as limitações da pseudoperfusão, por meio do controle de pH e melhoria da agitação e aeração. Por exemplo, biorreatores com volume de trabalho de até 250 mL (DASbox, Eppendorf, EUA) equipados com sistema ATF de retenção celular foram utilizados para o cultivo de células HEK293 produtoras de eritropoetina recombinante, alcançando $X_{v_{max}}$ de 80 milhões cél/mL (SCHWARZ et al., 2019). Gagliardi e colaboradores (2019) adaptaram um sistema de minibiorreatores de 15 mL de volume de trabalho em série (ambr®15, Sartorius, Alemanha) para operar em modo semicontínuo com alimentação intercalada com trocas completas de meio de cultivo para atingir um estado estacionário de substrato similar ao da perfusão, obtendo $X_{v_{max}}$ entre 80 e 95·10⁶ cél/mL e viabilidades celulares acima de 90% em células CHO. Apesar desses trabalhos, perfusão em biorreatores instrumentados de pequena escala ainda não é comumente realizada e não existem opções de sistemas de baixo custo disponíveis no mercado. Assim, a pseudoperfusão em tubos ventilados se mostra uma opção economicamente viável, de fácil operação e compatível com os equipamentos disponíveis na maioria dos laboratórios (CARVALHO e CASTILHO, 2017).

Os resultados de crescimento celular em pseudoperfusão para as populações celulares definidas como prioritárias (item 5.2) HEK.Fc1 e HEK.Fc9, além da linhagem hospedeira, estão mostrados na Figura 5.8, em comparação com os respectivos resultados do cultivo em batelada mostrados anteriormente.

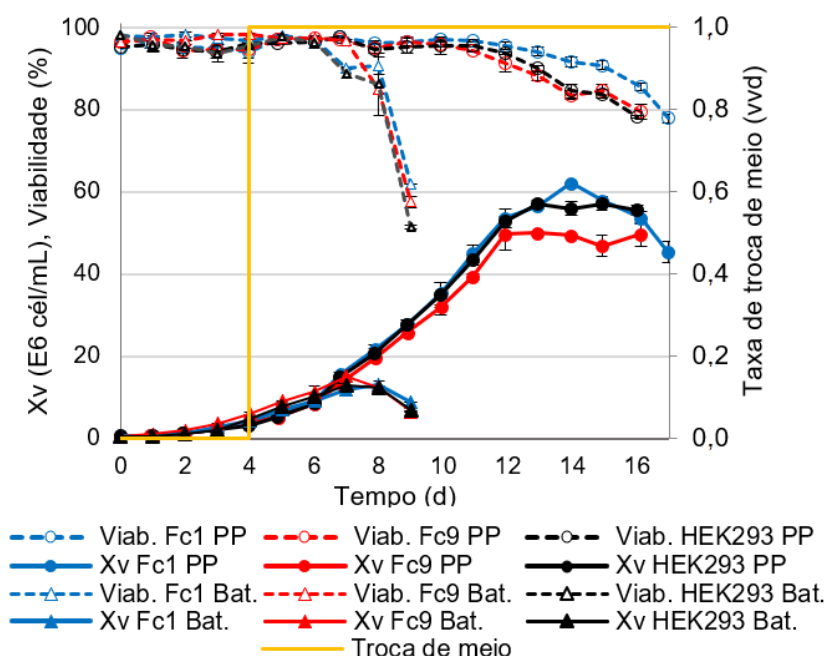


Figura 5.8 – Perfis de concentração de células viáveis (Xv) e viabilidade das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e da linhagem hospedeira HEK293 em batelada (Bat.) e pseudoperfusão (PP), além da taxa de troca de meio, expresso em volume de meio trocado pelo volume total de líquido por dia. Legenda: Xv (linha contínua com marcador preenchido); viabilidade (linha tracejada com marcador não preenchido); batelada (linha fina com triângulos); pseudoperfusão (linha grossa com círculos); barras de erro referentes às triplicatas biológicas.

Em todos os experimentos, foram observadas fases exponenciais de crescimento celular entre os dias 2 e 8, diferentemente do observado em cultivo em batelada, em que a fase exponencial durava no máximo até o 5º dia. Isto já era esperado devido à reposição do meio de cultivo e, portanto, disponibilidade de nutrientes por mais tempo, bem como à remoção de subprodutos tóxicos (CHOTTEAU, 2015).

As taxas específicas de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}) das populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9 foram, respectivamente, $0,464 \pm 0,007 \text{ d}^{-1}$ e $0,459 \pm 0,009 \text{ d}^{-1}$ e os respectivos tempo de duplicação foram $35,9 \pm 0,6 \text{ h}$ e $36,3 \pm 0,7 \text{ h}$. Esses valores foram muito próximos dos observados para o cultivo em pseudoperfusão das células hospedeiras HEK293, com μ_{exp} de $0,471 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$ e t_{Dexp} de $35,3 \pm 0,6 \text{ h}$.

A população celular HEK.Fc1 foi a que apresentou o melhor comportamento de crescimento celular em pseudoperfusão, atingindo a $X_{v_{max}}$ de $62,12 \pm 0,08$ milhões cél/mL e mantendo viabilidade superior a 90% até o 15º dia. Em comparação, HEK.Fc9 apresentou $X_{v_{max}}$ de $50,07 \pm 0,07$ milhões cél/mL e viabilidade inferior a 90% no 13º dia.

Definindo-se o fim do cultivo para quando as viabilidades atingissem o valor de 80%, os cultivos em pseudoperfusão de HEK293 e HEK.Fc9 duraram 16 dias, enquanto HEK.Fc1 foi cultivada até o 17º dia até atingir a viabilidade limite. Assim, o modo de pseudoperfusão permitiu prolongar o tempo de cultivo por cerca de 7-8 dias a mais do que em batelada, atingindo concentrações celulares até quatro vezes mais altas.

Os trabalhos descritos na literatura utilizam pseudoperfusão em pequena escala para estudar duas estratégias: operação em concentração constante de células, realizando a eliminação controlada de células, ou operação do cultivo em concentrações celulares cada vez mais altas, até atingir-se limitação em termos de O_2 dissolvido. A operação em concentração constante, simulando um estado estacionário em pequena escala permite estudar comparativamente cultivos conduzidos sob diversas condições e de forma simultânea (ZHANG et al., 2020) e seu uso já foi descrito para modelagem metabólica do cultivo (HAGROT et al., 2017) e análise de glicosilação de mAbs (ZHANG et al., 2020). Wolf e colaboradores (2018), mantiveram células CHO em concentração menor, de aproximadamente $20 \cdot 10^6$ cél/mL por 10 dias, para comparação com cultivo em biorreator na mesma concentração.

O uso de pseudoperfusão para mimetizar o cultivo em perfusão a concentrações muito altas é mais comum. Villiger-Oberbek e colaboradores (2015) observaram concentrações máximas de $50 \cdot 10^6$ cél/mL no cultivo de células CHO para produção de uma enzima recombinante. Gomez e colaboradores (2017) alcançaram concentrações entre 20 e 50 milhões cél/mL para o cultivo de 13 linhagens de células CHO para a produção de mAbs e fragmentos de anticorpo. Bielser e colaboradores (2018) obtiveram as maiores concentrações máximas de células viáveis encontradas na literatura para cultivos de células CHO em pseudoperfusão, atingindo até $65 \cdot 10^6$ cél/mL em tubos ventilados com troca de meio de 1 vvd. Bettinardi e colaboradoras (2017) cultivaram células CHO entre 40 e 50 milhões cél/mL por mais de 20 dias, para obtenção de um anticorpo monoclonal. Utilizando células HEK293 para a produção de partículas pseudovirais de Zika, Alvim e colaboradores (2019a) mantiveram um estado pseudoestacionário numa concentração entre 30 e 40 milhões cél/mL.

Os resultados da literatura estão, portanto, de acordo com o observado neste estudo, com $X_{v_{max}}$ entre 50 e 65 milhões cél/mL. Assim, verificou-se que a oxigenação de cultivos em tubos ventilados agitados poderia estar sendo limitante em concentrações celulares acima de $50 \cdot 10^6$ cél/mL, o que pode variar conforme a taxa específica de consumo celular de oxigênio de cada linhagem celular (VILLIGER-OBERBEK et al., 2015; GOMEZ et al., 2017).

Foram encontrados poucos artigos na literatura sobre o cultivo de células HEK293 em pseudoperfusão, todos com valores de $X_{v_{max}}$ inferiores aos obtidos nesse trabalho. Como já mencionado, Alvim e colaboradores (2019a) atingiram concentrações altas e poderiam ter conseguido valores superiores de $X_{v_{max}}$ se não houvesse eliminação controlada de células para mimetizar o estado estacionário. De acordo com a revisão bibliográfica realizada, somente há dois trabalhos que utilizam células HEK293 para produção de anticorpos monoclonais ou seus derivados em pseudoperfusão em tubos ventilados. Beckmann e colaboradores (2015) cultivaram células HEK293 para transfecção e produção de anticorpos monoclonais, mas sem citar dados das concentrações máximas obtidas. Püngel e colaboradores (2015) atingiram concentrações celulares de até 40 milhões cél/mL para transfecção transiente em alta concentração celular.

A Figura 5.9 mostra os perfis de concentração de glicose e lactato nos cultivos em pseudoperfusão, comparados com os cultivos em batelada para as populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9, além da linhagem hospedeira não transfectada. As figuras foram separadas para facilitar a visualização. As linhas verticais indicam a troca total diária do meio de cultivo, realizada a partir do dia 4, resultando em aumento de glicose e diminuição de lactato após a troca. O progressivo aumento do volume do *pellet* celular após a centrifugação ao longo dos dias de cultivo dificultou a troca completa do meio para concentrações de células mais elevadas e é a razão das menores concentrações de glicose e maiores concentrações de lactato observadas após as trocas nos últimos dias do cultivo.

Em comparação com o cultivo em batelada, os perfis permitem avaliar os efeitos da disponibilidade prolongada de nutrientes no meio de cultivo em pseudoperfusão, graças às trocas diárias de meio. Isso propicia um ambiente favorável para o crescimento e manutenção celular por mais tempo, evidenciado pelo aumento da fase exponencial de crescimento celular de 5 para 8 dias e o cultivo com altas viabilidades celulares até os dias 16-17.

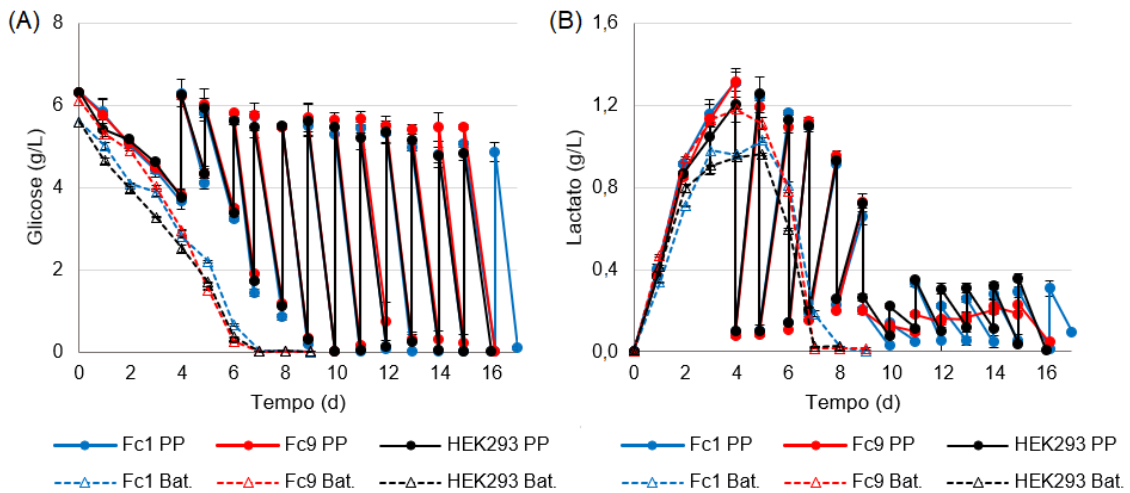


Figura 5.9 – Perfis de concentração de glicose (A) e lactato (B) das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e da linhagem hospedeira HEK293 em batelada (Bat.) e pseudoperfusão (PP). As linhas verticais no cultivo em pseudoperfusão indicam a troca total diária do meio de cultivo, representando o aumento de glicose e diminuição de lactato após a troca. Legenda: Pseudoperfusão (linha contínua com círculo preenchido); batelada (linha tracejada com triângulo não preenchido); barras de erro referentes às triplicatas biológicas.

A estratégia de uma troca diária de meio de 1 vvd com início durante a fase exponencial foi bem-sucedida até o 10^o dia de cultivo em pseudoperfusão, quando houve a depleção de glicose antes da troca de meio. Assim, após esse dia, sabe-se que as células passavam um período sem presença de glicose no meio de cultivo, o que impacta negativamente no crescimento celular e expressão de proteínas. Idealmente, deseja-se a manutenção de ao menos 1 g/L de glicose disponíveis para as células (PÖRTNER, 2009). Para isso, seria, portanto, necessária a realização de mais de uma troca de meio de cultivo por dia a partir do dia 8.

O perfil de lactato na pseudoperfusão é diretamente relacionado com a disponibilidade de glicose no meio. Em altas concentrações de glicose, o lactato foi produzido e se acumulou, mas, conforme os níveis de glicose no meio de cultivo diminuíram, o metabolismo celular mudou para consumir lactato como fonte de carbono e energia, chegando próximo à sua depleção nos últimos dias de cultivo.

Na Figura 5.10b, os valores de concentração de proteína Fc do início até o 4^o dia de cultivo se referem ao cultivo sem troca de meio, assim, relativos ao acúmulo de Fc do início do cultivo até o momento da amostragem. A partir do dia 5, com o início das trocas de meio, os valores da concentração de Fc representam as proteínas produzidas nas cerca de 24h decorridas desde a última troca de meio até a amostragem. As taxas específicas de formação de proteínas Fc, expressas em picograma de proteína Fc por

célula por dia, mostradas são referentes às proteínas produzidas no período de 24 h prévio a cada amostragem.

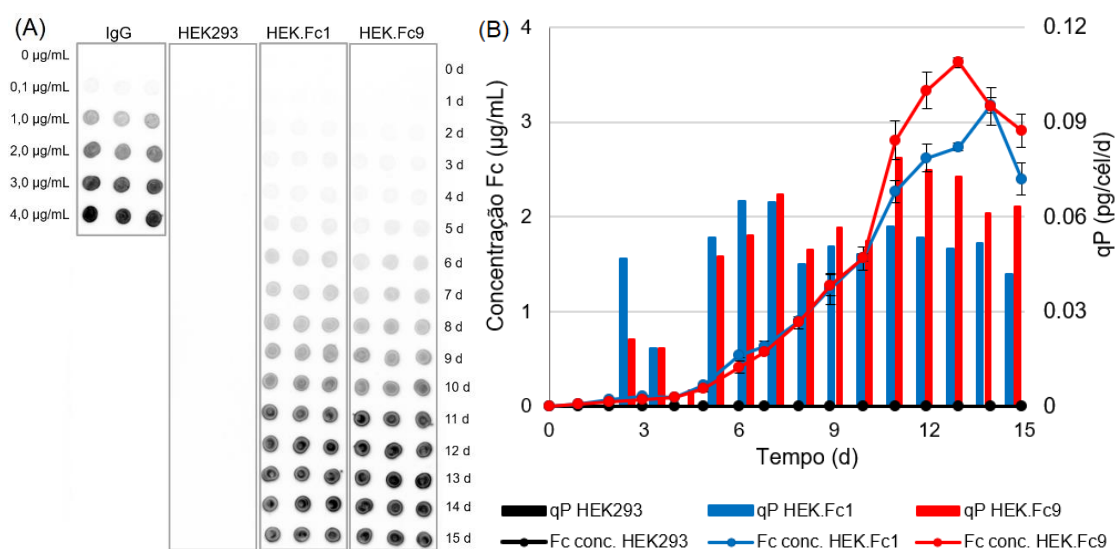


Figura 5.10 – Quantificação da produção de proteínas Fc pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 e pela linhagem hospedeira HEK293 no modo pseudoperfusão em tubos ventilados, com início da troca diária de meio a partir do dia 4. Os resultados são referentes às triplicatas biológicas. (A) Imagem de revelação de *spot blot*. Diferentes concentrações de IgG de soro humano foram utilizadas como padrão para quantificação realizada; (B) Perfil de produção de proteínas Fc (linhas com círculos) e taxa específica de produção de proteínas Fc (q_P , barras).

As taxas específicas de formação de proteínas na fase exponencial ($q_{P_{exp}}$) das populações celulares HEK.Fc1 e HEK.Fc9 foram $0,050 \pm 0,004$ pg/cél/d e $0,046 \pm 0,005$ pg/cél/d, respectivamente. Esses valores foram maiores do que os obtidos no cultivo em batelada, o que pode ser decorrente da troca de meio diária com fornecimento de nutrientes e remoção de metabólitos inibitórios, como lactato, que reduz o pH do meio e pode afetar a expressão (HENRY et al., 2008; LI et al., 2012).

Os experimentos em pseudoperfusão alcançaram produtividades gerais de $11,50 \pm 0,46$ e $13,03 \pm 0,20$ µg de proteína Fc por dia ao longo do cultivo de 16 dias para as populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9, respectivamente, o que representa respectivos aumentos de 3,2 e 4,8 vezes em relação às produtividades gerais obtidas em batelada. Considerando o gasto maior de meio de cultivo em pseudoperfusão, a população HEK.Fc9 também obteve melhores resultados, com produtividade volumétrica específica de $100,3 \pm 1,6$ µg/L/d, em relação a HEK.Fc1, que apresentou Pve de $88,5 \pm 3,6$ µg/L/d. Em comparação com o cultivo em batelada, a produtividade volumétrica específica dos experimentos de pseudoperfusão de HEK.Fc1 foram semelhantes e

houve aumento de 29% para HEK.Fc9. As baixas diferenças nos valores de produtividade geral e volumétrica específica encontradas se devem à estratégia de troca de meio utilizada, de 1 vvd, no início da fase exponencial, resultando na retirada desnecessária de nutrientes não consumidos do meio. Para uma maior produtividade volumétrica específica geral, idealmente, deve-se aumentar a proporção de meio trocado conforme a necessidade (HENRY et al., 2008; BETTINARDI, 2016). Considerando somente o período dos dias 8 a 16, em que as concentrações de células viáveis eram superiores a $20 \cdot 10^6$ cél/mL, as produtividades volumétricas específicas obtidas foram de $234,96 \pm 9,18$ µg/L/d e $272,0 \pm 4,45$ µg/L/d para as populações HEK.Fc1 e HEK.Fc9, respectivamente. Na revisão bibliográfica feita, não foram encontrados trabalhos de produção de anticorpos ou derivados por linhagens ou populações estáveis em células HEK293 em modo de pseudoperfusão.

Como ambas populações celulares HEK.Fc1 e HEK.Fc9 apresentaram resultados promissores em modo pseudoperfusão, prosseguiu-se o trabalho com ambas.

5.4 Cultivo em biorreator de tanque agitado em modo batelada

O cultivo das populações estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em biorreator com volume de trabalho de 1,5 L (Figura 5.11) representa o estudo do comportamento dessas populações em escala cem vezes maior do que os experimentos em tubos agitados. As corridas em batelada com HEK.Fc1 e HEK.Fc9 foram conduzidas sob condições idênticas, com exceção do controle de pH por meio de injeção de base, que foi menos restritivo no cultivo de HEK.Fc9, com maior injeção do que em HEK.Fc1. Além disso, o cultivo de HEK.Fc9 teve de ser interrompido no 8º dia por conta de um problema do compressor de ar, enquanto HEK.Fc1 foi cultivada até o 9º dia, assim como nos cultivos em tubos ventilados (item 5.2). Em experimentos anteriores em biorreatores, o uso de antiespumante prejudicou a transferência de oxigênio, fazendo com que a flutuação de oxigênio dissolvido não permitisse a manutenção de um cultivo estável em relação à aeração e o crescimento celular (dados não mostrados). Assim, optou-se por não utilizar antiespumante nos presentes cultivos.

Os perfis de crescimento celular, glicose, lactato e proteínas Fc nos cultivos em biorreator agitado e tubos ventilados agitados em batelada (Figura 5.12) foram semelhantes, com algumas diferenças em relação à concentração máxima de células.



Figura 5.11 – Imagens do cultivo em biorreator de tanque agitado em batelada utilizando o biorreator Applikon ez-Control (esquerda). À direita, a foto mostra em maior detalhe a suspensão de células no interior do vaso do biorreator.

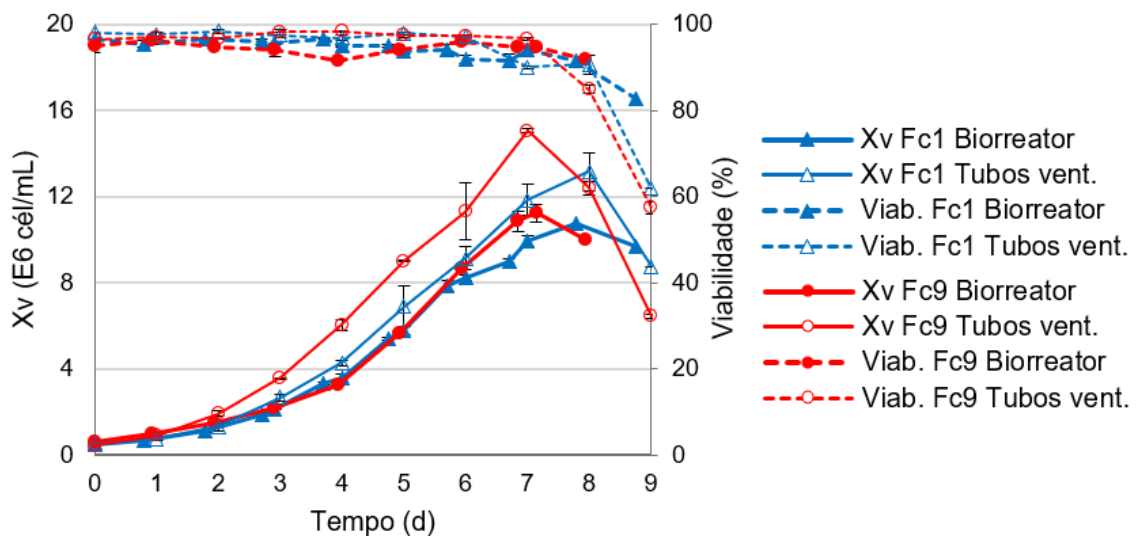


Figura 5.12 – Perfis de concentração de células viáveis (X_v) e viabilidade das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em batelada em biorreator de tanque agitado e em tubos ventilados. Legenda: X_v (linha contínua); viabilidade (linha tracejada); biorreator (linha grossa e triângulo preenchido); tubos ventilados (linha fina e círculo não preenchido); barras de erro referentes às triplicatas analíticas.

As viabilidades celulares de todas as condições se mantiveram altas, acima de 90%, até os dias 7-8 de cultivo. Os cultivos de HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em biorreator agitado alcançaram concentrações celulares máximas inferiores em 18,2% e 25,8% ao

observado em tubos agitados, respectivamente (Tabela 5.3). Diferenças no comportamento em cultivo escalonado podem ser observadas pela mudança dos parâmetros de agitação, aeração, manutenção de pH e oxigênio dissolvido, sendo mais perceptíveis quanto maior a diferença de escala (XING et al., 2009). Liste-Calleja e colaboradores (2015) obtiveram concentrações celulares máximas similares às obtidas no presente trabalho, entre 11,1 e 14,0 milhões cél/mL, no cultivo em batelada de células HEK293-3F6 em biorreator de tanque agitado de 2 L.

As fases exponenciais de crescimento celular em biorreator agitado foram observadas entre os dias 2-5 para HEK.Fc1 e dias 1-5 para HEK.Fc9, semelhantes às observadas no cultivo em tubos agitados. Na fase exponencial, as taxas específicas de crescimento celular dos cultivos em biorreator foram inferiores às obtidas no cultivo em tubos ventilados e os tempos de duplicação de ambas populações foram maiores em biorreatores (Tabela 5.3).

O perfil de crescimento celular inferior ao observado em tubos ventilados pode estar relacionado com a mudança do ambiente de cultivo celular, uma vez que os inóculos dos experimentos em tubos ventilados eram cultivados sob a mesma geometria, enquanto os inóculos dos experimentos em biorreator de tanque agitado eram cultivados em frascos erlenmeyer agitados orbitalmente, requerendo uma adaptação das células às novas condições de cultivo após a inoculação em biorreator. A mudança de geometria do sistema de cultivo, de condições de agitação e do controle de pH podem resultar em alteração dos resultados de crescimento celular, conforme descrito na literatura (EIBL et al., 2014; VILLIGER-OBEBEK et al., 2015; GOMEZ et al., 2017).

De forma proporcional ao crescimento celular mais lento observado nos cultivos em biorreator, o comportamento de consumo de glicose (Figura 5.13a) das populações em biorreator foi mais prolongado do que em tubos ventilados, sobretudo no cultivo de HEK.Fc9, que apresentou o menor valor de μ_{exp} (Tabela 5.3). No mais, os perfis foram semelhantes, com completa depleção de glicose entre os dias 7-8 de cultivo.

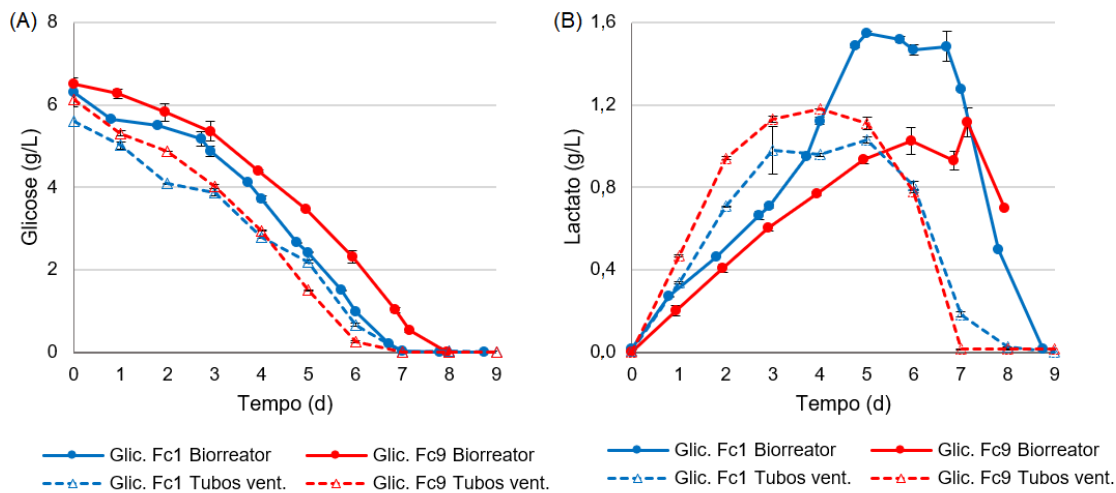


Figura 5.13 – Perfis de concentração de concentração de glicose (A) e lactato (B) das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 no cultivo em batelada em biorreator de tanque agitado e em tubos ventilados. Legenda: biorreator de tanque agitado (linha contínua com círculo preenchido); tubos ventilados (linha tracejada com triângulo não preenchido); barras de erro dos resultados em tubos ventilados referentes às duplicatas biológicas; barras de erro dos resultados em biorreator referentes às triplicatas analíticas.

Os perfis de concentração de lactato (Figura 5.13b) foram mais distintos entre os cultivos nas duas escalas. De forma geral, o cultivo de ambas populações em biorreator apresentaram formação de lactato por um período mais longo, com mudança tardia para o seu consumo, o que ocorreu conforme a depleção mais tardia de glicose. Contudo, foi observada maior produção de lactato no cultivo da população HEK.Fc1, atingindo 1,55 g/L, ou 17,2 mmol/L, de lactato. Na literatura, estão descritos valores inibitórios de 12-20 mmol/L de lactato para células animais (HASSELL et al., 1990; CRUZ et al., 2000; PATEL et al., 2000), sobretudo por acarretarem alterações no pH e na osmolalidade do meio (CRUZ et al., 2000). Não foram encontradas razões para o expressivo aumento de produção de lactato, mas sabe-se que isso pode ter impactado na limitação do crescimento celular observada. Não foi possível observar o consumo total de lactato no cultivo da população HEK.Fc9 devido à tardia mudança de metabolismo para o seu consumo e à interrupção do cultivo antes do previsto, por falha no sistema de fornecimento de ar do laboratório.

A quantificação da produção de proteínas Fc nos cultivos em biorreator de tanque agitado está mostrada na Figura 5.14. Assim como no cultivo em tubos ventilados em batelada, a população celular HEK.Fc1 apresentou maior expressão de proteínas Fc no cultivo em biorreator agitado do que a população HEK.Fc9. Já em comparação com o cultivo em tubos ventilados agitados, o cultivo em biorreator agitado resultou em menor produção de fragmentos Fc para ambas populações celulares, com redução de 28,3%

da concentração máxima produzida para HEK.Fc1 e de 60% para HEK.Fc9. O decréscimo na produção é, em parte, resultado do menor crescimento celular observado em biorreator. Os dados de produtividade específica na fase exponencial (q_{Pexp} , Tabela 5.3) também mostram um desempenho inferior dos cultivos em biorreator agitado para ambas populações celulares, indicando a necessidade de otimização das condições de cultivo em biorreator para aumento da produtividade específica.

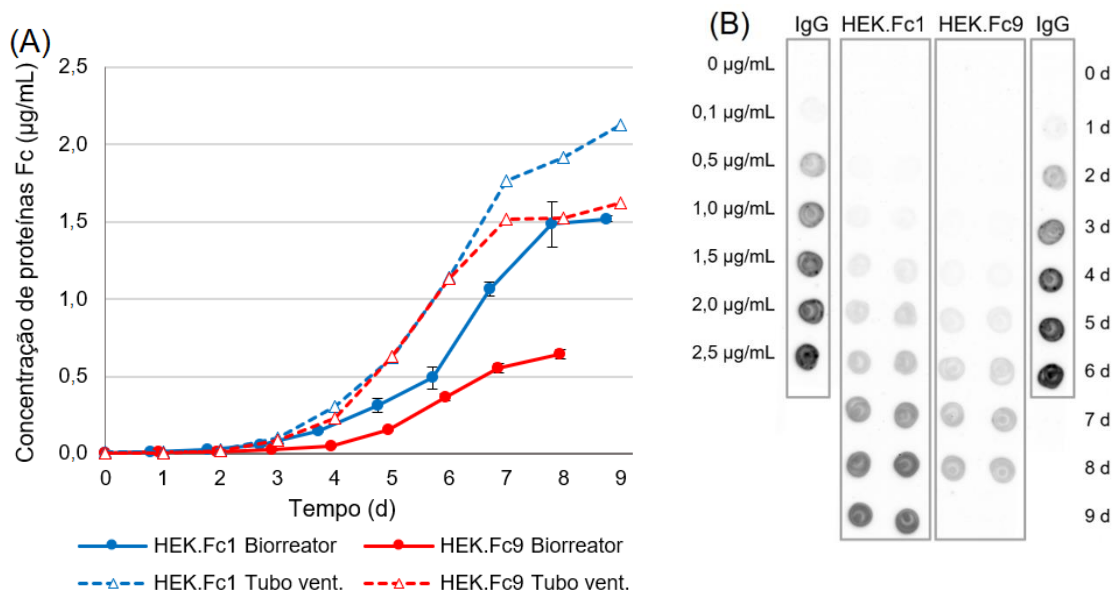


Figura 5.14 – Quantificação da produção de proteínas Fc pelas populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 em cultivo em batelada em biorreator de tanque agitado. Resultados referentes às duplicatas analíticas. (A) Comparação entre os perfis de produção em biorreator (linha contínua e marcador preenchido) e em tubos ventilados (linha tracejada e marcador não preenchido); (B) Imagem de revelação de *spot blot*. Diferentes concentrações de IgG de soro humano foram utilizadas como padrão.

A comparação dos dados de cultivo de células e produção (Tabela 5.3) permite a visualização dos principais fatores que levaram à escolha da população celular HEK.Fc1 como a mais indicada para o cultivo e produção de fragmentos Fc em escala de bancada em biorreatores de tanque agitado. O menor tempo de duplicação na fase exponencial e a maior taxa específica de produção de HEK.Fc1 foram os principais parâmetros que justificam esta escolha, por indicarem o rápido crescimento celular e, principalmente, a maior expressão proteica dessa população.

Tabela 5.3 – Resumo dos parâmetros de crescimento celular e expressão de proteínas Fc das populações celulares estáveis HEK.Fc1 e HEK.Fc9 no cultivo em batelada em tubo ventilado e em biorreator de tanque agitado. Legenda: concentração máxima de células viáveis ($X_{v_{max}}$); taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ_{exp}); tempo de duplicação na fase exponencial (t_{Dexp}); taxa específica de formação de produto na fase exponencial (q_{Pexp}); desvios dos resultados em tubos ventilados referentes às duplicatas biológicas; desvios dos resultados em biorreator referentes às triplicatas analíticas.

População celular estável	Escala	$X_{v_{max}}$ (10^6 cél/mL)	μ_{exp} (d^{-1})	t_{Dexp} (h)	Concentr. Fc máxima ($\mu g/mL$)	q_{Pexp} (pg/cél/d)
HEK.Fc1	Tubo ventilado	13,2 $\pm 0,9$	0,551 $\pm 0,005$	30,2 $\pm 0,3$	2,12	0,057
HEK.Fc1	Biorreator	10,8 $\pm 0,3$	0,504	33,0	1,52 $\pm 0,02$	0,033
HEK.Fc9	Tubo ventilado	15,1 $\pm 0,1$	0,589 $\pm 0,005$	28,3 $\pm 0,2$	1,62	0,040
HEK.Fc9	Biorreator	11,2 $\pm 0,4$	0,435	38,3	0,64 $\pm 0,03$	0,020

Conclui-se, também, que o peptídeo sinal PS1 é o mais eficaz para a expressão de proteínas Fc em células HEK293. Este peptídeo sinal foi selecionado na literatura para a expressão de anticorpos monoclonais secretados, em células CHO (HARYADI et al., 2015), e, neste trabalho, confirmou-se a sua adequação também para a produção dos fragmentos Fc de anticorpos em células HEK293-3F6.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

Este trabalho avaliou a influência de alterações na sequência gênica fragmentos Fc de anticorpos na geração de células HEK293 recombinantes e na expressão dessa proteína, bem com a escolha da melhor dentre 14 populações celulares recombinantes estáveis.

Foi observado que o reagente de transfecção Lipofectamine 3000 foi o mais eficiente na geração estável de populações de HEK293 produtoras de Fc, resultando em recuperação do crescimento celular mais rápido do que o reagente Mirus TransIT-2020. O cultivo das populações recombinantes geradas em batelada em pequena escala permitiu a identificação dos melhores peptídeos sinal para a expressão de fragmentos Fc em células HEK293, os peptídeos sinal PS1 e PS2.

Verificou-se que a mutação para impedir a dimerização da proteína Fc, uma das alterações gênicas analisadas, não resultou na produção de proteínas monoméricas, como desejado. Análises realizadas no *Immune Engineering Laboratory (University of Kansas, EUA)* com as proteínas produzidas neste estudo permitiram a identificação do *linker 1* como o ideal para a ligação da proteína Fc com outras moléculas e da adição da mutação como a melhor para atividade biológica do fragmento Fc. Assim, aprofundou-se o presente estudo para as construções gênicas Fc1 e Fc9, como as mais promissoras para o uso intencionado.

No cultivo em pseudoperfusão em pequena escala, foram alcançadas as maiores concentrações de células HEK293 encontradas na literatura para o cultivo em pseudoperfusão em tubos ventilados, com $62,2 \cdot 10^6$ cél/mL para HEK.Fc1. Por outro lado, a população HEK.Fc9 apresentou as melhores expressões de proteínas em altas concentrações celulares.

Por fim, a população HEK.Fc1 foi verificada como a melhor em relação ao crescimento celular e à expressão de proteínas Fc no cultivo em biorreator de tanque agitado no modo batelada.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, sugerem-se os seguintes pontos para o aperfeiçoamento e continuação dessa linha de pesquisa:

1. Cultivar a população celular HEK.Fc1 em perfusão em biorreator de tanque agitado para verificar a expressão do fragmento Fc sob altas concentrações celulares;
2. Investigar novas mutações para produção de proteína Fc monomérica, sobretudo por existirem poucos trabalhos na literatura sobre o tema;
3. Realizar a seleção de subpopulações ou de clones mais produtores da população HEK.Fc1 por citometria de fluxo acoplada a sorter (FACS).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ABSI, S.; XU, S.; GRAHAM, H.; DALAL, N.; BOYER, M.; DAVE, K. Cell culture process operations for recombinant protein production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 139, p. 35-68, 2014.

ALVIM, R. G. F. Produção de partículas pseudovirais de Zika em biorreatores de tanque agitado. Dissertação de M.Sc., EQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 112p, 2019.

ALVIM, R. G. F.; ITABAIANA JR, I.; CASTILHO, L. R. Zika virus-like particles (VLPs): Stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform. *Vaccine*, v. 37, p. 6970-6977, 2019a.

ALVIM, R. G. F.; LIMA, T. M.; CASTILHO, L. R. Perfusion process for the production of a new, VLP-based yellow fever vaccine candidate. Trabalho apresentado no congresso Integrated Continuous Biomanufacturing IV, Brewster, EUA, 2019b. Disponível em: <https://dc.engconfintl.org/biomanufact_iv/35/>. Acesso em: 05 janeiro de 2020.

AMABLE, P.; BUTLER, M. "Cell metabolism and its control in culture". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 4, p. 75-110.

ATTALLAH, C.; ETCHEVERRIGARAY, M.; KRATJE, R.; OGGERO, M. A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein Expression and Purification*, v. 132, p. 27-33, 2017.

BECKMANN, T. F.; KLAUSING, S.; PÜNGEL, S.; CORONEL, J.; WELSINK, T.; HEINRICH, C. Medium development beyond production media: chemically defined media for transfection and single cell cultivation. *BMC Proceedings*, v. 9 (Supl. 9), n. P27, p. 1-2, 2015.

BERNTZEN, G.; LUNDE, E.; FLOBAKK, M.; ANDERSEN, J. T.; LAUVRAK, V.; SANDLIE, I. Prolonged and increased expression of soluble Fc receptors, IgG and a TCR-Ig fusion protein by transiently transfected adherent 293E cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 298, p. 93-104, 2005.

BETTINARDI, I. W. Desenvolvimento de estratégias de alimentação com meios concentrados para cultivo de células animais em perfusão. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 115p, 2016.

BETTINARDI, I. W.; SÃO-JOSÉ, V.; CASTILHO, L. R. Evaluation of pseudo-perfusion feeding strategies for mAb production using a CHO cell line adapted to concentrated feed media. Trabalho apresentado no congresso Integrated Continuous Biomanufacturing III, Caiscais, Portugal, 2017. Disponível em: < https://dc.engconfintl.org/biomanufact_iii/85/>. Acesso em: 20 dezembro de 2019.

BIELSER, J. M.; WOLF, M.; SOUQUET, J.; BROLY, H.; MORBIDELLI, M. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - a critical review. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 4, p. 1328-1340, 2018.

BOLLATI-FOGOLIN, M.; COMINI, M. A. "Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 3, p. 39-73.

CARTER, M.; SHIEH, J. "Gene delivery strategies" In: CARTER, M.; SHIEH, J. *A guide to research techniques in neuroscience*. 2. ed. New York: Elsevier, 2015. cap. 11, p. 239-252.

CARVALHO, R. J.; CASTILHO, L. R. "Tools enabling continuous and integrated upstream and downstream processes in the manufacturing of biologicals". In: SUBRAMANIAN, G. *Continuous biomanufacturing: innovative technologies and methods*. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. cap. 2, p. 31-68.

CASTAN, C.; SCHULZ, P.; WENGER, T.; FISCHER, S. "Cell line development". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. cap. 7, p. 131-147.

CHEN, X.; ZARO, J.; SHEN, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 10, p. 1357-1369, 2013.

CHEUNG, W. Y.; HOVEY, O.; GOBIN, J. M.; MURADIA, G.; MEHIC, J.; WESTWOOD, C.; LAVOIE, J. R. Efficient nonviral transfection of human bone marrow mesenchymal

stromal cells shown using placental growth factor overexpression. *Stem Cells International*, v. 2018, n. 1310904, p. 1-10, 2018.

CHAMOW, S. M.; RYLL, T.; LOWMAN, H. B.; FARSON, D. *Therapeutic Fc-fusion proteins*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2014. 390 p.

CHOTTEAU, V. "Perfusion processes". In: AL-RUBEAI, M. *Animal cell culture*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. cap. 15, p. 407-444.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO-CARDERO, A. "Bioreactors for animal cells". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 9, p. 221-258.

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

CZAJKOWSKY, D. M.; HU, J.; SHAO, Z.; PLEASS, R. J. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Molecular Medicine*, v. 4, p. 1015-1028, 2012.

DALTON, C. A.; BARTON, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, v. 23, p. 517-525, 2014.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 6, p. 1110-1122, 2016.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, v. 7, n. 1, p. 9-14, 2015.

EIBL, D.; EIBL, R. "Bioreactors for mammalian cells: general overview". In: EIBL, R.; EIBL, D.; PÖRTNER, R.; CATAPANO, G.; CZERMAK, P. *Cell and tissue reaction engineering*. 1. ed. Berlin: Springer, 2009. cap. 3, p. 56-82.

EIBL, R.; LÖFFELHOLZ, C.; EIBL, D. "Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression". In: PÖRTNER, R. *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. 3. ed. Berlin: Springer, 2014. cap 18, p. 265-284.

GAGLIARDI, T. M.; CHELIKANI, R.; YANG, Y.; TUOZZOLO, G.; YUAN, H. Development of a novel, high-throughput screening tool for efficient perfusion-based cell culture process development. *Biotechnology Progress*, v. 35, n. 4, e2811, p. 1-12, 2019.

GOMEZ, N.; AMBHAIKAR, M.; ZHANG, L.; HUANG, C. J.; BARKHORDARIAN, H.; LULL, J.; GUTIERREZ, C. Analysis of Tubespins as a suitable scale-down model of bioreactors for high cell density CHO cell culture. *Biotechnology Progress*, v. 33, p. 490-499, 2017.

GRAF, L. Extended half-life Factor VIII and Factor IX preparations. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 45, p. 86-91, 2018.

GRILO, A.; MANTALARIS, A. The Increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends in Biotechnology*, v. 37, n. 1, p. 9-16, 2018.

GÜLER-GANE, G.; KIDD, S.; SRIDHARAN, S.; VAUGHAN, T. J.; WILKINSON, T. C. I.; TIGUE, N. J. Overcoming the refractory expression of secreted recombinant proteins in mammalian cells through modification of the signal peptide and adjacent amino acids. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, e0155340, p. 1-15, 2016.

HA, T. K.; LEE, J. S.; LEE, G. M. "Platform technology for therapeutic protein production". In: LEE, G. M.; KILDEGAARD, H. F. *Cell culture engineering recombinant protein production*. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2019. cap. 1, p. 1-22.

HAFEEZ, U.; GAN, H. K.; SCOTT, A. M. Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 41, p. 114-121, 2018.

HARYADI, R.; HO, S.; KOK, Y. J.; PU, H. X.; ZHENG, L.; PEREIRA, N. A.; LI, B.; BI, X.; GOH, L. T.; YANG, Y.; SONG, Z. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, e0116878, p. 1-16, 2015.

HASSEL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture - the effect of lactate and ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 30, p. 29-41, 1990.

HAUSER, H. "Cell line development". In: AL-RUBEAI, M. *Animal cell culture*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. cap. 1, p. 1-25.

HENRY, O.; KWOK, E.; PIRET, J. M. Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnology Progress*, v. 24, n. 4, p. 921-931, 2008.

HSU, C. Y. M.; WALSH, T.; BORYS, B. S.; KALLOS, M. S.; RANCOURT, D. E. An integrated approach toward the biomanufacturing of engineered cell therapy products in a stirred-suspension bioreactor. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, v. 9, p. 376-389, 2018.

JAFARI, R.; ZOLBANIN, N. M.; RAFATPANAHI, H.; MAJIDI, J.; KAZEMI, T. Fc-fusion proteins in therapy: an updated view. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 12, p. 1228-1237, 2017.

JÄGER, V.; BÜSSOW, K.; WAGNER, A.; WEBER, S.; HUST, M.; FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, v. 13, n. 52, p. 1-20, 2013.

JÄGER, V.; BÜSSOW, K.; SCHIRRMANN, T. "Transient recombinant protein expression in mammalian cells". In: AL-RUBEAI, M. *Animal cell culture*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. cap. 2, p. 27-64.

JAGSCHIES, G. "Brief review of the biopharmaceutical and vaccine industry". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; LACKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. cap. 2, p. 32-58.

JIANG, X. R.; SONG, A.; BERGELSON, S.; ARROLL, T.; PAREKH, B.; MAY, K.; CHUNG, S.; STROUSE, R.; MIRE-SLUIS, A.; SCHENERMAN, M. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 10, n. 2, p. 101-111, 2011.

KELLNER, C.; OTTE, A.; CAPPUZZELLO, E.; KLAUSZ, K.; PEIPP, M. Modulating cytotoxic effector functions by Fc engineering to improve cancer therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 44, p. 327-336, 2017.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 8, p. 3173-3178, 2010.

KOENDERMAN, L. Inside-out control of Fc-receptors. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. 544, p. 1-11, 2019.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.

KRAMPE, B.; AL-RUBEAI, M. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*, v. 62, p. 175-188, 2010.

LANDAUER, K. "Designing media for animal cell culture: CHO cells, the industrial standard". In: PÖRTNER, R. *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. 3. ed. Berlin: Springer, 2014. cap 7, p. 89-103.

LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. "Animal cells: basic concepts". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 2, p. 13-37.

LI, F.; VIJAYASANKARAN, N.; SHEN, A. Y.; KISS, R.; AMANULLAH, a. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, v. 2, n. 5, p. 466-477, 2010.

LI, J.; WONG, C. L.; VIJAYASANKARAN, N.; HUDSON, T.; AMANULLAH, A. Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, p. 1173-1186, 2012.

LINDSKOG, E. K. "The upstream process: principal modes of operation". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018a. cap. 31, p. 625-636.

LINDSKOG, E. K. "Upstream bioprocessing: basic concepts". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018b. cap. 5, p. 97-110.

LINDSKOG, E. K.; FISCHER, S.; WENGER, T.; SCHULZ, P. "Host cells". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical*

processing: development, design, and implementation of manufacturing processes. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. cap. 6, p. 111-130.

LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 117, n. 4, p. 471-477, 2014.

LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; LOPEZ-REPULLO, J.; ALBIOL, J.; SOLÀ, C.; CAIRÓ, J. J. Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 23, p. 9951-9960, 2015.

LOIGNON, M.; PERRET, S.; KELLY, J.; BOULAIS, D.; CASS, B.; BISSON, L.; AFKHAMIZARREH, F.; DUROCHER, Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, v. 8, n. 65, p. 1-16, 2008.

LORENZO, E.; MÉNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, E.; GONZALEZ, N.; CABRERA, G.; PÉREZ, R.; PIMENTEL, R.; SORDO, Y.; MOLTO, M. P.; SARDINA, T.; RODRÍGUEZ-MALLON, A.; ESTRADA, M. P. Plasticity of the HEK-293 cells, related to the culture media, as platform to produce a subunit vaccine against classical swine fever virus. *AMB Express*, v. 9, n. 139, p. 1-10, 2019.

MAARTENS, D. E.; VAN DEN END, E. J.; STREEFLAND, M. "Configuration of bioreactors". In: PÖRTNER, R. *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. 3. ed. Berlin: Springer, 2014. cap. 19, p. 285-312.

MAHMUDA, A.; BANDE, F.; AL-ZIHIRY, K. J. K.; ABDULHALEEM, N.; MAJID, R. A.; HAMAT, R. A.; ABDULLAH, W. O.; UNYAH, Z. Monoclonal antibodies: a review of therapeutic applications and future prospects. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 3, p. 713-722, 2017.

MIZUKAMI, A.; CARON, A. L.; PICANÇO-CASTRO, V.; SWIECH, K. "Platforms for recombinant therapeutic glycoprotein production". In: PICANÇO-CASTRO, V.; SWIECH, K. *Recombinant glycoprotein production: methods and protocols*. 1. ed. New York: Springer, 2018. cap. 1, p. 1-14.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. "Culture media for animal cells". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 5, p. 111-128.

MULUKUTLA, B. C.; GRAMER, M.; HUA, W. S. On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic Engineering*, v. 14, p. 138-149, 2012.

MURPHY, K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 888 p.

NAHREINI, P.; HANSON, A. J; PRASAD, R. N. Recombinant antibody fragments in HEK-293 cells using sodium butyrate. *BioTechniques*, v. 34, p. 968-972, 2003.

NGUYEN, L. T.; ATOBE, K.; BARICHELLO, J. M.; ISHIDA, T.; KIWADA, H. Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 4, p. 751-757, 2007.

PELLEGRINI, M. P.; PINTO, R. C. V.; CASTILHO, L. R. "Mechanisms of cell proliferation and cell death in animal cell culture *in vitro*". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 7, p. 147-179.

PIERACCI, J. P.; ARMANDO, J. W.; WESTOBY, M.; THOMMES, J. "Industry review of cell separation and product harvesting methods". In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, L.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. cap. 9, p. 165-216.

PATEL, S. D.; PAPOUTSAKIS, E. T.; WINTER, J. N.; MILLER, W. M. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. *Biotechnology Progress*, v. 16, n. 5, p. 885-892, 2000.

POLLOCK, J.; HO, S. V.; FARID, S. S. Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, n. 1, p. 206-219, 2013.

PÜNGEL, S.; VEICZI, M.; BECKMANN, T. F.; VATER, V.; SOTO, P. V.; ERMERLING, R.; LEVISON, D.; HEINRICH, C.; WELSINK, T. Reconciling pillars of transient gene expression: from DNA prep via media, reagent and cell line development to holistic process optimization. *BMC Proceedings*, v. 9 (Supl. 9), n. P18, p.1-3, 2015.

ROMÁN, R.; MIRET, J.; SCALIA, F.; CASABLANCAS, A.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. J. Enhancing heterologous protein expression and secretion in HEK293 cells by means of combination of CMV promoter and IFN α 2 signal peptide. *Journal of Biotechnology*, v. 239, p. 57-60, 2016.

PÖRTNER, R. "Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation". In: EIBL, R.; EIBL, D.; PÖRTNER, R.; CATAPANO, G.; CZERMAK, P. *Cell and tissue reaction engineering*. 1. ed. Berlin: Springer, 2009. cap. 2, p. 13-54.

PÖRTNER, R. "Bioreactors for mammalian cells". In: AL-RUBEAI, M. *Animal cell culture*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2015. cap. 4, p. 89-135.

RAJPAL, A.; STROP, P.; YEUNG, Y. A.; CHAPARRO-RIGGERS, J.; PONS, J. "Introduction: antibody structure and function". In: CHAMOW, S. M.; RYLL, T.; LOWMAN, H. B.; FARSON, D. *Therapeutic Fc-fusion proteins*. 1. ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2014. cap. 1, p. 1-43.

ROSE, N.; PINHO-NASCIMENTO, C. A.; RUGGIERI, A.; FAVUZZA, P.; TAMBORRINI, M.; ROTH, H.; MORAES, M. T. B.; MATILE, H.; JÄNISCH, T.; PLUSCHKE, G.; RÖLTGEN, K. Generation of monoclonal antibodies against native viral proteins using antigen-expressing mammalian cells for mouse immunization. *BMC Biotechnology*, v. 16, n. 83, p. 1-11, 2016.

SARKAR, K.; MEKA, S. R. K.; MADRAS, G.; CHATTERJEE, K. A self-assembling polycationic nanocarrier that exhibits exceptional gene transfection efficiency. *RSC Advances*, v. 5, p. 91619-91632, 2015.

SCHIRRMANN, T.; BÜSSOW, K. "Transient production of scFv-Fc fusion proteins in mammalian cells". In: KONTERMANN R.; DÜBEL S. *Antibody Engineering*. 1. ed. Berlin: Springer, 2010. cap 10, p. 387-398.

SCHWARZ, H.; ZHANG, Y.; ZHAN, C.; MALM, M.; FIELD, R.; TURNER, R.; SELICK, C.; VARLEY, P.; ROCKBERG, J.; CHOTTEAU, V. Small-scale bioreactor supports high

density HEK293 cell perfusion culture for the production of recombinant. *Journal of Biotechnology*, v. 309, p. 44-52, 2019.

SHI, L.; CHEN, X.; TANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; GAO, F.; SANG, J. Combination of FACS and homologous recombination for the generation of stable and high-expression engineered cell lines. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, e91712, p. 1-11, 2014.

STERN, B.; OLSEN, B.; TRÖBE, C.; RAVNEBERG, H.; PRYME, I. F. Improving mammalian cell factories: the selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends in Cell & Molecular Biology*, n. 2, p.1-7, 2007.

STROHL, W. R. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell*, v. 9, n. 1, p. 86-120, 2018.

SUBEDI, G. P.; JOHNSON, R. W.; MONIZ, H. A.; MOREMEN, K. W.; BARB, A. High yield expression of recombinant human proteins with the transient transfection of HEK293 cells in suspension. *Journal of Visualized Experiments*, v. 106, n. e53568, p. 1-10, 2015.

SUEN, K. F.; TURNER, M. S.; GAO, F.; LIU, B.; ALTHAGE, A.; SLAVIN, A.; OU, W.; ZUO, E.; ECKART, M.; OGAWA, T.; YAMADA, M.; TUNTLAND, T.; HARRIS, J. L.; TRAUGER, J. W. Transient expression of an IL-23R extracellular domain Fc fusion protein in CHO vs. HEK cells results in improved plasma exposure. *Protein Expression and Purification*, v. 71, n. 1, p. 96-102, 2010.

TAMASHIRO, W. M., AUGUSTO, E. F. P. "Monoclonal antibodies". In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 1. ed. cap. 17. New York: Taylor & Francis, 2008. cap. 17, p. 409-433.

TAMM, C.; KADEKAR, S.; PIJUAN-GALITÓ, S.; ANNERÉN, C. Fast and efficient transfection of mouse embryonic stem cells using non-viral reagents. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 12, p. 584-591, 2016.

VILLIGER-ÖBERBEK, A.; YANG, Y.; ZHOU, W.; YANG, J. Development and application of a high-throughput platform for perfusion-based cell culture processes. *Journal of Biotechnology*, v. 212, p. 21-29, 2015.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, p. 135-138, 2002.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, v. 36, n. 12, p. 1136-1145, 2018.

WANG, C.; WU, Y.; WANG, L.; HONG, B.; JIN, Y.; HU, D.; CHEN, G.; KONG, Y.; HUANG, A.; HUA, G.; YING T. Engineered soluble monomeric IgG1 Fc with significantly decreased non-specific binding. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. 1545, p. 1-8, 2017.

WELLS, E; ROBINSON, A. *Comparison of transfection methods on yield of recombinant human IgG1 Fc*. Trabalho apresentado no congresso Cell Culture Engineering XVI, Tampa, EUA, 2018. Disponível em: <<https://dc.engconfintl.org/ccexvi/107/>>. Acesso em 23 de dezembro de 2019.

WOLF, M. K. F.; LORENZ, V.; KARST, D. J.; SOUQUET, J.; BROLY, H.; MORBIDELLI, M. Development of a shake-tube-based scale-down model for perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 115, p. 2703-2713, 2018.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2004.

XIAO, S.; SHILOACH, J.; GRISSHAMMER, R. "Construction of recombinant HEK293 cell lines for the expression of the neurotensin receptor NTSR1". In: PRAZERES, D. M. F.; MARTINS, S. A. M. *G protein-coupled receptor screening assays*. 1. ed. New York: Springer, 2015. cap. 4, p. 51-64.

XING, Z.; KENTY, B. B.; LI, Z. J.; LEE, S. S. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 4, p. 733-746, 2009.

YING, T.; CHEN, W.; GONG, R.; FENG, Y.; DIMITROV, D. S. Soluble monomeric IgG1 Fc. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 23, p. 19399-19408, 2012.

ZHANG, L.; WANG, M.; CASTAN, A.; STEVENSON, J.; CHATZISSAVIDOU, N.; HJALMARSSON, H.; VILAPLANA, F.; CHOTTEAU, V. Glycan residues balance analysis - GReBA: a novel model for the N-linked glycosylation of IgG produced by CHO cells. *Metabolic Engineering*, v. 57, p. 118-128, 2020.