

QUESTÃO 3

PARA CULTIVO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO, O USO DE BIORREATORES DO TIPO TANQUE AGITADO (STR) É GERALMENTE A ESCOLHA PREFERENCIAL, DEVIDO À FACILIDADE DE MONITORAMENTO E CONTROLE DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO. ALÉM DISSO, HÁ EXTENSO EXPERTISE NA ACADEMIA E INDÚSTRIA EM COMO ESCALONAR BIOPROCESSOS CONDUZIDOS EM STR.

PENSANDO NO MODO DE OPERAÇÃO, A BATELADA ALIMENTADA, ONDE NUTRIENTES SÃO ADICIONADOS AO BIORREATOR EM INTERVALOS E VOLUMES ESPECÍFICOS, É AMPLAMENTE UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS COMO ANTICORPOS MONOCLONAIS (MABs). APESAR DISSO PERMITIR MAIORES CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E MAIOR TEMPO DE CULTIVO ANTES QUE A FASE DE MORTE CELULAR SEJA ATINGIDA, EM ALGUM MOMENTO A PRESENÇA E CONCENTRAÇÃO EXCESSIVA DE METABÓLITOS TÓXICOS COMO LACTATO E AMÔNIA IRÃO CAUSAR INIBIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO CELULAR E MORTE.

A OPERAÇÃO UTILIZANDO MODO DE OPERAÇÃO CONTÍNUO É UMA FORMA DE FAZER O CULTIVO DURAR POR MAIS TEMPO, ATINGINDO MAIORES PRODUTIVIDADES. ALÉM DA ALIMENTAÇÃO DE NUTRIENTES, HÁ RETIRADA DE MEIO DE CULTIVO GASTO. CASO SEJA BEM PLANEJADO E CONTROLADO, ISSO VAI PERMITIR QUE METABÓLITOS TÓXICOS NÃO

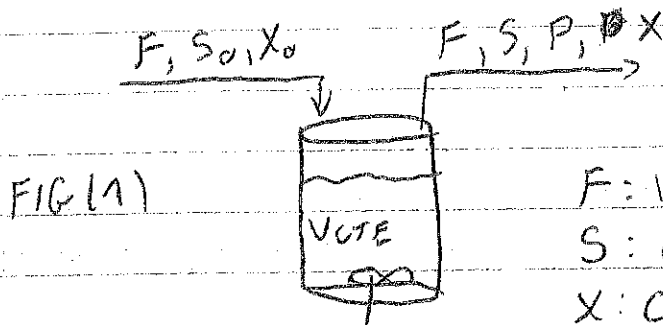
FSI

CÓDIGO 0.06

2

QUESTÃO 3 CONT.

SE ACUMULEM. A FIGURA ABAIXO É O BALANÇO DE MASSA PARA CÉLULAS "X" ILUSTRAM UM CULTIVO CONTÍNUO EM ESTADO ESTACIONÁRIO.



F: VAZÃO

S: CONCENTRAÇÃO SUBSTRATO

X: CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

P: CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO

BALANÇO PI CÉLULAS

$$[ENTRA] - [SAÍ] + [GERADO] = [ACÚMULO]$$

$$F X_0 - F X + \mu X V = \frac{d(XV)}{dt}$$

μ : TAXA ESPECÍFICA DE CRESC. CELULAR
COMO $V = CTE$ E $X_0 = 0$

$$\mu X V - F X = V \frac{dX}{dt}$$

$$\mu X - \frac{F}{V} X = \frac{dX}{dt}, \text{ NO ESTADO ESTACIONÁRIO } \left(\frac{dX}{dt} \right) = 0$$

EQ (1) $\boxed{\mu = \frac{F}{V} = D}$ D: TAXA DE DILUIÇÃO

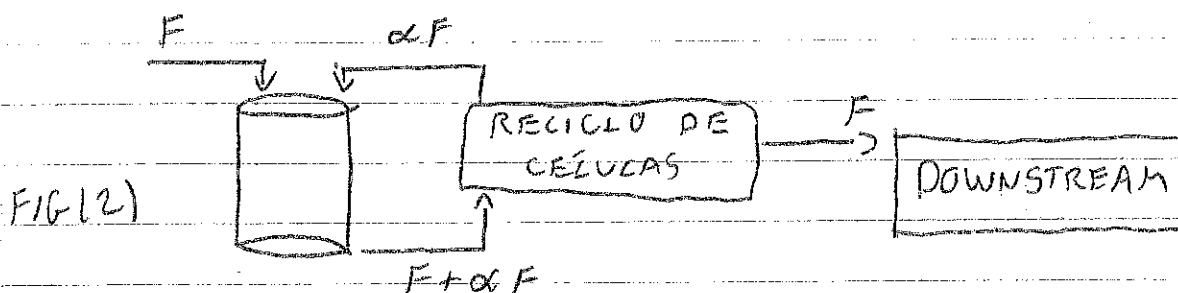
COMO PODEMOS OBSERVAR DA EQ (1), PARA QUE O ESTADO ESTACIONÁRIO SEJA MANTIDO EM UM CULTIVO CONTÍNUO, É A PERDA DE CONCENTRAÇÃO CELULAR PELO EFEITO DE WASH-OUT SEJA EVITADO, HÁVERÁ

QUESTÃO 3 CONT.

UM DESAFIO NO CASO DE CULTIVO COM CÉLULAS ANIMAIS, JÁ QUE OS VALORES DE " μ " PARA CÉLULAS ANIMAIS SÃO RELATIVAMENTE BAIXOS.

DESSA FORMA, PARA MANTER A IGUALDADE REPRESENTADA NA EQ (1), BAIXOS VALORES DE $[F/V]$ TERIAM QUE SER UTILIZADOS, O QUE SIGNIFICA BAIXA TROCA DE MEIO, COMPROMETENDO O BIOPROCESSO. CÉLULAS CHO, POR EXEMPLO, COSTUMAM APRESENTAR VALORES DE " μ " EM TORNO DE $0,7 d^{-1}$.

PORTANTO, PARA TORNAR O CULTIVO CONTÍNUO VIÁVEL, NO CASO DE CÉLULAS ANIMAIS É ESSENCIAL O USO DE DISPOSITIVOS PARA RECICLO DE CÉLULAS DE VOLTA AO BIORREATOR, COMO ILUSTRADO NA FIGURA ABAIXO (MODO CONTÍNUO COM PERFUSÃO)



OS DISPOSITIVOS MAIS USADOS NA INDÚSTRIA PARA PERFUSÃO SÃO FILTROS GIRATÓRIOS (SPIN-FILTERS), MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO, SEDIMENTADORES POR GRAVIDADE E CENTRÍFUGAS

OS FILTROS GIRATÓRIOS PODEM SER UTILIZADOS DENTRO DO BIORREATOR OU EXTERNO. O PERMEADO DO FILTRO CONTÉM O PRODUTO E É LIVRE DE CÉLULAS, SENDO

4

FSI

CODIGO. 06QUESTÃO 3 CONT.

COLETADO CONTINUAMENTE. O MOVIMENTO GIRATÓRIO DA PAREDE DO FILTRO EVITA PARCIALMENTE O PROCESSO DE FOULING.

JÁ MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO GERALMENTE SÃO APLICADAS NA PERFUSÃO COM MÓDULOS DE FIBRAS OCAS EXTERNOS. O MEIO DO BIORREATOR É BOMBEADO PARA O MÓDULO OPERANDO EM FLUXO TANGENCIAL (TFF - TANGENTIAL FLOW FILTRATION). AS CÉLULAS FICAM NA CORRENTE RETIDA E O PERMEADO LIVRE DE CÉLULAS É RETIRADO DO SISTEMA.

O FOULING TAMBÉM É UM PROBLEMA NA PERFUSÃO UTILIZANDO MEMBRANAS. PARA CONTORNAR ESSA DESVANTAGEM ALGUMAS EMPRESAS ESTÃO OPTANDO POR SISTEMAS CHAMADOS DE ATFF (ALTERNATE TANGENTIAL FLOW FILTRATION), ONDE PRESSÃO E VÁCUO SÃO APLICADOS NO MÓDULO DE MEMBRANA ALTERNADAMENTE, MUDANDO O SENTIDO DO FLUXO E PROMOVENDO LIMPEZA PARCIAL DO FOULING.

O MODO DE OPERAÇÃO POR PERFUSÃO TEM SIDO CADA VEZ MAIS UTILIZADO EM PLATAFORMAS PRODUTIVAS DE MABS, GERALMENTE UTILIZANDO CÉLULAS CHO, DEVIDO ÀS MAIORES PRODUTIVIDADES ALCANÇADAS. APESAR DISSO, TRATA-SE DE UMA OPERAÇÃO MAIS COMPLEXA DE IMPLEMENTAR E DE SE CONTROLAR.

MAS O MAIOR DESAFIO DE SE UTILIZAR PERFUSÃO EM UMA PLATAFORMA PRODUTIVA DE MABS É O FATO DE QUE TECNOLOGIAS

QUESTÃO 3 CONT.

CONTÍNUAS AINDA NÃO ESTÃO NO MESMO NÍVEL DE MATURIDADE NA ÁREA DE DOWNSTREAM, ESPECIALMENTE AS ETAPAS CROMATOGRAFICAS.

DESSA FORMA, DIVERSAS PLATAFORMAS PRODUTIVAS DE MAB SÃO OBRIGADAS A COLETAR POR UM TEMPO ESPECÍFICO O PRODUTO DA PERFUSÃO E ARMAZENAR, ANTES DE EXECUTAR A ~~PERFUSÃO PARA~~ PURIFICAÇÃO EM BATELADA.

O PRODUTO DA PERFUSÃO, NO ENTANTO, NÃO É ESTÁVEL, DEVIDO À PRESENÇA DE ENZIMAS QUE PODEM DEGRADAR O BIOPRODUTO. NA IMPLEMENTAÇÃO DE PERFUSÃO, PORTANTO, HÁ CUIDADOS ADICIONAIS EM COMO EVITAR A DEGRADAÇÃO DO PRODUTO, POSSIVELMENTE IMPACTANDO ATRIBUTOS CRÍTICOS DE QUALIDADE (CQAs - CRITICAL QUALITY ATTRIBUTES)

6

QUESTÃO 4

CÉLULAS CHO E E. COLI SÃO IMPORTANTES SISTEMAS DE EXPRESSÃO PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES. CÉLULAS CHO SÃO GERALMENTE ESCOLHIDAS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS MAIS COMPLEXAS, QUE EXIGEM MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL (PTMs). JÁ CÉLULAS E. COLI PODEM SER UTILIZADAS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELATIVAMENTE MAIS SIMPLES, COMO INSULINA.

QUANDO CULTIVADAS EM BIORREATOR, NO ENTANTO, ESSES SISTEMAS DE EXPRESSÃO VÃO APRESENTAR CARACTERÍSTICAS DISTINTAS, INCLUINDO O FORNECIMENTO ADEQUADO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO. A EQ (2) ABAIXO REPRESENTA MATEMATICAMENTE O FORNECIMENTO E CONSUMO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM UM BIORREATOR AERADO POR BORBULHAMENTO:

$$\text{EQ (2)} \quad \frac{d(OD)}{dt} = K_{LA}(OD^s - OD) - q_{O_2} X$$

ONDE: OD = OXIGÊNIO DISSOLVIDO

K_{LA} = COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

OD^s = OXIGÊNIO DISSOLVIDO DE SATURAÇÃO

q_{O_2} = TAXA ESPECÍFICA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO

X = CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

EM GERAL O FORNECIMENTO DE OXIGÊNIO DEPENDE DA VAZÃO DE AR ALIMENTADA AO

QUESTÃO 4 CONT

BORBULHADOR NO FUNDO DO VASO, TIPO DE IMPELIDOR UTILIZADO, POSIÇÃO DOS IMPELIDORES (CASO HAJA MAIS DE UM), TIPO DE BORBULHADOR UTILIZADO, E PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO NO GÁS ALIMENTADO AO IMPELIDOR.

EM RELAÇÃO AO CONSUMO, TEMOS UMA GRANDE DIFERENÇA ENTRE CÉLULAS CHO E E. COLI. BACTÉRIAS E. COLI SE PROLIFERAM MUITO MAIS RAPIDAMENTE QUE CÉLULAS CHO E ATINGEM CONCENTRAÇÕES CELULARES MAIS ELEVADAS. POR EXEMPLO, EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO, CÉLULAS E. COLI GERALMENTE APRESENTAM UM TEMPO DE DUPLICAÇÃO DE 30 MINUTOS. PARA CÉLULAS CHO ESSE VALOR GIRA EM TORNO DE 24h.

OUTRO ASPECTO A SER CONSIDERADO É A SENSIBILIDADE DE CADA CÉLULA A ESTRESSE HIDRODINÂMICO. CÉLULAS CHO, DEVIDO AO MAIOR TAMANHO E AUSÊNCIA DE PAREDE CELULAR, SÃO MUITO MAIS SENSÍVEIS QUE BACTÉRIAS E. COLI.

NO FORNECIMENTO DE OXIGÊNIO AO MEIO DE CULTIVO, TANTO A AÇÃO DO IMPELIDOR COMO O BORBULHAMENTO SERÃO FONTES DE ESTRESSE HIDRODINÂMICO.

DESSA FORMA, PARA FERMENTAÇÕES COM E. COLI, DEVIDO AO MAIOR CONSUMO DE O_2 E PELO FATO DE SEREM MAIS RESISTENTES, MAIORES VAZÕES DE AR NO ~~IMPELIDOR~~ ~~PODEM SER UTILIZADAS~~ BORBULHADOR PODEM SER UTILIZADAS E IMPELIDORES

QUESTÃO 4 CONT.

MAIS EFICIENTES OPERANDO EM ALTAS TAXAS DE AGITAÇÃO PODEM SER UTILIZADOS.

JÁ PARA CÉLULAS CHO, VAZÕES DE AR MENORES GERALMENTE SÃO UTILIZADAS (EM TORNO DE 0,5 VVM). CÉLULAS COSTUMAM TER MEMBRANA CELULAR COM ASPECTO LEVEMENTE HIDROFÓBICO. DESSA FORMA, ELAS PODEM ADERIR ÀS BOLHAS EM ASCENÇÃO QUE COLAPSAM NA SUPERFÍCIE DO LÍQUIDO GERANDO ENORME ESTRESSE. ESTE MECANISMO INCLUSIVE COSTUMA CAUSAR MAIS ESTRESSE DO QUE A PRÓPRIA AÇÃO DOS IMPELIDORES. MUITAS VEZES SURFACTANTES SÃO ADICIONADOS AO MEIO DE CULTIVO PARA SUAVIZAR ESTE PROBLEMA.

EM RELAÇÃO AO IMPELIDOR, O TIPO DE PÁS INCLINADAS COSTUMA SER A ESCOLHA PREFERENCIAL PARA CÉLULAS CHO. AS PÁS INCLINADAS EM AGITAÇÃO CAUSAM MENOR TENSÃO DE CISALHAMENTO QUANDO COMPARADAS ÀS PÁS RETAS, MAIS UTILIZADAS EM FERMENTAÇÕES COM E. COLI

OUTRO ASPECTO A SER CONSIDERADO É A MAIOR SENSIBILIDADE DE CÉLULAS ANIMAIS AO ESTRESSE OXIDATIVO. PROTEÍNAS MAIS COMPLEXAS TAMBÉM COSTUMAM SER MAIS SENSÍVEIS A ESTRESSE OXIDATIVO, COMO É O CASO DAS PONTES DISSULFETO ENTRE RESÍDUOS DE CISTEÍNA EM MOLÉCULAS DE MAB.

POR ISSO EM CÉLULAS ANIMAIS O CULTIVO DEMANDA UM CONTROLE MAIS

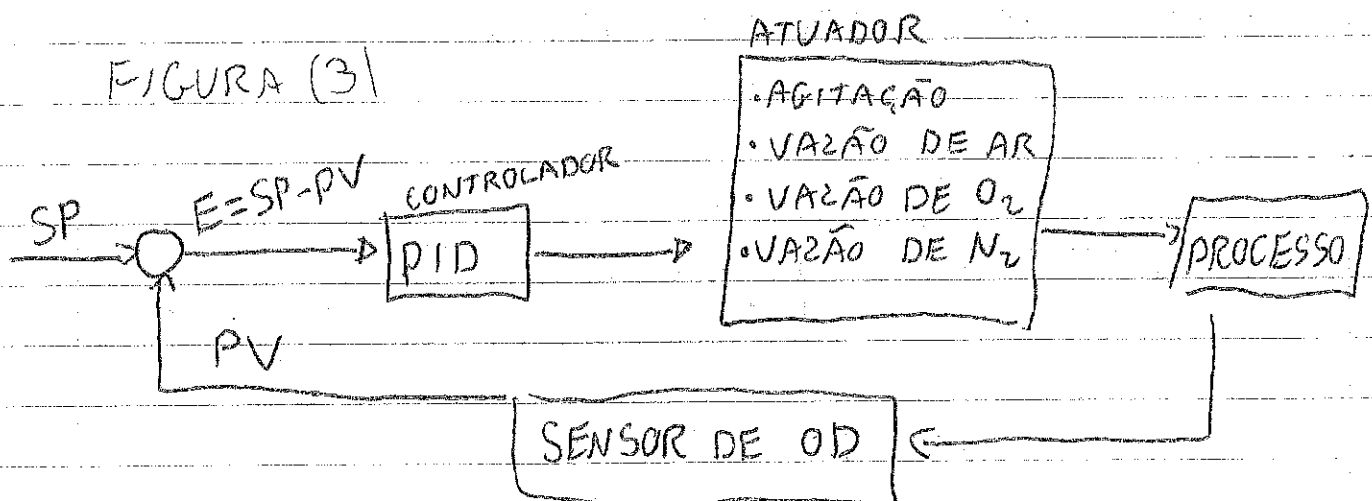
CÓDIGO 6

9

QUESTÃO 4 CONT.

PRECISO NO NÍVEL DE OD, GERALMENTE NA FAIXA DE 30% A 40% DA SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO NO MEIO.

PARA TER TAL CONTROLE, É PRECISO UM AJUSTE ~~FAÇA~~ FINO NA CASCATA DE CONTROLE DE OD. O NÍVEL DE OD É MEDIDO POR SENSORES INLINE E, DEPENDENDO DO SET POINT, DIVERSOS PARÂMETROS TERÃO ATUAÇÃO, COMO ILUSTRADO NA FIGURA (3) ABAIXO:



SP: SET POINT

PV: PROCESS VALUE (OD MEDIDO)

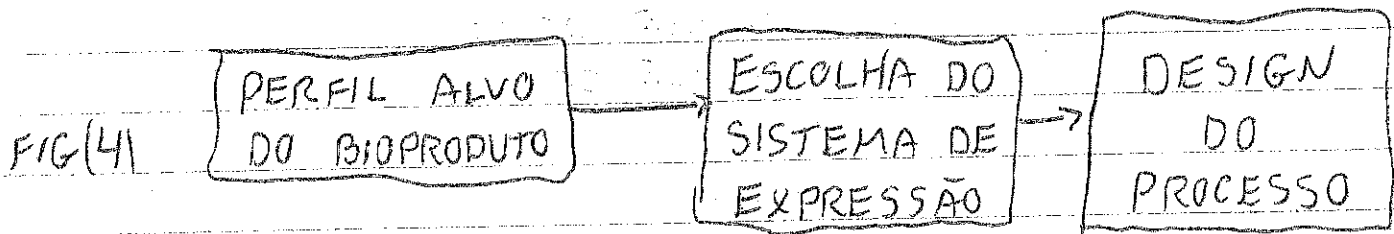
E: ERRO

PID: CONTROLADOR PROPORCIONAL/INTEGRAL / DERIVATIVO.

QUESTÃO 1

A ESCOLHA DO SISTEMA DE EXPRESSÃO* PARA UM BIOPRODUTO GERALMENTE SE INICIA COM ANÁLISE DO PERFIL ALMEJADO PARA O PRODUTO. A DEPENDER DO SISTEMA DE EXPRESSÃO ESCOLHIDO, CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO E APLICAÇÃO ALMEJADA DO PRODUTO, DESENVOLVE-SE O DESIGN DO PROCESSO. A FIGURA (4) ABAIXO EXEMPLIFICA ESSAS ETAPAS DE FORMA RESUMIDA.

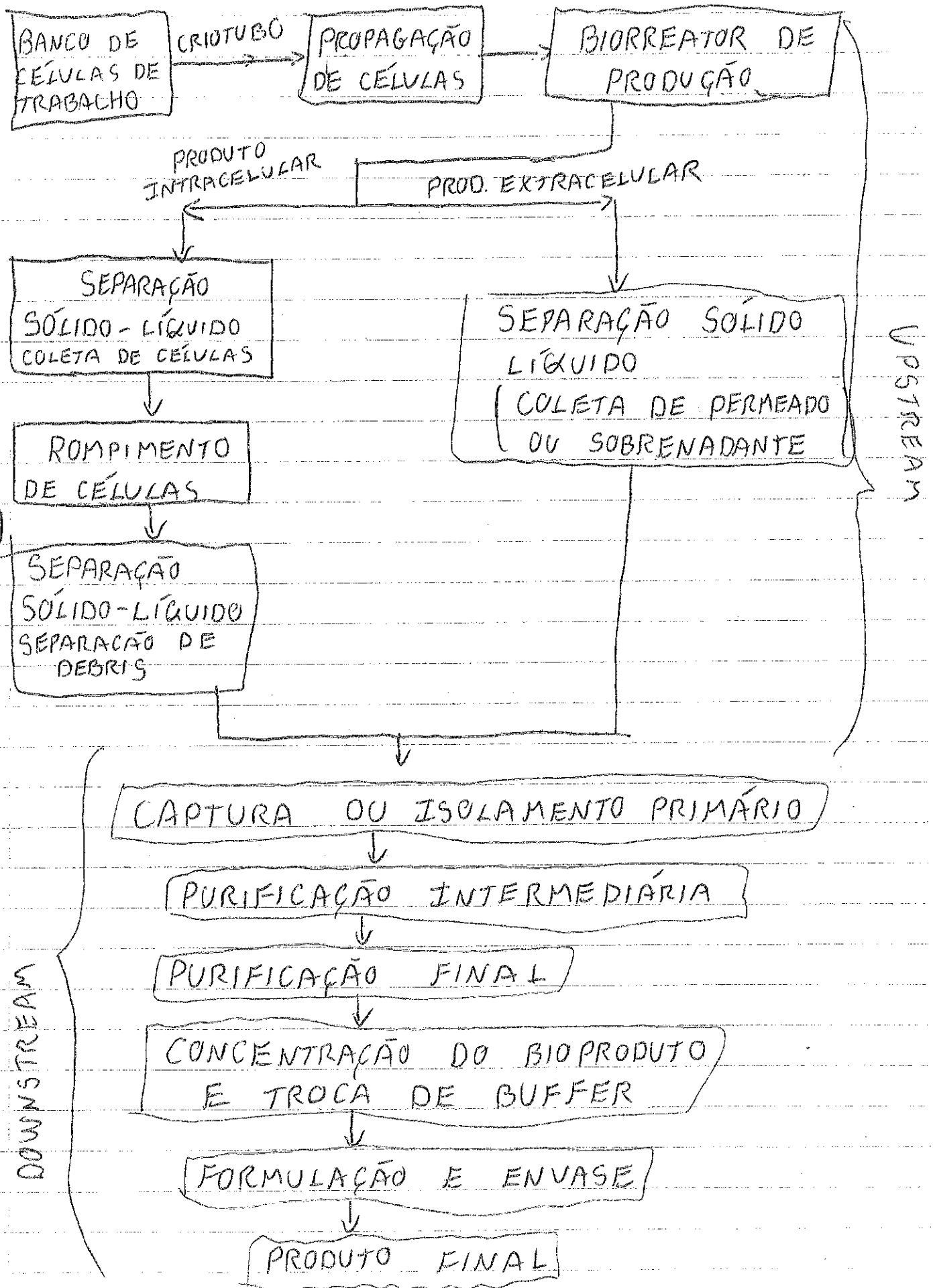
* ASSUMINDO BIOPRODUTO OBTIDO POR TECNOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE



O DESIGN DE PROCESSO COSTUMA SER DIVIDIDO EM UPSTREAM, QUE INCLUI ~~PROD~~ PROPAGAÇÃO DE CÉLULAS E CULTIVO OU FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR, E DOWNSTREAM, ONDE TEMOS OPERAÇÕES UNITÁRIAS PARA PURIFICAÇÃO DO BIOPRODUTO.

DEPENDENDO DA CÉLULA UTILIZADA NO BIOPROCESSO, O PRODUTO PODE SER INTRACELULAR (COMO É O CASO DE PROTEÍNAS HETEROLÓGAS EXPRESSAS EM E. COLI, FORMANDO CORPOS DE INCLUSÃO) OU EXTRACELULARES, COMO GERALMENTE ACONTECE QUANDO CÉLULAS CHO SÃO UTILIZADAS. A FIGURA (5) ESQUEMATIZA O FLUXOGRAMA DE PROCESSO SIMPLIFICADO PARA AMBOS CENÁRIOS.

QUESTÃO 1 CONT.



QUESTÃO 1 CONT

ALÉM DAS ETAPAS TÍPICAS APRESENTADAS NA FIGURA (5), VALE MENCIONAR QUE, NO CASO DO USO DE CÉLULAS ANIMAIS COMO CÉLULA CHO, É NECESSÁRIA A INCLUSÃO DE OPERAÇÕES DE INATIVAÇÃO VIRAL NO DOWNSTREAM, POR QUESTÕES REGULATÓRIAS E PARA GARANTIR SEGURANÇA AOS PACIENTES. ESSAS OPERAÇÕES COSTUMAM SER: INATIVAÇÃO POR pH, DETERGENTE E SEPARAÇÃO POR TAMANHO.

JÁ NO CASO DE PROTEÍNAS HETEROLÓGAS EXPRESSAS EM E. COLI, SÃO NECESSÁRIAS ETAPAS DE RENATURAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO, GERALMENTE CAUSANDO GRANDE PERDAS DE PRODUTO PROTEICO.

OUTRO ASPECTO IMPORTANTE NO CASO DO USO DE E. COLI É A POSSIBILIDADE DE HAVER ENDOTOXINAS NO PRODUTO, CARACTERÍSTICO DE PROCESSOS COM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS. DESSA FORMA, PARA SEGURANÇA DO PACIENTE, A REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS DEVE FAZER PARTE DO PROCESSO.

QUESTÃO 2

ANTICORPOS MONOCLONAIS REPRESENTAM UM DOS PRINCIPAIS TIPOS DE PRODUTOS DE BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.

EM TERMOS DE ESTRUTURA, ANTICORPOS MONOCLONAIS (MABs) SÃO GLICOPROTEÍNAS COMPLEXAS, FORMADAS POR QUATRO CADEIAS POLIPEPTÍDICAS (DUAS PESADAS E DUAS LEVES) LIGADAS PRINCIPALMENTE POR PONTES DISSULFETO ENTRE RESÍDUOS DE CISTEÍNA. EM UMA DAS EXTREMIDADES DA MOLECULA HA UMA REGIÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO QUE VAI DIRECIONAR SUA APLICAÇÃO TERAPÊUTICA. ALÉM DISSO, MABS APRESENTAM DIVERSAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (PTM) ESSENCIAIS PARA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO PRODUTO.

EM GRANDE PARTE DEVIDO À NECESSIDADE DE SE REALIZAR AS PTMs ADEQUADAS, CÉLULAS ANIMAIS SÃO GERALMENTE A ESCOLHA DE SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA ESTE BIOPRODUTO. EM ESPECIAL CÉLULAS CHO (CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTE CHINÊS) E CÉLULAS DE MIELOMA MURINO.

OUTRA CLASSE DE BIOPRODUTO DE GRANDE RELEVÂNCIA SÃO AS VACINAS DE SUBUNIDADE RECOMBINANTES. UTILIZANDO TECNOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE, O GENE RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO

12

QUESTÃO 2 CONT.

DE ALGUM COMPONENTE CELULAR (CAPAZ DE GERAR RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES) É INSERIDO E EXPRESSADO EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA

COMO SOMENTE ESTE COMPONENTE ANTÍGENO DO PATÓGENO SERÁ PRODUZIDO, ESTA É CONSIDERADA UMA TECNOLOGIA RELATIVAMENTE MAIS SEGURA E EFICAZ, QUANDO COMPARADA A VACINAS PRODUZIDAS POR ATENUAÇÃO OU INATIVAÇÃO DO PATÓGENO.

PODEMOS CITAR TAMBÉM AS VACINAS DE RNA MENSAGEIRO (RNA_m) COMO BIOPRODOTO FARMACÊUTICO QUE GANHOU GRANDE RELEVÂNCIA NA RECENTE PANDEMIA DE COVID-19

ATRAVÉS DE UM PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO IN VITRO UTILIZANDO ENZIMAS, MOLÉCULAS DE RNA_m CODIFICANTES PARA COMPONENTES ANTÍGENOS DE DETERMINADO PATÓGENO SÃO PRODUZIDAS.

APÓS PURIFICAÇÃO, FORMULAÇÃO E ENVASE, TEMOS UMA VACINA QUE, QUANDO INJETADA EM PACIENTES, IRÁ INSTRUIR AS CÉLULAS DO PACIENTE A GERAREM OS COMPONENTES ANTÍGENOS E, POSTERIORMENTE, INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE.

OUTRO TIPO DE PRODUTO DE BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA QUE TEM ATRAÍDO INVESTIMENTO SÃO OS CONJUGADOS DROGA-ANTICORPO

QUESTÃO 2 CONT

(ADCs - ANTIBODY-DRUG CONJUGATES)

MUITAS DROGAS CITOTÓXICAS (GERALMENTE PEQUENAS MOLECÚLAS PRODUZIDAS POR SÍNTESE QUÍMICA) TÊM SUA APLICAÇÃO LIMITADA DELO FATO DE CAUSAREM DANOS EM CÉLULAS DO PACIENTE QUE NÃO SÃO O ALVO DA TERAPIA.

DESSA FORMA, AO CONJUGARMOS ESSAS DROGAS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS, PODEMOS TER UMA AÇÃO MAIS DIRECIONADA DA DROGA CITOTÓXICA, TENTANDO DESENHAR A APLICAÇÃO PARA QUE A DROGA SEJA LIBERADA DENTRO DE CÉLULAS ALVO (GERALMENTE TUMORAIS), TRAZENDO MAIS SEGURANÇA E EFICÁCIA À TERAPIA.

POR FIM, PODEMOS CITAR OS MABs BIESPECÍFICOS. AO CONTRÁRIO DE MABs MAIS COMUNS, QUE APRESENTAM UMA REGIÃO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, MABs BIESPECÍFICOS SÃO ENGENHEIRADOS PARA TER EM SUA MOLECÚLA DUAS REGIÕES DE LIGAÇÃO A ANTÍGENOS (GERALMENTE DESTINADO A DIFERENTES RECEPTORES)

ISSO AUMENTA O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO BIOFÁRMACO DE DIVERSAS MANEIRAS, POR EXEMPLO PERMITINDO QUE O ANTICORPO SE LIGUE A DUAS CÉLULAS DIFERENTES, COMO CÉLULAS TUMORAIS E CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.