

① Escolha do produto.

- A escolha do produto deve levar em conta aspectos do mercado, o nível de conhecimento do produto, características específicas do local onde o produto vai ser produzido e comercializado.

→ Seleção do sistema de expressão.

- O sistema de expressão deve ser escolhido com base no produto a ser desenvolvido, estrutura disponível, experiência da equipe responsável entre muitos outros fatores.

- Um fator crítico para a escolha do sistema de expressão é a capacidade de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação. Bactérias não são capazes de realizar modificações pós-traducionais complexas, leveduras, células de plantas e de insetos são capazes, mas podem apresentar padrões diferentes do humano. Células de mamíferos (CHO, HEK, BHK, etc.) são mais indicadas para produtos onde o perfil de glicosilação próximo ao humano é crítico para a estabilidade, atividade ou imunogenicidade da molécula de interesse, podendo impactar na segurança e eficácia do produto.

- Outros fatores também devem ser considerados como produtividade, custo dos insumos, facilidade dos processos e controles. Caso o produto escolhido mantenha a segurança e eficácia deve-se considerar sistemas como bactérias, leveduras e células de inseto devido a produtividade.

→ Obtenção da sequência de DNA do gene de interesse.

- É necessário obter, a partir de estudos prévios ou bancos de dados a sequência para produzir a proteína de interesse. Além disso é recomendado que a sequência seja otimizada para o sistema de expressão escolhido, por exemplo, com a otimização dos códons de forma a melhorar a eficiência da expressão.

→ Obtenção do vetor para inserir o gene de interesse na célula produtora.

- Escolher a tecnologia a ser utilizada com base nas características da proteína de interesse (como o tamanho do gene) e na forma de expressão (transiente ou estável).

- Podem ser utilizados plasmídeos, que devem ter todas as estruturas necessárias para amplificação e regulação da expressão do gene de interesse. Vetores virais, que evoluíram para utilizar a maquinaria de células para replicação podem ser modificados geneticamente e utilizados para inserir o gene de interesse na célula de uma forma mais eficiente. Outros sistemas de integração sítio-dirigida podem ser usados para modificações mais precisas.

→ Transfecção das células e seleção de clones.

- Inserir o material genético para a expressão da proteína de interesse e selecionar dentre as células que incorporaram o gene aquelas que produzam mais, produzem um produto de melhor qualidade, tem perfil de enescimento melhor, e outras características relevantes para o produto e para o processo.

→ Desenvolvimento do processo "Upstream" e "Downstream".

- Selecionar o tipo de biorreator e o modo de produção.
- Selecionar as etapas de clonificação e purificação do produto.
- Otimizar os parâmetros de operação, a sequência das etapas, definir os parâmetros críticos do processo, os atributos críticos de qualidade, incluindo formulação e envase.

→ Aumento de escala de produção.

- Desenvolver um processo que seja capaz de manter a qualidade do produto e a produtividade obtidas no desenvolvimento do

processo em uma escala que seja adequada para o objetivo de produto definido na análise de mercado durante a definição do produto.

→ Desenvolvimento analítico.

- É necessário comprovar diversos parâmetros como pureza, identidade, biocarga, esterilidade, ausência de impurezas (DNA, HCP, agentes adventícios, etc.). Para isso deve-se utilizar métodos farmacopeicos ou desenvolvidos especificamente para o produto que devem ser validados e qualificados para atender as boas práticas.

→ Construção e adequação da área.

- Construir áreas classificadas, definir fluxos de processo, de materiais, de pessoas, de efluentes.

→ Adquirir os equipamentos.

- Comprar os equipamentos necessários para o processo, realizar as qualificações de instalação e de operação (IQ/OQ), treinar a equipe, fazer corridas de água, validação de limpeza, validação do processo (lotes de engenharia).

→ Desenvolvimento pré-clínico.

- testes em animais (modelos relevantes) para avaliar atividades biológicas, toxicidade, segurança.

→ Desenvolvimento clínico.

- testes em humanos:

- Fase I: avaliar segurança em voluntários saudáveis.

- Fase II: avaliar eficácia e estimar dose em indivíduos com a doença.

- Fase III: avaliar segurança e eficácia em um grupo maior.

de indivíduos, comparando com placebo ou alternativas de tratamento para obter a aprovação.

→ Obtenção de registro.

- Após submissão do Dossier completo; atendendo todas as especificações o produto é autorizado a entrar no mercado.

→ Comercialização e "pós venda"

- Com o produto no mercado deve-se continuar avaliando os pacientes e monitorando possíveis efeitos adversos (Fase IV).

- Após o registro qualquer alteração no processo, fornecedores, ou área devem ser registrados e avaliados junto a agência regulatória local.

②:

→ Vacinas:

As vacinas podem ser divididas em vários tipos

- Vacinas de sub-unidades: utilizam uma "parte" do agente infeccioso para gerar uma resposta imune que vai proteger o indivíduo de uma infecção ou doença grave futura. São exemplos de vacinas de sub-unidades proteínas como a proteína S no caso da SARS-COV-2, partículas pseudo virais, que simulam o vírus tridimensional sem a capacidade de replicar ou infectar e Polissacarídeos.

- Vacinas de vírus vivo, atenuado ou inativado: Utilizam um vírus atenuado ou inofensivo que é modificado para expressar na superfície um alvo do vírus para que o sistema imune reconheça e desenvolva resposta imunológica contra o vírus.

Nas vacinas inativadas o vírus é inativado por processos químicos ou físicos para serem incapazes de se replicar e infectar.

Em vacinas de vetor viral a maquinaria do vírus é usada para inserir um fragmento de DNA ou RNA que induz a expressão de antígeno que gera resposta imune.

- Vacinas de DNA e RNA: a material genético para a produção de antígeno é administrado, geralmente encapsulado em lipídios catiônicos para serem expressos e reconhecidos pelo sistema imune, durante a COVID-19 ganharam mais destaque pela rapidez que podem ser desenvolvidas e produzidas para atuar em emergências de saúde pública.

- Vacinas são a medida mais eficaz de saúde pública para ~~a~~ redução de mortes por doenças preveníveis juntamente com acesso a água potável.

→ Terapia Gênica.

- promove uma alteração genética nas células do paciente visando expressar no organismo uma proteína defeituosa ou inibir alguma proteína que esteja em excesso.

- Pode ser uma terapia in-vivo, onde vetores, geralmente vetores lentivirais ou adeno-associados contendo o gene de interesse é inserido no paciente para modificar a célula alvo e corrigir a expressão defeituosa.

- terapia gênica ex-vivo: As células são removidas do paciente e modificadas fora do organismo para depois serem reintroduzidas. Um exemplo que vem ganhando muita atenção é a terapia CAR-T, onde linfócitos T são removidos e separados das demais células, modificados com regiões receptoras de antígenos quimeras (ex: CD 19) e retornam ao organismo, agora com capacidade de

reconhecer e eliminar células ou antígenos que tenham o receptor de interesse; tem aplicações como leucemia ou HIV).

As terapias genicas possuem um custo muito elevado e o acesso a população é um desafio pelo custo e logística envolvidas.

→ Anticorpos monoclonais.

- Com a tecnologia de hibridoma desenvolvida em 1975, foi possível, através da fusão de um linfócito com uma célula imortalizada gerar anticorpos a partir de um clone contra um alvo específico. Desde então inúmeros avanços foram realizados nesta área, gerando anticorpos cada vez mais sofisticados.

- Os anticorpos murinos tem limitações de segurança, pois podem gerar resposta imune contra o anticorpo, fazendo com que o medicamento perca eficiência, para contornar este problema foram gerados anticorpos quimericos com regiões humanas, humanizados, com apenas as regiões CDR específicas murinas e também anticorpos totalmente humanos, produzidos em animais transgênicos ou por modificação genética para produção em células de mamíferos.

- Além da capacidade dos anticorpos de reconhecerem inúmeras alvos específicas, novas tecnologias vêm dominando cada vez mais os processos de anticorpos, como anticorpos bi-específicos, anticorpos conjugados a medicamentos, anticorpos como proteínas de fusão, tornando infinitas as possibilidades.

→ Diagnóstico

Produtos para diagnóstico são essenciais para o controle de doenças, tomadas de decisões e estudos populacionais.

Durante a pandemia, ficou evidenciada a enorme importância dessa categoria de produtos biotecnológicos. Os produtos de diagnóstico podem ser desde testes sorológicos que identificam a contaminação pela detecção de anticorpos contra o patógeno ou testes para identificar o patógeno, ou alguma subunidade, circulante no organismo. Exemplos de testes de diagnóstico são imunossaios de tipo ELISA, biosensores que indicam a presença de um antígeno específico, PCR entre outros.

→ Proteínas de reposição.

- São proteínas que não são expressas ou são expressas incorretamente no organismo, como insulina, fatores de crescimento, enzimas.

- Originalmente eram obtidas de fontes humanas, ou de cordões, ou animais. A insulina, por exemplo era obtida a partir de pâncreas de porcos e bois. Porém, com a tecnologia de DNA recombinante tornou-se possível produzir em ambientes muito mais controlados, reduzindo diversos riscos de contaminação e reações imunológicas aos produtos. Atualmente a maioria dos produtos deste tipo são produzidos por tecnologia de DNA recombinante em biorreatores.

③ A produção em sistemas contínuos com reciclo de células apresenta diversas vantagens em relação a outros modos de operação:

- Produtividade volumétrica: A principal vantagem dos sistemas em perfusão é o ganho de produtividade volumétrica, devido às elevadas concentrações de células e renovação contínua do meio fresco com nutrientes e remoção de metabólitos. É possível produzir muito mais produto em um volume inferior comparado com batelados ou mesmo bateladas alimentadas,

- Qualidade do produto: como as condições do biorreator são mantidas constantes ao longo de todo o processo, reduz o risco de ter variações no produto, permitindo, com uma otimização adequada manter as condições ótimas ao longo de todo o processo.

- Remoção de metabólitos: Metabólitos como amônia e lactato podem acumular ao longo do processo podendo ser tóxicos para as células ou atrapalhando a produtividade. Com a perfusão o meio é continuamente renovado evitando o acúmulo.

- Concentrações celulares elevadas: Mantendo os nutrientes, hormônios, aminoácidos essenciais e demais componentes do meio em níveis ótimos ao longo do processo, aliado à remoção de metabólitos e retenção das células no sistema é possível atingir concentrações celulares muito elevadas.

- Tamanho da equipamento (Footprint): O aumento da produtividade volumétrica permite operar com biorreatores muito menores, com isso alguns controles e homogeneização são facilitados. Apesar do biorreator ser menor são necessárias equipamentas extras para armazenar o meio de cultura e o produto coletado continuamente.

- Integração com processo contínuo de purificação: Visando um processo contínuo a perfusão facilita a integração com um processo contínuo de purificação.

- Algumas desvantagens dos processos de perfusão são: Operação complexa, mais equipamentos envolvidos para retenção celular com possibilidade de falha (gubner, entopir, etc.), longos tempos de processo com maior possibilidade de contaminação, estratégias de controle mais complexas, maior dificuldade de manter suprimento de oxigênio.

Para a retenção das células no biorreator diversos equipamentos podem ser utilizados:

- ATF: A filtração tangencial é operada através de um modelo de filtração com fibras ocas, onde o fluxo é controlado por um diafragma que alterna a posição puxando e devolvendo material para o biorreator, o material coletado no exterior das fibras é coletado isento de células. Vantagens: eficiente na remoção de células do material coletado, Desvantagens: pode entupir em processos longos.

- TFF: Semelhante ao ATF, porém a filtração ocorre em um único sentido filtrando e removendo o material que se acumula no filtro continuamente, também pode entupir.

- Sedimentador laminar: Sistema sem partes móveis que atua sedimentando as células em placas inclinadas vibratórias e devolvendo as células ao biorreator. Apesar de ser um sistema mais simples não tem uma eficiência tão alta na retenção de células, permitindo que alguma parte das células se perca no produto, além disso, o tempo maior fora do biorreator pode estressar as células reduzindo a viabilidade e produtividade.

- Hidrociclones: Semelhante ao sedimentador anterior, porém utiliza o formato em cone e o fluxo giratório do meio para sedimentar as células na parede do equipamento, sendo coletados na parte inferior enquanto o fluxo de produto é coletado com poucas células na parte superior. Também não tem retenção total das células.

→ Produtos instáveis e de baixa produtividade podem se beneficiar de um processo em perfusão. Um exemplo de produto é o fator de coagulação sanguíneo (Fator IX), que por ser instável e complexo apresenta muitas vantagens em ser produzido em um sistema em perfusão, onde a produtividade volumétrica vai ser aumentada e o tempo de retenção no biorreator

é muito reduzido, permitindo que o produto seja rapidamente processado e estabilizado, evitando a degradação e perda de rendimento.

Produtos sem muitas limitações de estabilidade e produtividade também podem ter benefícios em serem produzidos em perfusão devido a todas as vantagens citadas anteriormente (proteínas recombinantes, anticorpos, etc.). Processos em perfusão não devem ser utilizados em expressões transientes, como em alguns produtos de terapia gênica, onde, por segurança, plasmídeos diferentes devem ser usados para a transfecção para reduzir o risco de vírus replicante. Para alguns produtos muito grandes como partículas pseudo víricas deve-se ter cuidado no método de retenção de células para que não haja entupimento e retenção do produto.

④ Apesar de células animais apresentarem uma taxa de consumo de oxigênio menor do que bacteriana como a *E. coli*, as células de mamíferos (CHO) não apresentam parede celular, isto faz com que elas sejam muito mais sensíveis ao cisalhamento que células bacterianas.

O controle do oxigênio dissolvido no biorreator pode ser alterado por diversas vias, aumentando a taxa de alimentação de ar, aumentando a concentração de oxigênio no ar introduzido no reator, aumentando a velocidade de rotação do impelidor ou mudando o tipo de impelidor ou a quantidade e distribuição no biorreator. ou alterando a forma de barbulamento, alterando o tamanho dos bolhas e a distribuição.

Estas variedades de mecanismos para alterar a taxa de oxigenação do biorreator ($K_L a$) permite adotar diferentes estratégias para a aeração de biorreatores em processos com *E. coli*

(que são mais robustas e apresentam maior taxa de consumo de oxigênio (OUR)) e com células CHO (mais sensíveis ao estresse e com menor OUR).

Os principais desafios para oxigenação de biorreatores com células CHO são o cisalhamento resultante da rotação do impelidor e o cisalhamento de rompimento de bolhas e formação de espuma em sistemas com borbulhamento muito vigoroso. Para evitar que estes fatores prejudiquem o cultivo, impelidores com formatos que geram menos cisalhamento ("marine" ou "elephant ear") podem ser utilizados, parâmetros como a velocidade na ponta do impelidor e potência por volume devem ser cuidadosamente avaliados durante o desenvolvimento e aumento de escala.

A estratégia de borbulhamento também deve ser otimizada para dar preferência a micro-borbulhamento ou por membranas de forma a otimizar a transferência de oxigênio e minimizar a tamanho das bolhas e formação de espuma.

Ao longo do processo, com o aumento da concentração de células e OUR, uma cascata de controle alterando todos estes fatores simultaneamente (concentração de O_2 , volume de Ar alimentado, velocidade de agitação) deve ser estabelecido para que nenhum parâmetro crítico do processo seja excedido. Estudos de fluido dinâmico computacional e simulação do processo podem ser muito úteis para auxiliar a otimização destes parâmetros e poupar recursos durante o desenvolvimento do processo.