



**THIAGO DAVID DE PAIVA**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:  
COMPARAÇÃO DO  
DESEMPENHO DOS MODOS DE  
OPERAÇÃO DE BIORREATORES  
PARA A PRODUÇÃO DE  
ANTICORPOS MONOCLONAIS**

**LAVRAS - MG  
2022**

**THIAGO DAVID DE PAIVA**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODOS DE  
OPERAÇÃO DE BIORREATORES PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Engenharia  
Química, para a obtenção do título de  
Bacharel.

Prof. Dr. Luciano Jacob Correa  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2022**

**THIAGO DAVID DE PAIVA**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODOS DE  
OPERAÇÃO DE BIORREACTORES PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS**

**LITERATURE REVIEW: COMPARISON OF PERFORMANCE OF BIOREACTORS  
OPERATION MODES FOR MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Engenharia  
Química, para a obtenção do título de  
Bacharel.

APROVADO em 12 de Abril de 2022.

Prof. DSc. Luciano Jacob Correa UFSCAR  
Prof. DSc. Gilson Campani Junior UNICAMP  
Prof. DSc. João Moreira Neto UNICAMP

Prof. Dr. Luciano Jacob Correa  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2022**

*À minha dedicada mãe Ana, por todo o apoio e conselhos ao longo da minha trajetória.*

*Ao meu irmão Victor, por me trazer a alegria de sorrir e me sentir criança novamente.*

*Ao meu pai Marcelo, por sempre ter me mostrado a importância dos estudos.*

*À minha querida vó Elisa, que sempre participou nos cuidados dos netos.*

*Ao vô Vicente, por ser o meu exemplo de uma vida longa e saudável.*

*Ao tio Elias, à tia Denise e aos meus primos Giovanni e Gabriel, por serem a família*

*que sempre me recebeu de braços abertos.*

*Ao esposo de minha mãe, Marcelo, e seu filho, Gustavo, por terem abraçado a nossa*

*família e nos apoiado desde então.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, professor Luciano Jacob Correa, pela disposição e empenho no auxílio do desenvolvimento deste trabalho.

*O mundo não se divide em pessoas  
boas e más. Todos temos luz  
e trevas dentro de nós. O  
que importa é o lado o qual  
decidimos agir. Isso é o que  
realmente somos (Sirius  
Black)*

## RESUMO

Os anticorpos monoclonais se tratam de medicamentos desenvolvidos para combater células virais no organismo humano por meio da interação com uma porção específica delas, denominada epítipo. No Brasil, correspondem a um dos seis principais grupos de produtos biológicos distinguidos pela Anvisa e consomem partes crescentes do orçamento de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS). Pretendeu-se, no trabalho desenvolvido, estudar e comparar três tipos de processamento em biorreatores de anticorpos monoclonais, que são biofármacos com importância, principalmente, na terapia contra várias patologias, como alguns tipos de câncer e a COVID-19. Objetivou-se avaliar o desempenho de cada um dos métodos de cultura, sendo eles o batelada, o semi-batelada e o contínuo, por meio da pesquisa bibliográfica em artigos científicos descrevendo os mais relevantes parâmetros de cultivo, como a densidade celular viável, a viabilidade celular e a concentração e pureza do anticorpo monoclonal produzido. Os resultados permitiram classificar o modelo batelada como o mais primitivo dentre os demais, com os menores valores das grandezas relatadas, tendo sua principal vantagem relacionada à redução do custo global do processo. Utilizando a técnica em semi-batelada, por outro lado, obteve-se um desenvolvimento celular mais acelerado e elevados dados de concentração do biofármaco resultante, contudo, a otimização dos resultados foi altamente dependente da combinação do meio de cultivo selecionado com a fonte de alimentação de nutrientes no biorreator. O modo contínuo também forneceu altos valores de concentração da proteína de interesse, sendo menores em relação aos conseguidos no modo semi-batelada, entretanto, foram atingidas maiores purezas do produto final, devido às operações de purificação proteica, que são mais sofisticadas quando comparadas às dos outros dois modelos. A desvantagem do último tipo de processamento possui relação com o aumento das despesas no processo industrial. De acordo com a revisão realizada, o modelo contínuo é o qual possui maior tendência em ser utilizado ao longo dos anos, devido às várias possibilidades de polimento do produto final.

**Palavras-chave:** Câncer. Biofármacos. Bioprocessos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Anticorpos monoclonais .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Processo geral de produção de mAbs.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Etapas <i>upstream</i> da produção de mAbs.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Etapas <i>downstream</i> e exemplo de produção de mAbs .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Modo batelada .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Modo semi-batelada.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Modo contínuo.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Comparação entre os modos de operação .....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os anticorpos monoclonais podem ser definidos como uma classe de proteínas elaboradas para atingir invasores estrangeiros ou células cancerígenas, pelo sistema imunológico. Estes biofármacos podem ser utilizados em pesquisas médicas, terapias e na medicina diagnóstica. A sigla para denominá-los é mAbs (do inglês, *monoclonal antibodies*) (SALERNO *et al.*, 2018).

Até 2019, em torno de 570 terapias com o uso dos mAbs já haviam sido avaliadas em estudos clínicos por empresas farmacêuticas e, no ano de 2020, 79 estavam em estágios finais de estudo, cerca de três vezes a quantidade de 2010. Mais recentemente, é estudada a utilização destes medicamentos na terapia contra a COVID-19, doença pandêmica (NETO, 2021).

Tendo em vista a alta demanda populacional no Brasil e no restante do mundo por métodos eficazes de terapia contra as doenças mencionadas, é justificada a importância do desenvolvimento dos biofármacos em escala industrial, buscando otimizar a sua produção.

Com este objetivo, é projetado um bioprocesso envolvendo diversas etapas. As principais fases são a seleção das células de cultivo, a escolha do tipo de processamento dos biorreatores de cultivo e de produção celular e a purificação proteica, realizada por meio de uma sequência de operações unitárias.

Dependendo do modo de operação selecionado dos biorreatores, podem ser obtidos diferentes resultados quanto à produtividade e qualidade do produto final. Isto inclui, também, a presença de impurezas e a concentração do anticorpo monoclonal obtido.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar, através de uma revisão da literatura, o desempenho dos modelos batelada, semi-batelada e contínuo, comparando-os e avaliando as suas vantagens e desvantagens, de acordo com as características do produto desejadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anticorpos monoclonais

No Brasil, os mAbs são um dos seis principais grupos de produtos biológicos distinguidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (VIDAL *et al.*, 2018).

O grupo de anticorpos estudado é capaz de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos, desencadeando respostas imunológicas. Possuem afinidade monovalente, se ligando ao epítipo, que corresponde a uma parte individual do antígeno, de uma única forma. São produzidos por um mesmo linfócito B, escolhido e replicado artificialmente, utilizando técnicas de cultura de tecidos (SALERNO *et al.*, 2018).

Os agentes são efetivos por meio de diversos mecanismos, como o bloqueio de receptores ou fatores de crescimento essenciais à célula, indução de apoptose e ligação a alvos celulares (DEL DEBBIO *et al.*, 2007).

As desvantagens dos anticorpos monoclonais estão relacionadas ao seu processo de desenvolvimento, demandando tempo e habilidades técnicas especiais, com altos custos (SALERNO *et al.*, 2018).

A classe de anticorpos abordada vem sendo empregada no tratamento de algumas doenças, principalmente, o câncer. Embora recente, a terapia à base de mAbs conseguiu sucesso considerável nos últimos anos, devido à efetividade no tratamento de doenças malignas hematológicas e de alguns tumores sólidos, em razão de sua alta especificidade (VIDAL *et al.*, 2018).

De acordo com os estudos da Sociedade Americana de Câncer, já foram aprovados mais de doze tipos de mAbs no combate de determinados tipos de câncer pela US Food and Drug Administration (SALERNO *et al.*, 2018).

Mesmo sendo tolerados, podem existir vários efeitos associados ao uso dos medicamentos, como consequência de interações com moléculas de tecidos ou da inibição, ou promoção, da atividade da molécula no tecido-alvo. Contudo, os efeitos colaterais associados aos tratamentos do câncer utilizando mAbs possuem tendência a ser menos intensos em relação às terapias quimioterápicas

(DEL DEBBIO *et al.*, 2007).

Com a finalidade de atender às demandas urgentes da pandemia da COVID-19, os cientistas se mobilizaram na procura por novos tratamentos e o reposicionamento de fármacos surgiu naturalmente como a alternativa mais segura e viável. Os anticorpos monoclonais são os mais explorados em ensaios clínicos para a referida doença (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2020).

Um exemplo que pode ser citado é o estudo do tocilizumabe, um mAbs humano recombinante, dado com o objetivo de diminuir a intensa resposta inflamatória ao vírus em pacientes graves, conhecida como tempestade de citocinas. Este problema corresponde a uma reação imunológica excessiva, progredindo de forma rápida no organismo, causando a ele muitos danos e provocando alta mortalidade (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2020).

Outro estudo possível seria o teste das cadeias de mAbs eficazes contra SARS-CoV no combate do SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19. O avanço nas plataformas de produção de proteínas terapêuticas poderia tornar o desenvolvimento de mAbs mais acessível e com menores custos (NETO, 2021).

Os anticorpos monoclonais também possuem vantagens no tratamento das doenças auto-imunes quando comparados com as terapias convencionais por se tratarem de uma terapia alvo, com especificidade, alta seletividade, sendo capazes de destruir uma célula alvo e necessitarem de doses menores (SANTOS; STURARO, 2014).

Além disso, o tratamento por meio dos biofármacos mencionados é uma alternativa nos quadros clínicos, onde não existe efetividade no controle das doenças auto-imunes com as terapias convencionais. São usados como segunda linha de tratamento (SANTOS; STURARO, 2014).

## **2.2 Processo geral de produção de mAbs**

O processamento biofarmacêutico é tipicamente dividido em duas partes: *upstream* e *downstream*. Nas fases iniciais da produção, pequenas quantidades em gramas do biofármaco são produzidas, porém, com o progresso do desenvolvimento das proteínas terapêuticas, quilogramas de produtos são obtidos

para suprir a demanda das diferentes etapas, incluindo ensaios clínicos (DIDIER; MOREIRA, 2016).

Quando a produção se torna comercial, toneladas de medicamentos podem ser necessárias para atender à meta, especialmente, no caso do uso em terapias (DIDIER; MOREIRA, 2016).

Na fabricação dos anticorpos monoclonais, células hospedeiras são utilizadas para expressá-los, sendo estes as proteínas de interesse. A escolha desta classe de células possui um grande impacto no projeto do processo, tendo como opções as leveduras, *Escherichia coli* e células de mamíferos, como as provenientes do ovário de hamster chinês (do inglês, CHO - *Chinese hamster ovary cells*) (WARNOCK; AL-RUBEAI, 2006).

A expressão das proteínas pode ocorrer de forma intracelular, como é o caso geral das células procarióticas, ou de forma extracelular, o que é observado ao empregar células de mamíferos. Na primeira ocorrência, pode ser necessária a desintegração do organismo para liberar a proteína, e, algumas vezes, o redobramento para manter a conformação apropriada (YANG *et al.*, 2019).

Utilizando células de mamíferos, pode haver o aparecimento de diferentes impurezas do processo e, também, acompanhando o produto final, como DNA e proteínas indesejadas. Sua remoção é realizada ao longo das etapas da produção (BUYEL *et al.*, 2017).

Nas operações de *upstream*, são utilizados biorreatores ou fermentadores para o cultivo das células microbianas ou de mamíferos. Nas etapas de *downstream*, aplicam-se métodos para a purificação proteica (WILSON, 2020).

A cultura das células de mamíferos vem se tornando a mais utilizada entre as demais, em razão de serem geradas proteínas que se assemelham mais às humanas. Auxiliam otimizando a atividade, reduzindo o acontecimento de eventos adversos de imunogenicidade e favorecendo o perfil farmacocinético dos anticorpos produzidos (SALERNO *et al.*, 2018).

### 2.3 Etapas *upstream* da produção de mAbs

Ao trabalhar com células de mamíferos, há tipicamente duas fases *upstream*: a inoculação acompanhada do cultivo, realizada em biorreatores de cultivo, e a produção celular, que ocorre em biorreatores de produção. Em ambas as fases, podem ser usados biorreatores operando nos modos de batelada, semi-batelada e contínuo (WARNOCK; AL-RUBEAI, 2006).

Usualmente, as companhias biofarmacêuticas optam por utilizar biorreatores em batelada ou batelada alimentada com o tamanho variando entre 5000 e 25000 L, com um tempo de operação na faixa de 10 a 17 dias. A concentração das proteínas produzidas varia, geralmente, de 1 a 5 g/L, já tendo sido atingidos resultados entre 10 e 13 g/L (YANG *et al.*, 2019).

O processamento em batelada consiste na adição do material reacional antes do início do processo, sem entrada ou saída do biorreatores, com a exceção de gases. O término do cultivo é associado ao esgotamento de substrato limitante e acúmulo do produto de interesse, tendo o conteúdo do interior do biorreator descarregado ao fim da etapa (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O modelo batelada é muito utilizado industrialmente por se tratar da maneira mais simplificada de cultivo de células. Uma vez que não há adição ou remoção de matéria durante o procedimento, a concentração de nutrientes irá decrescer gradualmente ao mesmo tempo em que a concentração do produto aumenta, desencadeando, aos poucos, a deterioração do ambiente para o crescimento celular (RODRIGUES *et al.*, 2010).

O equacionamento de cultivos em batelada é elaborado por meio do balanço de massa para as células, para o substrato e para o produto. Iniciando o procedimento pela expressão geral de balanço para as células, são apresentadas as Equações 1 e 2. O termo  $r_X$  representa a velocidade instantânea de crescimento celular,  $r_D$  equivale à velocidade instantânea de morte celular,  $V$  é o volume do biorreator e  $m_X$ , a massa de células (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\text{Saída} = \text{Entrada} + \text{Geração} - \text{Consumo} - \text{Acúmulo} \quad (1)$$

$$0 = 0 + r_X \cdot V - r_D \cdot V - \frac{dm_X}{dt} \quad (2)$$

Desenvolvendo a Equação 2, é possível escrever a velocidade instantânea de crescimento celular como o produto da taxa de crescimento específico, representada por  $\mu_X$ , pela concentração de células, expressa por X. Além disto, a velocidade instantânea de morte celular pode ser escrita como o produto da constante cinética de morte celular, simbolizada por  $k_D$ , pela concentração de células. Desta maneira, é conseguida a Equação 3 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$0 = 0 + \mu_X \cdot X \cdot V - k_D \cdot X \cdot V - \frac{dm_X}{dt} \quad (3)$$

Sendo  $m_X$  igual ao produto da concentração de células pelo volume do biorreator e tendo o segundo valor constante, obtém-se a Equação 4 por meio da manipulação da Equação 3. Após as simplificações, é obtida a Equação 5 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$0 = 0 + \mu_X \cdot X \cdot V - k_D \cdot X \cdot V - \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_X - k_D) \cdot X \quad (5)$$

Realizando os mesmos passos para o substrato, é retratada a Equação 6. A velocidade instantânea de consumo do substrato é denotada por  $r_S$ , enquanto  $m_S$  representa a massa deste componente (NELSON; COX, 2011).

$$0 = 0 + 0 - r_S \cdot V - \frac{dm_S}{dt} \quad (6)$$

Definem-se os coeficientes de rendimento com base no consumo de uma substância para a formação de outra em um intervalo de tempo para processos descontínuos. O coeficiente de rendimento de substrato em células relaciona o consumo do primeiro com a produção do segundo e é indicado por  $Y_{X/S}$ , estimado pela Equação 7. Quanto maior o seu valor, maior é o rendimento para a produção microbiana (NELSON; COX, 2011).

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{dX}{-dS} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (7)$$

De modo similar, apresenta-se o coeficiente de rendimento de substrato em produto como  $Y_{P/S}$ , calculado com o uso da Equação 8. Este dado associa o

consumo de substrato com a formação de produto. À medida em que se torna mais elevado, maior é o rendimento para a formação de produto. Expressa-se  $r_P$  como a velocidade instantânea de formação do produto (NELSON; COX, 2011).

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{dP}{-dS} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (8)$$

Retornando à Equação 6 e fazendo as substituições das Equações 7 e 8, além de expressar  $m_S$  como o produto da concentração de substrato, representada por S, pelo volume, escreve-se a Equação 9 (VOET; VOET, 2013).

$$\frac{d(S.V)}{dt} = - \left( \frac{\mu_X.X.V}{Y_{X/S}} + m_c.X.V + \frac{\mu_P.X.V}{Y_{P/S}} \right) \quad (9)$$

As três parcelas incluídas nesta expressão são referentes à formação de células; à manutenção celular, na qual está incluída um coeficiente de manutenção celular, simbolizado por  $m_c$ , multiplicado pela concentração de células e pelo volume; e à formação do produto. Fazendo a simplificação, é obtida a Equação 10, com  $\mu_P$  indicando a taxa específica de formação do produto (VOET; VOET, 2013).

$$\frac{dS}{dt} = - \left( \frac{\mu_X.X}{Y_{X/S}} + m_c.X + \frac{\mu_P.X}{Y_{P/S}} \right) \quad (10)$$

Por meio da Equação 1, é feito o mesmo procedimento para o produto, obtendo-se a Equação 11. Utiliza-se o símbolo  $r_{DP}$  para fazer referência à velocidade instantânea de degradação do produto, enquanto  $m_P$  denota a massa deste componente (VOET; VOET, 2013).

$$0 = 0 + r_P.V - r_{DP}.V - \frac{dm_P}{dt} \quad (11)$$

Substituindo  $m_P$  pela multiplicação da concentração do produto, apresentada por P, pelo volume e, também, trocando  $r_{DP}$  pelo produto da constante cinética de degradação, denotada por  $k_{DP}$ , pelo volume, obtém-se a Equação 12, após a simplificação (BLANCH, 1997).

$$\frac{dP}{dt} = r_P - k_{DP}.P \quad (12)$$

O tempo de cultivo em batelada, indicado por  $t_b$ , pode ser obtido da

integração da Equação 5, de acordo com a Equação 13. Para representar a concentração inicial de células, é utilizado o elemento  $X_0$  (BLANCH, 1997).

$$t_b = \int_{X_0}^X \frac{dX}{(\mu_X - k_D).X} \quad (13)$$

Em um processo batelada industrial, é necessário prever o tempo inoperante do processo, equivalente a  $t_i$ , o qual inclui os tempos de enchimento e esvaziamento do biorreator, bem como o tempo de limpeza e assepsia. Deve-se, também, adicionar o tempo da fase de adaptação das células ao meio, que é correspondente ao tempo da fase lag, indicado por  $t_{lag}$ . Somando os termos, é obtida a Equação 14 para estimar o tempo total do procedimento (BLANCH, 1997).

$$t_{total} = t_{lag} + t_b + t_i \quad (14)$$

Ao longo do processo, as células alcançam uma determinada densidade e concentração do produto. A densidade máxima possível de ser atingida é ditada pela limitação de nutrientes, como glucose e glutamina; inibição do produto residual ou pelo cobrimento total da superfície disponível para o crescimento celular. O valor desta grandeza é de, geralmente,  $10^6$  células/mL (RODRIGUES *et al.*, 2010).

O tempo na cultura em batelada é baseado na cinética de formação do produto, em outras palavras, se a formação de produto é associada, ou não, ao crescimento. Na primeira circunstância, a produtividade específica aumenta com o incremento da taxa de crescimento e cessa quando a cultura entra no estado estacionário. Já no segundo caso, o acréscimo da fabricação de produto é favorecido pela diminuição da taxa de crescimento ou ocorre apenas na fase estacionária (DORAN, 2013).

A qualidade do produto também deve ser considerada no momento em que se estipula o tempo de colheita no processamento em batelada, em razão de a mudança gradativa da composição do meio de cultura poder afetar a qualidade do produto sintetizado previamente (DORAN, 2013).

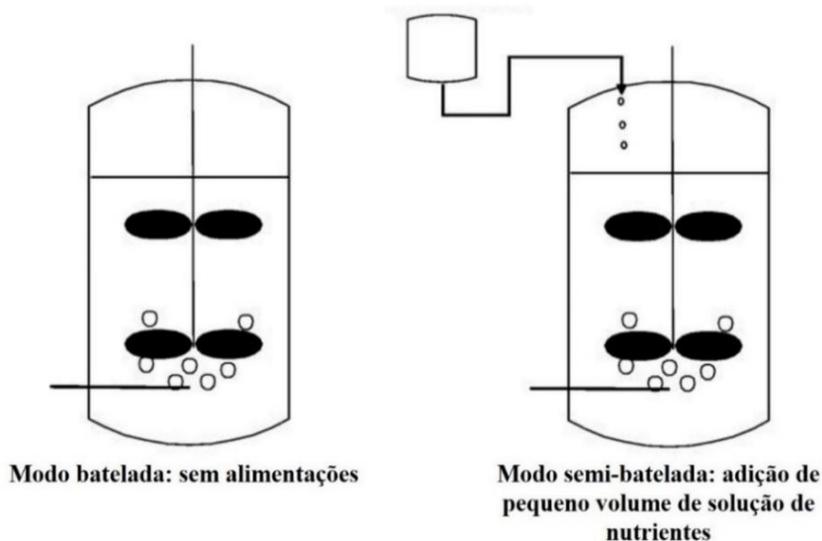
No caso do modelo semi-batelada, uma alimentação controlada de

nutrientes é fornecida ao biorreator durante o cultivo, com a finalidade de aumentar a longevidade da cultura, o rendimento celular e a produtividade. Ao fim do processo, os materiais são descarregados (DEAN; REDDY, 2013).

Entre os métodos utilizados de provimento de nutrientes, incluem-se a mudança parcial do meio de cultura em intervalos regulares e a adição de nutritivos específicos nos estágios críticos da produção. É necessário identificar os nutrientes limitantes para que o aumento da concentração de um nutricional específico seja feito de forma correta (KAPPATOU *et al.*, 2017).

O processamento em semi-batelada é bastante adotado devido à facilidade de operação e à alta produtividade volumétrica. Uma desvantagem deste sistema é o acúmulo de produtos residuais, podendo atingir concentrações responsáveis pela inibição do crescimento celular (KAPPATOU *et al.*, 2017). A Figura 1 ilustra os modelos batelada e semi-batelada.

Figura 1 – Representação de biorreatores operando em batelada e semi-batelada.



Fonte: Adaptado de BIRCH; RACHER (2006).

O equacionamento para o sistema em semi-batelada é bastante similar ao batelada, exceto pelo fato de existir uma alimentação e, desta forma, o volume do biorreator é variável. O desenvolvimento das equações também é feito para as células, o substrato e o produto. A Equação 4 pode ser utilizada inicialmente para expressar o balanço para as células, sendo que o termo referente à variação da

massa de células com o tempo deve ser escrito de acordo com a Equação 15 (BAILEY, 1996).

$$\frac{d(X.V)}{dt} = X \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dX}{dt} = \mu_X \cdot X \cdot V - k_d \cdot X \cdot V \quad (15)$$

A variação do volume com o tempo pode ser definida como a vazão volumétrica, simbolizada por F. Fazendo-se as manipulações da Equação 15, é obtida a Equação 16 (BAILEY, 1996).

$$\frac{dX}{dt} = \left( \mu_X - k_D - \frac{F}{V} \right) \cdot X \quad (16)$$

A razão da vazão volumétrica pelo volume do biorreator é denotada como a taxa de diluição, cuja representação é feita por D. Desta maneira, a Equação 16 se torna a Equação 17 (BAILEY, 1996).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_X - k_D - D) \cdot X \quad (17)$$

Quando a vazão é constante, o volume do meio varia linearmente com o tempo, de acordo com a Equação 18. A Equação 19 expressa a taxa de diluição considerando a definição feita na equação anterior (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$V = V_i + F \cdot t \quad (18)$$

$$D = \frac{F}{V} = \frac{F}{V_i + F \cdot t} \quad (19)$$

Executando o balanço de massa para o substrato no modelo em questão, é escrita a Equação 20.  $S_E$  simboliza a concentração do substrato na solução alimentada. Após a manipulação, obtém-se a Equação 21 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$0 = F \cdot S_E + 0 - r_S \cdot V - \frac{dm_S}{dt} \quad (20)$$

$$\frac{dm_S}{dt} = \frac{d(S.V)}{dt} = F \cdot S_E - r_S \cdot V \quad (21)$$

Dividindo a Equação 21 pelo volume, é conseguida a Equação 22, sendo que tanto o substrato quanto o volume variam com o tempo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_E - S) - \left( \frac{\mu_X \cdot X}{Y_{X/S}} + m_c \cdot X + \frac{\mu_P \cdot X}{Y_{P/S}} \right) \quad (22)$$

Ao realizar o balanço de massa para o produto no processamento em semi-batelada, é desenvolvida a Equação 11. A Equação 23 apresenta como deve ser expressa a variação da massa do produto com o tempo. A Equação 24 corresponde à equação geral da variação da concentração do produto com o tempo, arranjada após as simplificações (NELSON; COX, 2011).

$$\frac{dm_P}{dt} = \frac{d(P \cdot V)}{dt} = P \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dP}{dt} \quad (23)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P \cdot X - k_{DP} \cdot P - D \cdot P \quad (24)$$

Por último, o modo contínuo de operação consiste em um sistema aberto associado a uma alimentação uniforme do meio, com o descarregamento dos nutrientes gastos.

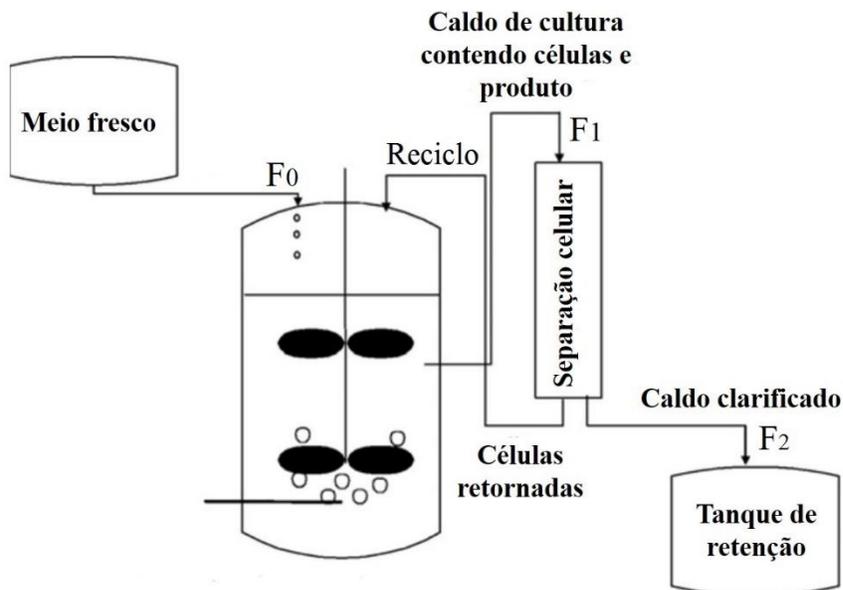
Este método permite a continuidade do crescimento celular por períodos mais longos quando comparados aos dos processamentos em batelada e semi-batelada. Há ainda dois tipos de configurações do modelo contínuo, correspondendo à cultura em quimiostato e em perfusão (STEINEBACH *et al.*, 2017).

No cultivo no método quimiostato, as células são continuamente removidas do biorreator com o meio deteriorado. O crescimento é controlado pela vazão de nutrientes, expressa como a taxa de diluição. Quando a taxa de crescimento celular se iguala à taxa mencionada anteriormente, é atingido um estado de equilíbrio estacionário, no qual as concentrações de células, nutrientes e produtos são constantes (RODRIGUES *et al.*, 2010).

No caso da cultura em perfusão, as células saem do biorreator e são retidas nas unidades de separação fora dele (reciclo externo) ou no seu interior (reciclo interno). O tanque recebe uma alimentação contínua do meio fresco enquanto o meio gasto, contendo produtos, é constantemente removido. Contudo, a biomassa celular é reciclada e devolvida à cultura antes da remoção do meio consumido (FONSECA, 2018).

A adoção desta configuração resulta em alta longevidade, elevada densidade celular (superior a  $10^7$  células/mL) e, conseqüentemente, alta produtividade volumétrica. Além disto, o tempo de residência no meio de cultura é diminuído, fornecendo melhor qualidade do produto final (FONSECA, 2018). A Figura 2 ilustra o sistema contínuo em perfusão.

Figura 2 – Representação da configuração de perfusão.



Fonte: Adaptado de BIRCH; RACHER (2006).

O desenvolvimento das equações para o modo contínuo de operação é feito com base na configuração em perfusão. São repetidos os balanços de massa para as células, substrato e produto.

Considerando densidades constantes e iguais em todas as correntes do processo, tem-se o regime permanente para uma massa total, tanto no biorreator quanto na sua unidade de separação (NELSON; COX, 2011).

Desta forma, para manter volumes constantes no biorreator e na unidade de separação, a vazão volumétrica de entrada do meio fresco no reservatório, representada por  $F_0$ , deve ser igual a vazão de caldo clarificado na saída da unidade de separação, simbolizada por  $F_2$ . Isto está representado na Equação 25 (NELSON; COX, 2011).

$$F_0 = F_2 \quad (25)$$

Além da proposição citada, também é necessário que a vazão de saída do biorreator, escrita como  $F_1$ , seja equivalente à soma da vazão de caldo clarificado com a vazão de células retornadas, utilizando  $F_3$  para fazer referência à última. A Equação 26 é empregada para expressar o ditado (VOET; VOET, 2013).

$$F_1 = F_2 + F_3 \quad (26)$$

Neste tipo de cultivo, são definidos dois parâmetros importantes para o sistema. O primeiro deles é a razão de reciclo,  $R$ , estimada pela Equação 27. O segundo corresponde ao fator de concentração,  $B$ , calculado pela Equação 28. Os símbolos  $X_1$  e  $X_3$  correspondem, respectivamente, à concentração de células na corrente de saída do biorreator e à concentração celular na corrente de saída da unidade de separação (VOET; VOET, 2013).

$$R = \frac{F_3}{F_2} = \frac{F_3}{F_0} \quad (27)$$

$$B = \frac{X_3}{X_1} \quad (28)$$

Desta maneira, podem também ser escritas as Equações 29, 30 e 31.

$$F_3 = R \cdot F_0 \quad (29)$$

$$F_1 = (1 + R) \cdot F_0 \quad (30)$$

$$X_3 = X_1 \cdot B \quad (31)$$

Executando o balanço de massa para as células, é escrita a Equação 32. Fazendo as substituições de  $m_X$ ,  $r_X$  e  $r_D$  por expressões multiplicativas conforme foi feito nos modelos anteriores e também das Equações 29, 30 e 31, é obtida a Equação 33 (VOET; VOET, 2013).

$$F_1 \cdot X_1 = F_3 \cdot X_3 + r_X \cdot V - r_D \cdot V - \frac{dm_X}{dt} \quad (32)$$

$$\left(\frac{dX_1}{dt}\right) \cdot V = (\mu_X - k_D) \cdot X_1 \cdot V - F_0 \cdot X_1 \cdot (1 - R(1 - B)) \quad (33)$$

Sendo a taxa de diluição equivalente, neste caso, à razão da vazão de alimentação ( $F_0$ ) pelo volume, é simplificada a Equação 33 conseguindo a Equação 34.

$$\frac{dX_1}{dt} = (\mu_X - k_D) \cdot X_1 - D \cdot X_1 \cdot (1 - R(1 - B)) \quad (34)$$

Considerando o estado estacionário, a Equação 34 é resumida à Equação 35 (BLANCH, 1997).

$$D = \frac{\mu_X - k_D}{1 + R(1 - B)} \quad (35)$$

Realizando o balanço de massa para o substrato, escreve-se a Equação 36 (BLANCH, 1997).

$$F_1 \cdot S_1 = F_0 \cdot S_0 + F_3 \cdot S_3 - r_S \cdot V - \frac{dm_S}{dt} \quad (36)$$

Fazendo as substituições e simplificações na Equação 36, obtém-se a Equação 37 (BLANCH, 1997).

$$\frac{dS_1}{dt} = D \cdot (S_0 - S_1) - \left( \frac{\mu_X \cdot X_1}{Y_{X/S}} + m_C \cdot X + \frac{\mu_P \cdot X_1}{Y_{P/S}} \right) \quad (37)$$

No regime estacionário, a Equação 37 se torna a Equação 38 (BLANCH, 1997).

$$D \cdot (S_0 - S_1) = \left( \frac{\mu_X \cdot X_1}{Y_{X/S}} + m_C \cdot X + \frac{\mu_P \cdot X_1}{Y_{P/S}} \right) \quad (38)$$

Escrevendo o balanço de massa para o produto, define-se a Equação 39 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$F_1 \cdot P_1 = F_3 \cdot P_3 + r_P \cdot V - r_{DP} \cdot V - \frac{dm_P}{dt} \quad (39)$$

Por meio das recolocações e simplificações feitas na Equação 39, é conseguida a Equação 40 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\frac{dP_1}{dt} = \mu_P \cdot X_1 - P_1(D + k_{DP}) \quad (40)$$

Considerando o estado estacionário, a Equação 40 pode ser escrita como a Equação 41 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$D \cdot P_1 = \mu_P \cdot X - k_{DP} \cdot P_1 \quad (41)$$

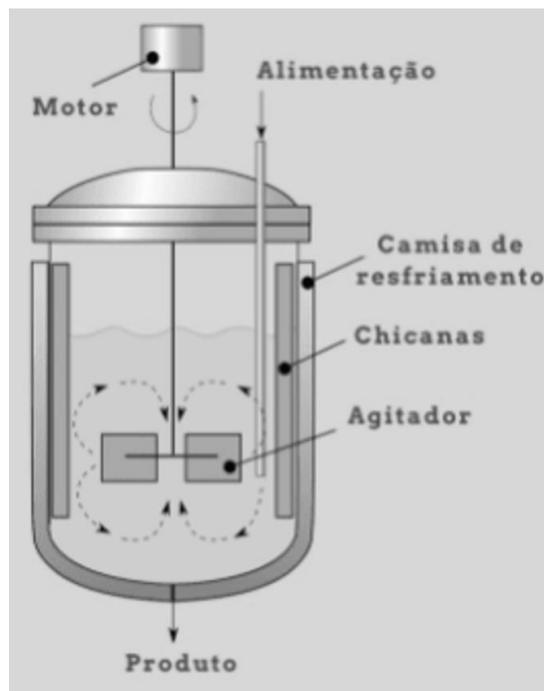
Os tipos de biorreatores empregados no cultivo celular incluem o de tanque agitado, coluna de bolhas, *air lift*, fluxo pistonado, leito fixo com células imobilizadas, leito fluidizado com células imobilizadas, membrana plana e fibra

oca (DORAN, 2013).

O biorreator de tanque agitado é o mais utilizado industrialmente, consistindo num cilindro com agitação mecânica no qual são comuns relações de diâmetro-altura de 2:1 ou 3:1, podendo ser aplicado tanto para enzimas livres quanto imobilizadas. Na maioria das vezes, somente 70-80% do volume do tanque é preenchido com o líquido, com o objetivo de permitir o desprendimento dos gases produzidos durante o processo (DORAN, 2013).

A classe dos recipientes apresentada também pode ser chamada de biorreatores de mistura completa (Figura 3), sendo a sua capacidade muito variável e dependente do tipo de processo no qual estão sendo utilizados. Os tanques são providos de sistemas de controle de pH, temperatura, nutrientes e de oxigênio dissolvido (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Figura 3 – Esquema do biorreator mecanicamente agitado.



Fonte: KLASENER (2022).

Após o cultivo e a produção celular realizados nos biorreatores selecionados no projeto do bioprocesso, dá-se início às fases *downstream*, que consistem em um conjunto de operações unitárias desenvolvidas com o objetivo de obter um maior grau de pureza do produto final.

## 2.4 Etapas *downstream* e exemplo de produção de mAbs

A primeira fase *downstream* é, costumeiramente, a clarificação. Nesta etapa, são realizadas, principalmente, operações de centrifugação e/ou filtração. Nos processamentos em batelada e semi-batelada, usam-se, geralmente, centrífugas seguidas por filtros, enquanto no modo de operação contínuo estes equipamentos podem ser incluídos no biorreator (BUYEL *et al.*, 2017).

A combinação ótima de filtros em termos de capacidade, clarificação e recuperação do produto deve ser determinada de acordo com a distribuição de tamanho de partículas. Podem, também, ser acrescentadas a floculação e a precipitação na etapa de clarificação para reduzir as impurezas (BUYEL *et al.*, 2017).

Após a clarificação, há a etapa de primeira captura, na qual se utiliza a cromatografia com a proteína A para a remoção de DNA de células hospedeiras e outras impurezas. Esta fase consiste em passar a mistura em uma coluna cromatográfica de leito empacotado contendo a proteína A, que consiste em uma substância constituinte da parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*, possuindo alta seletividade e estabilidade (HINTON-SHELEY, 2022).

Com base no procedimento anterior, ocorrem interações biológicas específicas entre as moléculas da proteína A e as impurezas da mistura, refinando os anticorpos monoclonais produzidos (HINTON-SHELEY, 2022).

Na produção em larga escala dos mAbs, diferentes métodos de primeira captura podem ser empregados. Um exemplo possível de ser mencionado é a cromatografia de contracorrente periódica, a qual consiste em realizar a etapa de cromatografia de afinidade de um modo quase contínuo, sendo adotada em várias companhias biofarmacêuticas (YANG *et al.*, 2019).

A etapa sucessiva da primeira captura é a operação unitária de inativação viral. Nela, ocorre a exposição do conteúdo diluído na fase anterior a baixas condições de pH com a finalidade de desativar os vírus presentes. Valores de pH em torno de 3,8 são suficientes para o atingimento do objetivo neste estágio do processo, sendo uma condição estável para os mAbs produzidos (STEINEBACH

*et al.*, 2017).

No processamento em batelada, a execução deste procedimento pode ser feita utilizando tanques de mistura para a incubação e, então, neutralização. No caso do processamento contínuo, a inativação viral pode ocorrer por intermédio de diversos métodos, como pelo uso de tanques dispostos na configuração em paralelo ou em série, reator tubular reto ou reator de fluxo empistonado (YANG *et al.*, 2019).

Geralmente, após a inativação, são realizadas etapas adicionais de purificação, que somadas resultam no polimento. Podem ser exemplificadas pela cromatografia de troca iônica, pela cromatografia de interações hidrofóbicas, ou uma combinação de ambas (YANG *et al.*, 2019).

O processo de polimento no modo de operação em batelada é tipicamente executado no modo de ligação/eluição, no qual os elementos da amostra são separados por absorção e direcionados a diferentes pontos de uma coluna, ao longo do comprimento dos tubos. As substâncias presentes nas amostras são distinguidas pelo seu tempo de retenção, ou seja, o tempo necessário para a passagem pela coluna. Outro modo possível é o de fluência, em que a coluna é lavada com o solvente (ASHBY, 2022).

Já no modo contínuo, o polimento pode ser executado aplicando as técnicas mencionadas em multi-coluna ou métodos mais diferenciados, como a cromatografia em leito móvel simulado (do inglês, SMB - *Simulated moving bed*). Este mecanismo apresenta como vantagem o investimento reduzido e é continuamente aplicado a misturas binárias que apresentam baixo fator de separação (AZEVEDO; RODRIGUES, 2006).

A etapa final do processamento do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) corresponde à formulação, incluindo a concentração proteica (JUNGBAUER, 2013).

No modelo batelada, a formulação é feita tradicionalmente por meio das operações de ultrafiltração e diafiltração (FUSATI, 2022).

A ultrafiltração é uma variedade de filtração destinada a remover sólidos

físicos do fluido de trabalho, passando-o numa membrana semi-permeável. Desta maneira, as partículas são capturadas e descartadas (FUSATI, 2022).

A diafiltração pode ser definida como uma forma de separação utilizando membranas com o objetivo de purificar um soluto de uma determinada solução em que os contaminantes possuem dimensões menores quando comparadas às do soluto de interesse (GOMES *et al.*, 2012).

Abordando o modelo contínuo, a formulação pode ser realizada por intermédio de diferentes métodos, como a diafiltração em cascata, a diafiltração contracorrente em múltiplos estágios e a cristalização (JUNGBAUER, 2013).

A Figura 4 ilustra quatro possíveis rotas de produção de anticorpos monoclonais, utilizando diferentes combinações de operações unitárias em cada um das etapas, tendo os equipamentos descritos conforme a legenda. No processo A, foram escolhidas como as células hospedeiras as provenientes do ovário de hamster chinês, sendo incluídos biorreatores para o cultivo na fase *upstream* (KELLEY, 2009).

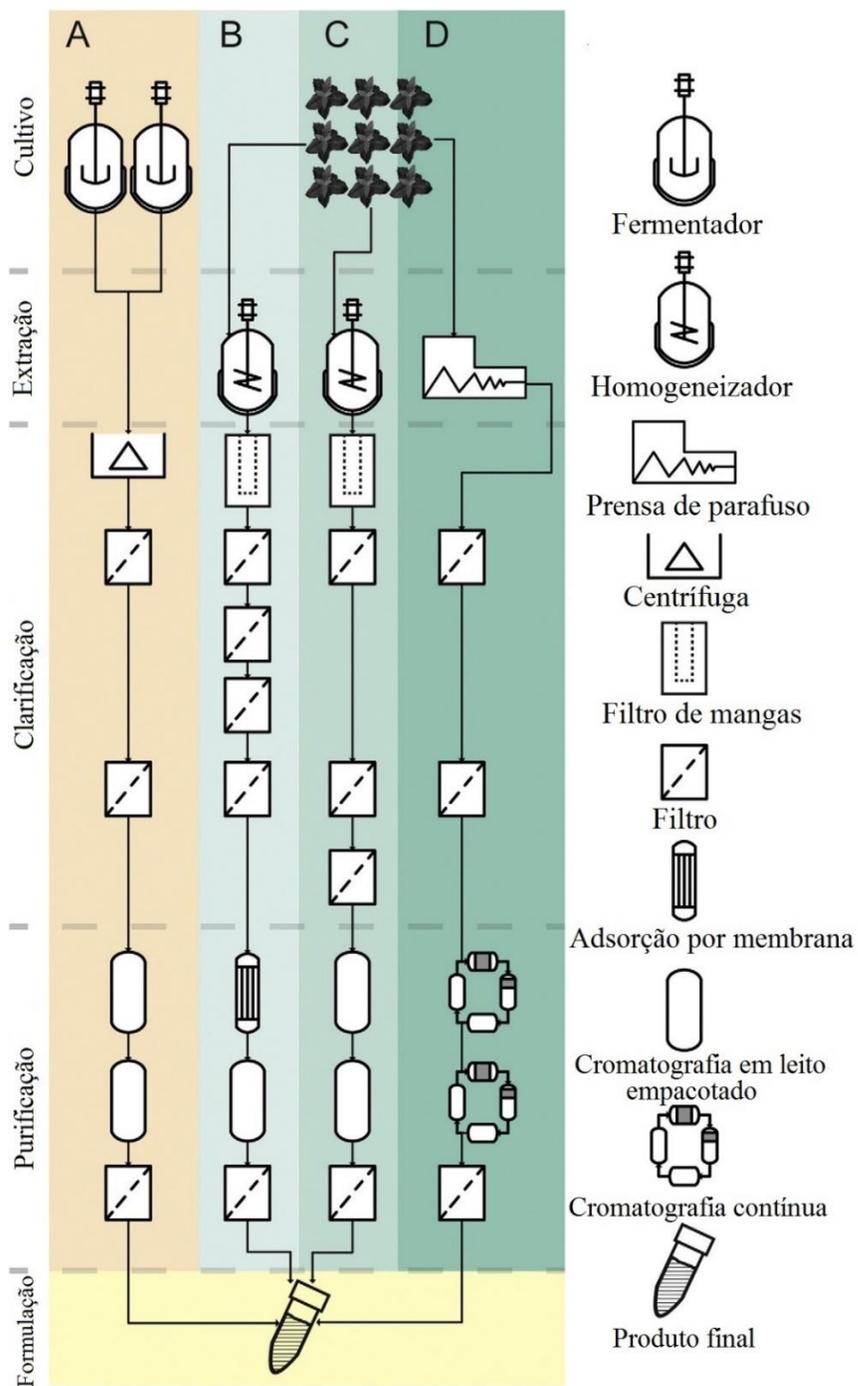
Nos métodos B, C e D, a matéria-prima selecionada foi a planta utilizada no processamento do tabaco, a qual possui o nome científico *Nicotina tabacum* (PLANTAMED, 2021).

No modo B, usou-se um homogeneizador para a extração das células e foi selecionado um filtro de mangas e um arranjo de filtros na etapa de clarificação. Para a purificação, foi usada uma coluna de adsorção por membrana, uma coluna de cromatografia em leito empacotado e um filtro (MA *et al.*, 2015).

Comparando o sistema C com o B, a quantidade de filtros empregados na clarificação foi reduzida e foram utilizadas duas colunas cromatográficas em leito empacotado, na etapa de purificação (BUYEL *et al.*, 2017).

Já no processamento D, foi escolhida uma prensa de parafuso para realizar a extração e dois filtros para a clarificação. Na purificação, foram feitas duas associações de colunas cromatográficas de maneira a possibilitar a cromatografia da mistura no modo contínuo, seguidas por um filtro (BUYEL *et al.*, 2017).

Figura 4 – Comparação esquemática de quatro processos de produção dos mAbs.



Fonte: Adaptado de BUYEL *et al.* (2017).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar a comparação do desempenho dos modos de operação em batelada, semi-batelada e contínuo, foram analisados dois artigos científicos a respeito de cada um deles, conforme é descrito nos próximos subitens. Em todos os trabalhos apresentados, foram selecionadas as células provenientes do ovário de hamster chinês (CHO) para a obtenção dos anticorpos monoclonais.

Os anticorpos produzidos em todos os processos foram dependentes das tecnologias genéticas utilizadas na sua expressão, justificando, em alguns dos casos, o conseguinte de biofármacos diferentes.

#### 3.1 Modo batelada

O primeiro artigo científico avaliado descrevendo o modelo batelada possui o título “*Insight into the roles of hypoxanthine and thymidine on cultivating antibody-producing CHO cells: cell growth, antibody production and long-term stability*”, tendo sido estruturado por CHEN *et al.* (2011) e publicado na revista científica “*Applied Microbiology and Biotechnology*”.

O anticorpo monoclonal expresso pelas células se tratava de uma proteína quimérica anti-humana CD20.

O meio de cultura preparado para o cultivo celular foi composto, principalmente, por uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas. Também foram adicionados insulina recombinante, etanolamina, selenato de sódio, lipídeos e bicarbonato de sódio.

As células foram inicialmente posicionadas em um agitador rotatório com uma taxa de agitação de 50 rpm em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. A cada dois dias, foram adicionadas novas células a uma densidade celular inicial de 3.10<sup>5</sup> células/mL.

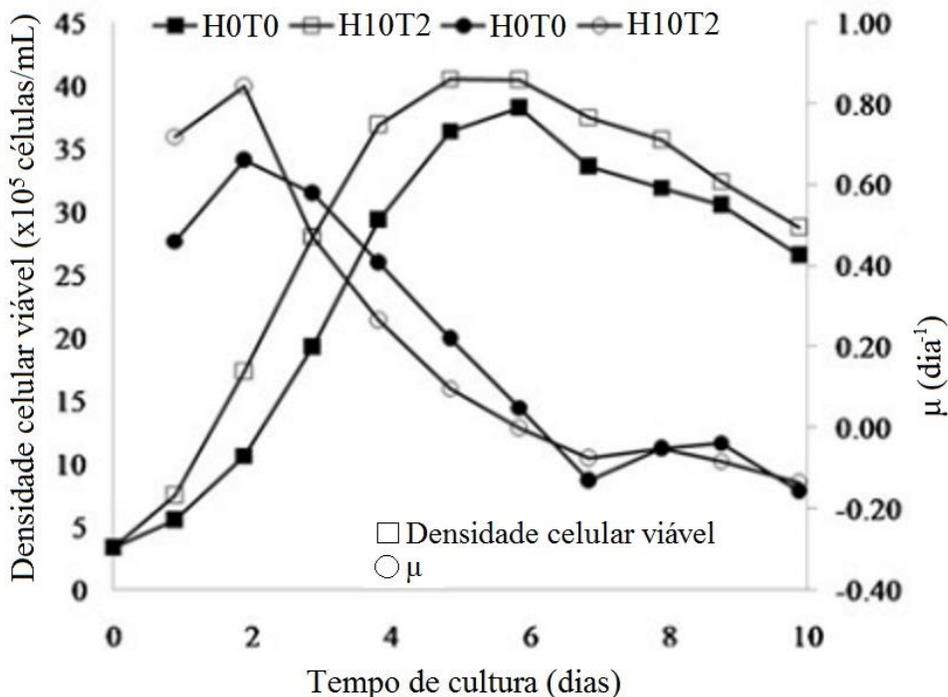
A cultura de suspensão em batelada foi, então, executada em frascos rotatórios com um volume de trabalho de 60 mL. As células em crescimento exponencial foram coletadas por meio de uma centrifugação, sendo submetidas a rotação de 1200 rpm por 10 minutos.

A próxima etapa foi fazer a inoculação das células, com uma densidade celular inicial de  $3$  a  $4 \cdot 10^5$  células/mL, no meio de cultura preparado. As amostras de células em suspensão foram coletadas a cada 24 horas e os resíduos sobrenadantes, depois da centrifugação, foram coletados em alíquota e mantidos congelados a  $-20^\circ\text{C}$ .

O cultivo foi executado em dois diferentes de meios de cultura, sendo o primeiro aquele preparado inicialmente, denotado como meio H0T0, e o segundo, o meio H0T0 com a adição de hipoxantina e timidina, simbolizado como meio H10T2.

A Figura 5 ilustra as curvas de densidade celular viável construídas, que representam a quantidade de células vivas por unidade de volume, e, também, a taxa de crescimento específico, em  $\text{dia}^{-1}$ , para os meios de cultura trabalhados.

Figura 5 – Curvas de densidade celular viável e taxa de crescimento específico.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.* (2011).

De acordo com os dados da Figura 5, foi atingido um valor ligeiramente maior de densidade celular viável máxima ao utilizar o meio H10T2, de aproximadamente  $40 \cdot 10^5$  células/mL, enquanto usando o meio H0T0 o resultado

foi em torno de  $38.10^5$  células/mL.

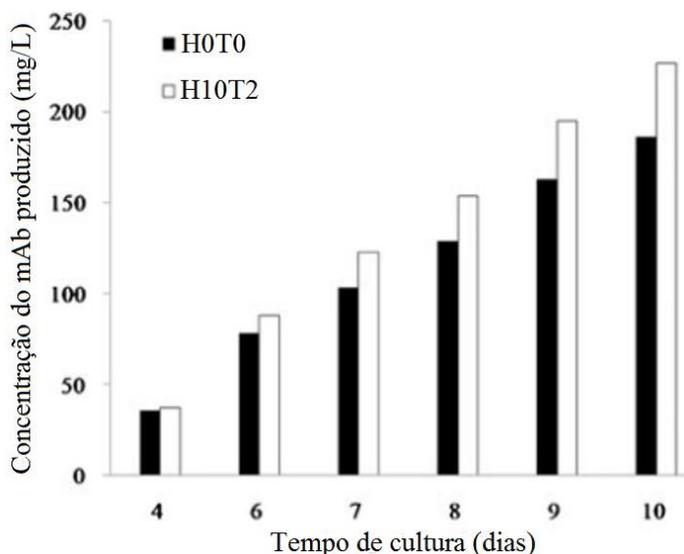
A fase exponencial de crescimento celular ocorreu até pouco depois do quarto dia de cultivo para ambos os meios de cultura empregados, sendo possível observar maiores números de densidade celular viável quando aplicado o meio H10T2. Foi observada a fase estacionária entre o período mencionado e o sexto dia do processo, sendo iguais as taxas de crescimento e morte celular.

Do sexto dia de cultivo em diante, foi observada a fase de declínio, tendo a taxa de mortalidade maior quando comparada com a taxa de crescimento.

O valor máximo da taxa de crescimento específico foi, também, superior quando manuseado o meio H10T2, possuindo o valor de  $0,85 \text{ dia}^{-1}$ , ao passo que o dado desta grandeza na operação com o meio H0T0 resultou em  $0,65 \text{ dia}^{-1}$ .

Desta maneira, compreendeu-se o benefício ao crescimento celular por meio da adição de hipoxantina e timidina ao meio H0T0, tornando maior a disponibilidade de nutrientes e indicando a alta afinidade da classe de células com as substâncias.

Figura 6 – Dados de concentração do mAb produzido.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.* (2011).

A Figura 6 ilustra a concentração do anticorpo monoclonal produzido ao longo do tempo, em mg/L, para ambos os meios de cultura.

Foi possível analisar, em concordância com os gráficos de barras construídos, que a concentração da proteína CD20 foi maior quando adotado o meio H10T2, durante todos os 10 dias de cultivo celular. Neste caso, o ápice alcançado foi de 230 mg/L, no último dia do processo.

Com relação ao meio H0T0, verificou-se o apogeu de 190 mg/L da concentração de CD20 produzida, no décimo dia de cultura.

Baseando-se no constatado, foi entendido o acréscimo da hipoxantina e da timidina no meio H0T0 como uma maneira de favorecer a produção do mAb, sendo o esperado em virtude de haver uma maior quantidade de células desenvolvidas de forma adequada para a expressão do produto de interesse.

O segundo artigo científico discutindo a respeito do modelo batelada tem o título “*Monitoring proteolysis of recombinant human interferon- $\gamma$  during batch culture of Chinese hamster ovary cells*” e foi confeccionado por GOLDMAN *et al.* (1997) e publicado na revista “*Cytotechnology*”.

O anticorpo monoclonal produzido tratava-se de um interferon-gama, uma citocina envolvida na regulação das respostas imunológicas e inflamatórias, possuindo alguns efeitos antivirais e antitumorais (CANHAS, 2022).

As culturas foram inoculadas e semeadas em um biorreator agitado mecanicamente de volume de 15 L, sendo o volume de trabalho igual a 12 L. Foi mantida a condição de oxigênio dissolvido, com 40% de saturação do ar por meio de um borrifador de ar. O pH foi estabelecido em 7,2 adicionando CO<sub>2</sub> e NaOH a 0,1 M. A temperatura foi regulada em 37°C.

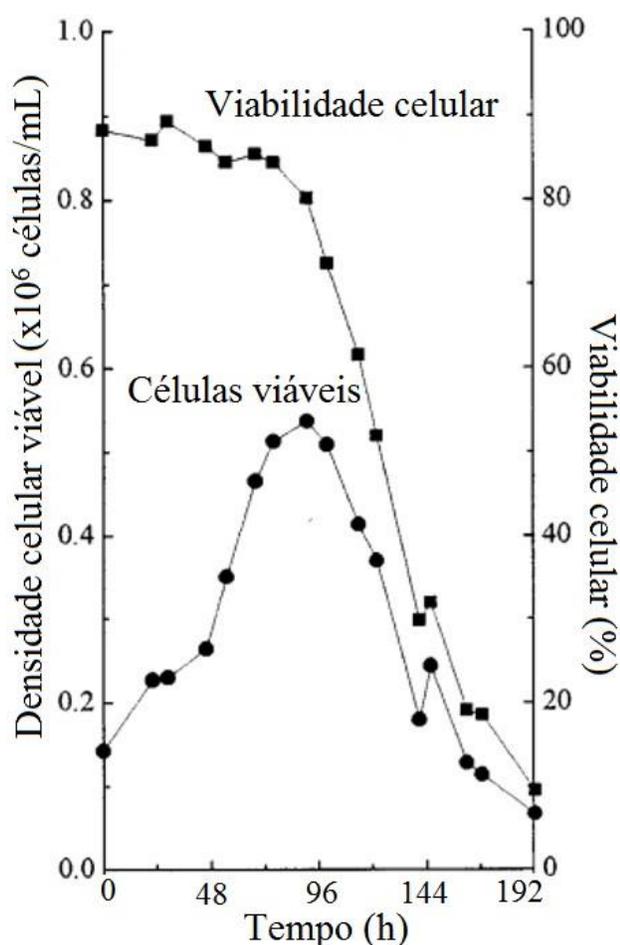
As amostras possuíam um volume variando entre 0,5 e 1,5 L, sendo removidas duas vezes ao dia para análise. Os sobrenadantes da cultura foram estocados a -80°C após a remoção das células por centrifugação, com uma rotação de 1000 rpm por 10 minutos.

As células atingiram uma densidade celular viável máxima de  $0,54 \cdot 10^6$  células/mL após 95 horas de cultura, tempo até o qual foi visualizada a fase exponencial de crescimento.

A viabilidade celular corresponde à razão entre a quantidade de células viáveis e o número total de células. No trabalho, este dado se manteve acima de 80% até as 72 horas de cultivo, com queda acentuada após o atingimento dos picos de densidade celular.

A fase de morte celular foi registrada do período de 95 a 192 horas de cultura, ocasionando a diminuição da densidade celular viável e da viabilidade celular devido ao aumento da quantidade de células mortas. Os dados estão representados na Figura 7.

Figura 7 – Curvas de densidade celular viável e viabilidade celular.

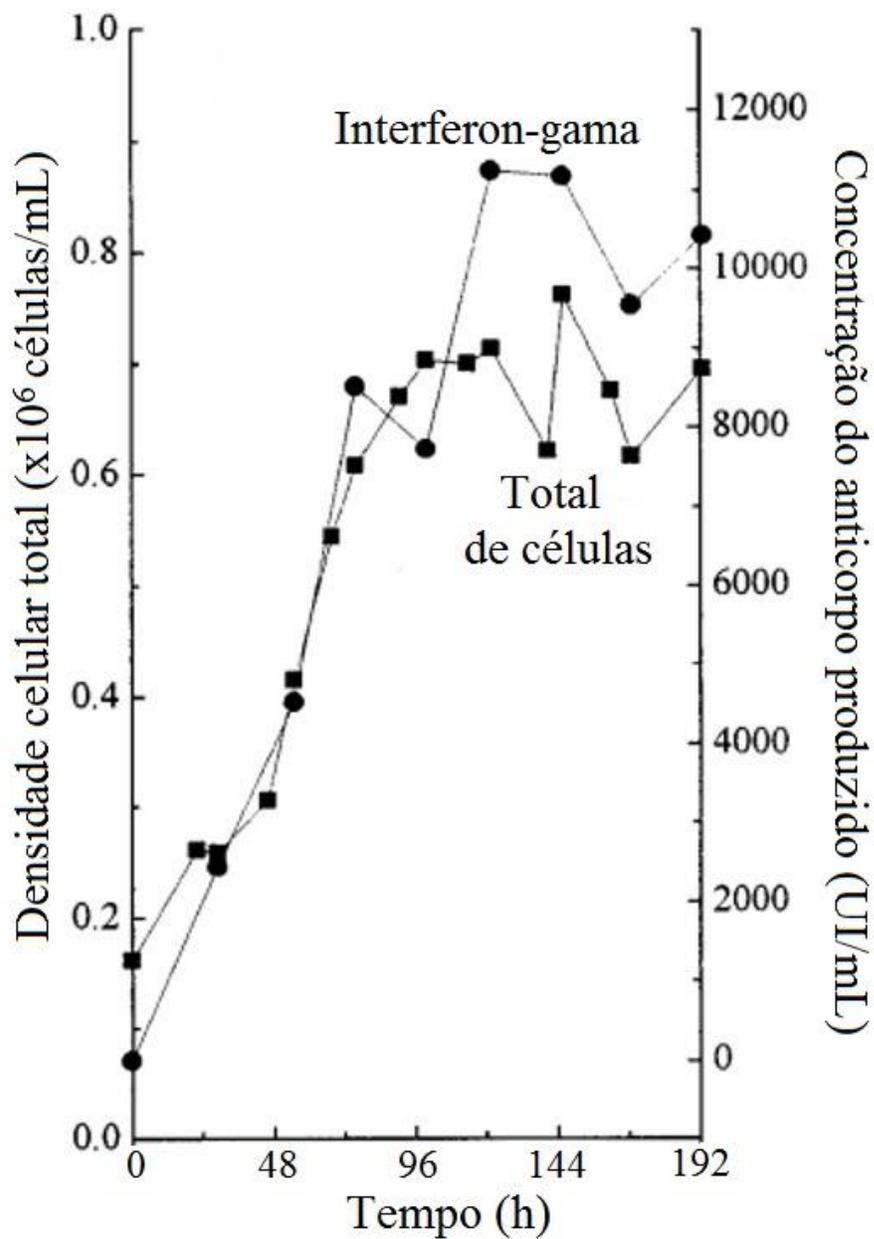


Fonte: Adaptado de GOLDMAN *et al.* (1997).

A Figura 8 apresenta as curvas de densidade celular total e de concentração do anticorpo produzido, com o decorrer do tempo de cultura. A unidade de concentração descrita é UI/mL, utilizada para representar a

quantidade de unidades do biofármaco produzido por mililitro de líquido.

Figura 8 – Curvas de concentração do interferon-gama e de densidade celular total.



Fonte: Adaptado de GOLDMAN *et al.* (1997).

Analisando a Figura 7, foi determinada a concentração máxima do interferon-gama produzido como sendo igual a 11200 UI/mL e a densidade celular total máxima, equivalente a  $0,77 \cdot 10^6$  células/mL.

### 3.2 Modo semi-batelada

O primeiro artigo científico selecionado tratando do modelo semi-batelada é intitulado ‘*Development of a chemically defined platform fed-batch culture media for monoclonal antibody-producing CHO cell lines with optimized choline content*’ e foi desenvolvido por KUWAE *et al.* (2018) e publicado na revista ‘*Cytotechnology*’.

No estudo, foi usada uma linhagem da classe de células escolhida para expressar o mAb. O anticorpo se tratava de uma Imunoglobulina G humana.

O meio de cultura decidido para o desenvolvimento celular na linhagem foi quimicamente definido para o crescimento das CHO e para a expressão proteica na suspensão de forma otimizada, sendo desprovido de proteínas e soros. A alimentação de nutrientes fornecida aos biorreatores foi composta por glicose, aminoácidos, vitaminas, minerais e colina.

Na etapa inicial do processo, o cultivo foi feito no modo batelada em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL em uma incubadora de agitação, mantendo-a no valor de 140 rpm. A temperatura foi mantida em 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade para prevenir a evaporação.

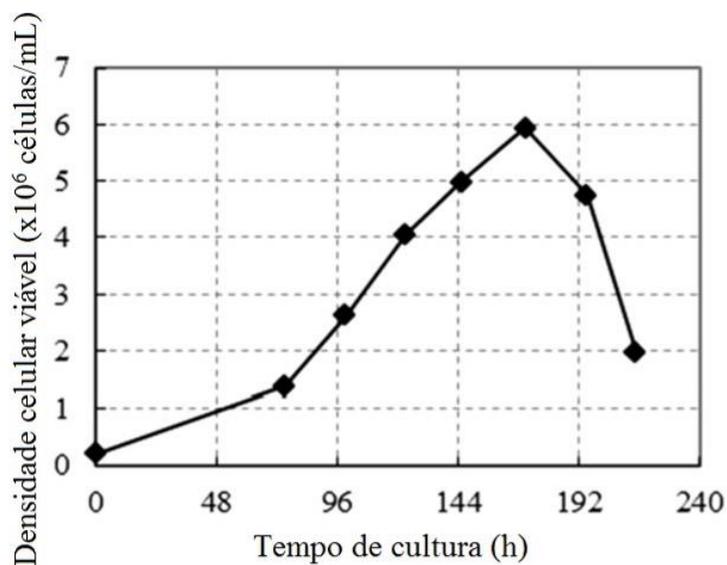
Na segunda etapa, a cultura foi conduzida em um biorreator de vidro de agitação mecânica com o volume de 10 L. A rotação foi mantida em 127 rpm. A temperatura foi fixada em 37°C com o uso de uma manta térmica. O pH foi controlado por meio do borbulhamento de CO<sub>2</sub> no meio e adicionando-se bicarbonato de sódio a 7,5% ou carbonato de sódio a 1 M. O oxigênio dissolvido foi controlado a 20%, principalmente, introduzindo bolhas do gás na mistura.

Após o segundo dia do processo, foi feita a alimentação de glicose no biorreator, com o objetivo de manter a concentração da substância a 2 g/L. As taxas de adição dos outros componentes nutricionais foram determinadas de forma proporcional à taxa de fornecimento de glicose.

Na fase batelada da cultura da linhagem celular, foi obtido o valor de pico de  $5,9 \cdot 10^6$  células/mL para a densidade celular viável. A concentração final do anticorpo monoclonal produzido foi de 510 mg/mL. Os resultados são ilustrados

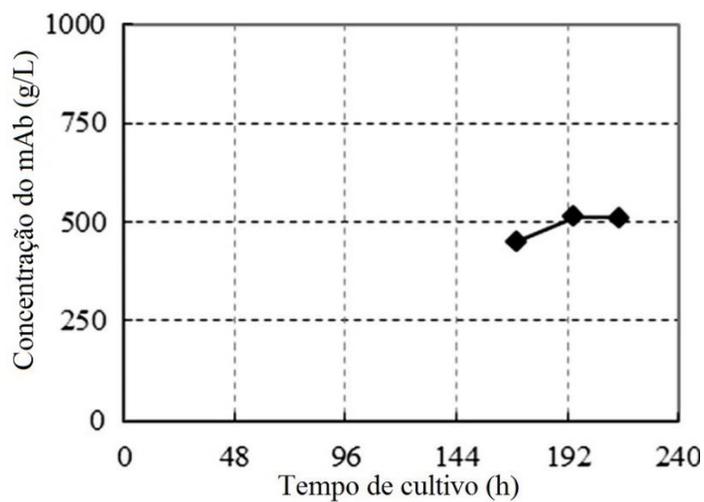
nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Curva de crescimento celular na fase batelada de cultivo.



Fonte: Adaptado de KUWAE *et al.* (2018).

Figura 10 – Concentração do mAb produzido na fase batelada.



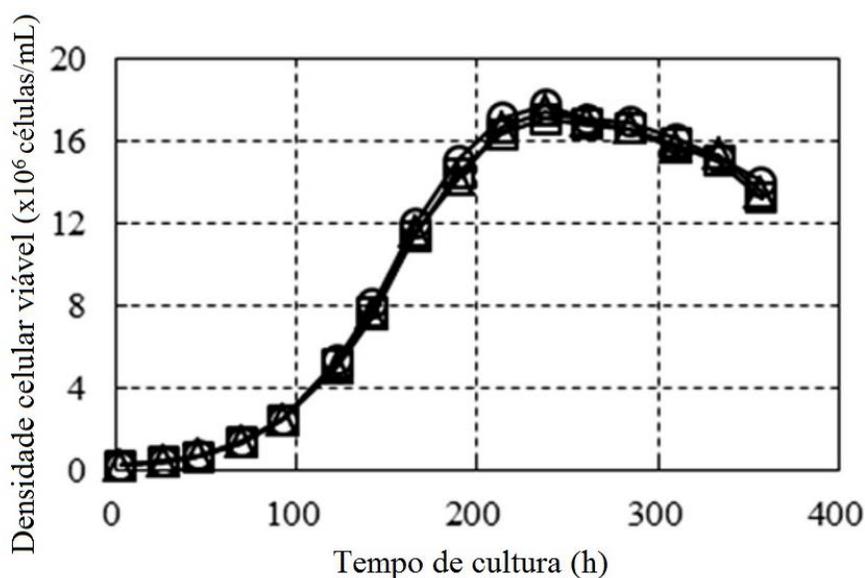
Fonte: Adaptado de KUWAE *et al.* (2018).

De acordo com a Figura 9, é possível notar que o valor máximo de densidade celular viável foi atingido, aproximadamente, após 168 horas de cultivo, correspondendo ao período da fase exponencial de crescimento. Do tempo mencionado em diante, foi observada a fase de decaimento, se estendendo até em torno das 210 horas da cultura.

Analisando a Figura 10, é visualizado o início da produção de Imunoglobulina G no tempo de 168 horas de cultura, correspondente ao momento de interrupção da fase exponencial. O valor da concentração foi crescente e constante no valor de 510 mg/mL das 192 horas até o fim do processo.

Na segunda etapa do cultivo, as células foram depositadas a uma densidade de  $2,5 \cdot 10^5$  células/mL no biorreator, alcançando um pico de  $1,7 \cdot 10^7$  células/mL de densidade celular viável, a um tempo de 237 h. A glicose foi alimentada após 93 h.

Figura 11 – Curva de crescimento celular na fase semi-batelada.



Fonte: Adaptado de KUWAE *et al.* (2018).

Fazendo o estudo da Figura 11, vê-se que o resultado da densidade celular viável máxima, de  $1,7 \cdot 10^7$  células/mL, foi maior em relação àquela obtido na fase batelada de cultivo, de  $5,9 \cdot 10^6$  células/mL, em, aproximadamente, 3 vezes.

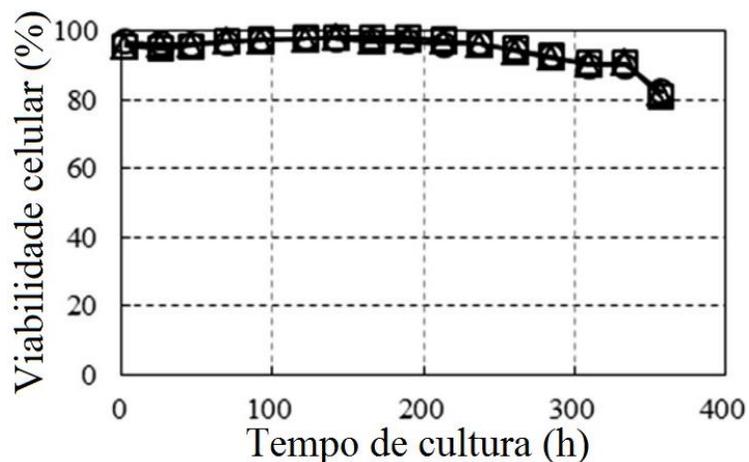
Foi visível que a a fase exponencial de desenvolvimento das células na etapa em semi-batelada foi estendida por um maior intervalo de tempo quando comparada à de batelada. A primeira se prolongou do início do processo até as 237 horas, enquanto a segunda foi limitada nas 168 horas.

O estágio de morte celular no ciclo de batelada alimentada foi iniciado pouco antes das 300 horas de cultivo, ao passo que no de batelada ele foi

começado imediatamente após o fim da fase exponencial, nas 168 horas.

Com base nas duas observações, pode-se inferir que a adição de glicose e de nutrientes contribuiu imensamente para o crescimento das células, sendo favorável para a adaptação e permitindo a manutenção de suas vidas por um espaço maior de tempo, se confrontado com a etapa em batelada, na qual não foi feita a alimentação dos nutrientes.

Figura 12 – Curva de viabilidade celular na fase semi-batelada.

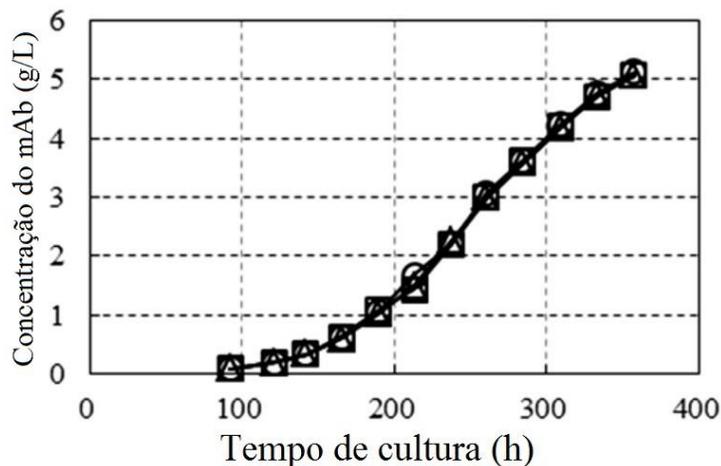


Fonte: Adaptado de KUWAE *et al.* (2018).

Explorando a Figura 12, o valor da viabilidade celular se manteve acima de 80% durante todo o cultivo, indicando a alta quantidade de células vivas em relação às células mortas presentes.

Ao investigar a Figura 13, o anticorpo monoclonal inicializou a ser gerado nas 100 horas de cultura. A concentração da proteína de interesse expressada atingiu o valor de 5 g/L nas 357 horas, o equivalente a aproximadamente 10 vezes o dado obtido na fase em batelada do processo.

Figura 13 – Concentração do mAb produzido na fase semi-batelada.



Fonte: Adaptado de KUWAE *et al.* (2018).

O segundo trabalho abordando o modelo semi-batelada é intitulado “*Selection of chemically defined media for CHO cell fed-batch culture processes*” e foi produzido por PAN *et al.* (2017) e publicado na revista “*Cytotechnology*”.

O anticorpo monoclonal obtido correspondia a uma Imunoglobulina G1, sendo a subclasse de Imunoglobulina G mais abundante no soro humano, possuindo importância para mediar respostas contra patógenos virais (THOMSON, 2016).

Utilizaram-se duas linhagens da classe de células com diferentes padrões de crescimento e produtividade. A primeira delas foi a denominada BC-G, com densidade celular máxima mais elevada e menor produtividade, e a outra, a BC-P, detendo baixa densidade celular máxima e alta produtividade.

Foram preparados quatro meios de cultura distintos para o cultivo das células, comparando o desempenho do processo quanto à densidade celular viável, a concentração de Imunoglobulina G1 e a produtividade volumétrica do anticorpo.

Os meios de cultura utilizados foram *CD FortiCHO<sup>TM</sup>*, *CD OptiCHO<sup>TM</sup>*, *CD-CHO*, adquiridos da empresa holandesa *Life Technologies*, e *AntiCHO-P*, comprado da companhia *GE HealthCare*, também holandesa.

Em combinação com os meios, foram selecionados três sistemas químicos definidos para a alimentação no recipiente, sendo eles *Efficient Feed™ A and B (EFA/B)*, *Efficient Feed™ C (EFC)*, adicionados na proporção de 1:1 em volume e obtidos da organização *Life Technologies*, e *AntiCHO Feed™ -A and -B (Acti A/B)*, recebido da corporação *GE Healthcare* e inserido na quantidade de 10:1 em volume.

Foram feitas todas as combinações possíveis entre os meios de cultura e os sistemas de alimentação, resultando em doze configurações.

O cultivo foi realizado em frascos rotatórios de 250 mL com um volume inicial de trabalho de 25 mL e densidade celular de  $2.10^5$  células/mL. As culturas foram incubadas com uma velocidade de rotação de 100 rpm, 8% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37°C e 90% de umidade.

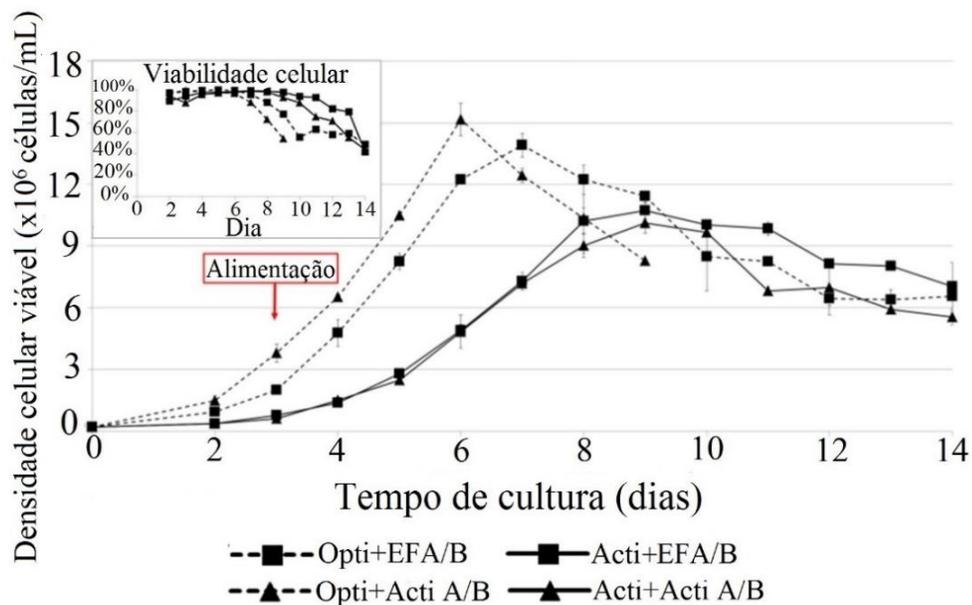
A alimentação nos recipientes com os sistemas químicos foi iniciada no terceiro dia de cultura. A coleta foi feita no dia 14, quando a viabilidade celular se situou abaixo de 60%.

Para o estudo da densidade celular viável e da viabilidade, foram escolhidas as combinações de meio de cultura *CD OptiCHO™* mais alimentação de EFA/B, *CD OptiCHO™* com Acti A/B, *AntiCHO-P* com EFA/B e *AntiCHO-P* com Acti A/B. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 14 e 15, para cada linhagem de células trabalhada.

Segundo a Figura 14, a configuração que obteve o melhor resultado de densidade celular viável máxima foi a composta pelo meio *CD OptiCHO™* alimentado com Acti A/B, possuindo o valor de  $1,5.10^7$  células/mL. Contudo, foi também percebida a menor extensão da fase exponencial neste caso, sendo registrada somente até o sexto dia de cultura. Deste momento em diante, foi visualizado o estágio de morte celular, interrompendo o cultivo no nono dia.

As combinações de *AntiCHO-P* com EFA/B e *AntiCHO-P* com Acti A/B exibiram a maior expansão da fase exponencial, limitada no nono dia.

Figura 14 – Curvas de densidade celular viável e viabilidade (linhagem BC-G).



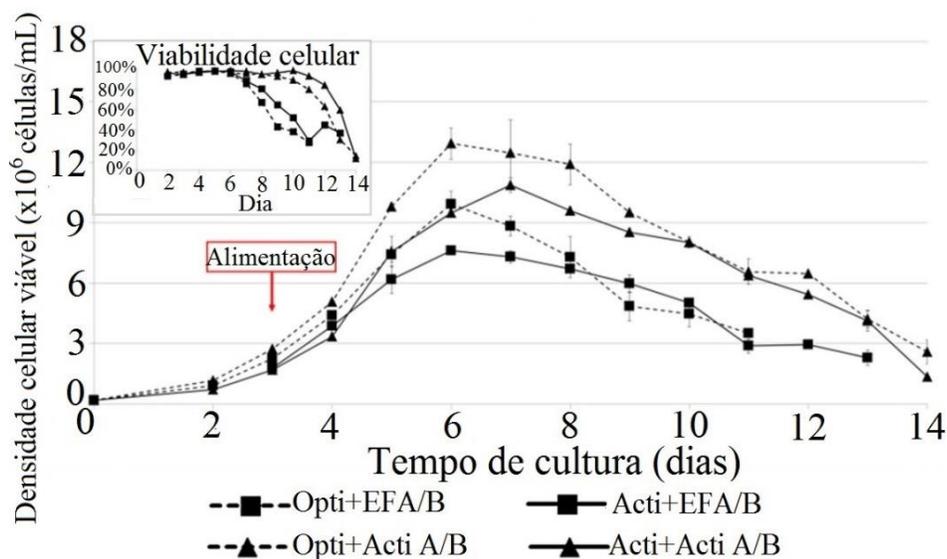
Fonte: Adaptado de PAN *et al.* (2017).

Observou-se uma queda mais acentuada da densidade celular viável após o fim do ciclo de crescimento acelerado, no sistema de *AntiCHO-P* com Acti A/B. Nas duas conformações, o período de decaimento foi reparado do décimo ao último dia. A densidade celular viável máxima foi em torno de  $1,5 \cdot 10^7$  células/mL.

Com relação aos dados obtidos no cultivo usando a associação do meio *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com EFA/B, registrou-se a fase exponencial até, aproximadamente, o sétimo dia de cultivo. O decaimento celular foi visto deste dia até o último de cultura.

A viabilidade celular se manteve na faixa de 80 a 90% no limite do sétimo dia de cultura nos quatro sistemas. As maiores decadências do valor aconteceram ao utilizar o meio *CD OptiCHO<sup>TM</sup>*, em contrapartida, adotando o meio *AntiCHO-P*, o resultado permaneceu na mesma faixa de 80 a 90%, pelo menos, até o décimo dia de cultura. No fim do processo, as quatro combinações apresentaram a viabilidade celular de 50%.

Figura 15 – Curvas de densidade celular viável e viabilidade (linhagem BC-P).



Fonte: Adaptado de PAN *et al.* (2017).

Pela análise da Figura 15, foi visto, novamente, o maior resultado de densidade celular viável máxima para a combinação de *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com Acti A/B, de, aproximadamente,  $1,3 \cdot 10^7$  células/mL.

Foi percebido que a etapa de crescimento acelerado foi estendida até o sexto dia para todas as configurações, com exceção da de *AntiCHO-P* com Acti A/B, a qual permaneceu até o sétimo dia.

Com relação aos dados de viabilidade celular, houve a permanência acima de 80% no limite do sétimo dia de cultura, para todos os sistemas. A diminuição do valor ocorreu de forma mais gradual quando foi utilizada a alimentação de Acti A/B, do sétimo ao último dia, indicando a maior quantidade de células vivas no fim do processo.

Comparando as linhagens BC-G e BC-P, foram visualizados os maiores números de densidade celular viável na primeira. Ao mesmo tempo, ocorreram as maiores diferenças com relação à extensão da fase exponencial ao utilizar os meios *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* e *AntiCHO-P*, ao passo que no grupo BC-P, o comportamento apresentou maior similaridade.

A viabilidade celular exibiu maior proximidade de valores entre as quatro configurações usadas, na linhagem BC-G. No caso do conjunto das células BC-P,

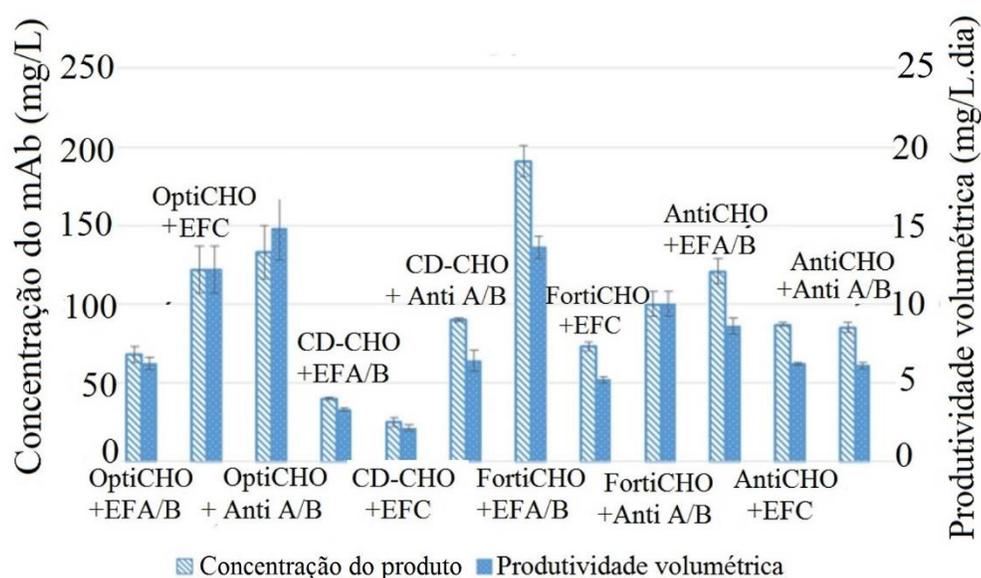
houve uma divergência mais pronunciada dos resultados, notadamente, ao permutar os meios selecionados para a cultura.

As Figuras 16 e 17 apresentam a concentração e a produtividade volumétrica da Imunoglobulina G1 por meio do cultivo dos agrupamentos celulares BC-G e BC-P, respectivamente.

Em ambas as linhagens, os dados foram estudados empregando cada uma das doze combinações de meio de cultura e sistema de alimentação.

Trabalhando com a classe BC-G, a concentração do anticorpo monoclonal produzido foi variada entre 55 mg/L e 200 mg/L. O menor dos valores foi obtido por intermédio do sistema *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com EFA/B e o maior pelo *CD FortiCHO<sup>TM</sup>* e alimentação de EFA/B, conforme indica a Figura 16.

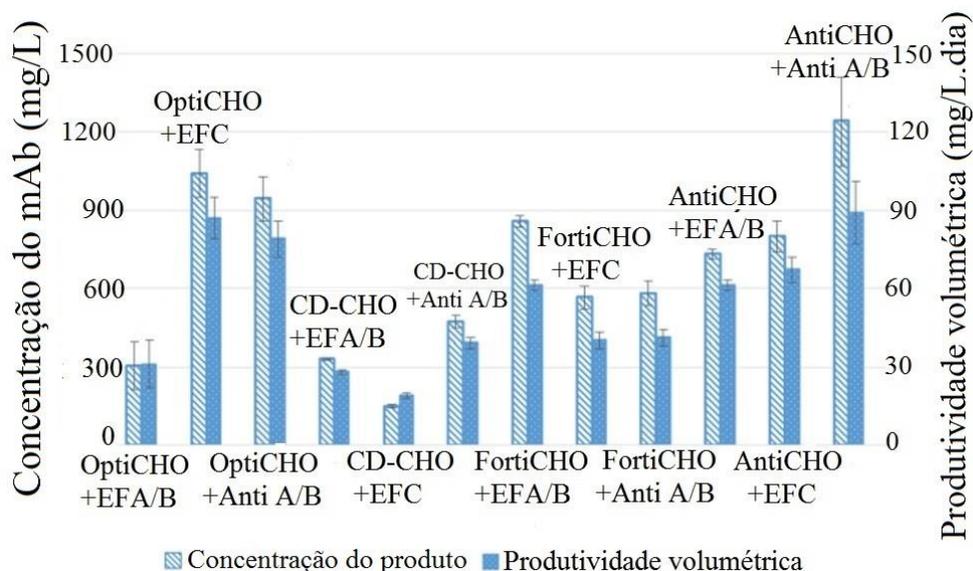
Figura 16 – Concentração e produtividade volumétrica do mAb (linhagem BC-G).



Fonte: Adaptado de PAN *et al.* (2017).

A produtividade volumétrica manifestou números na faixa de 1 a 15 mg/L.dia. O dado mais baixo foi notado na combinação de *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* e EFC, enquanto o mais alto foi visto na de *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com Anti A/B.

Figura 17 – Concentração e produtividade volumétrica do mAb (linhagem BC-P).



Fonte: Adaptado de PAN *et al.* (2017).

Em concordância com a Figura 17, a concentração da proteína de interesse alcançou números de 70 a 1200 mg/L, cultivando as células BC-P. O resultado menos elevado foi registrado, assim como na atividade com o grupo BC-G, no arranjo do meio *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com fornecimento de EFC. Desta maneira, foi permitido definir a conformação mencionada como a menos eficiente para a formação da Imunoglobulina G1. O anticorpo monoclonal mais concentrado foi obtido na associação entre *AntiCHO-P* e Anti A/B.

Discutindo a produtividade volumétrica, houve o atingimento de valores na faixa de 15 a 90 mg/L.dia. As combinações que manifestaram o menor e o maior dado foram, respectivamente, as quais forneceram a menor e a maior concentração proteica.

Com base no exposto, foi possível compreender o cultivo da linhagem BC-P como mais vantajoso quando comparado ao da BC-G, devido às maiores proporções de anticorpo produzidas ao longo do tempo e concentrações mais elevadas, apesar da densidade celular viável ter sido, de modo geral, menor.

### 3.3 Modo contínuo

O primeiro trabalho escolhido descrevendo o modo contínuo tem o título

“*Design and Operation of a Continuous Integrated Monoclonal Antibody Production Process*” e foi elaborado por STEINEBACH *et al.* (2017) e publicado na revista “*Biotechnology Progress*”. O anticorpo monoclonal produzido se tratava de uma Imunoglobulina G1.

O cultivo das células foi realizado em um biorreator agitado mecanicamente com a configuração de perfusão de volume de 1,5 L, objetivando um *set-point* de  $40.10^6$  células/mL para a densidade celular viável.

Foi implementado no tanque um filtro de fibra oca com a finalidade de fazer a completa retenção celular. O volume do biorreator foi mantido constante por meio do controle da vazão de alimentação em 1,5 L/min. A taxa de coleta das células foi fixada em 1,35 L/dia.

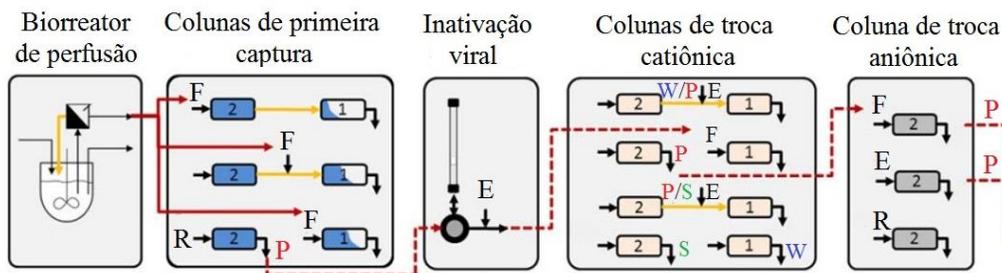
O valor da densidade celular viável foi conservado por meio do ajuste automático da corrente de saída do biorreator, controlada usando um sensor de biomassa viável.

Em etapa sucessiva, as células coletadas foram constantemente enviadas a duas colunas de primeira captura utilizando a proteína A, contendo 2,13 min de tempo de residência cada. A mistura foi eluída duas vezes por ciclo utilizando uma solução tampão de citrato de sódio a 50 mM e pH de 3,2, sendo, então, transferida para a operação de inativação viral, permanecendo nela por 30 minutos. Não foram feitas correções de pH em razão de a etapa anterior de captura já ter sido realizada a um baixo valor do parâmetro.

A fase posterior foi abastecer os equipamentos selecionados para fazer a etapa de polimento com a corrente contendo as proteínas de interesse. Os dispositivos foram mantidos em funcionamento por meio do processo de alimentação em múltiplas colunas e em contracorrente. O objetivo foi remover DNA, proteínas de células hospedeiras e proteína A lixiviada.

Primeiramente, utilizaram-se duas colunas de troca catiônica, realizando a eluição da mistura com o citrato de sódio duas vezes por ciclo, posteriormente. Por fim, a proteína alvo eluída foi diretamente abastecida em uma coluna de troca aniônica. O processo está resumido na Figura 18.

Figura 18 – Fluxograma do processo contínuo utilizado.

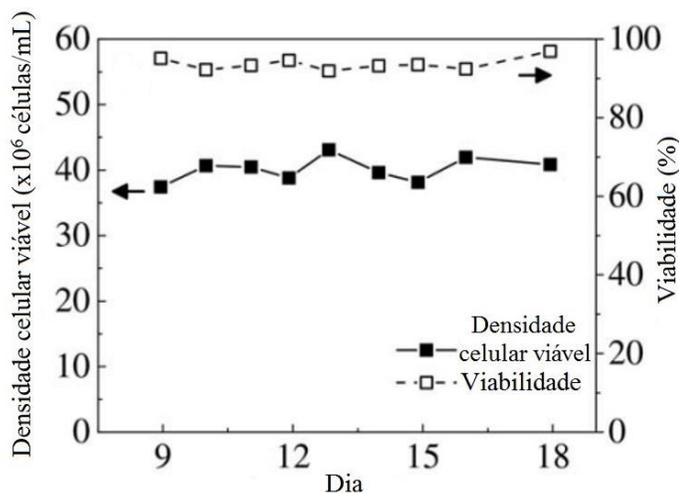


Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

As correntes em linha sólida de cor vermelha na Figura 9 representam os fluxos contínuos; as em linha tracejada da mesma cor, os fluxos cíclicos líquidos; e as em linha sólida de cor amarela, os reciclos internos. O fluxo do produto ocorre da esquerda para a direita e são retratadas por F, P, W, S, E e R, respectivamente, a corrente de alimentação, a de produto, a de impurezas de fraca absorção, a de impurezas de forte absorção, a de eluente e a de regeneração.

O biorreator realizou o cultivo num total de 18 dias, sendo conectado à fase *downstream* por 3 dias e meio. A Figura 19 ilustra as curvas de densidade celular viável e de viabilidade construídas. A Figura 20 apresenta a concentração do anticorpo monoclonal produzido, além das vazões envolvidas no projeto do biorreator.

Figura 19 – Curvas de densidade celular viável e de viabilidade do cultivo.



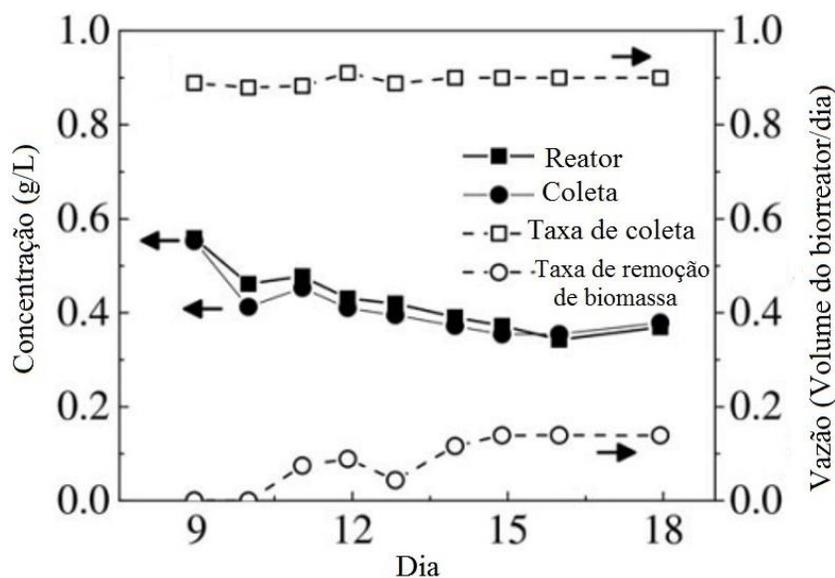
Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

Foi observado, tendo por base a Figura 19, que a densidade celular viável esteve perto de  $40 \cdot 10^6$  células/mL ao longo de todo o cultivo, conforme foi desejado. A viabilidade celular permaneceu na faixa acima de 90% durante o total de dias. As observações demonstram a vantagem de utilizar um sistema de controle no processo, correspondente às baixas variações das principais grandezas relacionadas ao crescimento celular.

Ao examinar a Figura 20, é vista a proximidade entre a curva de concentração da Imunoglobulina G1 no interior do reator e a curva desta grandeza na região de coleta. Isto indica que as concentrações do biofármaco na saída do reator foram praticamente iguais às medidas no interior do recipiente, significando a efetiva agitação e uniformidade do conteúdo misturado. A concentração obtida no fim do cultivo, em ambos os casos, foi em torno de 0,38 g/L.

Relativamente às vazões de projeto, houve o registro da taxa de remoção de biomassa, referente à quantidade do material orgânico retirado do tanque com a finalidade de proporcionar o pretendido desenvolvimento das células. O valor desta grandeza deve ser minimizado para aumentar a eficiência do processo.

Figura 20 – Concentração do mAb produzido e vazões com o tempo.



Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

Observa-se, na Figura 20, a vazão mencionada oscilando entre 0,05 a 0,15

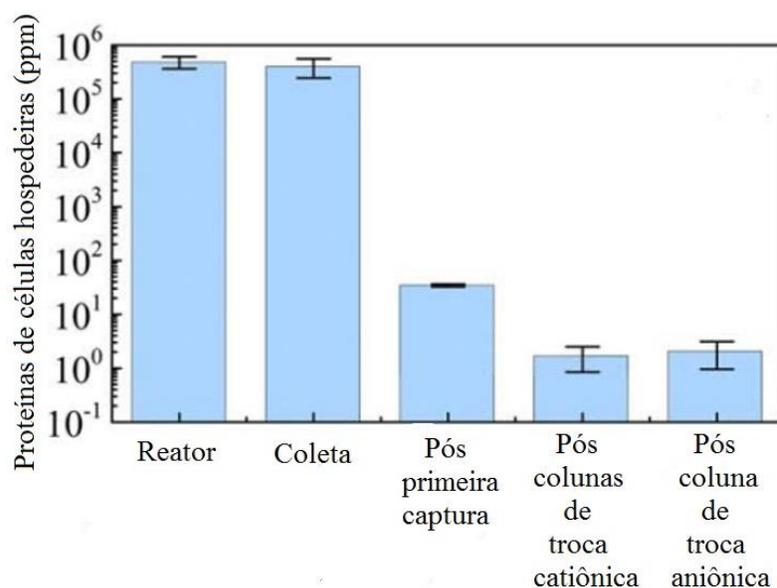
vezes o volume do biorreator por dia, apontando uma ligeira diminuição da eficácia da operação.

A vazão de coleta, conforme apresenta a Figura 20, praticamente, não sofreu perturbações no processo e perdurou no valor de 1,35 L/dia, igual a 0,9 vezes o volume do biorreator por dia.

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram, respectivamente, as proporções de proteínas das células hospedeiras, DNA e proteína A usada que foram removidas ao longo das operações unitárias de purificação.

Na Figura 21, é visível a alta concentração inicial de proteínas de células hospedeiras de  $10^6$  ppm, registrada no interior e na corrente de saída do biorreator. Após a passagem da mistura pelas colunas de primeira captura, ocorreu a queda do número até por volta de 55 ppm, sinalizando elevado êxito na purificação, em virtude de o dado ter sido reduzido em mais de 99% do valor original.

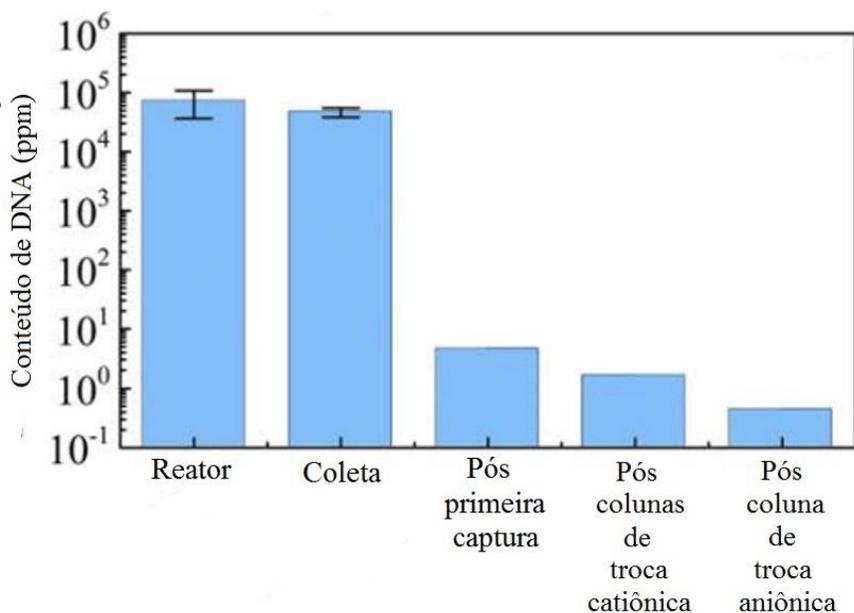
Figura 21 – Quantidade de proteínas de células hospedeiras.



Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

Ainda de acordo com a Figura 21, vê-se a decadência da concentração para, aproximadamente, 5 ppm, depois do caminho da mistura pelas colunas de troca catiônica e de troca aniônica.

Figura 22 – Quantidade de DNA.



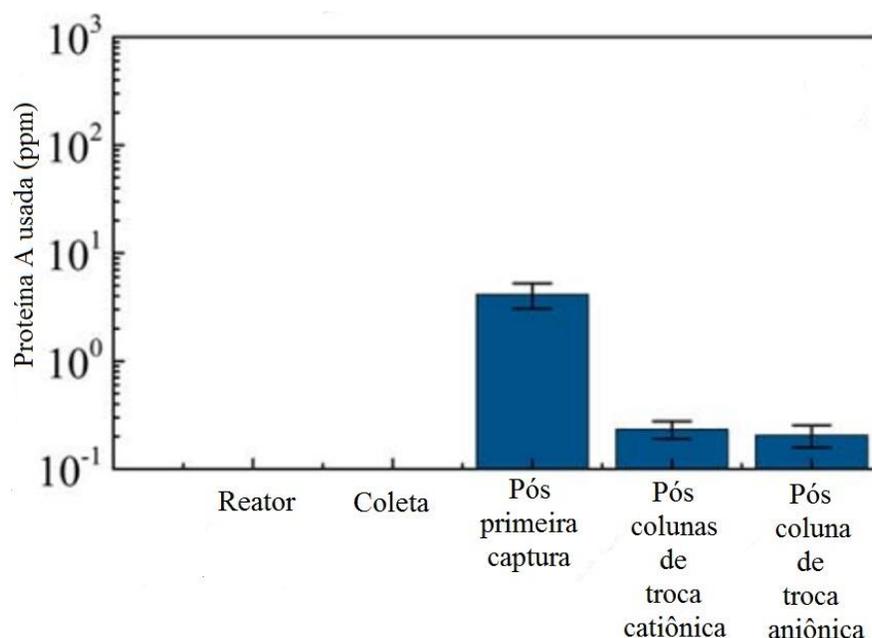
Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

Estudando a Figura 22, é anotada a concentração inicial de DNA ao redor de  $10^5$  ppm, no interior do tanque e na coleta. Com o acesso do fluido à coluna de primeira captura, houve o decréscimo da medida para 5 ppm e, sucessivamente, para 3 ppm, por meio do passadouro nas colunas de troca catiônica.

Utilizando a coluna de troca aniônica, os resíduos de DNA foram reduzidos a 0,05 ppm na saída do processo, sendo uma quantidade desprezível quando comparada aos  $10^5$  ppm iniciais.

Investigando a Figura 23, é vista a geração de resquícios de proteína A usada decorrente da primeira captura, contendo a concentração de 7,5 ppm. O uso das colunas de troca catiônica permitiu reduzir o valor para 0,025 ppm e, posteriormente, ocorreu o decréscimo para 0,02 ppm, com o emprego da coluna de troca aniônica.

Figura 23 – Proporções de proteína A usada.



Fonte: Adaptado de STEINEBACH *et al.* (2017).

O trabalho de KARST *et al.* (2017), intitulado “*Performance and Product Quality in an Integrated Continuous Antibody Production Process*” foi o segundo selecionado tratando do modo contínuo de operação, tendo sido publicado na revista “*Biotechnology and Bioengineering*”. O anticorpo monoclonal expressado pelas células foi uma Imunoglobulina G1.

Foi utilizado um biorreator de agitação mecânica no modo de perfusão para o cultivo celular, tendo as células, inicialmente, uma densidade celular viável de  $20 \cdot 10^6$  células/mL. O tanque detinha um volume total de 2,5 L, sendo 1,5 L correspondente ao volume de trabalho, e diâmetro de 13 cm.

Usou-se um sensor de capacitância para medir a biomassa viável, integrando-o a uma bomba, de modo a manter a densidade celular viável aos desejados valores de *set-point*, de 20, 40 e  $60 \cdot 10^6$  células/mL, pelo período de uma semana cada. A taxa constante de coleta foi de 2,5 L/dia. O tempo total de cultivo foi de 26 dias.

A alimentação fresca foi constituída por dois meios quimicamente definidos, sendo um mais enriquecido de nutrientes. A razão entre eles foi

ajustada de forma proporcional ao *set-point* da densidade celular viável. O nível de oxigênio dissolvido foi permanecido constante em 50%, por meio do ajustamento da vazão de gás.

O pH foi regulado em 7,1 manipulando a fração de CO<sub>2</sub> e a mistura atingiu 400 rpm de forma eficiente, utilizando uma turbina Rushton. A vazão de alimentação foi operada em 1,5 L/min.

Um tanque de compensação de 100 mL foi instalado entre o biorreator e as etapas de purificação proteica, com o objetivo de facilitar o controle das vazões da fase *upstream* para a *downstream*.

Foram colocados filtros de esterilização de polipropileno com porosidade de 0,2 µm antes e depois do recipiente, para prevenir a invasão de micro-organismos.

A etapa de captura foi executada por meio do método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

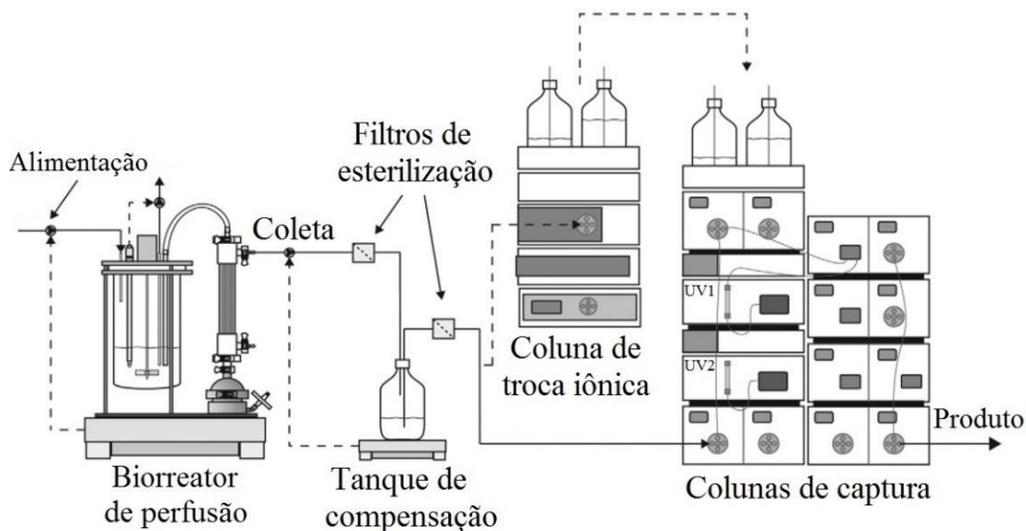
Os equipamentos inclusos na operação de captura foram um sistema de reservatório de fase móvel; um de injeção; duas colunas cromatográficas na configuração contracorrente, possibilitando um fluxo de alimentação contínuo; estrutura de detecção por Ultravioleta (UV) e tecnologia de aquisição e registro de dados.

O fluxograma contendo todas as operações unitárias do processo está mostrado na Figura 24.

A Figura 25 apresenta os resultados de densidade celular viável e de viabilidade celular obtidos no interior do biorreator.

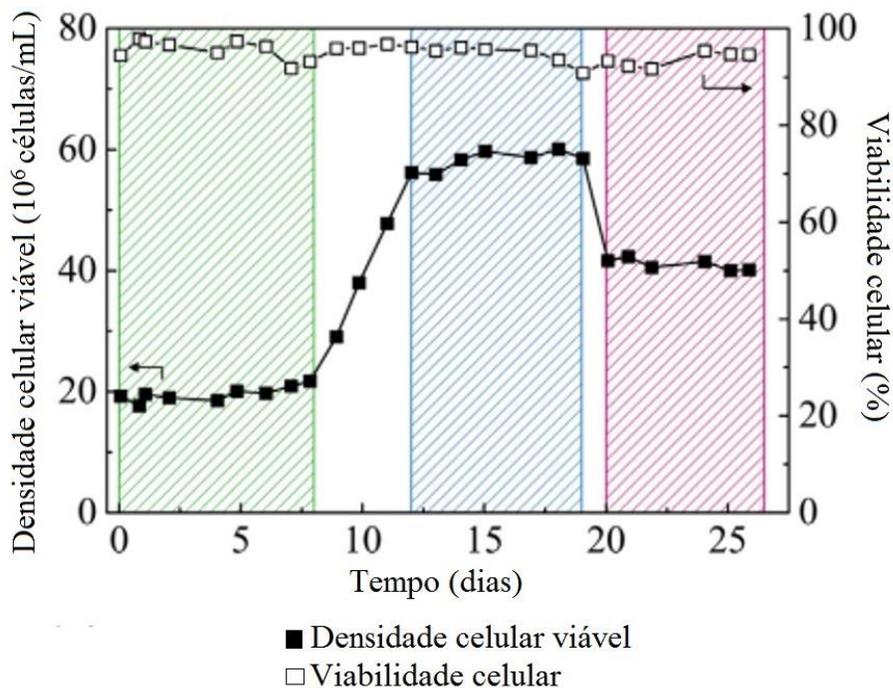
Cada um dos três estados estacionários trabalhados está representado na Figura 25, sendo, inicialmente, situado o valor do *set-point* da densidade celular viável em  $20 \cdot 10^6$  células/mL e, posteriormente, em  $60 \cdot 10^6$  e  $40 \cdot 10^6$  células/mL. A viabilidade celular permaneceu na faixa de 90%.

Figura 24 – Produção da Imunoglobulina G1 no modo contínuo.



Fonte: Adaptado de KARST *et al.* (2017).

Figura 25 – Dados de densidade celular viável e de viabilidade celular.



Fonte: Adaptado de KARST *et al.* (2017).

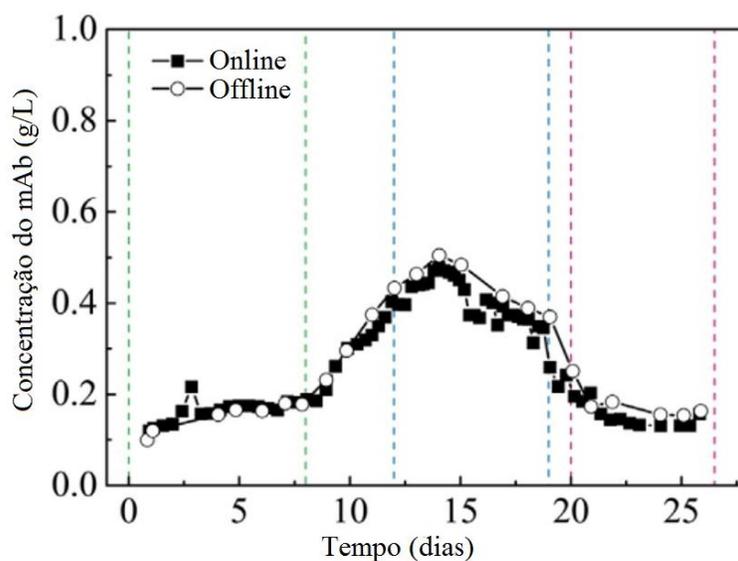
Analisando, ainda, a Figura 25, é entendida a utilidade do sistema de controle na regulação do *set-point* em cada fase de crescimento celular, sendo o primeiro correspondente à etapa de adaptação; a segunda, o ciclo depois do

período exponencial; e a terceira, o estágio posterior ao começo da morte celular.

A Figura 26 ilustra, graficamente, os valores de concentração da Imunoglobulina G1 produzida ao longo do tempo em duas situações. A primeira delas foi executada mantendo a coluna de troca iônica em operação (*Online*) e, a outra, desligada (*Offline*). Os três estados estacionários envolvidos no processo estão, novamente, incluídos.

Foi observado que a concentração do anticorpo atingiu em torno de 0,5 g/L durante o segundo estado estacionário, sendo este o valor máximo obtido em todo o tempo de cultivo. Nos outros dois períodos em regime permanente, a concentração esteve na faixa de 0,1 a 0,2 g/L.

Figura 26 – Valores de concentração da Imunoglobulina G1.

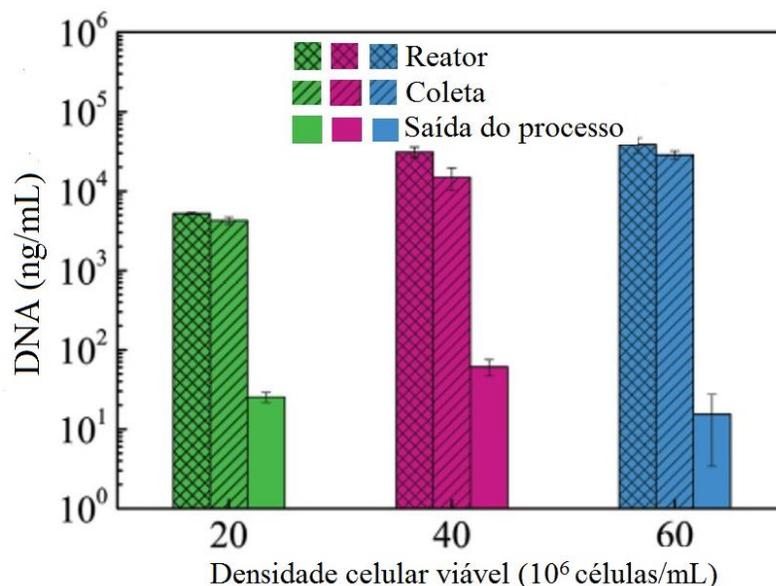


Fonte: Adaptado de KARST *et al.* (2017).

Foi visualizada pouca diferença entre as curvas de concentração usando a coluna de troca iônica ligada e desligada, prenunciando que a produção do biofármaco foi praticamente a mesma em ambas as circunstâncias.

Foram analisadas, por último, as quantidades de DNA e de proteínas de células hospedeiras removidas na saída do processo, em cada um dos valores de *set-point* de densidade celular viável trabalhados. Os dados estão descritos nas Figuras 27 e 28.

Figura 27 – Proporções de DNA.



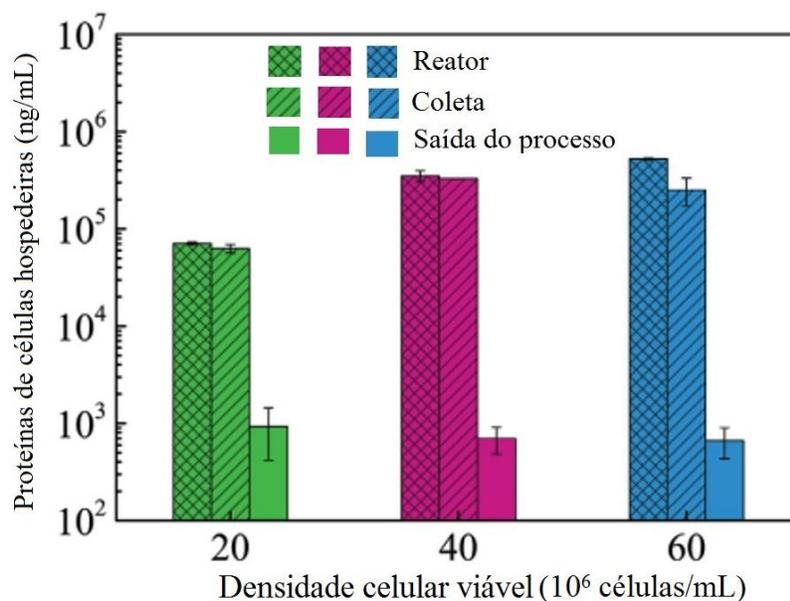
Fonte: Adaptado de KARST *et al.* (2017).

Consoante com a Figura 27, foi possível ver, no caso do *set-point* de  $20 \cdot 10^6$  células/mL, a presença de cerca de  $8,25 \cdot 10^3$  ng/mL de DNA no interior do reator, havendo um pequeno decaimento na saída, para o valor de  $8 \cdot 10^3$  ng/mL. Com o encaminhamento da mistura às colunas de troca iônica e de primeira captura, a concentração decresceu até 20 ng/mL.

Ao situar a densidade celular viável no valor constante de  $40 \cdot 10^6$  células/mL, a concentração de DNA inicial foi de  $4 \cdot 10^4$  ng/mL dentro do reservatório, ocorrendo a diminuição para  $2 \cdot 10^4$  ng/mL no efluente. Foi obtido o valor de 80 ng/mL por meio das operações de purificação proteica.

Já no caso do *set-point* de  $60 \cdot 10^6$  células/mL, os resquícios de DNA somaram  $4,5 \cdot 10^4$  ng/mL no biorreator, sendo reduzidos para  $3 \cdot 10^4$  ng/mL na corrente de saída. Os estágios de polimento permitiram o atingimento da concentração mínima de 10,5 ng/mL de DNA na fase final do crescimento celular.

Figura 28 – Quantidade de proteínas de células hospedeiras.



Fonte: Adaptado de KARST *et al.* (2017).

Estudando a Figura 28, quando foi trabalhado com a densidade celular viável de  $20 \cdot 10^6$  células/mL, foi notada a aparição de  $8 \cdot 10^4$  ng/mL de proteínas de células hospedeiras no tanque de cultivo, sendo ligeiramente decaída para  $7,7 \cdot 10^4$  células/mL na coleta. Utilizando as colunas da etapa *downstream*, a concentração apresentou o valor final de cerca de 900 ng/mL.

No segundo estado estacionário, marcando  $40 \cdot 10^6$  células/mL, foram registrados  $3,5 \cdot 10^5$  ng/mL de resíduos de células hospedeiras no recipiente onde foi feita a cultura. Praticamente, não houve a alteração do número mencionado no fluxo de coleta. O resultado anotado no fim da etapa foi de 750 ng/mL.

No último *set-point* operado, anotou-se  $7 \cdot 10^5$  ng/mL de restos proteicos de células hospedeiras, acontecendo a queda para  $2 \cdot 10^5$  ng/mL na correnteza após o cultivo. No término da cultura, a concentração determinada foi de 700 ng/mL.

### 3.4. Comparação entre os modos de operação

Explorando os resultados apresentados nos seis trabalhos escolhidos, é executável estabelecer discussões a respeito dos valores de densidade celular

viável, concentração do anticorpo monoclonal e viabilidade celular.

Sobre o modelo batelada, nos dois artigos científicos, os maiores dados de densidade celular viável estiveram na casa de  $10^6$  células/mL, sendo o maior deles, equivalente a  $4 \cdot 10^6$  células/mL no trabalho de CHEN *et al.* (2011). No estudo mencionado, foi verificado que o meio de cultivo apresentou pouca influência na densidade celular viável máxima, sendo praticamente a mesma nos dois meios empregados.

Tendo em consideração a concentração do anticorpo produzido, no experimento de CHEN *et al.* (2011), foram obtidos 190 e 230 mg/L usando os H0T0 e H10T2, respectivamente. GOLDMAN *et al.* (1997) apresentou o resultado de 11200 UI/mL e viabilidade celular na faixa de 80%.

Com relação ao modo semi-batelada, a densidade celular viável chegou a atingir números na faixa de  $10^7$  células/mL, em ambas as pesquisas desenvolvidas, sendo maiores quando comparados aos valores obtidos nos trabalhos discutindo o processamento em batelada. Inclusive, no trabalho de KUWAE *et al.* (2018) foi realizada uma fase batelada que apresentou, também, resultados de densidade celular máxima mais baixos.

A viabilidade celular exibiu valores acima de 90% no estudo de KUWAE *et al.* (2018) e entre 80 e 90% no de PAN *et al.* (2017), mais elevados quando comparados aos descritos nos artigos científicos relativos ao cultivo em batelada. Isto pode estar relacionado com a duração mais extensa da fase de crescimento celular acelerado no modelo semi-batelada, indicando um número maior de células vivas se adaptando ao meio.

As concentrações de anticorpo monoclonal foram, de maneira similar às outras grandezas, mais elevadas quando afrontadas com as atingidas na cultura em batelada. Na pesquisa de KUWAE *et al.* (2018), foi conseguido o dado de 5 g/L e no de PAN *et al.* (2017), de até 1,2 g/L.

Uma observação importante no tocante ao processamento em semi-batelada é a alta dependência dos resultados do meio de cultura e, principalmente, da fonte de fornecimento dos nutrientes.

Caso não exista a afinidade das células e do meio preparado com as substâncias selecionadas para a alimentação no biorreator, o crescimento celular poderá não ocorrer em grandes proporções e, conseqüentemente, não serão obtidas altas concentrações do anticorpo monoclonal. Isto foi constatado, especialmente, no estudo de PAN *et al.* (2017), no qual a combinação do meio *CD OptiCHO<sup>TM</sup>* com o fornecimento de EFC, por exemplo, produziu quantidades mínimas de Imunoglobulina G1.

Examinando o modelo contínuo, a densidade celular viável foi mantida constante, nos dois trabalhos, por meio da inclusão de um sistema de controle no *set-point* desejado. Foram trabalhados com números na mesma faixa dos artigos retratando a configuração em semi-batelada.

O uso dos medidores e controladores no modo contínuo significam custos adicionais ao processo, embora tragam o benefício de manter o valor da densidade celular viável sem variações.

A viabilidade celular esteve na faixa de 90% ao longo do cultivo no trabalho de STEINEBACH *et al.* (2017), estando, também, próxima dos resultados registrados no modo semi-batelada.

A concentração de anticorpo monoclonal atingiu os resultados máximos de 0,38 e 0,5 g/L, respectivamente, nas pesquisas de STEINEBACH *et al.* (2017) e KARST *et al.* (2017). Os dados numéricos são maiores em comparação com os conquistados nos experimentos em batelada e menores com relação aos dos procedimentos em semi-batelada.

É interessante ressaltar que o processamento contínuo possui, adicionalmente, sistemas de purificação proteica possibilitando a remoção de altas proporções dos mais diversos tipos de resíduos, como DNA, proteínas de células hospedeiras e proteína A usada. Estes conjuntos de operações unitárias são mais sofisticados ao serem confrontados com os dos modelos batelada e semi-batelada.

Dessa forma, o modo contínuo pode ser o mais vantajoso quando o projeto do processo deter, como uma de suas prioridades, a obtenção de um

biofármaco com maior grau de pureza.

#### 4 CONCLUSÕES

Tendo por base todas as informações apresentadas nos artigos avaliados, conclui-se que o modelo batelada é o mais rudimentar dentre os três métodos de cultivo apresentados. Suas vantagens estão relacionadas, principalmente, com sua simplicidade operacional, reduzindo os custos de implementação e manutenção em um processo de escala industrial.

Por outro lado, o crescimento celular, a concentração de anticorpo monoclonal e a pureza do produto podem não ter os resultados mais elevados, como é desejado. Os artigos científicos tratando deste modo de operação na produção dos biofármacos são, normalmente, mais antigos, mostrando a tendência em utilizar menos esta forma de cultura ao longo dos anos.

O processamento em semi-batelada é o mais benéfico quanto ao desenvolvimento celular, apresentando, também, as maiores concentrações de anticorpo monoclonal.

Contudo, é necessário um estudo aprofundado sobre o meio de cultivo e a fonte de alimentação que serão utilizados no biorreator para propiciar o crescimento das células e a expressão dos anticorpos de maneira adequada. Do contrário, o processo não obterá o desempenho esperado e os resultados podem, até mesmo, se situar abaixo dos obtidos ao empregar o modo batelada.

O modelo contínuo também permite elevadas concentrações da proteína de interesse e, além disso, é o mais aprimorado no tocante à pureza do produto final. Os estágios de purificação proteica podem ser elaborados de variadas possibilidades, tendo a pesquisa sobre eles trabalhada nos artigos científicos mais recentes com referência à produção de anticorpos monoclonais, contendo fluxogramas completos e metodologias detalhadas.

Como desvantagem, esta forma de cultivo em biorreatores possui custos elevados, requerindo um sistema de controle para minimizar as perturbações sofridas pelo sistema. Da mesma maneira, o investimento nas tecnologias aplicadas na fase *downstream* eleva a despesa global em um processo utilizado na indústria, apesar de fornecerem um produto mais purificado.

## REFERÊNCIAS

- ASHBY, N. **Flow through or bind-elute mode**. Disponível em: <<https://www.proz.com/kudoz/spanish-to-english/chemistry-chemscieng/43881770-flow-through-or-bind-elute-mode.html>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2022.
- AZEVEDO, D.C.S.; RODRIGUES, A.E. **Design and optimization of new simulated moving bed plants**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 23, No. 02, pp. 171 – 181, 2006.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 984 p., 1986.
- BIRCH, J.R.; RACHER, A.J. **Antibody production**. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 58, pp. 671 – 685, 2006.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical engineering**. Boca Raton, FL: CRC Press, 702 p., 1997.
- BUYEL, J.F.; TWYMAN, R.M.; FISCHER, R. **Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing**. Biotechnology Advances, Vol. 35, pp. 458 – 465, 2017.
- CANHAS, I. **Interferon**. Disponível em: <https://www.infoescola.com/sistema-imunologico/interferon/>. Acesso em 23 de fevereiro de 2022.
- CHEN, F.; FAN, L.; WANG, J.; ZHOU, Y.; YE, Z.; ZHAO, L.; TAN, W. **Insight into the roles of hypoxanthine and thymidine on cultivating antibody-producing CHO cells: cell growth, antibody production and long-term stability**. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 93, pp. 169 – 178, 2011.
- DEAN, J.; REDDY, P. **Metabolic Analysis of Antibody Producing CHO Cells in Fed-Batch Production**. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 110, No. 6, 2013.
- DEL DEBBIO, C.B.D; TONON, L.M.; SECOLI, S.R. **Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão da literatura**. Revista Gaúcha de Enfermagem, Vol. 28, No. 1, pp. 133 – 142, 2007.
- DIDIER, C.; MOREIRA, S.L. **Biofármacos: do desenvolvimento à produção industrial**. Revista Brasileira de Engenharia Química, Vol. 32, No. 1, 2016.
- DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. 2 ed. Boston: Elsevier, Academic Press, 919 p., 2013.
- FERREIRA, L.L.G.; ANDRICOPULO, A.D. **Medicamentos e tratamentos para a COVID-19**. Estudos Avançados, Vol. 34, No. 100, 2020.

FONSECA, J.M.S. **Impacto dos Biorreatores de perfusão na Produção de Biofármacos**. 87 f., Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

FUSATI. **O que é ultrafiltração e seus benefícios**. Disponível em: <<https://www.fusati.com.br/o-que-e-ultrafiltracao-e-seus-beneficios/>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2022.

GOMES, F.S.; SILVA, P.O.; OLIVEIRA, C.S.; ARAÚJO, M.C.P.; SILVA, L.F.M.; CABRAL, L.M.C. **Obtenção de licopeno a partir de suco de melancia processado por osmose inversa e diafiltração**. IV Simpósio em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, João Pessoa, 2012.

GOLDMAN, M.H.; JAMES, D.C.; ISON, A.P.; BULL, A.T. **Monitoring proteolysis of recombinant human interferon- during batch culture of Chinese hamster ovary cells**. Cytotechnology, Vol. 23, pp. 103 – 111, 1997.

HINTON-SHELEY, P. **Que é a proteína A**. Disponível em: [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Protein-A-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Protein-A-(Portuguese).aspx). Acesso em 23 de fevereiro, 2022.

JUNGBAUER, A. **Continuous downstream processing of biopharmaceuticals**. Trends Biotechnology, Vol. 31, No. 8, pp. 479 – 492, 2013.

KAPPATOU, C.D.; MHAMDI, A.; CAMPANO, A.Q.; MANTALARIS, A.; MITSOS, A. **Dynamic Optimization of the Production of Monoclonal Antibodies in Semi-batch Operation**. Proceedings of the 27<sup>th</sup> European Symposium on Computer Aided Process Engineering, Barcelona, 2017.

KARST, D.J.; STEINEBACH, F.; SOOS, M.; MORBIDELI, M. **Process Performance and Product Quality in an Integrated Continuous Antibody Production Process**. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 114, No. 2, 2017.

KELLEY, B. **Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads**. Mabs-Austin, Vol. 1, No. 5, pp. 443–452, 2009.

KLASENER, I.C. **Biorreatores: você sabe como eles funcionam?** Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/biorreatores-como-eles-funcionam/>>. Acesso em 12 de abril, 2022.

KUWAE, S.; MIYAKAWA, I.; DOI, T. **Development of a chemically defined platform fed-batch culture media for monoclonal antibody-producing CHO cell lines with optimized choline content**. Cytotechnology, Vol. 70, pp. 939 – 948, 2018.

MA, J.K., DROSSARD, J., LEWIS, D., ALTMANN, F., BOYLE, J., CHRISTOU, P. **Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants.** *Plant Biotechnology*, Vol. 13, 1106 – 1120, 2015.

NETO, B.R.S. **Medicina: aspectos epidemiológicos, clínicos e estratégicos de tratamento.** Ponta Grossa: Atena Editora, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 1273 p., 2011.

PAN, X.; STREEFLAND, M.; DALM, C.; WIJFFELS, R.H.; MARTENS, D.E. **Selection of chemically defined media for CHO cell fed-batch culture processes.** *Cytotechnology*, 69, pp. 39 – 56, 2017.

PLANTAMED. **Tabaco.** Disponível em: [https://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Nicotiana\\_tabacum.htm](https://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Nicotiana_tabacum.htm). Acesso em 23 de fevereiro de 2022.

RODRIGUES, M.E.; COSTA, A.R.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. **Technological Progresses in Monoclonal Antibody Production Systems.** *Biotechnology Progress*, Vol. 26, No. 2, 2010.

SALERNO, M.S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento.** Texto para discussão, IPEA, Brasília, 2018.

SANTOS, T.C.; STURARO, D. **Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais em doenças auto-imunes.** II Simpósio de Assistência Farmacêutica. Centro Universitário São Camilo, 24 de maio de 2014.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial.** Vol. 2, 1. ed. São Paulo: E. Blücher, 541 p., 2001.

STEINEBACH, F.; ULMER, N.; WOLF, M.; DECKER, L.; SCHNEIDER, V.; WALCHLI, R.; KARST, D.; SOUQUET, J.; MORBIDELLI, M. **Design and Operation of a Continuous Integrated Monoclonal Antibody Production Process.** *Biotechnology Progress*, Vol. 33, No. 5, 2017.

THOMSON, C.A. **IgG Structure and Function.** *Encyclopedia of Immunobiology*. Vol. 2, pp. 15 – 22, 2016.

VIDAL, T.J. **O mercado brasileiro de anticorpos monoclonais utilizados para o tratamento de câncer.** *Caderno de Saúde Pública*, Vol. 34, No. 12, 2018.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WARNOCK, J.N.; AL-RUBEAI, M. **Bioreactor systems for the production**

**of biopharmaceuticals from animal cells.** Biotechnology and Applied Biochemistry, Vol. 45, pp. 1 – 12, 2006.

**WILSON, L.J. Integrating Upstream and Downstream Process Development Strategies for Mammalian Cell Derived Therapeutic Antibodies.** Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade College London, Londres, 2020.

**YANG, O.; QADAN, M.; IERAPETRITOU, M. Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: a Review.** Journal of Pharmaceutical Innovation, Vol. 15, pp. 182 – 200, 2019.