



DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS EM PERFUSÃO A BAIXAS TAXAS DE
ALIMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
RECOMBINANTES COM CÉLULAS CHO

Ioná Walter Bettinardi

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

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Andreas Castan

Rio de Janeiro
Dezembro de 2020

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS EM PERFUSÃO A BAIXAS TAXAS DE
ALIMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
RECOMBINANTES COM CÉLULAS CHO

Ioná Walter Bettinardi

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

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Andreas Castan

Aprovada por: Prof. Eutimio Gustavo Fernández Nuñez

Prof. Renato Sampaio Carvalho

Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Prof. Argimiro Resende Secchi

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2020

Bettinardi, Ioná Walter

Desenvolvimento de processos em perfusão a baixas taxas de alimentação para a produção de anticorpos monoclonais recombinantes com células CHO / Ioná Walter Bettinardi. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XVIII, 177 p.: il.; 29,7 cm

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Andreas Castan

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 145-167.

1. Células animais. 2. Biofármacos. 3. Perfusão. 4. Estratégia de alimentação. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

Aos meus orientadores: à Prof. Leda, pela confiança e dedicação ao longo da minha jornada de pós-graduação; ao Prof. Ricardo, pelos ensinamentos; ao Andreas, por me receber e me orientar durante minha estadia na Suécia.

Aos membros da banca de defesa, pelo aceite ao meu convite e sugestões.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC). Um agradecimento especial à Renata, Alexandre, Juvissan, Thayana e Vitória, pela amizade, apoio e convívio.

Ao Rodrigo Coelho (Bio-Manguinhos/Fiocruz), pelas dicas para a utilização do hidrociclone.

Aos funcionários da GE Healthcare/Cytiva (Uppsala, Suécia), pelo apoio técnico nos experimentos com biorreatores em escala piloto. Em especial, Lisa Blomqvist, Jozsef Vasi, Andreas Andersson e Klas Marteleur.

Aos professores, funcionários e colaboradores do PEQ, em especial Vera Cruz, Luciana, Célio (NUCAT) e Mary.

Ao sr. Ricardo (Instituto de Física), torneiro que fez os adaptadores para conexão do hidrociclone aos biorreatores de bancada.

Ao segurança patrimonial Robson (prédio Anexo), pelo bom-humor durante as incontáveis idas ao Fundão nos fins-de-semana.

Aos meus amigos, ex-colegas de graduação, que moram no Rio. Um agradecimento especial a Fernanda e a Siew pela amizade.

Aos inúmeros colegas dos grupos de caronas que me auxiliaram no deslocamento ao Fundão.

À minha família (Maurício, Edicléa, Iara e Rafael), pelo apoio incondicional.

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e GE Healthcare), pelo suporte financeiro.

Àqueles que aqui não mencionei, e que de alguma forma contribuíram e participaram nessa importante etapa da minha vida.

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

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS EM PERFUSÃO A BAIXAS TAXAS DE ALIMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RECOMBINANTES COM CÉLULAS CHO

Ioná Walter Bettinardi

Dezembro/2020

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Andreas Castan

Programa: Engenharia Química

Os anticorpos monoclonais são os biofármacos que mais crescem em número de aprovações para uso humano. O aumento da demanda e a concorrência com os biossimilares pressionam as empresas biofarmacêuticas a estabelecerem plataformas de produção mais eficientes e de menor custo. Os processos contínuos em perfusão têm sido propostos devido a menor área de instalação, altas produtividades e qualidade de produto mais homogênea, porém o reduzido número de tecnologias disponíveis para retenção celular e as grandes quantidades de meio e de perfundido limitam uma ampla adoção da perfusão frente à batelada alimentada. Neste trabalho, processos em perfusão com células de ovário de hamster chinês (CHO) produtoras de anticorpos monoclonais a taxas específicas de diluição (CSPR) inferiores a 20 pL/cel/d foram estabelecidos. Três tecnologias de retenção celular foram utilizadas: o filtro tangencial alternante (ATF), o sedimentador gravitacional e o hidrociclone, este até então investigado com suspensões em baixa concentração celular. Pela primeira vez, concentrações entre 20×10^6 e 50×10^6 cels/mL foram obtidas com um hidrociclone operado a quedas de pressão superiores a 1 bar. Processos robustos de até 50 dias foram estabelecidos com o hidrociclone em biorreatores de bancada e em um biorreator com bolsa descartável de 50 L. Com o ATF, uma concentração de 130×10^6 cels/mL foi obtida a uma CSPR de 19 pL/cel/d. Foi observada a ocorrência de retenção de produto no biorreator usando o ATF, ao contrário do hidrociclone e do sedimentador. A redução da CSPR proporcionou uma maior concentração de produto no sobrenadante, mas também provocou uma diminuição na taxa específica de crescimento e na produtividade.

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

DEVELOPMENT OF PERFUSION PROCESSES AT LOW FEEDING RATES FOR
THE PRODUCTION OF RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODIES WITH
CHO CELLS

Ioná Walter Bettinardi

December/2020

Advisors: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Andreas Castan

Department: Chemical Engineering

Monoclonal antibodies are the most approved biopharmaceuticals for human therapy. A higher demand for those molecules and the competition with biosimilars have driven biomanufacturing companies to establish more efficient production platforms. Continuous processes have been proposed due to smaller footprint, more compact systems, higher productivities and a more consistent product quality. However, a limited number of cell retention devices and the high quantities of medium and supernatant hamper a widespread adoption of perfusion over fed-batch processes. In this work, cell-specific perfusion rates (CSPR) lower than 20 pL/cell/day were applied in perfusion processes with two Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. Cell retention was performed with three different devices: alternating tangential flow (ATF) and cell settler, which are widely used in industry; and a hydrocyclone, which had been tested with relatively low-density cell suspensions. For the first time, viable cell densities between 20×10^6 and 50×10^6 cell/mL were achieved in a perfusion with a hydrocyclone operated at pressure drops higher than 1 bar. Cultivations were maintained up to 50 days in lab-scale bioreactors and in a 50-L single-use bioreactor bag. A maximum cell density of 130×10^6 cell/mL was achieved at 19 pL/cell/day with ATF. As expected for membrane-less equipment, product retention in the bioreactor was not observed using cell settler and hydrocyclone. The reduction in CSPR provided higher product titers, even though a decrease in growth and productivity rates was observed.

Sumário

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas	xv
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xvii
1 Introdução.....	1
2 Objetivos da tese	5
3 Revisão Bibliográfica	6
3.1 Anticorpos monoclonais (mAbs).....	6
3.1.1 Mercado.....	8
3.2 Produção de mAbs por células animais.....	12
3.2.1 Metabolismo de células CHO.....	15
3.2.2 Meios de cultivo	17
3.2.3 Cultivo de células animais em biorreatores do tipo tanque agitado	18
3.2.4 Processos contínuos	20
3.3 Perfusão em biorreatores	22
3.3.1 Operação e controle de biorreatores em perfusão	27
3.3.2 Operação a baixas taxas específicas de perfusão (CSPR).....	28
3.3.3 Dispositivos de retenção celular.....	33
3.3.3.1 Sedimentador lamelado.....	37
3.3.3.2 Filtração tangencial alternante (ATF).....	39
3.3.3.3 Hidrociclone (HC)	42
4 Materiais e Métodos.....	47
4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	47
4.2 Ensaios de separação em batelada com hidrociclones	48
4.2.1 Comparação entre os cabeçotes de alta e de baixa pulsação	50
4.2.2 Controle de Q_o com uma bomba peristáltica.....	50
4.2.3 Efeito do diâmetro na saída do underflow	51
4.2.4 Cálculo para determinação de eficiência de separação em hidrociclone	52
4.3 Corridas em perfusão com o hidrociclone em biorreator de bolsas descartáveis de 50 L.....	52
4.3.1 Corrida HC-1: acoplamento do HC em fim de um cultivo em batelada alimentada.....	54
4.3.2 Corridas HC-2 e HC-3: customização das bolsas descartáveis para o acoplamento do HC	54
4.4 Ensaios de perfusão em biorreatores de bancada.....	55

4.4.1	<i>Sedimentador inclinado lamelado (CS)</i>	57
4.4.2	<i>Filtração tangencial alternante (ATF)</i>	57
4.4.3	<i>Hidrociclone (HC)</i>	58
4.4.4	<i>Ensaio analítico</i>	59
4.5	Cálculos das taxas e de eficiências de separação.....	60
4.6	Determinação dos atributos críticos de qualidade do produto.....	61
5	Resultados e Discussão	63
5.1	Ensaio em batelada com hidrociclones.....	63
5.1.1	<i>Intensidade de pulsação da bomba peristáltica de alimentação</i>	63
5.1.2	<i>Separação de células a $\Delta P > 2$ bar</i>	67
5.1.3	<i>Controle da vazão de overflow usando uma bomba peristáltica</i>	68
5.1.4	<i>Efeito do diâmetro na linha de reciclo de células (saída do underflow)</i>	70
5.2	Uso do hidrociclone em corridas em perfusão	74
5.2.1	<i>Corrida HC-1: recuperação da viabilidade celular de um cultivo em fase final de batelada alimentada</i>	74
5.2.2	<i>Corrida HC-2: aplicação do HC em uma bolsa descartável customizada com pequeno diâmetro na linha de alimentação</i>	79
5.2.3	<i>Corrida HC-3: obtenção de um cultivo de alta densidade celular com o hidrociclone</i>	85
5.2.4	<i>Corridas HC-4 e HC-5: aplicação do hidrociclone em biorreatores de bancada</i>	89
5.3	Corridas em perfusão em biorreatores de bancada usando sedimentador inclinado e ATF.....	100
5.3.1	<i>Cultivos em batelada simples e batelada alimentada em biorreator</i>	100
5.3.2	<i>Corridas em perfusão utilizando o sedimentador inclinado (CS10)</i>	104
5.3.2.1	<i>Corrida CS-1 (CHO DP-12, meio TC-LECC)</i>	104
5.3.2.2	<i>Corrida CS-2 (CHO_mAb#2, ActiPro fortificado)</i>	108
5.3.3	<i>Corridas em perfusão utilizando o ATF</i>	111
5.3.3.1	<i>Corridas ATF-1 e ATF-2 com células CHO DP-12</i>	111
5.3.3.2	<i>Corridas ATF-3 e ATF-4 com células CHO_mAb#2</i>	120
5.3.4	<i>Corrida HC-6: perfusão com dois equipamentos de retenção (ATF e HC)</i> ...	125
5.3.5	<i>Atributos críticos de qualidade obtidos para diferentes equipamentos de retenção</i> 133	
6	Conclusões e sugestões	139
6.1	Conclusões.....	139
6.2	Sugestões	143
	Referências Bibliográficas	145

Apêndices	168
A1. Registro de dados – perfusão ATF-1.....	168
A2. Registro de dados – perfusão ATF-2.....	169
A3. Registro de dados – perfusão ATF-3.....	170
A4. Registro de dados – perfusão ATF-4.....	171
A5. Registro de dados – perfusão CS-2	172
A6. Registro de dados – perfusão HC-6.....	173
A7. Corridas com CHO_mAb#2 utilizando ActiPro fortificado e sedimentador inclinado 174	
A8. Perfil de aminoácidos medidos na perfusão HC-5 com o HC2015, CHO_mAb#2 em ActiPro+CB1+CB3	175

Lista de Figuras

- Figura 3-1. Representação de uma imunoglobulina IgG, segmentada em porções F_{ab} e F_c , e composta por duas cadeias leves (azul-claro) e duas cadeias pesadas (azul-escuro), unidas por ligações dissulfeto. V_L e V_H correspondem às regiões variáveis, e C_L e C_H às regiões constantes das cadeias leve (subscrito L) e pesada (subscrito H), respectivamente. Em amarelo, as regiões determinantes de complementaridade (CDR), onde ocorre a ligação antígeno-anticorpo. 6
- Figura 3-2. Representação esquemática de um biorreator com células suspensas operado em perfusão acoplado a um equipamento de retenção celular externo..... 22
- Figura 3-3. Comparação entre processos em batelada simples, batelada alimentada e perfusão com células CHO DP-12 em meio TC-LECC realizados no presente trabalho. A) concentração de células viáveis (X_V); B) concentração de produto no biorreator; C) produtividade ou rendimento global (space time yield). Na perfusão, a X_V foi mantida constante a partir do dia 5 por aplicação de *bleeding*. 25
- Figura 3-4. Representação esquemática de um separador, com as correntes de alimentação proveniente do biorreator, diluída (ou perfundido) e concentrada (reciclada ao biorreator). 34
- Figura 3-5. A) Representação esquemática de um sedimentador inclinado. B) Montagem do sedimentador CS10 (Biotechnology Solutions) em conjunto com o trocador de calor e o dispositivo de vibração intermitente. Adaptado de Castilho (2015). 38
- Figura 3-6. A) Representação esquemática dos ciclos de pressão e de exaustão com ar comprimido e vácuo, que conferem o movimento alternante ao ATF. HFM – hollow fiber membrane (adaptado de Repligen 2015). B) Sistema ATF2 acoplado a um biorreator Applikon com vaso de 3 L, usado no presente trabalho no LECC/COPPE/UFRJ..... 40
- Figura 3-7. a) Representação esquemática do hidrociclone e o padrão de escoamento interno. b) Hidrociclones projetados por Deckwer et al. (2005) para separação de células animais, com dupla entrada tangencial; à esquerda, protótipo em aço inoxidável; à direita, protótipo em plástico anteriormente comercializado pela Sartorius. Adaptado de Carvalho; Castilho (2017). 43
- Figura 4-1. Corpo de teste para os ensaios de separação em batelada com o hidrociclone. A bomba na linha do *overflow* (tracejado) foi aplicada somente no ensaio descrito no item 4.2.2..... 48
- Figura 4-2. Mangueiras de silicone colocadas na saída do *underflow*. A) 9,5 mm DI; B) 25,4 mm DI..... 51
- Figura 4-3. Conectores rápidos ReadyMate™ presos a redutores, com diâmetro interno mínimo de A) 12,7 mm e B) 19,7 mm. 52
- Figura 5-1. Eficiência total (barras) e vazão de alimentação (símbolos) medidos a A) 0,5 bar; B) 1,0 bar; C) 1,5 bar usando cabeçotes de alta (fechados) e baixa (abertos) pulsação instalados na bomba peristáltica de alimentação do HC2015, empregando suspensões de beads cromatográficas com concentração entre 30×10^6 e 150×10^6 /mL. Ensaio realizado em duplicata experimental. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão. 65

Figura 5-2. Eficiências reduzidas (E') obtidas na separação de beads com HC2015 utilizando os cabeçotes de alta (A) e baixa (B) pulsação. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$	66
Figura 5-3. Curva de calibração para velocidade da bomba peristáltica 520U/520R2 e mangueira Marprene 3,2 x 2,4 mm.	69
Figura 5-4. Eficiência total (E_T) e razão de fluido (R_f) obtidos para vazões de <i>overflow</i> controladas por bomba peristáltica a 0,035 e 0,070 L/min, utilizando suspensões de beads a 5×10^6 (A, B) e 50×10^6 beads/mL (C, D). Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$	70
Figura 5-5. Efeito do diâmetro de tubo preso ao <i>underflow</i> (9,5 vs 25,4 mm DI) na eficiência de separação total E_T (linha contínua) e reduzida E' (linha pontilhada) de beads a A) 5×10^6 e B) 50×10^6 /mL. A condição “C” refere-se ao <i>underflow</i> livre. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$	72
Figura 5-6. Proposta final para a linha de reciclo do <i>underflow</i> para o biorreator descartável, por meio de uma conexão com ReadyMate™ com diâmetro interno de 19,7 mm acoplado a uma mangueira de silicone com 25,4 mm de diâmetro. Nesse experimento, o conteúdo do <i>underflow</i> foi coletado em uma garrafa Schott de 10 L.	73
Figura 5-7. Perfusão HC-1 com hidrociclone HC2015. A) hidrociclone posicionado acima do biorreator; B) redução do diâmetro interno da linha de reciclo para 3/8”. C) frasco Schott instalado na linha de reciclo a partir do dia 14, numa tentativa de aumentar o escoamento do <i>underflow</i> para o biorreator e eliminar o afogamento do orifício do <i>underflow</i>	75
Figura 5-8. Perfusão HC-1 com o HC2015 com linhagem CHO_mAb#1, iniciada a partir de uma batelada alimentada com viabilidade a 70%. A) X_V e taxa de perfusão; B) Viabilidade medida no biorreator (BR) e no perfundido (H); C) diâmetro médio das células; D) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 1,3 bar; E) glicose e lactato no biorreator (medidas antes e após cada ciclo de perfusão-reabastecimento com meio fresco); F) glutamina e amônio no biorreator; G) concentração de mAb; H) atividade de LDH extracelular.	77
Figura 5-9. Proposta para a conexão entre o <i>underflow</i> e o biorreator utilizando conectores ReadyMate™ (esq.). HC2015 instalado; a posição vertical foi obtida dobrando-se cuidadosamente a bolsa (dir.).	80
Figura 5-10. Perfusão HC-2 com o HC2015 com linhagem CHO_mAb#2, utilizando um biorreator descartável customizado (modelo PRO). A) X_V no biorreator (BR) e perfundido (H), e taxa de perfusão; B) viabilidade e diâmetro celular; C) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 2,5 bar. Valores de E_T calculados a partir do dia 19 após a instalação de um rotâmetro na linha de alimentação do HC, permitindo calcular Q_u ; D) glicose e lactato no biorreator (medidos antes de um ciclo de troca de meio), e CSPR; E) glutamato, glutamina e amônio no biorreator; F) concentração de mAb e osmolalidade; G) atividade de LDH extracelular; H) taxas específicas de crescimento e produtividade.	82
Figura 5-11. Efeito do diâmetro interno na linha de alimentação do HC2015 sobre ΔP medido à entrada do hidrociclone. Testes realizados com água usando a bomba 520U/520R2. No biorreator descartável usado na corrida HC-2, os valores de ΔP foram maiores devido à adição de uma linha extra de amostragem, conforme explicado no texto.	84

Figura 5-12. Perfusão HC-3 com linhagem CHO_mAb#2, utilizando um biorreator com bolsa descartável customizado (modelo DEV). A) X_v no biorreator (BR) e perfundido (H), e taxa de perfusão; B) viabilidade e diâmetro celular; C) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 2,5 bar; D) glicose, lactato no biorreator (medidos antes da troca de meio), e CSPR (no dia 4, avaliada em 177 pL/cel/d); E) glutamato, glutamina e amônio no biorreator; F) concentração de mAb e osmolalidade; G) atividade de LDH extracelular; H) taxas específicas de crescimento e de produtividade.	87
Figura 5-13. À esquerda: o biorreator RALF operando em perfusão com o HC2015 como equipamento de retenção (o HC não aparece nessa foto). À direita: detalhe do HC instalado na tampa no biorreator por meio de um adaptador com 12 mm de diâmetro interno. Observar o posicionamento livre para o orifício do <i>underflow</i> dentro do vaso, com espaço para a descarga em guarda-chuva.	89
Figura 5-14. Valores de pH monitorados em pHmetro externo calibrado. A) corrida HC-4 com CHO DP-12, alimentada com TC-LECC; B) corrida HC-5 com CHO_mAb#2, alimentada com ActiPro+CB1+CB3.....	91
Figura 5-15. Corrida HC-4: perfusão com HC2015, CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) medida em biorreator (BR) e perfundido (H); B) viabilidade e diâmetro celular avaliados em biorreator e perfundido; C) eficiências de separação total (E_T) e reduzida (E'); D) taxas específicas de crescimento e produtividade; E) perfis de glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica), e CSPR; F) perfis de mAb avaliados em biorreator e perfundido..	92
Figura 5-16. Corrida HC-5: perfusão com HC2015, CHO_mAb#2, alimentação com ActiPro+CB1+CB3. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e viabilidade medidas em biorreator (BR) e perfundido (H); B) viabilidade e diâmetro celular avaliados em biorreator e perfundido; C) eficiências de separação total (E_T) e reduzida (E'); D) perfis de glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica), e CSPR (entre dias 3 e 4, CSPR a 99 pL/cel/d); E) taxas específicas de crescimento e produtividade; F) perfis de mAb avaliados em biorreator e perfundido.....	97
Figura 5-17. Batelada (B) e batelada alimentada (FB) em biorreator com CHO DP-12 em meio basal TC-LECC. A) concentração de células viáveis e viabilidade; B) concentração de mAb; C) perfil de glicose e vazão de alimentação na batelada alimentada (Q_A); D) perfil de lactato. Dados apresentados como média±desvio-padrão, em duplicata analítica.	101
Figura 5-18. Batelada (B) e batelada alimentada (FB) em biorreator com CHO_mAb#2 em meio basal ActiPro. A) concentração de células viáveis e viabilidade; B) concentração de mAb; C) perfil de glicose e taxa de alimentação com CB1 (10% m/v) na batelada alimentada (Q_A); D) perfil de lactato. Dados apresentados como média±desvio-padrão, em duplicata analítica.....	103
Figura 5-19. Corrida CS-1 em perfusão com CS10, células CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração e viabilidade medidas no biorreator (BR) e perfundido (H); B) taxas de diluição da alimentação (D), perfundido (D_H) e <i>bleeding</i> (D_B); C) perfis de glicose, lactato e CSPR; D) perfil de anticorpo medido apenas no biorreator e produtividade específica. Dados apresentados como média±desvio-padrão, em duplicata analítica.	105
Figura 5-20. Massa de anticorpo acumulada nas corridas em batelada simples e batelada alimentada (descritas no item 5.3.1) em comparação à corrida CS-1, utilizando células CHO DP-12.	107

- Figura 5-21. Corrida CS-2, perfusão com CS10 com células CHO_mAb#2, alimentada com meio ActiPro+CB1+CB3 entre os dias 3-19, e ActiPro entre os dias 20-24. A) concentração de células viáveis no biorreator (BR) e perfundido (H), viabilidade e CSPR; B) taxas específicas de crescimento e produtividade; C) perfis de glicose e lactato; D) anticorpo medido no biorreator e perfundido. Dados apresentados como média±desvio-padrão, em duplicata analítica. 109
- Figura 5-22. Corrida ATF-1, perfusão com ATF com CHO DP-12 usando quatro meios de alimentação, com o meio basal TC-LECC fortificado com TCX2D. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e viabilidade medidas no biorreator (BR), e CSPR; B) taxas de diluição da alimentação(D), perfundido (D_H) e *bleeding* (D_B); C) glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica); D) perfis de anticorpo medido em biorreator e perfundido, e de produtividade específica..... 115
- Figura 5-23. Corrida ATF-2: perfusão com ATF, CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração e viabilidade medidas no biorreator (BR), e CSPR; B) taxas de diluição da alimentação (D), perfundido (D_H) e *bleeding* (D_B); C) perfis de glicose e lactato; D) perfil de anticorpo medido em biorreator e perfundido (média±desvio-padrão, duplicata analítica), e produtividade específica..... 117
- Figura 5-24. Retenção de mAb no biorreator nas corridas ATF-1 (A) e ATF-2 (B) utilizando o ATF com a membrana comercial da Repligen (#F2:RF02PES). 120
- Figura 5-25. Valores de X_v obtidos com ViCell (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e sensor de capacitância Fogale nas corridas ATF-3 (A,B) e ATF-4 (C,D) com o ATF O fator de conversão padrão de 1 pF/cm \equiv 10⁶ cels/mL. São apresentados apenas os valores de permissividade registrados no momento da amostragem com o ViCell, visto que não foi possível gravar o monitoramento completo por limitações técnicas do computador de aquisição de dados. 121
- Figura 5-26. Perfusão com células CHO_mAb#2 utilizando o ATF como equipamento de retenção em biorreator de bancada. Concentração celular (medição off-line), viabilidade e taxa de diluição, corridas ATF-3 (A) e ATF-4 (B). Taxas específicas de crescimento e produtividade, corridas ATF-3 (C) e ATF-4 (D). Perfis de glicose e lactato, corridas ATF-3 (E) e ATF-4 (F). Concentração de glutamato e glutamina, corridas ATF-3 (G) e ATF-4 (H); em (G), a CSPR entre os dias 3 e 4 foi avaliada em 115 pL/cel/d. Concentração de mAb medida em biorreator (BR) e perfundido (H), corridas ATF-3 (I) e ATF-4 (J). Dados de X_v, Glc, Lac e mAb apresentados como média±desvio-padrão, duplicata analítica. 123
- Figura 5-27. À esquerda: o biorreator Applikon com o ATF e o HC2015 acoplados como equipamentos de retenção celular. À direita: em primeiro plano, o HC instalado na tampa no biorreator por meio de um adaptador com 19 mm de diâmetro interno..... 126
- Figura 5-28. Perfusão HC-6 com CHO_mAb#2 em meio ActiPro utilizando dois equipamentos de retenção celular (ATF e HC2015) em um biorreator Applikon. O ATF foi operado nos intervalos entre os dias 0-8, 14-16 e 20-23 (áreas delimitadas pelas linhas tracejadas). A) concentração celular medida em biorreator (BR) e perfundido (H) (média±desvio-padrão, duplicata analítica); B) eficiência de separação; as velocidades rotacionais (rpm) referem-se à bomba de alimentação do HC; C) diâmetro e viabilidade celular medidos em biorreator e perfundido..... 128
- Figura 5-29. Corrida HC-6 alternando o ATF e o hidrociclone como equipamentos de retenção. A) perfis de glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica); B)

taxas específicas de crescimento (μ) e de produtividade (q_p); C) perfis de glutamato e glutamina; D) concentração de mAb em biorreator (BR) e perfundido (H). 131

Figura 5-30. Distribuição de: A) espécies N-glicosiladas; B) variantes de carga e C) agregados para amostras coletadas nas corridas HC-3, ATF-3 e CS-2 com equipamentos de retenção distintos com CHO_mAb#2 e ActiPro+CB1+CB3..... 135

Lista de Tabelas

Tabela 3-1. Os 10 medicamentos mais vendidos no mundo em 2019. Observar que oito são de origem biológica, dentre os quais sete são mAbs (adaptado de Urquhart, 2020; Walsh, 2018). N.A. – não avaliado.	9
Tabela 3-2. Exemplos de parcerias vigentes para a produção de alguns mAbs no Brasil. Fonte: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, atualizado em setembro/2020. Para mais informações sobre a situação de cada PDP, consultar: http://saude.gov.br/saude-de-a-z/parcerias-para-o-desenvolvimento-produtivo-pdp	11
Tabela 3-3. Comparação entre dispositivos de separação baseados por diferença de tamanho e de densidade, sob a perspectiva dos usuários. Baseado em Chotteau (2015) 36	
Tabela 4-1. Especificações de “cell type” configurados no ViCell respectivamente para a contagem de amostras de beads cromatográficas Superose 6.	50
Tabela 4-2. Corridas em perfusão realizadas em escala de bancada utilizando ATF, HC e sedimentador como dispositivos de retenção celular. A numeração das corridas não reflete a ordem em que elas foram realizadas.	56
Tabela 5-1. Comparação entre os cabeçotes de alta e baixa pulsação instalados na bomba peristáltica de alimentação do HC2015 para separação de células CHO DP-12. ΔV_u corresponde à diferença entre as viabilidades celulares medidas na alimentação e no <i>underflow</i> . As letras f, u e o subscritas referem-se respectivamente a “feed”, “ <i>underflow</i> ” e “ <i>overflow</i> ”. Ensaio realizado sem replicata experimental.	64
Tabela 5-2. Eficiência de separação de células CHO_mAb#2 com HC2015 operado com quedas de pressão de até 3 bar. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com n = 2.	68
Tabela 5-3. Efeito do diâmetro dos conectores da linha de reciclo sobre a separação e viabilidade de células CHO. Dados obtidos em duplicata técnica, exceto para 19,7 mm/2,8 bar (n = 1), e apresentados como média \pm desvio-padrão.	73
Tabela 5-4. Crescimento e produção durante os estados estacionários estabelecidos nas corridas HC-4 e HC-5 com HC2015 acoplado ao biorreator RALF com $V_T = 3 L$	97
Tabela 5-5. Valores médios para parâmetros de crescimento e produção nos estados estacionários estabelecidos na corrida CS-1 com sedimentador inclinado com CHO DP-12 em meio TC-LECC.	106
Tabela 5-6. Meios de alimentação empregados nas corridas ATF-1 e ATF-2 com CHO DP-12 cultivada em meio TC-LECC. “Glicose relativa (Glc_{rel})” consiste na razão entre a concentração de glicose medida nas formulações fortificadas com TCX2D e a do meio basal TC-LECC.	111
Tabela 5-7. Crescimento e produção durante os estados estacionários (EE) estabelecidos nas corridas ATF-1 e ATF-2, empregando CHO DP-12 cultivada em meio basal TC-LECC.	113
Tabela 5-8. Crescimento, produção e eficiência de separação para diferentes temperaturas aplicadas entre os dias 26 e 35, corrida HC-6. Nesse período, a CSPR variou entre 12 e 14 pL/cel/d.	129

Tabela 5-9. Parâmetros referentes aos cultivos HC-3, ATF-3 e CS-2 operados com diferentes equipamentos de retenção para as amostras coletadas para determinação do perfil de N-glicosilação, agregados e variantes de carga. N.D. – não determinado. 133

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Amn – concentração de amônio
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATF – filtração tangencial alternante (*alternating tangential flow*)
CB – CellBoost™
cels/mL – concentração de células por mililitro
CHO – célula de ovário de hamster chinês (*Chinese hamster ovary*)
CS – sedimentador (*cell settler*)
CSPR – taxa específica de perfusão (*cell-specific perfusion rate*)
 d^{-1} – por dia
D – taxa de diluição
 D_P – taxa de diluição do perfundido
 D_B – taxa de diluição de *bleeding*
DI – diâmetro interno
DO – oxigênio dissolvido
EE – estado estacionário
 E_T – eficiência total de separação
 E' – eficiência total reduzida de separação
g/L – grama por litro
Glc – concentração de glicose
Gln – concentração de glutamina
Glu – concentração de glutamato
HC – hidrociclone
IgG - imunoglobulina da classe G
L/d – litro por dia
L/min – litro por minuto
Lac – concentração de lactato
LDH – lactato desidrogenase
mAb – sigla em inglês para anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)
(m)g/L/d – (mili)grama por litro por dia
mM – milimol por litro
MS – Ministério da Saúde
pcd – picograma de proteína produzida por célula por dia (pg/cel/d)
pL/cel/d – picolitro por célula por dia
 P_v – produtividade volumétrica
 Q_f – vazão de alimentação do hidrociclone
 Q_o – vazão de *overflow* do hidrociclone
 Q_u – vazão de *underflow* do hidrociclone
 q_P – produtividade específica
 R_f – razão de fluido
rpm – rotação por minuto
SP - *setpoint*
STY – produtividade global (*space-time yield*)
TFF – filtração tangencial (*tangential flow filtration*)
 u_{tip} – velocidade na ponta do impelidor
Viab - viabilidade
 V_T – volume de trabalho
vvd – volume de meio trocado por volume de reator por dia

vvm – volume de gás trocado por volume de meio por minuto

X – concentração de partículas

X_v – concentração de células viáveis

$Y_{\text{Lac/Glc}}$ – coeficiente de rendimento de glicose em lactato

μ – taxa específica de crescimento

γ - taxa de cisalhamento

ΔP – queda de pressão no hidrociclone

ΔV_u – diferença de viabilidade de células medida entre alimentação e *underflow*

1 Introdução

O termo “biofármaco” é geralmente cunhado para designar proteínas e ácidos nucleicos obtidos de fontes biológicas não nativas, com finalidade terapêutica ou usados como ferramentas de diagnóstico *in vivo* (WALSH, 2002). Contudo, é mais frequentemente empregado para designar especificamente as proteínas recombinantes de uso terapêutico, as quais representam a grande maioria dos produtos desta classe. Entretanto, o mercado atendido pela indústria biofarmacêutica engloba também as vacinas recombinantes, as terapias gênicas e teciduais, e as moléculas utilizadas para diagnóstico *in vitro* ou *in vivo* (CASTILHO, 2017).

Ao longo das últimas décadas, desde 1982, quando foi aprovado o primeiro biofármaco para uso humano (insulina recombinante Humulin®, da empresa Eli Lilly), o mercado biofarmacêutico se estabeleceu, impulsionado pelo crescente número de aprovações por agências reguladoras como FDA (U.S. *Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*) e PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, Japão). O aumento da população de idosos, a maior incidência de doenças crônico-degenerativas como câncer e desordens inflamatórias, além da introdução dos biossimilares em decorrência da expiração de patentes de medicamentos inovadores, têm impulsionado o mercado de biofármacos (CASTILHO, 2017; SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). As vendas globais da indústria biofarmacêutica já superaram US\$ 200 bilhões em 2018, e quarenta e seis biofármacos alcançaram individualmente a marca de US\$ 1 bilhão em vendas naquele ano (os chamados *blockbusters*), sendo 28 anticorpos e 18 proteínas de outros tipos (LA MERIE PUBLISHING, 2019). Em comparação aos fármacos sintéticos, os biofármacos inovaram o mercado farmacêutico por serem moléculas de ação mais específica e oferecerem maiores níveis de segurança, além de possibilitar, em muitos casos, a única alternativa de tratamento para muitas doenças. Em decorrência de sua ação específica, os efeitos colaterais associados em geral têm menor incidência e/ou menor intensidade (OTTO; SANTAGOSTINO; SCHRADER, 2014).

Os biofármacos são moléculas com elevada massa molecular (algo entre 2 mil e 25 mil átomos) e com uma estrutura complexa requerida para a sua atividade biológica. O caráter de alto risco assumido pela indústria biofarmacêutica é evidenciado pelos elevados investimentos (US\$ 2,6 bilhões) e o longo tempo (10-15 anos) necessários para

desenvolver e lançar um novo produto no mercado, a uma taxa de sucesso de aprovação (ou seja, quando o produto é registrado pela agência reguladora e autorizado para comercialização) de aproximadamente 12% (FARID et al., 2020; PHRMA, 2016; THOMAS et al., 2016), ainda que superior à taxa de aprovação de moléculas sintéticas (THOMAS et al., 2016). Atualmente, a produção em larga escala dessas moléculas é majoritariamente baseada no cultivo de células animais recombinantes, em especial as de mamíferos (WALSH, 2018). Devido à suscetibilidade desses sistemas biológicos às condições de processo aplicadas, pode ocorrer variabilidade lote-a-lote e, portanto, os produtos devem apresentar conformidade em relação a uma determinada faixa de especificação para garantir a sua atividade biológica (KESIK-BRODACKA, 2018). A complexidade inerente ao controle de sistemas biológicos e o desenvolvimento de uma formulação que garantam a eficácia e a segurança do biofármaco exigem, portanto, uma instalação fabril cujos custos de construção e de manutenção são, no mínimo, duas vezes superiores em comparação à madura indústria de medicamentos sintéticos baseados em pequenas moléculas, e que leva quatro a cinco anos para ser construída (OTTO; SANTAGOSTINO; SCHRADER, 2014). Esses fatores, portanto, justificam os elevados preços dos biofármacos praticados no mercado (OTTO; SANTAGOSTINO; SCHRADER, 2014; REYNOLDS; ZYLBERBERG; CAMPO, 2016), representando tanto uma oportunidade de crescimento para as empresas farmacêuticas estabelecidas e emergentes, quanto um desafio para os sistemas de saúde para tornar as terapias acessíveis aos pacientes. A questão da acessibilidade tem impulsionado os países emergentes que outrora tinham baixa participação na indústria biofarmacêutica a buscar maneiras de oferecer tratamento a pacientes a custos aceitáveis através dos sistemas públicos de saúde (REYNOLDS; ZYLBERBERG; CAMPO, 2016).

No Brasil, o mercado farmacêutico faturou cerca de R\$ 76 bilhões em 2018 (ANVISA, 2018). O acesso universal ao sistema público de saúde garantido pela Constituição de 1988, associado às mudanças nos padrões demográficos e epidemiológicos, ampliaram consideravelmente a demanda por serviços de saúde, pressionando a incorporação e a compra pública dos medicamentos produzidos pela rota biotecnológica (TANAKA; AMORIM, 2014). A participação dos biofármacos (ou biológicos, de acordo com a terminologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) nas vendas do mercado farmacêutico vem aumentando nos últimos anos (19,1% em 2016, 22,0% em 2017 e 23,0% em 2018). Entretanto, em termos de quantidades comercializadas, a representatividade dos biofármacos foi de apenas 2% em

2018 (ANVISA, 2018), o que evidencia o elevado preço desses medicamentos, dominado por produtos importados. O alto preço também impacta os gastos públicos para a compra de medicamentos. Cerca de 60% do orçamento do Ministério de Saúde destinado à aquisição de medicamentos corresponde à compra de biológicos, equivalendo, porém, a apenas 12% da quantidade de medicamentos (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). Na última década, o governo brasileiro focou na produção de biossimilares valendo-se da expiração de patente dos biofármacos de referência. O formato adotado prevê a formação das Parcerias de Desenvolvimento Produtivo (PDPs), que visam ao fortalecimento do complexo industrial nacional para reduzir os custos de aquisição de medicamentos e produtos para saúde considerados estratégicos e de alto custo para o Sistema Único de Saúde. Neste modelo de PDP, vincula-se a aquisição de tais itens produzidos por laboratórios privados à exigência de transferência de sua tecnologia de produção para laboratórios públicos e companhias privadas nacionais, que gradualmente incorporariam as etapas do processo produtivo (RAUEN, 2017; SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). Com essa estratégia, espera-se reduzir a dependência de importação de biofármacos de alto valor, desenvolver competências de fabricação e assimilar tecnologia, para posteriormente constituir um arcabouço para as atividades de pesquisa e desenvolvimento nacionais (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). Em consulta no *site* do Ministério da Saúde em dezembro de 2020, 89 parcerias para a produção de medicamentos, vacinas e hemoderivados encontram-se vigentes (incluindo as que estão temporariamente em suspensão), sendo 27 relativas a biológicos, três a vacinas e uma a um hemoderivado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Na indústria biofarmacêutica, células animais recombinantes cultivadas em biorreatores constituem a plataforma dominante na produção em larga escala dos biofármacos. Estas células, especialmente as de mamíferos, promovem as complexas modificações pós-tradução que conferem a atividade biológica necessária para a ação terapêutica em pacientes humanos (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2015). A operação de tais reatores em modo contínuo com reciclo celular, conhecido como perfusão, tem recebido a atenção das empresas do ramo, em especial por promover concentrações celulares na ordem de 10^7 cels/mL mantidas em estado estacionário por longos períodos de tempo, preservando os atributos críticos de qualidade do produto de interesse em estreitas faixas de especificação, e reduzindo os períodos ociosos, como limpeza e esterilização dos biorreatores entre corridas (CASTILHO, 2015; CHOTTEAU, 2015; KARST; STEINEBACH; MORBIDELLI, 2018).

As vantagens associadas à operação em modo contínuo, combinada ao desenvolvimento de dispositivos de retenção celular mais robustos e com escalonamento mais simples, têm estimulado as indústrias a cogitar a perfusão em substituição à batelada alimentada (FARID; THOMPSON; DAVIDSON, 2014; LEHR; LYONS, 2016; NEWMAN, 2020; SAMSUNG, 2019; WALKER, 2017). A batelada alimentada, apesar da ampla aplicação na indústria nas últimas décadas devido à sua simplicidade de operação, inviabiliza a produção de moléculas lábeis, além de ser associada à formação de um produto mais heterogêneo em comparação ao processo contínuo (WALTHER et al., 2019). Durante a conferência do III *Integrated Continuous Biomanufacturing*, realizada em 2017 na cidade de Cascais (Portugal), um levantamento feito entre os participantes, oriundos da indústria (50%), academia (30%), cadeia de fornecedores (15%) e organizações governamentais (5%), apontou que 40% dos respondentes estavam, de fato, desenvolvendo plataformas de produção em modo contínuo já na fase inicial (fase I) de registro de produtos (FARID, 2019). Empresas consolidadas no ramo biofarmacêutico, como Genzyme, Bayer, Janssen, Merck, Novartis, Lonza e MedImmune, têm direcionando esforços para estabelecer processos contínuos em suas plataformas, seja em sua totalidade, seja em algumas etapas, como o cultivo em biorreator e a purificação por cromatografia (ARNOLD et al., 2019). Entretanto, a perfusão, se operada a elevadas taxas de diluição, implica na manipulação e no armazenamento de meio de alimentação e de perfundido em quantidades muito superiores ao volume de trabalho do reator. Maiores taxas de diluição, apesar de imprescindíveis para a produção de moléculas instáveis por conferirem um menor tempo de residência dentro do biorreator, causam a diluição do produto, o que acarreta em maior demanda por consumíveis nas posteriores etapas de purificação (CHOTTEAU, 2015; YANG et al., 2000). Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de estratégias de alimentação de processos em perfusão que permitam o estabelecimento de concentrações celulares muito elevadas, porém sob taxas de diluição moderadas a baixas.

O estabelecimento de processos com elevada produtividade e compatíveis com o processamento em modo contínuo mais eficiente representa uma necessidade da indústria biofarmacêutica, em especial para o caso dos mAbs, proteínas estáveis, administradas em geral em doses muito altas, e que hoje ocupam as primeiras posições de vendas mundiais de fármacos.

2 Objetivos da tese

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer um processo de cultivo em perfusão de células de ovário de hamster chinês (CHO) produtoras de anticorpos monoclonais (mAb) operado a baixas taxas de diluição.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Estabelecer estratégias de alimentação utilizando meios basais, meios mais concentrados ou uma combinação do meio basal com soluções concentradas de nutrientes para duas linhagens de células CHO produtoras de mAb;
- b) Avaliar o impacto da aplicação de menores taxas de diluição sobre o crescimento celular e a produtividade do processo;
- c) Comparar o desempenho de equipamentos de retenção celular que operam por diferentes princípios de separação (por diferença de tamanho e de densidade): o ATF, o sedimentador lamelado e o hidrociclone;
- d) Otimizar a instalação e a operação do hidrociclone como um dispositivo de retenção celular compatível em biorreatores de escala laboratorial e biorreatores de bolsas descartáveis de 50 L;
- e) Avaliar a estabilidade e a capacidade do processo em manter concentração e viabilidade celulares elevadas por períodos de quatro ou mais semanas.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Anticorpos monoclonais (mAbs)

Os anticorpos, também denominados imunoglobulinas, são glicoproteínas solúveis secretadas em grandes quantidades pelos linfócitos B em resposta à exposição aos antígenos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A imunoglobulina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas com massa de aproximadamente 50 kDa cada (cadeias pesadas), e duas cadeias com cerca de 25 kDa cada (cadeias leves). Cada dupla formada por uma cadeia leve e uma pesada é unida por ligações dissulfeto, e os dímeros formados conferem o formato da letra Y à molécula, conforme mostrado na Figura 3-1 (SPEARMAN; DIONNE; BUTLER, 2011). Uma dobradiça, a qual pode ser flexível ou rígida, separa duas regiões: a porção F_c (fragmento cristalizável), formada pelos domínios constantes C_{H2} e C_{H3} das cadeias pesadas, e que assume a função de elicitar as células de defesa do sistema imune (função efetora); e a porção F_{ab} (fragmento de ligação ao antígeno), que inclui a região variável do anticorpo responsável pelo reconhecimento e ligação ao antígeno. A especificidade na ligação anticorpo-antígeno é mediada pelas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) presentes nos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas.

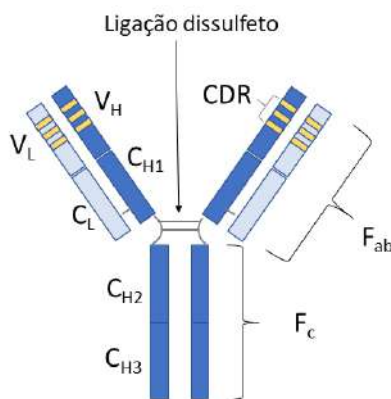


Figura 3-1. Representação de uma imunoglobulina IgG, segmentada em porções F_{ab} e F_c , e composta por duas cadeias leves (azul-claro) e duas cadeias pesadas (azul-escuro), unidas por ligações dissulfeto. V_L e V_H correspondem às regiões variáveis, e C_L e C_H às regiões constantes das cadeias leve (subscrito L) e pesada (subscrito H), respectivamente. Em amarelo, as regiões determinantes de complementaridade (CDR), onde ocorre a ligação antígeno-anticorpo.

Das cinco classes de imunoglobulinas (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), a IgG é a classe mais estudada para o desenvolvimento e a comercialização de anticorpos para uso terapêutico, devido ao maior tempo de meia-vida no plasma, estabilidade e facilidade para

purificação por afinidade (JOSTOCK, 2011), além de promover a função efetora essencial para alguns mecanismos de ação, como redução ou eliminação de tumores, por exemplo. Adicionalmente, a IgG possui o padrão de glicosilação mais simples dentre as imunoglobulinas, que consiste em uma ligação N-glicosídica no resíduo 297 de asparagina (Asn297) da porção F_c. Essa classe é subdividida em quatro isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada qual com variações na sequência de aminoácidos na região da dobradiça (SPEARMAN; DIONNE; BUTLER, 2011).

A determinação da estrutura dos anticorpos foi a base para elucidar as suas funções e os mecanismos que o sistema imune emprega para produzir cerca de 10¹⁸ moléculas distintas (BRINEY et al., 2019), cada uma com sua especificidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008). Entretanto, durante muitos anos, a única fonte de anticorpos disponíveis eram os soros policlonais coletados de indivíduos ou animais imunizados, contendo anticorpos produzidos por muitos clones de linfócitos B estimulados por diferentes porções (os epítomos) do antígeno de interesse, e também por diferentes antígenos apresentados anteriormente ao organismo. A produção *in vitro* de anticorpos com especificidade única, obtidos a partir da fusão entre um mieloma e um clone de linfócito B (portanto, monoclonal), teve início com o estabelecimento da tecnologia de hibridomas (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) empregando em geral células de camundongo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). O primeiro mAb terapêutico aprovado para uso em humanos foi OKT-3 (muronomabe) em 1986, para controle de rejeição aguda de órgãos transplantados (TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008). Nas décadas posteriores, o advento da biologia molecular e a identificação das sequências gênicas responsáveis pela expressão dos anticorpos permitiram desenvolver moléculas quiméricas, humanizadas ou humanas, tornando-as menos imunogênicas e com maiores chances de sucesso nos ensaios clínicos para aprovação (ROQUE; LOWE; TAIPA, 2004; TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008).

Atualmente, a maioria dos anticorpos monoclonais (mAbs) para fins terapêuticos são humanos do isotipo IgG1, devido à sua maior efetividade na função efetora. A atuação dessas moléculas baseia-se em três mecanismos principais: i) ligação direta ao antígeno-alvo ou tumor celular; ii) indução da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e da citotoxicidade dependente do complemento (CDC); iii) aplicação de alta especificidade de uma droga, toxina ou radioisótopo em células cancerosas (ADAMS; WEINER, 2005). Os mAbs são também empregados em ensaios de diagnóstico *in vivo* e

em inúmeros testes *in vitro* para detecção e quantificação de moléculas de interesse comercial e acadêmico e em análises clínicas (MARKS, 2015).

O nome não-comercial dos anticorpos monoclonais termina com o sufixo *-mab* (*-mabe*, na língua portuguesa), precedido por designações relativas ao organismo de origem, estrutura e alvo (BIOATLA, 2017). Os anticorpos de origem murina recebem o morfema *o* antes de *-mabe* (por exemplo, besilesomabe, muromomabe); os quiméricos, o morfema *xi* (abciximabe, rituximabe); os humanizados, o morfema *zu* (daclizumabe, trastuzumabe); e os humanos, o morfema *u* (belimumabe, adalimumabe).

3.1.1 Mercado

Os anticorpos monoclonais são os biofármacos mais estudados e aprovados para uso terapêutico em humanos, devido à sua especificidade de ação e, conseqüentemente, à eficácia no tratamento de diversas doenças. No mais recente levantamento realizado por Walsh (2018), os mAbs corresponderam a 53% dos novos biofármacos aprovados nos EUA e União Europeia para uso terapêutico humano entre os anos de 2015 e 2018, um percentual superior ao dos quadriênios 2005-2009 (22%) e 2010-2014 (26,5%). Em 2017, as vendas totais de mAbs atingiram US\$ 123 bilhões. O anticorpo Humira (adalimumabe) foi o biofármaco mais vendido em 2018, com vendas de cerca de US\$ 20 bilhões e, até hoje, é o mais vendido. Em 2019, sete dos dez medicamentos mais vendidos no mundo corresponderam a mAbs e derivados (Tabela 3-1), sendo majoritariamente indicados para o tratamento de doenças inflamatórias ou autoimunes (US\$ 64,6 bilhões de vendas acumuladas em 2017) e câncer (US\$ 43,1 bilhões, acumulados em 2017) (WALSH, 2018).

Tabela 3-1. Os 10 medicamentos mais vendidos no mundo em 2019. Observar que oito são de origem biológica, dentre os quais sete são mAbs (adaptado de Urquhart, 2020; Walsh, 2018). N.A. – não avaliado.

Posição	Nome comercial	Produto	Fabricante	Expiração da patente (EUA/UE)	Indicação	Vendas (em bilhões US\$)	Biossimilares aprovados (EUA/ UE)
1	Humira	adalimumabe	Abbvie+Esai	2016/2018	Artrite reumatoide	19,2	Halimatoz/Hefiya/Hyrimoz, Amgevita/Amjevita/Solymbic, Cyltezo, Imraldi
2	Keytruda	penbrolizumabe	Merck&Co	2036/2028	Melanoma	11,1	-
3	Revlimid	lenalidomida	Celgene	N.A.	Mieloma múltiplo, síndrome mielodisplásica	9,7	-
4	Eliquis	apixabana	Bristol-Myers Squibb	N.A.	Anti-coagulante	7,9	-
5	Opdivo	nivolumabe	Bristol-Myers Squibb	2027/2026	Melanoma, câncer renal, câncer de pulmão	7,2	-
6	Avastin	bevacizumabe	Roche	2017/2019	Câncer colorretal	7,1	Mvasi
7	Rituxan	rituximabe	Roche+ Pharmstandard	2013/2016	Linfoma não-Hodgkin	6,5	Blitzima/Truxima, Ritemvia, Rituzena, Rixathon/Riximyo
8	Stelara	ustequinumabe	Johnson&Johnson	2023/2024	Psoríase	6,4	-
9	Herceptin	trastuzumabe	Roche	2019/2014	Câncer de mama	6,1	Herzuma, Kanjinti, Trazimera, Ogivri, Ontruzant
10	Prevnar 13	vacina 13-valente	Pfizer	N.A.	Imunização contra <i>S. pneumoniae</i>	5,8	-

Apesar do evidente sucesso dos mAbs, Walsh (2018) também prevê a saturação desse mercado. Por um lado, vários mAbs são lançados contra um mesmo alvo, como o fator de necrose tumoral TNF- α que, sozinho, gerou vendas de US\$ 39,8 bilhões em 2017. Por outro lado, há mAbs com múltiplas indicações, como o infliximabe, usado no tratamento de várias formas de artrite, psoríase, doença de Crohn, colite ulcerativa e espondilite anquilosante. Isso, somando-se à pressão exercida pela massiva entrada dos biossimilares e a introdução de tecnologias competidoras, inovam o mercado com a descoberta de novos alvos, desenvolvimento de diferentes estruturas baseadas em mAbs e combinação de mAbs com um segundo agente terapêutico.

Os mAbs também corresponderam a mais de 50% dos biossimilares aprovados na Europa e EUA desde 2006 (WALSH, 2018). Apesar da crescente incorporação desses produtos em ambas as regiões, uma maior penetração dos biossimilares é esperada nos mercados de países menos desenvolvidos, visto que a competitividade com os biofármacos de referência acarreta redução de preço e economia para os sistemas de saúde.

De acordo com o Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico de 2018 (ANVISA, 2018), seis mAbs estão entre as 20 substâncias com maior faturamento no mercado brasileiro em 2018. Trastuzumabe, adalimumabe, infliximabe, bevacizumabe, rituximabe e nivolumabe assumiram respectivamente as posições 1, 3, 5, 7, 10 e 11 no *ranking* de valores de faturamento, cada um ultrapassando R\$ 500 milhões. Entretanto, em termos de quantidades, nenhum biofármaco apareceu nas 20 primeiras posições, um indício do alto valor agregado desses medicamentos, os quais corresponderam a 23% do faturamento total dos medicamentos em 2018, mas apenas a 2% do total das apresentações comercializadas. Com base em uma pesquisa no *site* da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED, atrelado à ANVISA) em dezembro de 2019, os preços de fábrica máximos atribuídos aos mAbs, sem incidência de impostos, podem variar entre R\$ 3 e R\$ 224 mil por miligrama de princípio ativo. A título de exemplo, o custo referente apenas à quantidade necessária de infliximabe para o tratamento de colite ulcerativa moderada a grave de acordo com a posologia recomendada, e considerando os preços de compras públicas mais recentes desse anticorpo, totalizaria cerca de R\$ 48 mil por paciente (CONITEC, 2019). Ainda segundo o mesmo relatório de recomendação elaborado pela CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, ligado ao MS), o custo de um segundo candidato (vedolizumabe) para tratar a mesma doença totalizaria R\$ 153,5 mil para um paciente.

Conforme comentado na Introdução, a política pública nacional vigente para o setor de biofármacos baseia-se no estabelecimento de PDPs para a transferência de tecnologia entre entidades privadas e públicas. Alguns exemplos de PDPs estabelecidas para a produção de mAbs são apresentados na Tabela 3-2.

Tabela 3-2. Exemplos de parcerias vigentes para a produção de alguns mAbs no Brasil. Fonte: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, atualizado em setembro/2020. Para mais informações sobre a situação de cada PDP, consultar: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/parcerias-para-o-desenvolvimento-produtivo-pdp>

Produto	Indicação	Apresentação	Instituição pública	Parceiro privado (nacional)	Detentora ou desenvolvedor da tecnologia do produto
Adalimumabe	Doença inflamatória	Solução Injetável (40 mg/0,8 mL)	Bio-Manguinhos	Bionovis S.A - Companhia Brasileira de Biotecnologia Farmacêutica	Fresenius-Kabi
Bevacizumabe	Oncológico	Solução Injetável (25 mg/mL)	Butantan	Libbs Farmacêutica Ltda	mAbxience
Golimumabe	Doença inflamatória	Solução injetável (50 mg)	Bio-Manguinhos	Bionovis S.A.	Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.
Infliximabe	Doença inflamatória	Pó para solução injetável frasco com 10mL (100 mg)	Bio-Manguinhos	Bionovis S.A.	Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.
Rituximabe	Oncológico/Artrite reumatoide	Solução injetável frasco com 50mL (10 mg/mL)	Butantan	Libbs Farmacêutica Ltda	mAbxience
Trastuzumabe	Oncológico	Pó para solução injetável (150 mg; 440 mg)	Bio-Manguinhos	Bionovis S.A.	Samsung Bioepis

Algumas empresas nacionais atuam de forma independente no segmento biofarmacêutico, como Libbs e Cristália. Outras formaram-se a partir da união de empresas, como a Bionovis (*joint venture* entre Aché, EMS, Hypera Pharma e União Química), e a Orygen Biotecnologia (*joint venture* entre a Eurofarma e Biolab). Destaca-se, também, a importância do Instituto Butantan (SP), da Fiocruz/Bio-Manguinhos (RJ) e do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR, PR) como centros de referência públicos na área de pesquisa e desenvolvimento, e responsáveis pela transferência de tecnologia de produção de vários biossimilares (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018).

3.2 Produção de mAbs por células animais

O estabelecimento da produção *in vitro* de anticorpos por hibridomas representou o primeiro passo para a indústria biofarmacêutica desenvolver e explorar comercialmente os mAbs como agentes terapêuticos. A descrição da tecnologia de geração de hibridomas foi publicada na revista *Nature* em 1975 (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) e, portanto, livre de direitos de proteção intelectual. Além disso, cada nova molécula de mAb desenvolvida é considerada um produto individual, o qual pode ser patenteado para gerar exclusividade no mercado (KUNERT; REINHART, 2016). Entretanto, os primeiros mAbs, por serem produzidos por hibridomas oriundos da fusão de linhagens celulares murinas, desencadearam uma série de respostas imunogênicas quando aplicados em humanos, sendo rapidamente eliminados do organismo e, assim, apresentando baixa eficácia (TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008). Os mAbs aprovados mais recentemente são humanos ou humanizados (WALSH, 2018), idealmente produzidos a partir de genes obtidos de indivíduos imunizados com um antígeno em particular e de bibliotecas de genes comercialmente disponíveis (KUNERT; REINHART, 2016). Também com base no avanço das técnicas de biologia molecular, as linhagens de células animais recombinantes constituem a plataforma dominante para a produção de mAbs, devido à possibilidade de modificações do seu genoma pela inserção dos genes responsáveis pela codificação da proteína de interesse e pela edição de sequências gênicas que promovem o aumento da expressão e da secreção proteica. Apesar da descrição na literatura para sistemas alternativos de produção de anticorpos, baseados em organismos recombinantes como plantas (SARRION-PERDIGONES et al., 2011), leveduras (ZHA; LINDEN; POTGIETER, 2011) e animais transgênicos (YOSHINORI; MASAMICHI, 2011), e de fragmentos de mAbs expressos em bactérias (TACHIBANA; TAKEKOSHI, 2011), do ponto de vista industrial, as células animais, especialmente as de mamíferos, são o sistema de expressão de mAbs predominantes. Segundo Walsh (2018), 79% dos novos produtos aprovados no período de 2015 a 2018 são produzidos em células de mamíferos. As vantagens das células de mamíferos como sistema de expressão incluem: i) a capacidade de processamento pós-tradução, gerando anticorpos com características similares aos de humanos nativos e com a atividade biológica necessária (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2015); ii) facilidade na adaptação de linhagens aderentes para o cultivo em suspensão, o que permite o seu cultivo em biorreatores do tipo tanque agitado de uso consagrado na indústria biotecnológica (GAUGHAN, 2016; KUYSTERMANS; AL-

RUBEAI, 2011); iii) os avanços das duas últimas décadas na geração de linhagens celulares com alta produtividade específica em um intervalo de tempo relativamente curto, de aproximadamente 20 semanas (JOSTOCK, 2011).

As principais linhagens celulares empregadas na produção de mAbs aprovados para uso humano são CHO (*Chinese hamster ovary*) e as de mieloma murino NS0 e Sp2/0 (KUNERT; REINHART, 2016). As células CHO são empregadas em pelo menos 70% dos processos industriais para a produção de proteínas terapêuticas (JAYAPAL et al., 2007; KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2015) e presente em 75% de publicações científicas relativas a mAbs (KUNERT; REINHART, 2016). Oitenta e quatro por cento dos novos mAbs aprovados entre 2015 e 2018 são produzidos por células CHO (WALSH, 2018). A popularidade das células CHO na indústria é atribuída a várias razões, especialmente a: i) sistemas de amplificação gênica bem caracterizados, como o da diidrofolato redutase (DHFR) e da glutamina sintetase (GS), os quais aumentam a produtividade específica da linhagem; ii) a fácil adaptação ao cultivo em suspensão, o que permite a utilização de biorreatores de larga escala; iii) elevadas taxas de crescimento e de produção em meios quimicamente definidos; iv) um padrão de modificações pós-tradução especialmente a glicosilação, semelhante ao conferido por células humanas; e v) segurança comprovada há pelo menos duas décadas frente à propagação de vírus humanos e outros agentes adventícios eventualmente patogênicos para humanos, o que aumenta as chances de aprovação pelas agências reguladoras (BIRCH; RACHER, 2006; GAUGHAN, 2016; KELLEY, 2009; KIM; KIM; LEE, 2012).

De modo geral, a produção de proteínas terapêuticas com células de mamíferos contempla duas grandes etapas de processamento: *upstream*, que se inicia com o descongelamento de um criotubo proveniente de um banco de trabalho de células, e prosseguindo com a expansão do inóculo (N-1), cultivo no biorreator de produção principal (N) e remoção das células (clarificação); e *downstream*, que engloba a captura do produto secretado a partir do sobrenadante do cultivo, purificação, concentração, formulação e envase. Em comparação ao processamento *upstream*, o desenvolvimento de linhagens de rápido crescimento e altamente produtivas é relativamente longo e laborioso, e requisitos como estabilidade genética e crescimento em meios quimicamente definidos também devem ser contemplados nessa etapa. O desenvolvimento do processo de produção prossegue com a inclusão de biorreatores de bancada e piloto, em que investigações dos aspectos físicos e nutricionais sobre o crescimento e a produtividade são conduzidas (GAUGHAN, 2016; SHUKLA; THÖMMES, 2010).

Na plataforma industrial para produção de mAbs, a etapa de captura consiste, via de regra, em cromatografia de afinidade utilizando proteína A como ligante. A especificidade da ligação entre a porção F_c e a proteína A na fase estacionária permite a eliminação da maior parte de contaminantes, conferindo uma pureza superior a 98% em uma única etapa (SHUKLA; THÖMMES, 2010). As etapas subsequentes de polimento, baseadas em uma combinação de cromatografias de troca iônica e de interação hidrofóbica, objetivam reduzir a quantidade de contaminantes como DNA, proteínas da célula hospedeira (HCP) e agregados de alta massa molecular aos níveis aceitáveis para a formulação final. A remoção da carga viral contempla pelo menos duas etapas ortogonais, a inativação (por exemplo, por redução de pH) e a filtração. O produto com alto teor de pureza (já denominado insumo farmacêutico ativo – IFA) é, finalmente, concentrado e armazenado no tampão de formulação por uma etapa de ultrafiltração/diafiltração, e destinado para o envase (SHUKLA; THÖMMES, 2010). Os rendimentos globais típicos de uma purificação de mAbs variam entre 60 e 80%, dependendo do número de etapas (BIRCH; RACHER, 2006).

A demanda por alguns mAbs ultrapassa 100 kg ao ano, uma vez que altas doses aplicadas com frequência são normalmente requeridas em terapias (HAN; HEWIG; VEDANTHAM, 2011). O desenvolvimento de linhagens altamente produtivas e o aperfeiçoamento nas condições do cultivo já permitem estabelecer processos com produtividades volumétricas superiores a 1 g/L/d (OZTURK, 2019). Por outro lado, as etapas de purificação não acompanharam as melhorias promovidas no processamento *upstream*. Os altos títulos obtidos no sobrenadante requerem colunas de grande diâmetro nos métodos cromatográficos, com impacto direto sobre os custos. Métodos alternativos à cromatografia e a filosofia de operação em modo contínuo têm sido propostos para aumentar os índices de rendimento e pureza e estabelecer processos com maior capacidade de processamento (CARVALHO; CASTILHO, 2017; GOTTSCHALK, 2008; GRONEMEYER; DITZ; STRUBE, 2014).

No desenvolvimento e otimização de processo e de técnicas analíticas, o princípio do *Quality by Design* (QbD, ou Qualidade Baseada no Projeto) combinado a métodos de alto rendimento (*high-throughput*) tem sido adotado pela indústria para mitigar os riscos na manufatura que impactam a qualidade do produto. Dessa forma, a implementação do QbD contribui no estabelecimento de processos mais robustos e eficientes que resultam em um produto final com maior eficácia clínica (GRONEMEYER; DITZ; STRUBE, 2014).

3.2.1 Metabolismo de células CHO

O metabolismo das linhagens imortalizadas cultivadas *in vitro* é altamente desregulado. As taxas de consumo de glicose e de glutamina excedem às necessidades nutricionais das células, uma condição conhecida como *overflow metabolism*. Conseqüentemente, subprodutos como lactato, amônio e alanina se acumulam no meio extracelular, resultado dos elevados fluxos nas vias da glicólise e da glutaminólise (AMABLE; BUTLER, 2008).

A glicose tem um papel fundamental no metabolismo celular, pois é a fonte primária para a produção de compostos energéticos e precursores para a síntese de biomassa. Um fenômeno bastante observado é a glicólise aeróbia ou “efeito Warburg”, no qual a glicose, em concentrações mais elevadas, é preferencialmente convertida em lactato, mesmo em concentrações não limitantes de oxigênio. Apesar do menor rendimento de ATP, a redução do piruvato a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) proporciona uma regeneração de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) mais rápida em relação à fosforilação oxidativa na mitocôndria com a entrada do piruvato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esse mecanismo seria uma maneira de células altamente proliferativas maximizarem o seu crescimento na presença de nutrientes em excesso (WAHRHEIT, 2014). Entretanto, o lactato, em determinadas concentrações, inibe o crescimento celular devido a alterações do pH e ao aumento da osmolalidade do meio (CRUZ et al., 2000; LAO; TOTH, 1997; OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992). Por outro lado, as células CHO possuem a habilidade em modificar o metabolismo para consumir o lactato produzido quando a glicose é exaurida do meio. Essa condição é conhecida como *shift* metabólico, e é frequentemente relacionada a um metabolismo oxidativo mais eficiente, com um impacto positivo sobre a produtividade (LUO et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2013; ZAGARI et al., 2013). Além disso, o *shift* minimiza os efeitos tóxicos associados ao lactato acumulado no meio extracelular.

Glutamina e glutamato são importantes precursores para a síntese de outros aminoácidos e nucleotídeos, além de exercerem um papel fundamental como fonte de carbono e de energia para a formação de compostos intermediários no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (AMABLE; BUTLER, 2008). Assim como a glicose, a glutamina também é consumida a altas taxas quando presente em altas concentrações, levando ao acúmulo de amônio. O amônio pode inibir o crescimento celular e, sobretudo, afetar o padrão de glicosilação do produto de interesse (BORYS; LINZER; PAPOUTSAKIS, 1994; YANG;

BUTLER, 2002) em concentrações muito menores (2-10 mM) em comparação ao lactato (20-40 mM) (CRUZ et al., 2000; FREUND; CROUGHAN, 2018; TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008).

É importante ressaltar que, como qualquer sistema biológico, as rotas metabólicas são interconectadas, capacitando as células a se adaptarem às modificações em função das características do cultivo no momento da perturbação. Esse fato é relevante especialmente nos processos em batelada simples e alimentada, em que as células são expostas a diferentes concentrações de glicose e glutamina e ajustam as taxas de consumo de acordo com a disponibilidade desses nutrientes (GÒDIA; CAIRÓ, 2006). Aproveitando-se dessa flexibilidade, diferentes estratégias podem ser exploradas para reduzir as taxas glicolíticas e favorecer rotas oxidativas, de modo a aumentar a produção de mAb sem prejudicar o crescimento celular. Uma possibilidade é otimizar as taxas de alimentação mantendo baixas concentrações de glicose e glutamina para limitar o acúmulo de lactato e amônio, mas em níveis mínimos para atender à demanda nutricional das células. Os efeitos da limitação nutricional sobre o metabolismo e produção foram amplamente investigados em batelada alimentada (BIBILA; ROBINSON, 1995; GAGNON et al., 2011; KONAKOVSKY et al., 2016; LU; SUN; ZHANG, 2005; MATTHEWS et al., 2016; SAUER et al., 2000; WAHRHEIT; NICOLAE; HEINZLE, 2014) e em perfusão (BANIK; HEATH, 1996; KONSTANTINOV, 2000; TENG et al., 2011). Entretanto, como pontuam Gòdia e Cairó (2006), essa estratégia deve se basear em um estudo cinético adequado para cada linhagem utilizada, sendo recomendada a medição *on-line* para o adequado ajuste das taxas de alimentação. A privação de glicose reduz a disponibilidade de açúcares de nucleotídeos precursores da glicosilação (VILLACRÉS et al., 2015; WONG et al., 2005), o que também deve ser considerado na escolha da estratégia de alimentação. A substituição de glicose e/ou glutamina por outros precursores é outra possibilidade, desde que as células sejam capazes de transportar e metabolizá-los a menores taxas (ALTAMIRANO et al., 2004; GÒDIA; CAIRÓ, 2006). A substituição da glutamina é de particular interesse, visto a necessidade em se reduzir o acúmulo de amônio. Nesse caso, o fornecimento de glutamina por meio de di-peptídeos (CHRISTIE; BUTLER, 1994), ou a substituição de glutamina por piruvato (GENZEL et al., 2008) ou glutamato (ALTAMIRANO et al., 2000) já foram propostos, com aumentos significativos na produtividade, embora as concentrações máximas de células alcançadas tendam a ser menores (GAGNON et al., 2011). As linhagens amplificadas com o gene da glutamina sintetase, que não requerem a suplementação de glutamina no meio de cultivo,

já são utilizadas industrialmente, sendo reportadas concentrações de mAb superiores a 5 g/L em batelada alimentada para células CHO e NS0 (BEBBINGTON et al., 1992; BIRCH; MAINWARING; RACHER, 2008). A terceira abordagem para um melhor desempenho do cultivo é a engenharia metabólica (GÒDIA; CAIRÓ, 2006), em que ou rotas enzimáticas são incorporadas para aumentar o fluxo para o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (IRANI et al., 1999), ou reações enzimáticas responsáveis pela desregulação metabólica são moduladas (ZHOU et al., 2011).

3.2.2 Meios de cultivo

As células animais requerem uma grande variedade de nutrientes para o crescimento e a produção. Usualmente, as células são propagadas em um meio de cultivo basal que contém todos os componentes necessários (carboidratos, aminoácidos, sais, vitaminas e fatores de crescimento) em concentrações suficientes para manter os cultivos em batelada simples por poucos dias (YANG, 2019). Misturas de meios clássicos, como DMEM e Ham's F-12 (cuja composição pode ser consultada em BURGNER; BUTLER, (2006)), compõem a base da maioria dos meios utilizados industrialmente. Soros e, posteriormente, hidrolisados derivados de plantas, passaram a ser suplementados a esses meios, agregando lipídeos, hormônios e proteínas carreadoras necessários para um crescimento celular mais robusto e uma maior produtividade final (YANG, 2019). Além disso, sua composição rica em proteínas confere uma maior proteção às células frente a tensões de cisalhamento impostas nos biorreatores, especialmente em sistemas aerados. Entretanto, a composição indefinida de ambos os suplementos, o potencial de contaminação por vírus e príons por parte dos soros no produto final, e a alta variabilidade na matéria-prima usada na produção desses suplementos conferem características indesejáveis para a produção industrial, como uma ampla faixa de variação dos atributos críticos de qualidade, e um sobrenadante mais impuro para o processamento *downstream* (BURGNER; BUTLER, 2006; YANG, 2019). Portanto, atualmente os meios adotados possuem composição química definida, cujos componentes são adicionados de forma individual. A ausência de soro e de hidrolisados evidenciou a importância dos metais-traço, principalmente como cofatores para as enzimas envolvidas na glicosilação (PACIS et al., 2011), ou para um metabolismo oxidativo mais eficiente (XU; HOSHAN; CHEN, 2016). Aditivos químicos, como o Pluronic F68, são utilizados para minimizar as tensões cisalhantes provocadas por microbolhas (RITACCO; WU; KHETAN, 2018; YANG, 2019). A fim de reduzir custos e ter um maior controle sobre a linha de produção, muitas

empresas biofarmacêuticas desenvolvem os seus próprios meios de produção, quimicamente definidos e livres de proteínas.

Com a ampla adoção da batelada alimentada, foi necessário desenvolver meios de alimentação capazes de sustentar maiores concentrações celulares por, pelo menos, duas semanas. Esses meios – ou *feeds* – possuem uma maior concentração de carboidratos e aminoácidos. Para impedir efeitos deletérios por hiperosmolalidade, os sais são eliminados ou adicionados em concentrações reduzidas (YANG, 2019). Entretanto, problemas de solubilização e um desbalanceamento nutricional desses meios podem acarretar situações de depleção ou acúmulo de metabólitos tóxicos. Análises do meio consumido (*spent media analysis*) são importantes para a otimização dos meios, em que a concentração de componentes específicos, como aminoácidos, é ajustada de acordo com a demanda pela linhagem celular em uso (COSTA et al., 2014; KISHISHITA et al., 2015). Misturas de meios basais com *feeds* também são comumente investigadas para melhorar o desempenho na produção tanto em batelada (REINHART et al., 2015, 2018) quanto em perfusão (LIN et al., 2017; MAYRHOFER et al., 2020). Além de considerar as demandas nutricionais das linhagens utilizadas, os efeitos sobre os atributos críticos de qualidade da proteína de interesse, como cor da formulação final, padrão de N-glicosilação, formação de agregados e distribuição de variantes de carga, devem ser considerados na formulação dos meios (BRÜHLMANN et al., 2015; VIJAYASANKARAN et al., 2013).

3.2.3 Cultivo de células animais em biorreatores do tipo tanque agitado

Embora os dispositivos desenvolvidos para o cultivo de células aderentes, como as garrafas *roller* e os sistemas multiplacas, promovam altas concentrações celulares e maiores produtividades em relação aos métodos tradicionais de laboratório, eles não são ideais para uso em escala industrial. Uma vez que a máxima concentração celular alcançada está diretamente relacionada à superfície disponível, eles implicam altos custos em termos de espaço, consumíveis, equipamentos e mão-de-obra, além de um controle ineficiente sobre os parâmetros físicos e químicos do cultivo devido à baixa homogeneização (RODRIGUES et al., 2010). O estabelecimento de protocolos de adaptação das células para o crescimento em suspensão foi um dos fatores decisivos para a utilização dos biorreatores do tipo tanque agitado (*stirred tank bioreactor*), uma vez que esses sistemas garantem a homogeneização da suspensão celular, minimizando os gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, nutrientes e metabólitos.

Os biorreatores do tipo tanque agitado em escala industrial consistem tradicionalmente em tanques fabricados em aço com grau farmacêutico (AISI 316L), contendo um eixo com impelidores, aeradores, entradas para sondas de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e outras variáveis, além de sistemas especializados no monitoramento e controle dos parâmetros essenciais para a manutenção do cultivo celular, de limpeza (CIP – *cleaning in place*) e esterilização (SIP – *sterilization in place*), e um conjunto de instrumentos associados à amostragem, segurança e escoamento de líquidos (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2011; PÖRTNER, 2015).

Os modos de operação utilizados na produção de mAbs são a batelada simples, a batelada alimentada e a perfusão (GAUGHAN, 2016). Para a batelada e a batelada alimentada, em geral são utilizados tanques com milhares de litros. De operação simples, ambos os modos são muito utilizados especialmente para a produção de moléculas estáveis, já que o sobrenadante contendo a proteína de interesse é coletado em uma única vez, em geral 7 a 14 dias dependendo das características do processo. Entretanto, as modificações do meio reacional ao longo do tempo de cultivo, decorrentes do metabolismo celular, podem afetar o estado fisiológico da célula e a produtividade, o que dificulta a padronização dos lotes dentro de uma faixa específica de variação dos atributos críticos de qualidade a serem atendidos para o produto. A perfusão, além de proporcionar uma maior produtividade volumétrica, permite estabelecer condições de cultivo constantes ao longo do tempo (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO-CARDERO, 2008).

Entre as décadas de 1980 e 1990, as primeiras linhagens celulares recombinantes expressavam baixos níveis da proteína de interesse, apenas alguns miligramas por litro. Como as terapias com mAbs prescrevem altas doses por pacientes aplicadas por um longo período, a indústria biofarmacêutica precisava suprir uma demanda crescente que, em 2009, alcançou um valor médio de 200 kg/ano e, no caso dos *blockbusters*, a marca de uma tonelada anual. Portanto, muitas empresas biofarmacêuticas e empresas prestadoras de serviços como as CMOs (*contract manufacturing organization*) investiram na instalação de múltiplos biorreatores com volume superior a 10 mil litros, como uma maneira de compensar a baixa produtividade (KELLEY, 2009). Contudo, nas duas últimas décadas, avanços no processamento *upstream* alavancaram a produtividade dos bioprocessos com células animais, hoje comparável à obtida em sistemas microbianos (BIRCH; RACHER, 2006; WURM, 2004). O aperfeiçoamento das técnicas de cultivo celular, o desenvolvimento de linhagens com produtividades superiores a 20 pg/cel/d

(pcd), a otimização dos meios de cultivo e de estratégias de controle em processos em biorreatores permitiram obter concentrações de mAb na ordem de gramas por litro (GRONEMEYER; DITZ; STRUBE, 2014). Títulos entre 3-5 g/L já são rotineiramente alcançados em batelada alimentada, e concentrações superiores a 20 g/L já foram reportadas na literatura (KUCZEWSKI et al., 2011; XU et al., 2017).

3.2.4 Processos contínuos

A plataforma de produção de mAbs adotada pela maioria das empresas atualmente consiste em biorreatores com milhares de litros operando em batelada alimentada (GAUGHAN, 2016; KELLEY, 2009). Segundo Kelley (2009), tanques com dezenas de milhares de litros fornecendo elevadas concentrações de proteína ao final do cultivo assinalam um excesso de capacidade produtiva instalada em anos mais recentes, superando até mesmo a demanda de mercado para alguns produtos. Além disso, as empresas biofarmacêuticas têm optado por acomodar os diferentes volumes de produção em uma mesma instalação industrial. Essa flexibilidade é facilmente alcançada por meio de processos contínuos que, por oferecerem uma produtividade volumétrica superior em relação aos sistemas em batelada, podem ser realizados em equipamentos mais compactos que ocupam uma menor área de instalação (*footprint*). A redução da área está atrelada ao princípio inerente da operação contínua que, por sua vez, aumenta a taxa de ocupação dos equipamentos e reduz o tempo de residência dentro do biorreator, favorecendo uma melhor qualidade ao produto. Com isso, é possível empregar menores equipamentos como biorreatores e colunas cromatográficas, eliminar e/ou diminuir o número de tanques intermediários, e reduzir os ciclos de ociosidade como limpeza, esterilização e regeneração (KONSTANTINOV; COONEY, 2015). Dessa forma, os custos de capital podem ser reduzidos, tornando a empresa mais competitiva frente à maciça entrada dos biossimilares e ao desenvolvimento de produtos personalizados ao paciente ou com maior eficácia por dose (KELLEY, 2009). O escalonamento com sistemas mais compactos pode ser realizado por adição de unidades (*scale-out*), o que pode ser mais barato e fácil de ser executado em comparação ao escalonamento por tamanho (*scale-up*) (OZTURK, 2019).

A operação contínua em biorreator pode ser realizada com retenção total ou parcial de células (perfusão) ou sem retenção celular (quimiostato). O quimiostato tem aplicação industrial restrita devido à baixa produtividade volumétrica, já que menores concentrações celulares são obtidas em comparação à perfusão, e as taxas de diluição são limitadas pela baixa velocidade de crescimento das células (PATIL; WALTHER, 2017).

Entretanto, empresas como Biogen e Pfizer já estão explorando o quimiostato como uma alternativa tecnicamente mais simples, com menor consumo de meio em comparação à perfusão e sem ocasionar a retenção de produto mediada pelo equipamento de separação de células (GAGNON et al., 2019; KHATTAK et al., 2019). Uma terceira modalidade, denominada semicontínua por Ozturk (2019), e que pode ou não envolver retenção de células, consiste em bateladas repetidas mantidas por três a quatro dias, quando parte do conteúdo do reator é coletado e substituído por meio fresco. A produção de BeneFIX (fator de coagulação sanguínea IX) é um exemplo de aplicação industrial dessa modalidade de operação (DESAI, 2015).

Em relação ao custo operacional, devido ao ganho de produtividade volumétrica, um processo em perfusão utilizando o filtro tangencial alternante (ATF) poderia reduzir em até 20% o preço de custo (*cost of goods* – COG) por grama de produto em comparação à batelada alimentada, para escalas de produção entre 100 a 1000 kg de mAb anuais (POLLOCK; HO; FARID, 2013). O preço de custo englobaria tanto o custo operacional direto (mão-de-obra, matérias-primas e materiais de consumo) quanto o indireto (por exemplo, depreciação de equipamentos). Segundo os mesmos autores, apesar da maior participação de materiais sobre os custos operacionais diretos da perfusão (principalmente devido à maior quantidade de meio de cultivo empregada), por outro lado a perfusão reduziria o número de passos de purificação, acarretando em uma economia significativa (40%) sobre os custos indiretos. Arnold et al. (2019) demonstraram que a integração total das etapas de *upstream* e *downstream* em modo contínuo poderia reduzir em 15% o custo de produção devido a um ganho de produtividade volumétrica de aproximadamente cinco vezes proporcionado pelo processo contínuo. Ainda, o processo proposto reduziria significativamente o custo capital, com a substituição de quatro reatores de aço inoxidável de 12500 L operando em batelada alimentada por cinco reatores *single-use* de 2000 L.

Além de permitirem a realização de campanhas para manufatura de diferentes produtos, os processos contínuos são compatíveis à escala de dispositivos descartáveis (*single-use*), atualmente disponíveis para até 2000 L (FARID; THOMPSON; DAVIDSON, 2014; KELLEY, 2009; KLUTZ et al., 2016). Entretanto, o número de plataformas em transição para o modo contínuo ainda é pequeno, visto a pouca experiência de muitas empresas nessa modalidade frente à operação robusta e mais simples proporcionada pela batelada alimentada, especialmente para proteínas estáveis como os anticorpos (FARID; THOMPSON; DAVIDSON, 2014). As primeiras tentativas de se estabelecer processos industriais em perfusão realizadas na década de 1990

fracassaram principalmente devido a dificuldades técnicas de se operar os dispositivos de retenção celular disponíveis, como o filtro de malha rotativa (*spin filter*) (BONHAM-CARTER; SHEVITZ, 2011; FARID; THOMPSON; DAVIDSON, 2014). Atualmente, a *expertise* acumulada ao longo dos últimos anos e um maior número de opções de equipamento de retenção disponíveis no mercado têm incentivado a utilização de processos contínuos para a produção de mAbs, inclusive com processos híbridos que combinam uma batelada alimentada com a perfusão (HILLER et al., 2017), perfusão com purificação em batelada (KONSTANTINOV; COONEY, 2015) ou com a purificação em modo contínuo (KLUTZ et al., 2016).

3.3 Perfusão em biorreatores

A perfusão consiste no cultivo em biorreator operado em modo contínuo com retenção de células, uma solução empregada para contornar as baixas concentrações celulares e a baixa produtividade volumétrica obtidas no quimiostato (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO-CARDERO, 2008; OZTURK, 2019). Conforme mostrado na Figura 3-2, são estabelecidas uma corrente de nutrientes para alimentação e uma corrente de saída (perfundido) contendo o produto de interesse. À saída, acopla-se um dispositivo para reter as células no interior biorreator, cuja eficiência pode variar entre 10 e 100% (OZTURK, 2019).

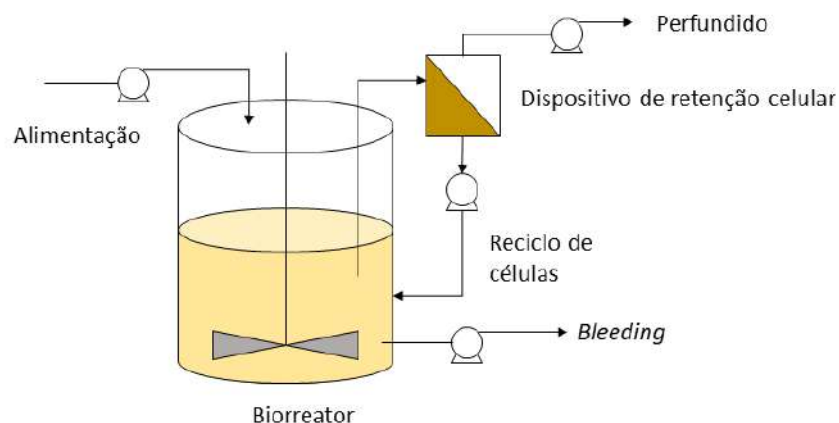


Figura 3-2. Representação esquemática de um biorreator com células suspensas operado em perfusão acoplado a um equipamento de retenção celular externo.

Alternativamente ao emprego de um dispositivo para a retenção das células em suspensão, sistemas heterogêneos baseados na imobilização das células em microcarregadores suspensos (RODRIGUES et al., 2010) e em leito recheado

(MEUWLY et al., 2007; ZHANG et al., 2015) foram propostos. Apesar das elevadas concentrações celulares obtidas ($> 10^8$ cels/mL) e a relativa proteção das células às tensões de cisalhamento, tais sistemas têm como desvantagens a dificuldade de se obter uma amostragem representativa, zonas heterogêneas decorrentes de uma ineficiente transferência de massa (por exemplo, agitação, oxigênio) e limitações no escalonamento (MARKS, 2003; PATIL; WALTHER, 2017).

Um dos aspectos positivos da perfusão é promover uma contínua renovação do meio, com a introdução dos substratos-chave essenciais para o metabolismo celular e a concomitante remoção tanto dos metabólitos secundários tóxicos (em especial, lactato e amônio) quanto da proteína de interesse, a qual é destinada para as etapas subsequentes de purificação (CASTILHO, 2015; LINDSKOG, 2018). A operação contínua do biorreator em estado estacionário minimiza os riscos de se expor as células a variações do ambiente reacional, o que favorece a homogeneidade do produto nos diferentes lotes (CHOTTEAU, 2015).

A taxa de diluição, definida pela Equação 1, corresponde ao número de trocas de volume do reator por um período de tempo, sendo expressa em vvd (volume de meio por volume de reator por dia) ou d^{-1} :

$$D = Q/V_T \quad (1)$$

onde:

D – taxa de diluição (T^{-1})

Q – vazão volumétrica de alimentação (L^3T^{-1})

V_T – volume de trabalho do biorreator (L^3)

O somatório das correntes de entrada deve equivaler ao de correntes de saída, de modo a manter o volume de trabalho do biorreator constante. Portanto, a taxa de diluição (D) deve equivaler à taxa de perfundido (D_H) e, se aplicável, à taxa de *bleeding* (D_B) (Equação 2):

$$D = D_H + D_B \quad (2)$$

Uma corrida em perfusão é tipicamente dividida em duas fases: a de crescimento celular, durante os 7-10 primeiros dias; e a de produção, quando a concentração celular máxima desejada é alcançada e mantida aproximadamente constante (OZTURK, 2019). O estado estacionário em relação à concentração de células é estabelecido por meio da remoção controlada de células (purga ou *bleeding*) ou por inibição de crescimento, como

redução de temperatura (CASTILHO, 2015). O *bleeding*, além de prevenir uma eventual sobrecarga dos equipamentos de retenção e auxiliar na remoção de células mortas retidas no biorreator, permite prolongar o tempo de operação de processos com elevadas concentrações celulares na ordem de 10^7 a 10^8 células/mL (KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2011). O regime contínuo, mediante um controle bem ajustado para manter o estado estacionário, pode ser operado ininterruptamente por longos períodos, desde que comprovada a estabilidade produtiva da linhagem celular empregada (BONHAM-CARTER; SHEVITZ, 2011), sendo possível encontrar processos adotados industrialmente com duração de seis meses ou mais (BOEDEKER, 1992; KADOURI; SPIER, 1997). Nessas condições, os períodos considerados ociosos no horizonte de produção anual são menores, pois o número de ciclos para a limpeza, o preparo e a esterilização do sistema é reduzido (CASTILHO, 2015; KADOURI; SPIER, 1997).

Numa perfusão, concentrações relativamente altas de produto são obtidas a partir de altas concentrações celulares, considerando uma produtividade específica constante. A concentração de produto obtida é menor em comparação à batelada alimentada devido à diluição (Figura 3-3B), porém ele é obtido ininterruptamente por um período muito maior. Com isso, a produtividade da perfusão é maior em comparação à batelada alimentada (Figura 3-3C). Há várias possibilidades de se comparar produtividade entre processos, mas os mais utilizados são: a produtividade volumétrica (P_v), determinada em um dado momento do processo; e o rendimento ou produtividade global (STY – *space time yield*), calculado com base na massa acumulada de produto ao longo do processo (BAUSCH; SCHULTHEISS; SIECK, 2019). O valor de P_v depende da produtividade específica intrínseca à linhagem celular em um dado instante. Para processos em perfusão operando em estado estacionário de concentração de células, P_v pode ser aproximada pela Equação 3 (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO-CARDERO, 2008; CORONEL et al., 2019):

$$P_v \approx q_p \times X_v \quad (3)$$

em que q_p é a produtividade específica, e X_v é a concentração de células viáveis.

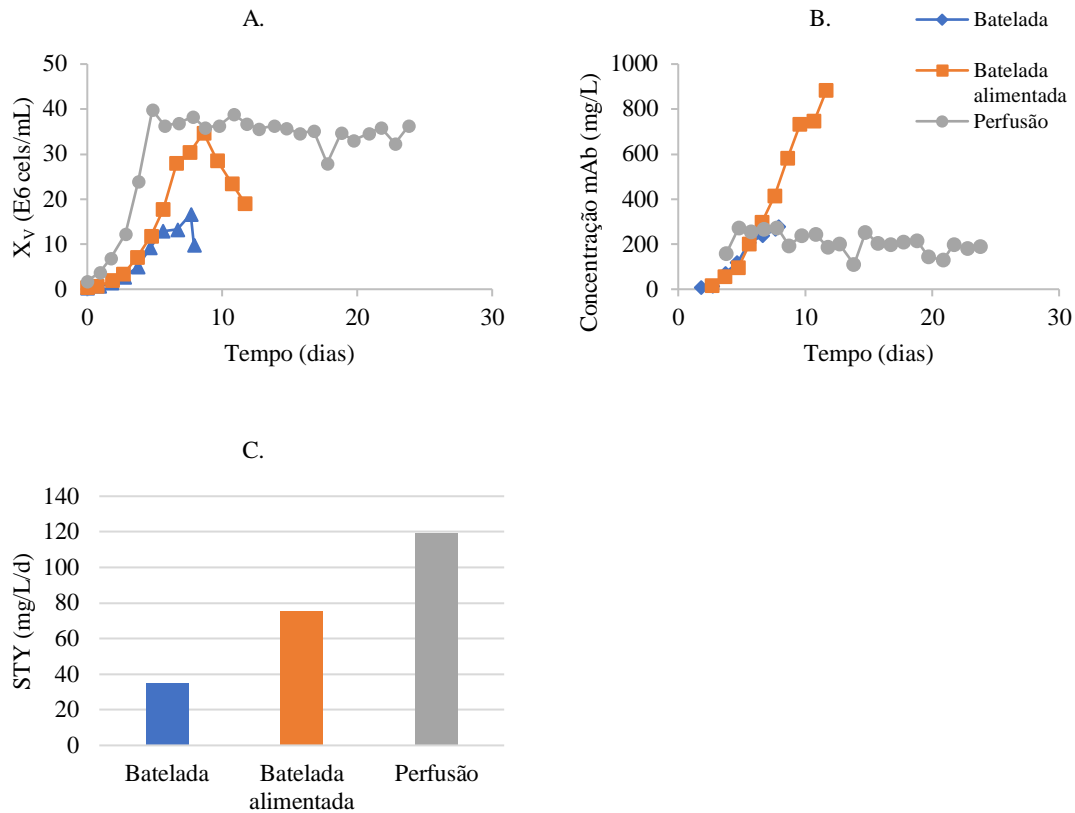


Figura 3-3. Comparação entre processos em batelada simples, batelada alimentada e perfusão com células CHO DP-12 em meio TC-LECC realizados no presente trabalho. A) concentração de células viáveis (X_v); B) concentração de produto no biorreator; C) produtividade ou rendimento global (space time yield). Na perfusão, a X_v foi mantida constante a partir do dia 5 por aplicação de bleeding.

A retenção de células permite aplicar taxas de perfusão muito superiores à taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}), pois impede a lavagem das células do biorreator. O aumento de D acarreta em uma maior disponibilidade de nutrientes ao sistema, permitindo que se alcancem elevadas concentrações de células (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEREDO-CARDERO, 2008). A perfusão operada a altos valores de D apresenta-se como o sistema ideal para a produção de proteínas instáveis como fatores de coagulação sanguínea e enzimas, que necessariamente precisam permanecer o menor tempo possível no biorreator expostas a proteases e glicosidases secretadas pelas células ou liberadas de células mortas (BONHAM-CARTER; SHEVITZ, 2011).

A perfusão, com sua capacidade de prover cultivos com alta densidade celular, tem sido explorada como uma alternativa para reduzir o período de propagação de inóculo (*seed train*), em que um biorreator em perfusão com alta X_v é utilizado para inocular o biorreator de produção de maior capacidade (POHLSCHEIDT et al., 2013). Outras aplicações da perfusão incluem a produção em massa de células para a criopreservação de bancos celulares (HEIDEMANN et al., 2002), processos híbridos (HILLER et al.,

2017; VÁZQUEZ-RAMÍREZ et al., 2019) e bateladas alimentadas em que o produto é totalmente retido por meio de membranas de ultrafiltração (*concentrated fed-batch*), permitindo a eliminação dos metabólitos secundários (XU et al., 2017; XU; HOSHAN; CHEN, 2016; YANG et al., 2016).

Uma vez que o produto é coletado em concentrações moderadamente elevadas e por longos períodos, resultando em uma alta produtividade, os biorreatores industriais em perfusão usualmente têm menor volume em comparação aos operados em batelada alimentada. Os processos comerciais operam em uma faixa de 75 a 4000 L (POLLOCK; HO; FARID, 2013), preferencialmente entre 500 e 1000 L (LINDSKOG, 2018), capacidades compatíveis com o tamanho de bolsas descartáveis atualmente disponíveis no mercado (CHOTTEAU, 2015; KAISER et al., 2015).

Apesar de todas as vantagens oferecidas pelos processos contínuos e os avanços na tecnologia da perfusão nos últimos 30 anos, a batelada alimentada ainda é a plataforma de produção de preferência adotada por muitas empresas, relegando a perfusão para a produção de proteínas lábeis (OZTURK, 2019). Segundo levantamento realizado por Ozturk (2019), cerca de 24 biofármacos eram produzidos em sistemas contínuos em 2017, a maioria sendo enzimas e fatores de coagulação sanguínea. Por outro lado, o mesmo levantamento mostra que, a partir de 2007, moléculas estáveis como mAbs e derivados também têm sido produzidas em biorreatores em perfusão. Destes, destacam-se o Remicade® (infliximabe), Stelara® (ustequinumabe), Simponi® (golimumabe) e o Sylvant® (siltuximabe), todos produzidos pela Janssen Biotech. É interessante observar a evolução dos equipamentos de retenção ao longo dos anos. Na década de 1990, os *spin filters* predominavam nos processos em perfusão, porém o escalonamento limitado e o entupimento progressivo desses equipamentos, além do sucesso da batelada alimentada, inibiram as empresas a adotarem a perfusão (BONHAM-CARTER; SHEVITZ, 2011). A partir dos anos 2000, o sedimentador gravitacional e, mais recentemente, o filtro tangencial alternante (ATF) são os equipamentos mais utilizados (POLLOCK; HO; FARID, 2013).

Além da maior complexidade técnica da perfusão, as grandes quantidades de meio de alimentação e de perfundido coletado (o qual deve ser mantido preferencialmente sob refrigeração) aumentam os custos relativos à área e à estrutura industrial, tornando-se equivalentes aos de um biorreator de milhares de litros operando em batelada alimentada, principalmente para os processos com altas taxas de perfusão por longos períodos (CHOTTEAU, 2015; FIKE, 2007). O impacto ambiental decorrente da grande quantidade

de água requerida no processo, consumo de energia e geração de resíduos nos processos em perfusão é significativamente maior em comparação à batelada alimentada (BUNNAK et al., 2016; POLLOCK; HO; FARID, 2013), e é um aspecto que deve ser avaliado em conjunto à viabilidade econômica e operacional para a seleção do modo de operação. Com o propósito de contornar suas limitações e incentivar a adoção dos processos contínuos para a produção de biofármacos, novas abordagens incluem: i) estratégias de alimentação com meios fortificados que reduzam as taxas de perfusão (BETTINARDI, 2016; FENG et al., 2006; MAYRHOFER et al., 2020; TENG et al., 2011; YANG et al., 2000); ii) sistemas para a purificação em modo contínuo (LUCA et al., 2020; MÜLLER-SPÄTH et al., 2008; ZYDNEY, 2016); e iii) propostas para a integração de etapas de processamento *upstream* com *downstream* (CASTILHO; ANSPACH; DECKWER, 2002; KARST et al., 2017b; WARIKOO et al., 2012; XENOPOULOS, 2015).

3.3.1 Operação e controle de biorreatores em perfusão

Um sistema em perfusão demanda elementos adicionais ao controle dos parâmetros físicos convencionais em biorreator (pH, DO, temperatura e agitação). Por exemplo, as vazões de entrada e de saída do sistema devem ser coordenadas para manter o volume de trabalho constante. Bombas de alimentação e de perfundido operando de forma independente não necessariamente garantem essa condição, mesmo sendo do mesmo modelo e previamente calibradas, pois flutuações na vazão podem ocorrer devido à fadiga da mangueira encaixada no cabeçote (CHOTTEAU, 2015). Na maioria dos processos em perfusão, o perfundido é continuamente removido de acordo com a taxa de diluição, enquanto que a bomba de meio de alimentação é atuada por uma balança ou sensor de nível e operada em modo intermitente (*on/off*). Quando a massa do biorreator ou o nível estão abaixo do *setpoint*, essa bomba é ativada, sendo interrompida quando os *setpoints* são alcançados (OZTURK, 2019).

A máxima concentração celular obtida depende de fatores como a capacidade máxima de transferência de oxigênio no sistema e a composição do meio alimentado a uma dada taxa de perfusão. Entretanto, para garantir a estabilidade do processo, a concentração de células é usualmente controlada em valores um pouco mais baixos do que o limite máximo (CASTILHO, 2015; OZTURK, 2019). A remoção por *bleeding* pode ser mantida fixa (tipicamente 10% do volume do reator) ou semicontínua (BIELSER et al., 2018), ajustada diariamente de acordo com contagem celular (CLINCKE et al.,

2013a), ou controlada por meio de um algoritmo baseado na concentração celular (DESCHÊNES et al., 2006; KARST et al., 2016; OZTURK, 2019). A taxa de *bleeding* pode ser controlada por medidas *online* de biomassa, assim como a taxa de perfusão de acordo com uma determinada taxa normalizada pela concentração de células (CSPR, discutida a seguir). Atualmente, os sensores de capacitância são os mais utilizados para a medição *online* de concentração de células viáveis (BIELSER et al., 2018).

3.3.2 Operação a baixas taxas específicas de perfusão (CSPR)

A otimização dos bioprocessos busca maximizar a sua produtividade, mantendo os atributos críticos de qualidade esperados ao produto de interesse. No caso da perfusão, uma maior produtividade volumétrica é obtida com células altamente produtivas (alto q_p) mantidas a altas concentrações X_v , variáveis idealmente constantes durante longos períodos de produção, conforme a Equação 3 (CHOTTEAU, 2015).

O estabelecimento de taxas ótimas de perfusão deve levar em consideração as limitações físicas inerentes ao próprio sistema de perfusão. Os valores mínimos de D são determinados de acordo com o tempo de residência máximo tolerado pelo produto de interesse dentro do sistema, desde que o suprimento de nutrientes às células esteja adequado para evitar a interrupção do processo e para fornecer o produto de acordo com a qualidade desejada. Já as taxas de perfusão máximas são limitadas pela capacidade de separação do dispositivo de retenção celular, ao passo que a concentração celular máxima alcançada é limitada pela capacidade de transferência de oxigênio e de remoção de CO_2 do sistema (CHOTTEAU, 2015; KONSTANTINOV et al., 2006). Conforme abordado anteriormente, a aplicação de altos valores de D , apesar de garantir a disponibilidade de nutrientes às células, gera grandes volumes de perfundido contendo o produto diluído, o que impacta diretamente no *footprint* industrial e nos custos de purificação. Nestes casos, a otimização das estratégias de alimentação do biorreator a fim de reduzir D seria uma solução.

A manutenção das variáveis de processo em valores constantes é crucial para o estabelecimento de processos operando em estado estacionário, garantindo a produtividade e a viabilidade celular. A taxa de troca de meio pode ser expressa também pela taxa específica de perfusão (CSPR – *cell-specific perfusion rate*), conceito proposto por Ozturk (1996), em que o valor de D é normalizado pela concentração de células (Equação 4). A CSPR pode ser interpretada como a quantidade de meio necessária para suprir uma célula em um dado intervalo de tempo:

$$CSPR = D/X_V \quad (4)$$

As estratégias para redução de D sem prejudicar a atividade celular pautam-se na minimização da CSPR, em que substratos essenciais (glicose e glutamina) e metabólitos tóxicos (como lactato e amônio) sejam mantidos em baixas concentrações (TENG et al., 2011). Adicionalmente, a manutenção de q_p e a de uma alta viabilidade celular constituem critérios-chave para restringir as taxas de perfusão (SCHWARZ et al., 2020). Uma vez determinadas as condições ótimas de um destes parâmetros de controle, a tendência é que os demais também se estabilizem, o que é esperado para sistemas operando em estado estacionário (CHOTTEAU, 2015).

A faixa de valores de CSPR normalmente empregada é de 0,05 a 0,5 nL/cel/d (ou 50 a 500 pL/cel/d). Atualmente, as indústrias almejam valores de CSPR inferiores a 20 pL/cel/d para determinar o CSPR mínimo ($CSPR_{min}$) (KONSTANTINOV et al., 2006). O desenvolvimento de meios de cultivos capazes de sustentar, para esses baixos valores de $CSPR_{min}$, o crescimento celular sem prejudicar a produtividade é um desafio. Em termos de taxa de perfusão, considerando um X_V de 50×10^6 cels/mL, reduzir a CSPR de 50 para 20 pL/cel/d equivaleria a diminuir D de 2,5 para 1 vvd. Considerando um biorreator com centenas ou milhares de litros, o impacto é significativo sobre o tamanho dos equipamentos e quantidade requerida de matérias-primas. É interessante notar que a recíproca de $CSPR_{min}$ é conhecida como *medium depth*, a “força do meio”, e é uma medida que expressa o número máximo de células suportadas por um mililitro de meio para um dado intervalo de tempo (KONSTANTINOV et al., 2006). Uma $CSPR_{min}$ de 50 pL/cel/d equivale a dizer que 1 mL de meio é capaz de suportar 20×10^6 células durante um dia. Reduzir a CSPR para 20 pL/cel/d significa que mais células (50×10^6) podem ser mantidas com 1 mL por um dia (BIELSER et al., 2018).

Além de diminuir drasticamente a quantidade de meio, a redução da CSPR pode contribuir para o aumento da produtividade volumétrica do processo ao inibir o crescimento celular. Um estado proliferativo ativo pode estar associado a um metabolismo ineficiente e, por consequência, a uma menor produtividade específica (BI; SHUTTLEWORTH; AL-RUBEAI, 2004; SUZUKI; OLLIS, 1990). Adicionalmente, com a redução da taxa específica de crescimento μ , menores taxas de *bleeding* são requeridas, o que minimiza a perda de produto por essa corrente (GAGNON et al., 2018; SIECK; SCHILD; VON HAGEN, 2017). Portanto, maiores rendimentos em perfundido são obtidos, considerando a Equação 2.

Em um dos primeiros trabalhos citando a estratégia baseada na redução na CSPR, Dowd et al. (2001) demonstraram que, para valores de CSPR maiores que 200 pL/cel/d em uma perfusão para a produção de t-PA (ativador de plasminogênio tecidual), as taxas específicas de consumo e de formação de metabólitos máximas foram alcançadas e mantidas constantes à medida que a CSPR foi incrementada, uma evidência de que para altas taxas específicas de perfusão, ocorre uma saturação devido ao excesso de nutrientes. Ainda, nessas condições, a concentração de t-PA presente no sobrenadante diminuiu, em decorrência da diluição. Com a redução gradual de D, foi possível estabelecer o valor da $CSPR_{min}$ para processo, garantindo uma maior concentração de produto e atendendo às exigências nutricionais das células.

Konstantinov et al. (2006) propuseram a estratégia *push-to-low*, ou a redução de CSPR mantendo constante a concentração de células em 20×10^6 cels/mL e reduzindo gradualmente as taxas de alimentação com meios cuja composição foi modificada de acordo com as taxas metabólicas determinadas no estado estacionário avaliado. Apesar do sucesso da estratégia, que conduziu a um aumento de 500% na concentração do produto (um mAb anti-TNF – *tumour necrosis factor*), o ajuste na composição dos meios pode ser carecer de informações básicas, pois a formulação dos meios comercialmente disponíveis e especificamente desenvolvidos para uma determinada linhagem celular é mantida sob segredo industrial. Embora a maioria dos meios sejam quimicamente definidos, a variedade de componentes presentes, que incluem fontes de carbono e de nitrogênio, sais, aminoácidos livres, micronutrientes, vitaminas, lipídeos e outros suplementos, é muito grande. Determinar o requerimento dos nutrientes mais consumidos e, por conseguinte, propor as concentrações ótimas destes, impõe uma série de restrições ao adotar essa estratégia. Xu e Chen (2016) relataram, pela primeira vez, o estabelecimento de um valor de CSPR de entre 15 e 23 pL/cel/d para uma perfusão em escala laboratorial com células CHO-GS produtoras de um anticorpo monoclonal em uma concentração entre 40×10^6 e 60×10^6 cels/mL. Entretanto, a estratégia utilizada, baseada na fortificação de um meio de cultivo comercial (Merck) e adição de uma solução concentrada de glicose, não foi descrita em detalhes. Clincke et al. (2013a) atingiram, pela primeira vez, uma concentração celular superior a 200×10^6 cels/mL em uma perfusão de células CHO-DHFR produtoras de um IgG1 utilizando um módulo de filtração tangencial acoplado a um biorreator de ondas. A CSPR foi mantida entre 50 e 60 pL/cel/d, sendo necessária uma taxa de perfusão de até 10 vvd para alcançar essa elevada concentração. Os autores ressaltaram que esse valor de X_v foi alcançado graças à

suplementação com glicose e glutamina concentradas, adicionadas em correntes separadas à do meio de alimentação, a fim de garantir uma concentração mínima desses substratos. Embora tenha sido mencionado o uso de meios comerciais livres de componentes de origem animal suplementados com hidrolisados e com soluções fortificadas (*feed*), a estratégia adotada também não foi descrita em detalhes. Gagnon et al. (2018) propuseram a estratégia HILVOP (*high intensity, low-volume perfusion*), em que baixas CSPRs são aplicadas na fase de produção em estágio tardio do processo. Aplicando taxas menores do que 10 pL/cel/d, os autores obtiveram produtividades acima de 1 g/L/d ou 3,8 vezes superior à batelada alimentada, e utilizando uma quantidade de meio até 12 vezes inferior em comparação à perfusão. Meios enriquecidos com glicose e aminoácidos foram aplicados a taxas de perfusão inferiores a 0,5 vvd e sustentando concentrações celulares superiores a 40×10^6 cels/mL com uma viabilidade celular de 80% (GAGNON et al., 2018). Mayrhofer et al. (2019) executaram sucessivos planejamentos experimentais misturando meios basais com suplementos comerciais para definir um meio para perfusão. Com essa otimização, concentrações celulares de até 200×10^6 cels/mL foram alcançadas a CSPRs entre 10 e 30 pL/cel/d, sem alterações significativas na qualidade do produto. Células embrionárias de rim humano (HEK293) produtoras de eritropoietina foram mantidas em uma concentração de 80×10^6 cels/mL a uma CSPR de 8-12 pL/cel/d estabelecida com uma mistura de meio basal e *feed* (SCHWARZ et al., 2020). Apesar da alta viabilidade celular e uma redução de 81% na quantidade de meio consumida, uma significativa redução em qp foi observada pelos autores.

Uma segunda abordagem para a otimização da perfusão estruturada em duas etapas e utilizando apenas um meio de cultivo foi descrita (WOLF et al., 2019b). No primeiro passo, com base nos conceitos descritos por Konstantinov et al. (2006), esses autores concluíram que o mesmo valor de $CSPR_{min}$ foi obtido aplicando tanto a estratégia *push-to-low* (redução de D a X_V constante) quanto *push-to-high* (aumento de X_V a D constante). O segundo passo consistiu em operar a perfusão mantendo a $CSPR_{min}$ constante ao aumentar simultaneamente a concentração celular e a taxa de perfusão. Nessa última condição, um aumento em D resultou em um aumento da produtividade volumétrica, provavelmente como consequência de uma maior depuração dos metabólitos tóxicos do sistema. Taxas de perfusão mais elevadas também reduzem o tempo de residência da proteína de interesse no biorreator. Portanto, a otimização de processos em perfusão via redução da CSPR poderia ser estendida para a produção de proteínas lábeis em cultivos com alta X_V , desde que altas taxas de perfusão sejam mantidas para garantir

o tempo de residência máximo tolerado pelo produto. Apesar do conservadorismo daqueles autores em estipular uma $CSPR_{min}$ de 33 pL/cel/d para garantir a estabilidade de seus processos, o método proposto pode ser utilizado para determinar valores de CSPR menores ainda.

A aplicação do conceito de CSPR e seu impacto sobre a estimativa de custos relacionada à economia de meio de cultivo foi explorada por Klutz et al. (2016) que, em um estudo de viabilidade econômica, demonstraram que o preço de custo (COG, em €/g de produto) de um processo clássico de produção de mAb utilizando batelada alimentada e purificação em batelada foi aproximadamente 30% menor em relação a um processo contínuo baseado em uma perfusão integrada à purificação em modo contínuo, ambos estabelecidos para uma mesma demanda anual de produto (200 kg/ano). Segundo os autores, a grande quantidade de meio usado na perfusão foi o componente de maior impacto no custo, representando 56% do valor de COG específico, efeito que acabou suprimindo a redução de 8% no custo promovido pelas etapas de purificação contínua. Outro impacto negativo do processo foi o custo referente à área filtrante necessária para a clarificação de grandes volumes de perfundido obtidos do sedimentador lamelado, para uma perfusão operando com CSPR a 50 pL/cel/d. A única situação em que a perfusão apresentou um desempenho comparável e/ou superior (i.e, com menor COG) em relação à batelada alimentada foi quando o valor de CSPR foi reduzido para 16,5 pL/cel/d, equivalente a uma diminuição em D de 3 para 1 vvd para um processo operando a 60×10^6 cels/mL, condição mencionada pelos autores como ambiciosa, mas já reportada na literatura (GAGNON et al., 2018; MAYRHOFER et al., 2020; XU; CHEN, 2016). XU et al. (2017) observaram uma diminuição do custo de meio de cultivo em um processo em perfusão alimentado a uma CSPR de 14 pL/cel/d, em comparação a uma batelada alimentada com concentração final mAb de 6,8 g/L e com duração de 14 dias. Tal redução foi atribuída ao significativo aumento da produtividade volumétrica da perfusão (superior a 2g/L/d) em comparação à produtividade obtida em batelada alimentada (< 0,5 g/L/d), obtido com o enriquecimento do meio de cultivo com uma solução concentrada. Portanto, o ganho de produtividade, (tanto volumétrica quanto celular específica), compensaria a elevação do custo do processo ao se empregar soluções concentradas em estratégias de fortificação dos meios de cultivo de alimentação.

3.3.3 Dispositivos de retenção celular

Nos sistemas operando em perfusão, a seleção de um dispositivo que promova uma eficiente separação sólido-líquido é decisiva. Atualmente, a maior parte dos equipamentos de retenção celular comercialmente disponíveis aplica a diferença de tamanho ou de densidade como princípio de separação (CASTILHO, 2015), embora outras propriedades também sejam exploradas, como diferenças de carga elétrica, constante dielétrica e propriedades de superfície (VOISARD et al., 2003). No entanto, o pequeno diâmetro celular (normalmente entre 10-20 μm), a densidade próxima à do meio aquoso (1,06-1,14 g/cm^3), a ausência de uma parede celular resistente a tensões de cisalhamento, além da tendência de as células em aderir a superfícies impõem desafios para a seleção do equipamento de retenção mais adequado (CASTILHO, 2015). Outra restrição a ser considerada, especialmente quando se aplica a sedimentação em campo gravitacional ou centrífugo como princípio de separação, é que a velocidade terminal de sedimentação das células diminui com a concentração celular (CASTILHO; MEDRONHO, 2008), cujo efeito torna-se significativo em culturas com alta X_v obtidas em perfusão.

Na escolha de um equipamento de retenção, buscam-se elevadas eficiências de separação, simplicidade de operação, robustez na utilização por longos períodos e compatibilidade com as células utilizadas, sem reduzir a sua viabilidade. A possibilidade de reutilização do equipamento também é um ponto relevante, embora o uso dos equipamentos *single-use* seja uma tendência (WHITFORD, 2015). Os dispositivos podem ser instalados de forma interna ou externa ao biorreator, sendo que esta última configuração apresenta vantagens como possibilidade de substituição durante o processo e escalonamento independente do reator. Entretanto, os dispositivos externos devem ser idealmente operados a taxas de recirculação que minimizem o tempo de exposição das células oriundas do biorreator a condições não controladas, por exemplo de temperatura e oxigênio dissolvido (CASTILHO; MEDRONHO, 2002).

A eficiência de separação é o principal parâmetro monitorado para avaliar o desempenho de um dado dispositivo de retenção celular. Dois tipos de eficiência são avaliados: a total (E_T) e a total reduzida (E^r). Tendo como base um separador esquematizado na Figura 3-4, a eficiência total E_T consiste na fração de células recuperadas na corrente concentrada, a qual é reciclada para o biorreator (Equação 5):

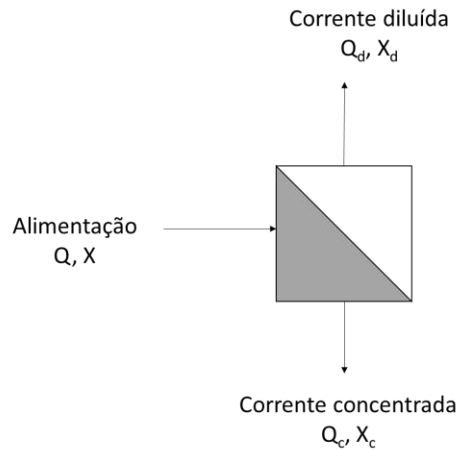


Figura 3-4. Representação esquemática de um separador, com as correntes de alimentação proveniente do biorreator, diluída (ou perfundido) e concentrada (reciclada ao biorreator).

$$E_T = \frac{Q_c X_c}{QX} \quad (5)$$

onde Q é a vazão volumétrica da alimentação, Q_c é a vazão volumétrica da corrente concentrada, X é a concentração (em unidades de partículas por volume) da alimentação, e X_c é a concentração na corrente concentrada. A fração de fluido oriunda da alimentação que se dirige à corrente concentrada é denominada razão de fluido (R_f), definida pela Equação 6 (CASTILHO; MEDRONHO, 2008):

$$R_f = \frac{Q_c}{Q} \quad (6)$$

Alguns equipamentos promovem a separação com $R_f = 0$, enquanto outros com $R_f > 0$. Entretanto, a separação das partículas para a corrente concentrada não ocorre exclusivamente devido ao poder de separação do equipamento. Parte delas é separada devido à força de arraste do fluido que deixa o equipamento, e essa diferença é normalmente igual ao valor de R_f (CASTILHO; MEDRONHO, 2008). A razão de fluido é uma medida da eficiência mínima de separação com que um dado separador opera. Para equipamentos cujo $R_f > 0$, determina-se a eficiência total reduzida E' , calculada conforme a Equação 7, e que leva em consideração as partículas separadas unicamente pelo princípio de separação do dispositivo. No caso, as células que chegam à corrente concentrada devido simplesmente à divisão de correntes não são consideradas no cálculo de E' .

$$E' = \frac{E_T - R_f}{1 - R_f} \quad (7)$$

Outra expressão para E' , deduzida a partir das equações anteriores e do balanço de massa para a fração líquida e sólida do sistema de separação, é apresentada pela Equação 8 (CASTILHO; MEDRONHO, 2008):

$$E' = 1 - \frac{X_d}{X} \quad (8)$$

Atualmente, os principais equipamentos de retenção celular utilizados em larga escala são os sistemas microfiltrantes e os sedimentadores gravitacionais (POLLOCK; HO; FARID, 2013), os quais serão utilizados no presente trabalho. Outras tecnologias estão disponíveis, como os separadores por ondas acústicas e as centrífugas, porém de uso industrial mais limitado (CASTILHO, 2015; CHOTTEAU, 2015). A Tabela 3-3 compara algumas propriedades relevantes na seleção de um equipamento de retenção. Os filtros de malha rotativa (*spin filters*) com instalação interna ao biorreator atualmente são pouco utilizados, apesar de seu amplo emprego nos primeiros processos em perfusão estabelecidos a partir da década de 1970 (HIMMELFARB; THAYER; MARTIN, 1969). Entre os motivos para o seu desuso, citam-se os problemas de colmatção progressiva ou *fouling* com consequente interrupção prematura do cultivo, e restrições no escalonamento (BONHAM-CARTER; SHEVITZ, 2011). Entretanto, é possível encontrar exemplos de aplicação industrial de *spin filters* externos (FIGUEREDO-CARDERO et al., 2014). Centrífugas, mais comumente utilizadas em pequena escala, enfrentam dificuldades relacionadas ao custo de aquisição e de manutenção, à complexidade de centrífugas contínuas e ao risco de entupimento de canais de saída destas, limitando a manutenção de processos por longos períodos de operação (CASTILHO, 2015; CHOTTEAU, 2015).

Tabela 3-3. Comparação entre dispositivos de separação baseados por diferença de tamanho e de densidade, sob a perspectiva dos usuários. Baseado em Chotteau (2015).

Propriedade	Spin filter	ATF	TFF	Sedimentador lamelado	Sedimentador acústico	Hidro ciclone	Centrífuga
E_T , células viáveis (%)	60-100 ^a	100	100	90-99 ^b	94-96 ^c	90-99 ^{d,e}	99 ^f
Eliminação de células mortas (+ + = eliminação)	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
Potencial de X_V máxima (10 ⁶ cels/mL)	10 ^a	200 ^g	200 ^g	20-60 ^b	40 ^h	50 ⁱ	20 ^f
Recuperação de produto no perfundido (+ + = alto rendimento)	- -	-	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
Tempo de residência no separador (minutos)	0 (se interno)	1-2 ^k	1-2	30-90 ^l	3-14	0,0005-0,0017 ^j	2-9
Simplicidade de operação (+ + = mais simples)	-	+ +	+ +	-	+	+ +	- -
Escalonamento (+ + = mais simples)	-	+ +	+ +	+	-	+ +	+ +
Custos de aquisição (- - = mais caro)	+	+	+ +	-	-	+	- -
Custos de manutenção (- - = mais caro)	+	- -	- -	+	+	+ +	-

a) Castilho e Medronho (2002); b) Castilho (2015); c) Dalm et al. (2005); d) Schröder et al. (2010); e) Pinto et al. (2008); f) Byoung et al. (2008); g) Clincke et al. (2013a); h) Shirgaonkar et al. (2004); i) este trabalho; j) Elsayed et al. (2006); k) Walther et al. (2019); l) Searles et al. (1994)

Os itens a seguir descrevem as características de operação e apresentam exemplos de aplicação de três equipamentos de retenção, sendo dois bastante utilizados industrialmente (sedimentador lamelado e ATF), e o hidrociclone, a ser explorado pela primeira vez em processos de perfusão com concentrações celulares superiores a 10×10^6 cels/mL.

3.3.3.1 Sedimentador lamelado

Os sedimentadores gravitacionais separam as células da fase líquida pela ação da gravidade, gerando um sobrenadante quase livre de células. São equipamentos instalados externamente ao biorreator, que não possuem partes móveis e que não submetem as células a altas tensões de cisalhamento (CASTILHO, 2015). No entanto, devido à baixa velocidade de sedimentação das células (1-15 cm/h a 37°C), os sedimentadores devem operar a baixas vazões, e a área disponível para a sedimentação deve ser grande o suficiente para minimizar a perda de células pela corrente diluída (CASTILHO; MEDRONHO, 2002, 2008). Essa restrição é particularmente importante no caso da perfusão, em que altas concentrações celulares são alcançadas e a velocidade de sedimentação diminui. No escalonamento de um sedimentador, maiores áreas de sedimentação são requeridas, o que, além de elevar o custo para a instalação (CHOTTEAU, 2015; VOISARD et al., 2003), aumenta o volume do equipamento e o tempo de residência em condições não controladas fora do biorreator (OZTURK, 2019). Para contornar a limitação no escalonamento, o desenho desses equipamentos deve ser otimizado, a exemplo dos sedimentadores inclinados (BATT; DAVIS; KOMPALA, 1990) ou com melhor aproveitamento do espaço tridimensional (KOMPALA, 2016).

O sedimentador inclinado lamelado (Figura 3-5) proporciona um aumento da área que, teoricamente, corresponde à soma das áreas projetadas de lamelas dispostas em um determinado ângulo de inclinação sobre um plano horizontal. Desse modo, a área de instalação desse equipamento diminuiu consideravelmente em comparação a um sedimentador vertical de mesma área equivalente (CASTILHO, 2015). A suspensão proveniente do biorreator é introduzida na parte inferior do sedimentador e é bombeada para a parte de cima pela bomba de perfundido. A disposição paralela das lamelas inclinadas estabelece um regime laminar que intensifica o efeito *Boycott*, em que as células sedimentam e escorregam para a parte inferior do equipamento, em um movimento contrário ao de subida de fluido (PATIL; WALTHER, 2017). As células acumuladas são recirculadas ao biorreator com uma bomba, o que eventualmente

contribuiu com estresse mecânico sobre as células caso esta não seja adequadamente operada (OZTURK, 2019). A pequena distância de separação entre as lamelas (0,5-0,7 cm) torna o sedimentador lamelado um equipamento compacto, o que reduz o tempo de residência das células fora do biorreator. Os parâmetros típicos encontrados na operação dos sedimentadores inclinados são a largura, o comprimento e o ângulo de inclinação das lamelas em relação ao eixo vertical, além da distância de separação entre elas (VOISARD et al., 2003).

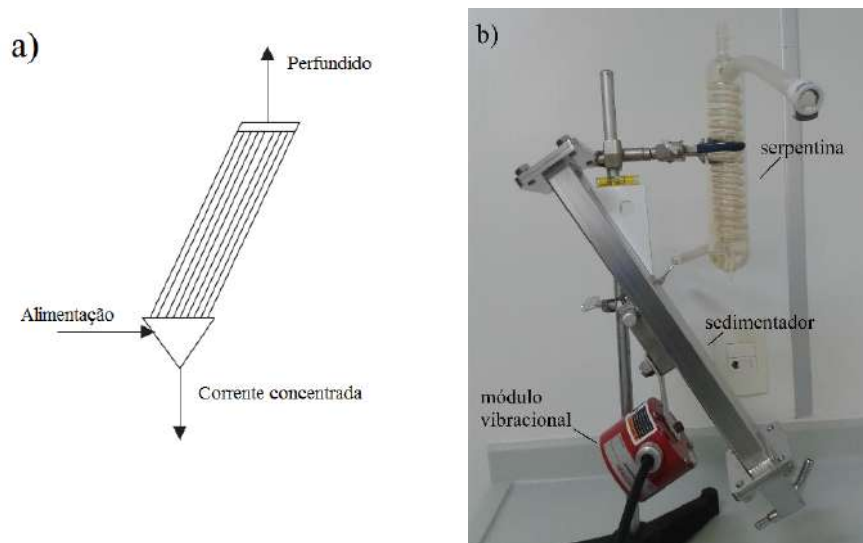


Figura 3-5. A) Representação esquemática de um sedimentador inclinado. B) Montagem do sedimentador CS10 (Biotechnology Solutions) em conjunto com o trocador de calor e o dispositivo de vibração intermitente. Adaptado de Castilho (2015).

Os sedimentadores não promovem retenção de produto, uma vez que não empregam barreiras físicas para a separação, podendo ser operados de forma robusta por meses (PATIL; WALTHER, 2017). Por isso, são bastante populares na indústria para a produção de biofármacos em perfusão (CASTILHO, 2015). Adicionalmente, o sedimentador promove uma retenção preferencial de células viáveis, uma vez as células mortas assumem uma velocidade de sedimentação significativamente menor e, com isso, são preferencialmente eliminadas na corrente de perfundido, contribuindo para manter uma alta viabilidade no biorreator (BATT; DAVIS; KOMPALA, 1990; CASTILHO, 2015).

As células, mesmo se adaptadas à suspensão, mantêm a capacidade de se aderir sobre as lamelas, podendo ocasionalmente entupir o equipamento e reduzir a eficiência de separação. De forma a minimizar a adesão e reduzir o tempo de residência das células em condições não controladas, o recobrimento das lamelas com silicone (BATT; DAVIS; KOMPALA, 1990) ou a aplicação de vibração intermitente (SEARLES; TODD;

KOMPALA, 1994) são estratégias comumente empregadas. Com o objetivo de reduzir correntes de convecção, as quais podem afetar a eficiência de separação, trocadores de calor são bastante utilizados para resfriar (por exemplo, para 20°C) o meio contendo as células na entrada do sedimentador. O resfriamento também desacelera o metabolismo celular, o que ajuda a preservar a viabilidade celular mediante as condições não controladas impostas durante a circulação dentro do equipamento (CASTILHO, 2015; CHOTTEAU, 2015; SEARLES; TODD; KOMPALA, 1994).

3.3.3.2 Filtração tangencial alternante (ATF)

De acordo com a Tabela 3-3, os sistemas baseados em filtração tangencial são os únicos que até hoje foram capazes de fornecer cultivos em suspensão com uma concentração celular de até 200×10^6 cels/mL. A operação desses sistemas é simples e não intensiva em mão-de-obra, e a disposição das fibras ocas em módulos compactos torna o processo de escalonamento modular e, portanto, mais simples (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Por fornecer um permeado livre de células pronto para a purificação, os sistemas filtrantes constituem a principal escolha para o desenvolvimento de processos integrados (GODAWAT et al., 2015; WARIKOO et al., 2012). Entretanto, devido à eficiência de separação de 100%, esses dispositivos não permitem eliminar as células mortas pelo perfundido. A remoção dessas células, no caso, é realizada apenas pela corrente de *bleeding*. Outra desvantagem apresentada por esses equipamentos é a possibilidade de retenção da proteína de interesse, ou seja, quando a concentração de produto presente no perfundido é significativamente menor em relação àquela detectada no biorreator. A retenção normalmente ocorre em decorrência do entupimento (*fouling*), com a formação de uma camada-gel constituída de debris celulares, proteínas e ácidos nucleicos provenientes do extravasamento do conteúdo citoplasmático das células mortas sobre as membranas (KELLY et al., 2014; KIM et al., 2016a; KUDUGUNTI et al., 2017).

O sistema de filtração tangencial alternante (ATF – *alternating tangential flow*), mostrado na Figura 3-6, foi desenvolvido de forma a minimizar o problema de entupimento através da inversão periódica do sentido do escoamento da suspensão celular no interior das fibras ocas. Por meio de uma conexão única entre o dispositivo e o biorreator, a suspensão de células é recirculada no interior das fibras ocas, enquanto o permeado é coletado pelo casco com o auxílio de uma bomba peristáltica. O movimento alternado é promovido por um diafragma instalado na base no cartucho de fibras ocas e submetido a ciclos sucessivos de pressurização e exaustão, com duração entre 10 e 20

segundos cada. A alternância da direção do escoamento promove a retrolavagem das membranas e ajuda a evitar o entupimento (SHEVITZ, 2003). Com isso, prolonga-se a duração da corrida. Além disso, na ocorrência de falha de operação, há a possibilidade de substituição por um novo cartucho.

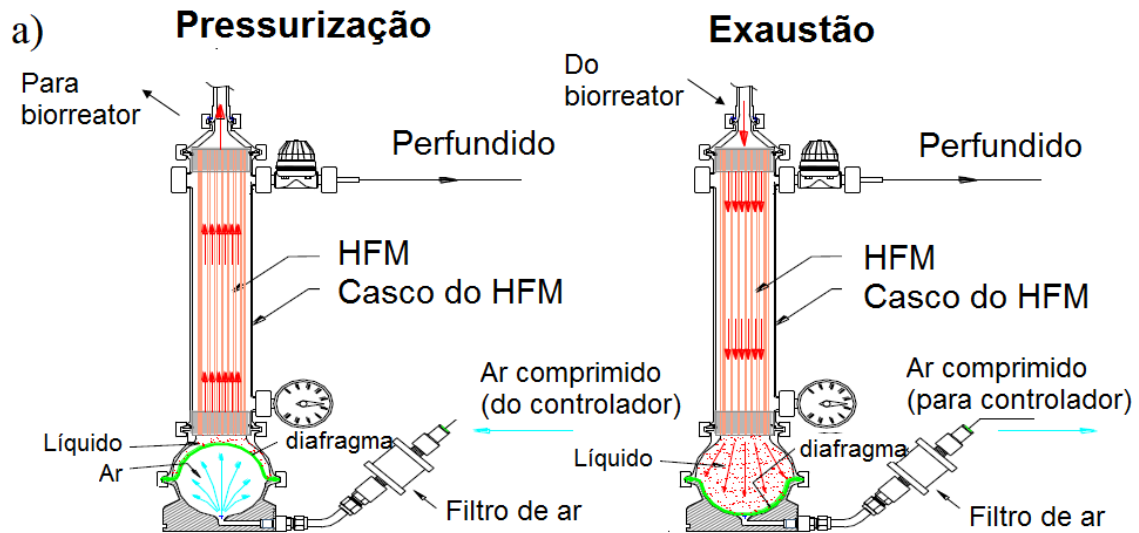


Figura 3-6. A) Representação esquemática dos ciclos de pressão e de exaustão com ar comprimido e vácuo, que conferem o movimento alternante ao ATF. HFM – hollow fiber membrane (adaptado de Repligen 2015). B) Sistema ATF2 acoplado a um biorreator Applikon com vaso de 3 L, usado no presente trabalho no LECC/COPPE/UFRJ.

Apesar de o ATF ter sido projetado para reduzir problemas associados ao entupimento, a retenção de produto nesse sistema é reportada na literatura (PATIL; WALTHER, 2017), o que em alguns casos foi explorado para o estabelecimento de

perfusão ultra concentrada, em que o produto se acumula dentro do biorreator. Por exemplo, Clincke et al. (2013a) e Duvar et al. (2013) substituíram as membranas de 0,2 μm por membranas de ultrafiltração de 50 kDa para permitir a retenção total do anticorpo monoclonal no biorreator. Essa estratégia permitiu aumentar significativamente a concentração de produto ao final da corrida. Ressalta-se, porém, que essa estratégia se aplica somente para a produção de proteínas que toleram elevados tempos de residência.

O ATF tem sido extensivamente utilizado na produção comercial de proteínas terapêuticas (FARID; THOMPSON; DAVIDSON, 2014; REPLIGEN, 2017a) e em setores de pesquisa e desenvolvimento de empresas (CASTILHO, 2015). Entretanto, no ambiente acadêmico, poucos trabalhos de caracterização dos parâmetros que influenciam a operação do ATF são encontrados. Um exemplo é o trabalho de Kelly et al. (2014), que avaliaram o efeito da concentração de antiespumante e de debris celulares no aumento da resistência ao fluxo permeado e, a partir dessas informações, estabeleceram um modelo de predição de ocorrência de entupimento em processos de perfusão com células animais utilizando o ATF (KELLY et al., 2014). Recentemente, uma ampla investigação dos parâmetros de operação do ATF sobre o metabolismo e a produtividade das células foi conduzido por Walther et al. (2019). Os autores determinaram também que fluxos de permeado superiores a 60 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$ em membranas de 0,2 μm de poro contribuíram significativamente para o aumento da retenção de produto.

Outros trabalhos encontrados na literatura propuseram comparar o desempenho do ATF em relação a outros equipamentos de retenção celular. Em um dos primeiros trabalhos do gênero, Hufford (2007), em um estudo de comparação do ATF com um *spin filter* e um dispositivo de retenção à base de membrana cerâmica, obteve os maiores valores de concentração celular em cultivos de células CHO e hibridomas com o ATF. No entanto, a autora atribuiu uma menor produtividade e a redução de viabilidade das células no ATF às tensões cisalhantes. Duvar et al. (2013) obtiveram concentrações celulares de 130×10^6 cels/mL para o ATF, muito superior em relação ao sedimentador gravitacional e à centrífuga, de 30×10^6 cels/mL. Conforme mencionado anteriormente, estes autores conseguiram aumentar em quatro vezes a concentração de mAb ao substituir as membranas de microfiltração por membranas com *cutoff* de 50 kDa, promovendo a retenção completa do produto. Uma análise de viabilidade econômica comparando o ATF com *spin filter* e a batelada alimentada demonstrou que o ATF se torna competitivo quando atinge uma concentração celular pelo menos três vezes superior ao obtido em batelada alimentada. Além disso, o ATF apresentou-se como a opção mais econômica

devido ao menor *footprint* utilizado, por permitir a substituição do cartucho sem interromper a produção, e por ser compatível com aplicações *single-use* (POLLOCK; HO; FARID, 2013).

O exercício de comparação entre os sistemas de TFF (*tangential filtration flow*) convencional e ATF também encontra alguns exemplos. Clincke et al. (2013b) obtiveram concentrações celulares superiores para o TFF em relação ao ATF (214×10^6 vs. 132×10^6 cels/mL), sendo o pior desempenho do ATF atribuído a dificuldades do sistema em manter o movimento alternante para uma suspensão com alta viscosidade. Embora tenha sido constatada a indesejada retenção de produto no biorreator em ambos os sistemas, esta foi significativamente superior para o TFF. O melhor desempenho do ATF nesse quesito seria uma evidência do efeito de retrolavagem estabelecido pelo movimento alternante. Karst et al. (2016), em um experimento de caracterização da hidrodinâmica em biorreatores usando partículas de poli (metil metacrilato), determinaram menores tensões de cisalhamento impostas pelo ATF em relação ao TFF para as mesmas condições de agitação e aeração. Além disso, em processos com células CHO produtoras de mAb, os autores observaram a retenção de produto apenas para o TFF.

3.3.3.3 Hidrociclone (HC)

Equipamento simples e sem partes móveis, o hidrociclone (HC) promove a separação sólido-líquido por meio de um campo centrífugo. Conforme apresentado na Figura 3-7, o HC consiste em um dispositivo com formato cônico acoplado a um corpo cilíndrico. O campo centrífugo é formado pela alimentação, a altas vazões, da suspensão celular do biorreator em entradas dispostas tangencialmente no corpo cilíndrico, formando o vórtice primário. As células são submetidas a um intenso movimento em espiral direcionado para a parte inferior do cone (*underflow*), carregando as partículas maiores e mais densas em direção à parede e subsequentemente em movimento descendente em direção ao *underflow*. Como o orifício do *underflow* não é grande o suficiente para a descarga completa do material, apenas parte do fluido e a maioria das partículas é liberada, ao passo que a outra parte do fluido adquire um movimento espiralado central no sentido inverso, em direção à parte superior do hidrociclone, onde está localizado o orifício do *overflow*. Este vórtice secundário resulta na formação de uma corrente mais diluída, carregando uma menor quantidade de partículas, de menor tamanho e/ou menos densas (CASTILHO; MEDRONHO, 2002).

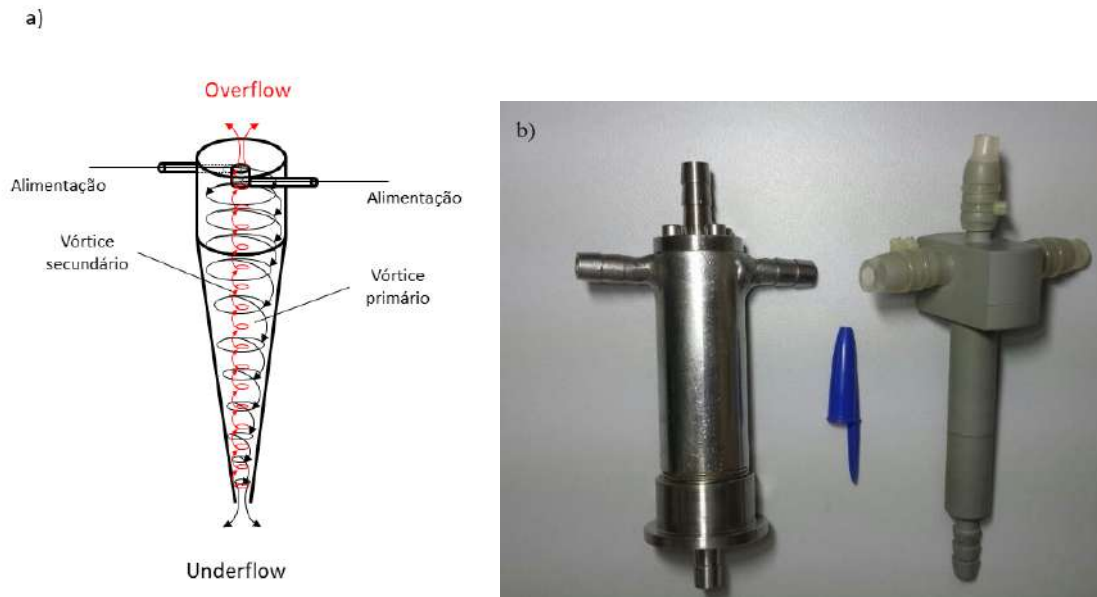


Figura 3-7. a) Representação esquemática do hidrociclone e o padrão de escoamento interno. b) Hidrociclones projetados por Deckwer et al. (2005) para separação de células animais, com dupla entrada tangencial; à esquerda, protótipo em aço inoxidável; à direita, protótipo em plástico anteriormente comercializado pela Sartorius. Adaptado de Carvalho; Castilho (2017).

A formação dos vórtices ocorre com o estabelecimento de uma diferença de pressão (ΔP) entre os orifícios de alimentação e de saída. O campo centrífugo é estabelecido pelo escoamento da suspensão e não por rotores externos como as centrífugas (DECKWER et al., 2005). Quanto maior a vazão de alimentação, maior a queda de pressão e, por conseguinte, mais intenso é o campo centrífugo proporcionado.

No presente trabalho, a nomenclatura adotada para os hidrociclones é dada na forma de “HCXXYY”, em que “XX” e “YY” discriminam o diâmetro dos orifícios localizados no *underflow* e *overflow*, respectivamente. Portanto, um hidrociclone HC2015 possui 2,0 mm de diâmetro de orifício de *underflow* e 1,5 mm de diâmetro de orifício de *overflow*; um HC2520 possui 2,5 mm de *underflow* e 2,0 mm de *overflow*, e assim por diante.

O potencial dos HCs como dispositivos para retenção de células animais em perfusão começou a ser explorado nos anos 2000, com a publicação de uma patente (DECKWER et al., 2005) e com trabalhos avaliando a eficiência de separação e o impacto da queda de pressão sobre a viabilidade celular. A preocupação com a redução da viabilidade deve-se ao fato de que as células são submetidas a altas tensões de cisalhamento durante a separação no HC. Contudo, como o tempo de residência é muito baixo (entre 0,03-0,1 s), comprovou-se que as células poderiam resistir a esse efeito (ELSAYED et al., 2006). Os hidrociclones atualmente disponíveis para separação de

células animais são bastante compactos, com 1 cm de diâmetro cilíndrico e volume interno inferior a 3 mL, o que reduz consideravelmente o tempo de residência das células fora do biorreator em comparação ao sedimentador. Apesar do pequeno tamanho, a sua capacidade de processamento é muito elevada, sendo possível coletar perfundido a vazões tão altas quanto 500 L/d com um único dispositivo (CASTILHO, 2015). Outras vantagens atribuídas aos HCs para a aplicação na perfusão incluem a ausência virtual de manutenção (como, por exemplo, substituição ao longo da corrida), a estabilidade de operação por longos períodos e o escalonamento relativamente simples, com o arranjo de equipamentos em paralelo (CASTILHO; MEDRONHO, 2002; DECKWER et al., 2005).

Luebberstedt et al. (2000), em avaliação de três diferentes modelos comerciais de HC, observaram que não houve queda de viabilidade de células HeLa retidas pelo *underflow* para uma ΔP de até 4 bar. O modelo comercial Dorr-Oliver com 10 mm de diâmetro do corpo cilíndrico promoveu uma eficiência de separação de 81% para uma ΔP de 3 bar, índice que foi elevado para 94% com a instalação em série de um segundo HC do mesmo modelo à saída do *overflow*.

Jockwer et al. (2001) avaliaram HCs específicos para a separação de células animais comparando nove diferentes geometrias com base na combinação de diâmetros de *overflow* entre 1 – 2 mm, e de *underflow* entre 2 – 3 mm. Uma eficiência de separação de 94% foi obtida para a combinação 2520 (i.e., diâmetro de 2,5 mm no *underflow*; 2,0 mm no *overflow*). Esses autores, pela primeira vez, demonstraram a aplicação do HC em perfusão realizada em um biorreator de 5 L com células CHO produtoras de um anticorpo monoclonal. O cultivo foi mantido por 23 dias e com viabilidade celular superior a 90%, com um aumento de 50% na concentração celular e de três vezes na concentração de produto. Devido à alta capacidade de processamento, esse hidrociclone foi operado de forma intermitente. Elsayed et al. (2006), também utilizando um HC2520 para a separação de células BHK e HeLa em baixas concentrações, observaram eficiências de separação entre 77 e 97% para uma faixa de ΔP entre 0,4 e 1,3 bar. Não foi observada a diminuição de viabilidade durante os ensaios, exceto para as células BHK coletadas no *overflow* a 1,3 bar. A menor viabilidade observada no *overflow* foi atribuída pelos autores à inversão do movimento espiralado, em que as células estariam sujeitas a maiores tensões de cisalhamento. A maior concentração de células não-viáveis não afetaria o desempenho do biorreator, já que a corrente de *overflow* se destina à coleta de produto. Por outro lado, o produto presente no sobrenadante estaria sujeito à degradação

ao ser exposto na presença de células mortas, caso seja necessário armazenar o perfundido antes de prosseguir com a purificação.

Simulações numéricas usando fluidodinâmica computacional (CFD) demonstraram que um hidrociclone do tipo Bradley com 1 cm de diâmetro seria capaz de separar células de mamíferos com uma eficiência total de até 90%, ao passo que as eficiências de separação de células de levedura e de *Escherichia coli* seriam muito baixas (MEDRONHO; SCHUETZE; DECKWER, 2005).

Em outro trabalho utilizando HC para separação de células animais, Pinto et al. (2008) observaram que a eficiência de separação celular manteve-se acima de 97% tanto para a linhagem parental CHO.K1 quanto para uma linhagem recombinante produtora de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Por meio de técnica de microscopia de epifluorescência utilizando laranja de acridina e brometo de etídio na observação de aberrações da cromatina, os autores constataram que a passagem das células pelo HC a uma queda de pressão de 1 bar não induziu apoptose. Com base nessa informação, foi evidenciado o potencial de uso do HC como dispositivo de retenção celular, uma vez que as células oriundas do biorreator, embora sujeitas a sucessivos ciclos de recirculação e submetidas a altas tensões cisalhantes, porém por um curto período de tempo, não estariam sujeitas à apoptose.

As aplicações mais recentes do hidrociclone com células de mamíferos em biorreatores de até 200 L foram reportados na literatura há aproximadamente 10 anos (ELSAYED; WAGNER, 2011; SCHRÖDER et al., 2010). Entretanto, em todos os trabalhos citados até então, observa-se a baixa concentração celular obtida (menor que 20×10^6 cels/mL) em meios relativamente pobres ou que necessitam de suplementação com soro, o que atualmente é evitado. Além disso, o hidrociclone foi aplicado por curtos períodos (10-20 dias), muitas vezes devido à limitação da quantidade de meio disponível para os ensaios em escala piloto. A falta de um modelo em escala laboratorial robusto possivelmente atrai pouca atenção das empresas em explorar o hidrociclone como uma tecnologia de retenção celular alternativa aos equipamentos de filtração. Adicionalmente, há o preconceito por parte de alguns autores de que os hidrociclones promovem efeitos deletérios sobre as células devido às intensas tensões de cisalhamento aplicadas tanto devido ao bombeamento a alta vazões quanto à formação de vórtices no interior do equipamento (OZTURK, 2019). Atualmente, o estabelecimento de linhagens mais robustas ao estresse mecânico e a oferta de meios de cultivo capazes de sustentar corridas em perfusão com concentração muito alta poderiam resultar em processos mais robustos

capazes de validar o hidrociclone como equipamento para retenção celular em perfusão. A retomada dos estudos com o hidrociclone estaria alinhado ao propósito de outros trabalhos que buscam alternativas para a filtração tangencial, já que as quedas de rendimento devido à retenção de produto por membranas são significativas. Por exemplo, Gagnon et al. (2019) propuseram um processo baseado em quimiostato com uma produtividade duas vezes superior a uma batelada convencional, aplicável em biorreatores com capacidade superior a 2000 L. Kwon et al. (2017) comprovaram o uso de um dispositivo de classificação inercial baseado em conceitos de microfluidos para uma perfusão em escala laboratorial, com eficiências de separação entre 75 e 99%. Em um segundo trabalho, o mesmo grupo investigou o potencial do mesmo dispositivo microfluídico em remover debris e células mortas de um biorreator em perfusão, com eficiências de separação de até 84% (KWON et al., 2018). Adicionalmente, a construção do hidrociclone por impressão tridimensional tornaria esse dispositivo adequado para aplicações *single-use*, além de permitir uma caracterização experimental mais rápida de modelos desenvolvidos por CFD e o desenvolvimento de mini-hidrociclones com diâmetro de cilindro inferior a 1 cm e, por conseguinte, com maior eficiência de separação (SYED et al., 2017; VEGA-GARCIA; BRITO-PARADA; CILLIERS, 2018). Deve-se ressaltar que, apesar da simplicidade conferida ao hidrociclone devido ao seu tamanho compacto, uma proporção geométrica incorreta das dimensões internas, como diferenças no diâmetro dos orifícios de saída, impactam diretamente na eficiência de separação do hidrociclone (CASTILHO, 2015).

4 Materiais e Métodos

Neste trabalho, o esforço experimental compreende duas grandes partes:

- a) o emprego de um hidrociclone HC2015 de aço inoxidável em ensaios de separação em batelada para comparar diferentes cabeçotes da bomba de alimentação e avaliar o impacto do diâmetro de mangueira das saídas sobre o desempenho de separação, e a aplicação deste dispositivo como equipamento de retenção celular em perfusão em um biorreator com bolsa descartável em escala piloto;
- b) a realização de um total de 12 corridas em perfusão em biorreatores de escala laboratorial (volume de trabalho entre 0,7 e 4 L). Foram utilizadas duas linhagens celulares de células CHO produtoras de mAb cultivadas em meios de cultivo quimicamente definidos, e utilizando três equipamentos de retenção celular: o sedimentador lamelado, o ATF e o hidrociclone.

Todas as corridas em perfusão em escala laboratorial com os três equipamentos de retenção foram conduzidas no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (PEQ/COPPE/UFRJ). Já os ensaios de separação em batelada com o hidrociclone, assim como as corridas em biorreatores de bolsas descartáveis de 50 L com esse equipamento, foram realizados no setor de Pesquisa e Desenvolvimento em Upstream da GE Healthcare (atualmente, Cytiva), em Uppsala, Suécia, entre setembro de 2017 e maio de 2018.

4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizados os seguintes clones de células CHO produtoras de anticorpo monoclonal, adaptadas ao crescimento em suspensão e cultivadas em meios quimicamente definidos e livres de componentes de origem animal:

- a) CHO DP-12 clone#1934 (ATCC® CRL-12445), cultivada em meio TC-LECC (Xell AG, Alemanha) suplementado com 8 mM de glutamina, 0,1 mg/L de fator de crescimento semelhante à insulina (Long®R3IGF1, Xell AG) e 200 nM de metotrexato (Hytas, Brasil). Essa linhagem produz um anticorpo humanizado IgG1 que possui afinidade à interleucina 8 (IL-8) (GONZALEZ; LEONG; PRESTA, 2000);
- b) Uma linhagem recombinante de CHO-K1 (Cobra Biologics, Suécia) produtora de IgG1, aqui denominada como CHO_mAb#1, cultivada em meio

HyClone™ ActiPro™ (GE Healthcare/Cytiva, EUA) suplementado com 6 mM de glutamina. Essa linhagem foi utilizada apenas na primeira perfusão experimental com o hidrociclone em biorreator descartável de 50 L (corrida HC-1);

- c) Uma linhagem recombinante de CHO-K1 produtora de IgG1, amplificada pelo sistema de glutamina sintetase (GS), aqui denominada como CHO_mAb#2, cultivada em meio ActiPro.

Para a realização dos experimentos com essas células, um criotubo proveniente de bancos celulares mantidos em ultrafreezer, e contendo 10^7 cels/mL, foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37°C, ressuspensionado em 10 mL de meio de cultivo e centrifugado a 150xg por 5 minutos. O pellet obtido foi ressuspensionado em meio fresco aquecido a 37°C contido em frascos agitados (Corning Inc, EUA) ou *spintubes* (TPP, Suíça) com tampas ventiladas. As células foram passadas a cada 2-4 dias, e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5-7,5% de CO₂. Os frascos foram mantidos em agitação a 105 rpm (para frascos de 1 L, *shaker* com órbita de 2,5 cm), 140 rpm (frascos de 125 a 500 mL, órbita de 2,5 cm) e 180 rpm (*spintubes*, *shaker* com órbita de 5 cm).

4.2 Ensaios de separação em batelada com hidrociclones

Para avaliar os efeitos de diversas variáveis e as configurações de operação do hidrociclone sobre a eficiência de separação (apresentados nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3), os testes de separação em batelada foram realizados em temperatura ambiente e a pressão atmosférica. A Figura 4-1 mostra o esquema do corpo de teste preparado para esses ensaios.

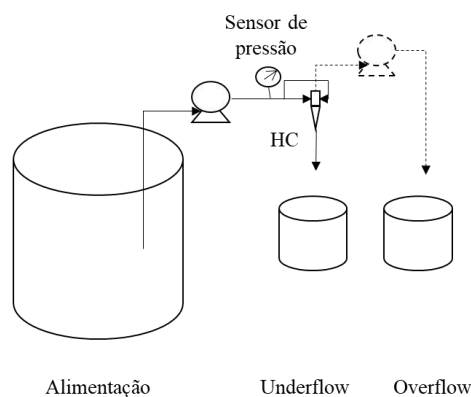


Figura 4-1. Corpo de teste para os ensaios de separação em batelada com o hidrociclone. A bomba na linha do overflow (tracejado) foi aplicada somente no ensaio descrito no item 4.2.2.

O hidrociclone empregado em todos os ensaios foi o HC2015 (2,0 mm de diâmetro de *underflow*, 1,5 mm de *overflow*) fabricado em aço inoxidável, e semelhante ao mostrado na Figura 3-7. Esse protótipo, cuja geometria foi idealizada para a separação de células animais (DECKWER et al., 2005), possui um cilindro com 10 mm de diâmetro, um ângulo cônico de 6°, e uma entrada dupla de alimentação. Tanto as entradas quanto as saídas (*underflow* e *overflow*) consistem em espigões de 9,5 mm (3/8”) de diâmetro, com ranhuras na superfície para uma melhor fixação das mangueiras de silicone.

Como suspensões-teste, foram usadas células CHO ou *beads* cromatográficas, conforme mencionado no texto. Volumes variando entre três e quatro litros de suspensão-teste foram mantidas sob agitação magnética em velocidade moderada, de modo a manter as partículas em suspensão. A bomba peristáltica de alimentação do hidrociclone (520U, Watson-Marlow, Reino Unido) foi sempre operada em sentido anti-horário, e segmentos de mangueira Marprene (Watson-Marlow, especificações 902.0080.024 e 902.0096.024) foram acoplados ao cabeçote da bomba utilizado. As quedas de pressão (ΔP) no hidrociclone foram correlacionadas com a rotação da bomba peristáltica de alimentação. Quanto maior a rotação, maior a vazão de alimentação e, portanto, maior o ΔP . Para medir o ΔP , um manômetro a óleo (Wika, Brasil) ou um sensor de pressão autoclavável (SciPress™, Parker Hannifin, EUA) foi instalado no ponto mais próximo possível da bifurcação de alimentação do HC. Mangueiras de silicone com diâmetro interno de 9,5 mm (3/8”) foram utilizadas nas conexões, e presas ao hidrociclone com abraçadeiras de metal.

Para determinar as vazões do *underflow* (Q_u) e do *overflow* (Q_o), amostras foram coletadas em béqueres pré-tarados posicionados sob as respectivas saídas durante um intervalo mínimo de 10 s. Para o cálculo das vazões, foi considerado 1 kg ~ 1 L. Após a pesagem final dos béqueres, foram retiradas amostras para determinar as concentrações de células ou *beads* em contador automático (ViCell XR, Beckman Coulter, EUA), e de viabilidade (no caso de células, também com o ViCell). As vazões e as concentrações foram determinadas em duplicata técnica para cada ΔP avaliado. À vazão de alimentação Q_f , foi atribuído o somatório das vazões das saídas do *underflow* e *overflow* (Q_u+Q_o).

No ViCell, foram ajustados os parâmetros para a análise de imagens de *beads* de acordo com a Tabela 4-1. O tipo celular padrão de fábrica “CHO” foi utilizado nas contagens das células animais.

Tabela 4-1. Especificações de “cell type” configurados no ViCell respectivamente para a contagem de amostras de beads cromatográficas Superose 6.

Parâmetro	Valor (cell type: bead)
Minimum diameter (μm)	2
Maximum diameter (μm)	50
Number of images	50
Aspiration cycles	1
Trypan blue mixture cycles	3
Cell brightness (%)	90
Cell sharpness (%)	100
Viable cell spot brightness (%)	75
Viable cell spot area (%)	5
Minimum circularity (roundness)	0,6
Decluster degree	Medium

4.2.1 Comparação entre os cabeçotes de alta e de baixa pulsação

Cabeçotes de alta (520R2) e de baixa (505L) pulsação compatíveis com a bomba peristáltica modelo 520U foram usados para comparar a intensidade do movimento peristáltico sobre o desempenho do hidrociclones e efeito sobre as células. Nos cabeçotes, foram utilizadas mangueiras Marprene com diâmetro interno de 8,0 mm (#902.0080.024). No caso do cabeçote 505L de duplo trilho, dois segmentos de Marprene foram presos em dois elementos Y, um em cada lado do cabeçote, conforme instruções do fabricante.

Foram empregadas duas suspensões-teste: células CHO-DP12 diluídas a aproximadamente $8,0 \times 10^6$ cels/mL com tampão fosfato salino (PBS); e *beads* cromatográficas de agarose não funcionalizadas (Superose 6, GE Healthcare/Cytiva, Suécia), fornecidas como um *slurry* em etanol a 20%, e diluídas em água purificada numa faixa de concentração entre 30×10^6 e 150×10^6 *beads*/mL. As *beads* foram inicialmente adotadas como partícula-modelo para simular a separação de células, devido ao seu diâmetro nominal próxima de 13 μm , e pela rápida disponibilidade para os ensaios. Além disso, as *beads* poderiam ser reutilizadas num intervalo de poucos dias, já que o processamento com o HC não afetou significativamente a sua integridade, após uma inspeção em microscópio.

4.2.2 Controle de Q_o com uma bomba peristáltica

Visto que, na operação contínua do hidrociclone utilizado nesse trabalho a vazão de *overflow* é muito alta, foi avaliada a possibilidade de se controlar a vazão de *overflow* (Q_o) em valores compatíveis com as escalas de biorreatores utilizados, nos quais processos em perfusão seriam mantidos entre 1 e 2 vvd. Para isso, uma bomba peristáltica 520U com cabeçote de alta pulsação (520R2) foi acoplada na linha de *overflow*. No

cabeçote da bomba, foi acoplado um segmento de Marprene com 3,2 mm de diâmetro interno e espessura de parede de 2,4 mm (#902.0032.024). Uma calibração prévia dessa linha foi realizada com água e sem o HC acoplado, de modo a se determinar as velocidades de rotação da bomba equivalentes a 50 e 100 L/d, aproximadamente. Nos ensaios de separação, ambas as bombas de alimentação do HC e de controle de Q_o foram acionadas simultaneamente. Foram avaliadas as vazões de *overflow* de 50 e 100 L/d para ΔP entre 1 e 2 bar, empregando suspensões de *beads* Superose 6 com 5×10^6 e 50×10^6 *beads*/mL.

4.2.3 Efeito do diâmetro na saída do *underflow*

Para investigar a possibilidade de se conectar a saída do *underflow* ao biorreator por meio de uma mangueira de silicone ou conectores rápidos, ensaios em batelada com diferentes proposições de conectores e de diâmetros de mangueira foram realizados. Portanto, a linha de reciclo de células poderia ser construída ou pela fusão de tubos termoplásticos, ou pela conexão rápida asséptica, respectivamente, de acordo as especificações de diâmetro disponíveis comercialmente ou na bolsa descartável.

Nos primeiros testes, foram comparados dois diâmetros de mangueira de silicone: o menor, com diâmetro interno de 9,5 mm (3/8") preso à saída do *underflow*; e o maior, de aproximadamente 25,4 mm (1"), preso ao corpo do hidrociclone, como mostra a Figura 4-2. Foram utilizados tubos com cerca de 30 cm de comprimento.

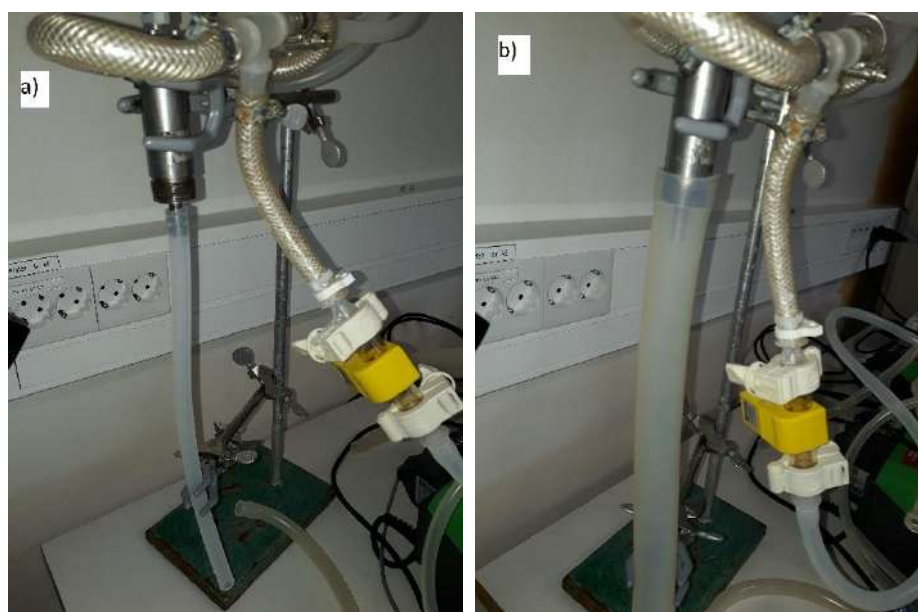


Figura 4-2. Mangueiras de silicone colocadas na saída do *underflow*. A) 9,5 mm DI; B) 25,4 mm DI

Em uma segunda abordagem, conectores rápidos ReadyMate™ (GE Healthcare/Cytiva, EUA) acoplados a redutores comerciais com diferentes diâmetros foram testados. Dois conjuntos foram montados: um ReadyMate™ com 15,7 mm DI (Mini TC, # 28-9366-95) engatado com um conector de flange com 12,7 mm DI; e um ReadyMate™ DI 19,7 mm (Standard TC, # 28-9568-89) engatado a um conector de flange com 25,4 mm DI. Portanto, foram comparados dois diâmetros que eventualmente poderiam restringir o fluxo de descarga do *underflow* (12,7 e 19,7 mm), conforme mostrado na Figura 4-3. Ambos os conjuntos foram presos ao corpo do HC2015 com uma mangueira de silicone de 25,4 mm D.I.

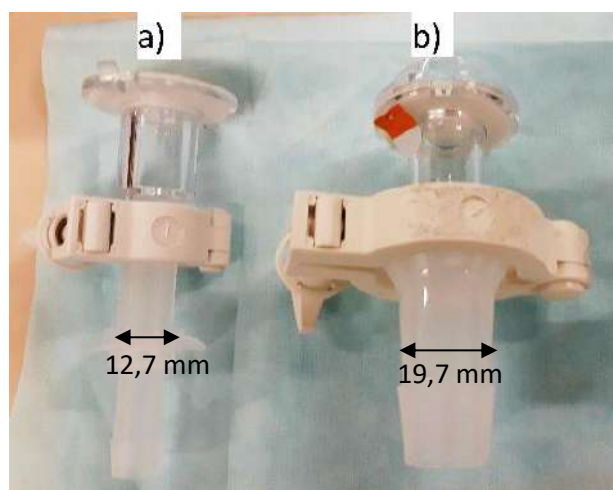


Figura 4-3. Conectores rápidos ReadyMate™ presos a redutores, com diâmetro interno mínimo de A) 12,7 mm e B) 19,7 mm.

4.2.4 Cálculo para determinação de eficiência de separação em hidrociclone

As eficiências total (E_T) e total reduzida (E') de separação foram calculadas respectivamente pelas Equações 5 e 7. A razão de fluido (R_f), que corresponde à eficiência mínima de separação devido à força de arraste, foi determinada pela Equação 6.

4.3 Corridas em perfusão com o hidrociclone em biorreator de bolsas descartáveis de 50 L

O hidrociclone HC2015 foi testado como equipamento de retenção celular em três cultivos em perfusão com células CHO produtoras de mAb. Foram testadas diferentes formas de se conectar e operar o HC em biorreatores descartáveis de 50 L, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2. O volume de trabalho (V_T) adotado foi de 40 L.

As células utilizadas (CHO_mAb#1 e CHO_mAb#2) foram expandidas em meio ActiPro em frascos agitados a 37°C e atmosfera contendo CO₂ a 7,5%. Para o inóculo do

biorreator principal, as células foram cultivadas em batelada por 4 dias em um biorreator de ondas descartável (Cellbag™, GE Healthcare/Cytiva, #CB0010L10-31), a 36,8°C, agitação a 20 rpm e ângulo de 6°, aerado a 0,2 L/min e 7,5% CO₂. O inóculo foi então lentamente bombeado para o biorreator principal já contendo o meio basal ActiPro, em temperatura e pH controlados.

As bolsas descartáveis foram instaladas no sistema Xcellerex XDR-50 (GE Healthcare/Cytiva, EUA), acoplado ao módulo X-station e *software* Wonderware (GE Healthcare/Cytiva) para o controle de pH (7,10), oxigênio dissolvido (DO, 40% da saturação de ar), temperatura (36,8°C) e volume de trabalho (40 L). Sondas de pH e DO (InPro, Mettler-Toledo, Suíça) foram autoclavadas e assepticamente instaladas na bolsa por meio de conectores rápidos (Kleenpak™, Pall Corporation, EUA). Para o controle de pH, foram injetados CO₂ e bicarbonato de sódio 7,5% (m/v) para acidificação e alcalinização, respectivamente. Ar e O₂ puro foram injetados em uma vazão máxima de 0,02 vvm por meio de um aerador microporoso (2 ou 20 µm, dependendo do modelo da bolsa) para controlar o oxigênio dissolvido, enquanto que ar a uma vazão constante de 1-1,5 L/min foi injetado por um aerador macroporoso (1 mm) para remoção de CO₂. Antiespumante C (Sigma-Aldrich, EUA) a 3% (v/v) foi adicionado quando necessário. Os cultivos foram mantidos em batelada durante os três primeiros dias. Diariamente, amostras do biorreator e da linha de *overflow* foram coletadas para determinar a concentração celular e viabilidade (ViCell), metabólitos (BioProfile FLEX, Nova Biomedical, EUA), e atividade da lactato desidrogenase (LDH) e concentração de anticorpo (Cedex Bio Analyser, Roche, Alemanha).

Separadamente, o hidrociclone e todos os acessórios, i.e., mangueiras de silicone trançadas, tubo Marprene com 9,6 mm DI, sensor de pressão autoclavável (SciPress™) e, quando disponível, um medidor de vazão descartável (FM-23WV, PendoTECH, EUA), foram montados e autoclavados. A bomba peristáltica de alta pulsação (WM, 520U com cabeçote 520R2) foi empregada em todas as corridas como a bomba de alimentação do hidrociclone. Nas extremidades das linhas de alimentação e *overflow*, conectores ReadyMate™ foram utilizados, ao passo que na extremidade do *underflow* foram utilizados ou segmentos de mangueira termoplástica (i.e., soldável) ou ReadyMate™, conforme o tipo de porta disponível na bolsa utilizada (descrito nos itens a seguir). A linha do *overflow* foi conectada a uma bolsa de 200 L (ReadyCircuit 200 L 3-D bag, GE Healthcare/Cytiva, #29064849) acomodada em uma caixa (ReadyToProcess Bin,

#29384061). Quando disponível, uma balança de chão (Mettler-Toledo) foi usada para monitorar a massa de *overflow* (ou perfundido) coletada.

4.3.1 *Corrida HC-1: acoplamento do HC em fim de um cultivo em batelada alimentada*

O primeiro teste para operar o HC em um biorreator descartável, de caráter exploratório, foi iniciado ao final de uma corrida em batelada alimentada com células CHO (CHO_mAb#1), em uma bolsa não-customizada para o acoplamento do HC (XDR-50 DEV, GE Healthcare/Cytiva, #888-0356-C). Nesse modelo de biorreator, uma longa tubulação (> 1 m) foi usada para a linha de recirculação das células entre o *underflow* e o biorreator com uma redução de diâmetro para 12,7 mm (DI) disponível para a conexão.

A corrida foi iniciada diluindo-se as células em meio ActiPro suplementado com glutamina 6 mM, e mantidas em batelada. No terceiro dia, a perfusão em modo intermitente foi iniciada, removendo-se cerca de 10 L pelo *overflow*, e completando o volume do biorreator com meio fresco. A troca parcial foi executada uma vez ao dia durante toda a corrida, com o HC operado a aproximadamente 1 bar. O meio basal ActiPro foi usado como meio de alimentação em toda a corrida.

4.3.2 *Corridas HC-2 e HC-3: customização das bolsas descartáveis para o acoplamento do HC*

Visto que na primeira corrida com o HC em biorreator de 50 L foi necessário adaptar uma longa tubulação para a linha de reciclo das células, as corridas subsequentes foram realizadas em biorreatores descartáveis modificados para o acoplamento do HC. Um conector ReadyMate™ (Standard TC, 1 ½”) com 19,7 mm DI foi soldado no topo de uma bolsa XDR-50 PRO (GE Healthcare/Cytiva, #888-0086-C) e uma bolsa XDR-50 DEV (#888-0356-C), as quais foram usadas respectivamente nas corridas HC-2 e HC-3. A modificação foi feita em ambos os modelos devido à disponibilidade de bolsa pelo fornecedor (GE Healthcare/Cytiva, EUA). As principais diferenças entre ambos os modelos estão no tamanho do poro do aerador microporoso (2 µm na PRO, 20 µm na DEV), e na quantidade e diâmetro das mangueiras de conexão. No caso da bolsa PRO (corrida HC-2), a linha de alimentação do hidrociclone consistiu em duas mangueiras com diâmetro interno de 3,2 mm (1/8”) que saíam do fundo da bolsa, e unidas por uma bifurcação. Já a bolsa DEV, usada na corrida HC-3, possuía na lateral esquerda uma mangueira com diâmetro maior (3/4” ou 19 mm DI) disponível para a linha de alimentação do HC, como usada anteriormente na corrida HC-1. A porta extra no topo da

bolsa foi usada para conectar a saída do *underflow* e o biorreator, de forma a permitir um caminho mais curto para a recirculação das células, e preservar a descarga em forma de guarda-chuva.

Outra mudança em relação à corrida HC-1 foi a utilização de um temporizador analógico (Diehl 881-4, Alemanha) para programar os intervalos de operação do HC. Utilizado a função *auto-start* da bomba de alimentação (520U) do hidrociclone, ciclos de 15 minutos foram programados em intervalos de 3 a 6 horas, conforme a taxa de perfusão desejada. O intervalo I entre os ciclos, em horas, foi determinado considerando o volume a ser trocado em 24 h de acordo com a taxa de perfusão desejada (portanto, $V_T \times D$) e o volume descartado pelo *overflow* durante os 15 minutos de operação ($Q_o \times \Delta t$, onde $\Delta t = 15$ min). Dessa forma (Equação 9):

$$I \approx \frac{24}{V_{TD}/(Q_o \Delta t)} \quad (9)$$

Quando o HC começou a operar, a redução do peso do biorreator ativou a bomba do sistema X-Station configurada para introduzir meio fresco e corrigir o volume de trabalho (40 L).

A linhagem CHO_mAb#2 foi empregada em ambas as corridas. Nos primeiros dias da corrida HC-2, foi utilizado apenas ActiPro como meio de alimentação, o qual foi substituído por meio ActiPro fortificado com CellBoost™ 7a (7% v/v) e 7b (0.7% v/v) (GE Healthcare/Cytiva, EUA). Na corrida HC-3, meio ActiPro fortificado com CellBoost™ 1 (13.9% v/v) e 3 (15.8% v/v) foi usado como o meio de alimentação em toda a corrida.

4.4 Ensaios de perfusão em biorreatores de bancada

Os experimentos de perfusão foram realizados em biorreatores em escala laboratorial RALF Plus (BioEngineering AG, Suíça) e eZ-Control (Applikon Biotechnology, Países Baixos). O volume de trabalho utilizado foi entre 1 e 4 litros que devido a razões econômicas, foi limitado pela quantidade de meios de cultivo disponíveis para os experimentos. A Tabela 4-2 relaciona todos os experimentos e parâmetros de cultivo utilizados.

Tabela 4-2. Corridas em perfusão realizadas em escala de bancada utilizando ATF, HC e sedimentador como dispositivos de retenção celular. A numeração das corridas não reflète a ordem em que elas foram realizadas.

Corrida	Linhagem / Meio basal	Biorreator	Dispositivo de retenção celular	pH	DO (%)	T (°C)	Aerador	V _T (L)	
ATF-1	CHO DP-12 / TC-LECC	Applikon	ATF	7,10	30	37	Forma de L, macroporoso	1,0	
ATF-2		Applikon	ATF	7,10	30	37	Forma de L, macroporoso	1,0	
CS-1		RALF	CS10	7,10	30	37	Tubo aberto	1,0	
HC-4		RALF	HC	Sem controle	40	36,8	5 µm	3,0	
ATF-3	CHO_mAb#2 / ActiPro	Applikon	ATF	6,80	40	36,8	15 µm	2,0	
ATF-4		Applikon	ATF	7,10	40	36,8	15 µm	1,0	
CS-2		Applikon	CS10	6,80	40	36,8	15 µm	2,0	
HC-5		RALF	HC	Sem controle	40	36,8	5 µm	3,0	
HC-6		Applikon	ATF/HC	6,80/7,10		40	36,8/34/31	15 µm	3,5

Adicionalmente, ensaios em batelada simples e alimentada foram conduzidos no biorreator RALF com ambas as linhagens e os respectivos meios de propagação. Na batelada alimentada com CHO DP-12, foi utilizado o *feed* TCX2D (Xell AG, Alemanha) suplementado com glicose e glutamina em concentrações cinco vezes superiores em relação ao TC-LECC. No cultivo com CHO_mAb#2 em batelada alimentada, foi utilizado o suplemento CB1 10% (m/v) como meio de alimentação, adicionado a 40 mL/L conforme sugestão do fabricante.

Em ambos os sistemas de biorreator, a mistura gasosa composta por ar, oxigênio puro e CO₂ foi injetada por meio de aeradores submersos. O controle de temperatura foi realizado ou por meio de recirculação de água por uma camisa externa ao vaso (RALF) ou por manta aquecedora (Applikon). A DO foi controlada por uma cascata de controle de injeção de ar, oxigênio puro e agitação (em rpm). Para o controle de pH, foram utilizados CO₂ e Na₂CO₃ 1 M (base). Impelidores do tipo pás inclinadas e Rushton foram utilizados.

Após a montagem do conjunto (i.e., o vaso, as mangueiras e o dispositivo de retenção celular), uma pressão máxima de 0,4 bar foi aplicada ao vaso injetando-se ar, de modo a detectar possíveis pontos de vazamento através das portas da tampa do biorreator. Em seguida, o conjunto foi autoclavado a 121°C por 40 minutos e, após o resfriamento, o meio de cultivo foi introduzido e mantido por 1-2 dias em temperatura ambiente (teste de esterilidade) sob aeração constante. Após a calibração da sonda de DO para 100% de saturação com ar e ajuste do pH na temperatura do cultivo, as células foram inoculadas. O cultivo foi mantido em batelada por 2-3 dias.

O meio de alimentação e o perfundido coletado foram armazenados em *carboys* autoclavados (ThermoFisher Scientific, EUA) em temperatura ambiente. As vazões de alimentação, perfundido e *bleeding* foram controladas por meio de bombas peristálticas modelo 520U/520R2 (Watson-Marlow), utilizando mangueiras Marprene (Watson Marlow) previamente calibradas. Essas vazões foram monitoradas diariamente por meio de pesagem dos frascos de coleta de alimentação, perfundido e *bleeding*.

Ao longo de todo o experimento, foram retiradas diariamente amostras do biorreator e de perfundido por meio de válvulas anti-retorno, para a determinação de células viáveis (X_V), viabilidade, glicose e lactato. O sobrenadante dessas amostras foi armazenado a 4°C para determinação de osmolalidade (K-7400, Knauer, Alemanha), e a -20°C para análises realizadas posteriormente (ver 4.4.4).

4.4.1 Sedimentador inclinado lamelado (CS)

O sedimentador CS10 (Biotechnology Solutions, EUA) foi operado conforme descrito em Coronel et al. (2019), baseado nas instruções do fabricante do equipamento. A vazão máxima de perfundido recomendada é de 8 L/d, e o volume no *loop* de recirculação (que inclui o sedimentador, a serpentina de resfriamento e mangueiras) é de 0,3-0,4 L. A área total disponível é de 484 cm², distribuída em quatro lamelas. Para minimizar a adesão das células às lamelas e a consequente queda na eficiência de reciclo, foi utilizado um módulo de vibração intermitente, cujo ciclo de operação (15 s ligado e 10 min desligado) foi controlado por um temporizador programável (GraLab 451, EUA). O sedimentador foi posicionado em um ângulo de 30° em relação à vertical, e a vazão de recirculação das células foi mantida constante a 35 mL/min, controlada por uma bomba peristáltica Peripex W2 (BioEngineering, Suíça). Anterior à entrada ao sedimentador, foi instalado um condensador em serpentina necessário para o resfriamento das células a 20°C, a fim de reduzir a atividade metabólica das células expostas às condições não controladas fora do biorreator e de minimizar as correntes de convecção que poderiam arrastar as células junto com o perfundido.

4.4.2 Filtração tangencial alternante (ATF)

O sistema XCell® ATF (Repligen, EUA) foi montado conforme as instruções do fabricante (REPLIGEN, 2015). A alternância dos ciclos foi mediada por um controlador C24U-v.2 fornecido junto com o equipamento. A única conexão entre o ATF e o biorreator consistiu em um pescador (*dip tube*) com 250 mm de comprimento e 12 mm

de diâmetro interno instalado na cabeça do biorreator, conectado a um tubo de silicone (DI 3/8”). Na outra extremidade do tubo de silicone, foi instalado o módulo de fibras ocas que, por sua vez, foi conectado à bomba de diafragma.

Nas corridas ATF-1 e ATF-2, foi utilizado um módulo comercial da Repligen (#F2:RF02PES), com 75 capilares de poli (éter sulfona) de 60 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro de lúmen, com poros de 0,2 μm e a área de filtração disponível de 0,13 m^2 . Na corrida HC-6, foi utilizado um módulo CFP-6-D-4X2MA (GE Healthcare/Cytiva) de polissulfona (75 capilares de 0,75 mm de lúmen e 60 cm de comprimento), com poro de 0,65 μm e área de filtração de 0,095 m^2 . No lado do permeado, uma bomba peristáltica para a coleta de perfundido foi conectada na porta superior do módulo, enquanto que a inferior foi mantida fechada com um grampo de metal e um filtro de ar (Midisart 2000, Sartorius, Alemanha). A fixação de todo o conjunto (módulo, diafragma e pescador) foi feita com grampos sanitários de 1/2”, fornecidos com o sistema.

As faixas de operação para o ATF2 e os parâmetros de operação da bomba de diafragma foram estabelecidas no controlador C24U conforme as orientações do fabricante (REPLIGEN, 2015). A vazão de recirculação aplicada no ATF variou entre 0,7 e 1,4 L/min, conforme mencionado no texto.

4.4.3 Hidrociclone (HC)

O hidrociclone HC2015 de aço inoxidável foi utilizado nos ensaios em biorreator de bancada (corridas HC-4, HC-5 e HC-6). Adaptadores com rosca feitos em aço inox 316 foram especialmente fabricados para instalar o hidrociclone na tampa do biorreator, de modo que a saída do *underflow* permanecesse livre sobre a suspensão de células do biorreator. Portanto, nesse caso, não foi preparada uma linha de recirculação com mangueiras e conectores, nem utilizado um frasco intermediário para a coleta das células do *underflow*, como utilizado por Elsayed (2005) e Pinto (2007). Para a linha de alimentação do hidrociclone, foram utilizadas uma mangueira de silicone trançada e um segmento Marprene (9,6 mm DI), presas por abraçadeiras de metal. Visto que o manômetro a óleo não pode ser autoclavado, não foi possível medir *in-line* a queda de pressão no hidrociclone. As quedas de pressão foram previamente determinadas calibrando-se a bomba de alimentação (520U, cabeçote 520R2) com PBS a temperatura ambiente e com o HC instalado já no biorreator, correlacionando ΔP com a velocidade de rotação.

Da mesma forma que as corridas HC-2 e HC-3 em biorreator descartável de 50 L, o HC foi operado de forma intermitente, visto o pequeno volume de trabalho do biorreator (3-4 L). Ciclos de 1 min foram acionados por meio de um temporizador digital comercialmente disponível ligado à bomba de alimentação do HC. Os intervalos de operação foram determinados conforme a taxa de perfusão aplicada, conforme explicado em 4.3.2, e com $\Delta t = 1$ min. Pelo menos uma vez ao dia, durante o acionamento do HC, amostras do biorreator e da linha do *overflow* foram retiradas para determinar a concentração celular e metabólitos. Para o enchimento do biorreator com meio fresco, foi empregado ou um sensor de nível (biorreator RALF) acoplado à bomba de alimentação de meio, ou um segundo timer ligado à bomba de alimentação (biorreator Applikon). Foram empregadas vazões de alimentação de forma que o enchimento ocorresse no menor intervalo possível (menos de 30 minutos).

4.4.4 Ensaios analíticos

A concentração de células viáveis (X_v) e viabilidade foram determinadas em contador automático (Vi-Cell XR, Beckman-Coulter, EUA), baseada na diferenciação entre células viáveis e não-viáveis pela exclusão de azul de tripan das células viáveis (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). A viabilidade foi calculada como a razão entre a concentração de células viáveis (i.e., não coradas com azul de tripan) e a concentração de células totais (coradas e não coradas).

As concentrações de glicose (Glc) e de lactato (Lac) foram medidas no sobrenadante de amostras frescas centrifugadas no analisador bioquímico YSI 2700 *Select Analyser* (YSI Inc., EUA). Quando necessário, as amostras foram pré-diluídas em tampão PBS, de modo que as concentrações de glicose e de lactato estivessem próximas a 2,5 g/L e 0,5 g/L respectivamente, os quais são os valores de referência do padrão interno de calibração do equipamento.

Para determinar a concentração de aminoácidos livres presentes no sobrenadante das amostras, incluindo glutamina (Gln) e glutamato (Glu), foi adaptado o método de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC) e injeção em HPLC descrito em Büntemeyer (2007). Uma mistura de padrões de aminoácidos foi preparada adicionando-se 100 μ L de soluções individuais a 10 mM de cada um dos 20 aminoácidos (Sigma, LAA21-1KT) preparadas em HCl 0,1 M, e derivatizada conforme o protocolo. Alíquotas de 100 μ L de amostra e da mistura de padrões foram submetidas à secagem a vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf, Alemanha) em temperatura ambiente durante 90 minutos.

Após as etapas de derivatização e secagem, o resíduo obtido foi ressuspensionado em 1 mL de fase A (acetato de sódio 0,085 M pH 5,2, acetonitrila 2%) e injetado em uma coluna de fase reversa (Restek, Ultra C18, 250x4 mm, 5 µm, #9174575) instalada no HPLC (Prominence, Shimadzu, Japão). A temperatura do forno foi controlada a 46°C, e a detecção foi realizada por espectrometria UV a 254 nm. O gradiente de eluição foi modificado com a introdução da fase B (30% de acetato de sódio 0,085 M pH 5,2 e 70% de acetonitrila), e programado para um período de 40 min (para quantificação de Glu e Gln) ou 75 min (quantificação de todos os aminoácidos). A fim de confirmar os tempos de retenção de cada pico de aminoácido, amostras de cada solução individual de aminoácido utilizado para compor a mistura de padrões também foram derivatizadas e injetadas.

A concentração de anticorpo foi determinada com coluna analítica de proteína A (POROS™ A, ThermoFisher, EUA, #2100100) em HPLC. Foi empregado um sistema binário, com o tampão de carregamento (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,20±0,05) e o tampão de eluição (NaCl 150 mM, HCl 12 mM, pH ~ 2). Um padrão de IgG obtido de soro humano (Sigma, I4506) foi utilizado para construir a curva de calibração entre a área do pico e a massa de anticorpo eluída e, assim, determinar a concentração na amostra. O sobrenadante das amostras, mantido a -20°C, foi filtrado a 0,45 µm antes da injeção.

4.5 Cálculos das taxas e de eficiências de separação

A taxa de diluição (doravante taxa de perfusão) foi controlada de acordo com a Equação 2, de modo a manter constante o volume de trabalho do biorreator.

A taxa específica de crescimento μ foi calculada de acordo com a Equação 10, considerando o balanço de massa de células viáveis no biorreator (X_V) num intervalo de amostragem do biorreator (t_n-t_{n-1}):

$$\mu = \frac{1}{\bar{X}_V} \left(\frac{X_{Vn} - X_{Vn-1}}{t_n - t_{n-1}} \right) + \bar{\alpha} \bar{D}_H + \bar{D}_B \quad (10)$$

Onde \bar{X}_V é a média logarítmica de concentração de células viáveis no biorreator no intervalo avaliado, $\bar{\alpha}$ é o fator de perda de células (a razão entre a concentração de células eliminadas pelo perfundido e no biorreator), D_H é a taxa de perfundido e D_B é a taxa de *bleeding*. Foram utilizados os valores médios de α , D_H e D_B determinados no intervalo t_n-t_{n-1} .

Anulando o termo de acúmulo do balanço de massa de células ($\Delta X_V/\Delta t = 0$), a Equação 10 foi utilizada para determinar a taxa de *bleeding* a ser aplicada no intervalo seguinte de amostragem do biorreator.

A produtividade específica (q_P), expressa em picograma de proteína produzida por célula por dia (pcd), foi determinada em cada intervalo de amostragem do biorreator, de acordo com a Equação 11:

$$q_P = \frac{1}{\bar{X}_V} \left(\frac{P_n - P_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} + \overline{D_H P_H} + \overline{D_B P} \right) \quad (11)$$

Onde P e P_H são a concentração de anticorpo medida no biorreator e no perfundido, respectivamente.

A produtividade volumétrica (P_V) foi avaliada em condição de estado estacionário em cada intervalo de amostragem do biorreator, utilizando a Equação 3.

Nas corridas em perfusão utilizando o hidrociclone como equipamento de retenção celular, a eficiência reduzida de separação E' foi calculada pela Equação 12:

$$E' \approx 1 - \frac{X_{V_H}}{X_V} \quad (12)$$

Onde X_{V_H} é a concentração de células viáveis medidas no *overflow*. A eficiência total de separação (E_T) foi estimada com base na Equação 7, utilizado o valor de 0,77 para R_f . Uma vez que não foi possível instalar um medidor de vazão na linha de alimentação do hidrociclone na maioria das corridas (exceto corrida HC-2), não foi possível determinar o valor real de Q_u para que fosse possível aplicar a Equação 5. Com o medidor, seria possível calcular Q_u como a diferença entre Q_f (vazão de alimentação, por medição em linha) e Q_o (monitorada utilizando uma balança).

4.6 Determinação dos atributos críticos de qualidade do produto

Amostras do biorreator foram coletadas das corridas HC-3, ATF-3 e CS-2 para determinar o perfil de N-glicosilação, presença de agregados e variantes de carga do produto. As amostras foram centrifugadas e filtradas (0,45 μ m), e o sobrenadante foi mantido a 4°C (corrida HC-3) ou -20°C (corridas ATF-3 e CS-2).

O anticorpo obtido da corrida HC-3 foi manualmente purificado com uma coluna de 1 mL com proteína A (HiTrap™ Protein A HP, GE Healthcare/Cytiva, Suécia) conforme protocolo interno. O sobrenadante das corridas ATF-3 e CS-2 também foi

purificado com uma coluna de proteína A (ProSep Ultra Plus 5 mL, Merck, EUA) instalada no sistema Äkta Purifier (GE Healthcare/Cytiva, Suécia). As frações eluídas de cada amostra foram combinadas e enviadas para um laboratório interno da GE/Cytiva (Uppsala) para a determinação do perfil de: N-glicosilação em coluna de interação hidrofílica (1,7 µm, 2,1x150 mm, e GlycoWorks™ RapiFluor-MS N-Glycan Kit, todos fabricados pela Waters, EUA); agregados (Superdex™ 200 Increase 5/150 GL, GE Healthcare/Cytiva, Suécia); e variantes de carga (ProPac WCX-10 2x250 mm, ThermoFisher Scientific, EUA), todas realizadas em HPLC.

5 Resultados e Discussão

Essa seção foi dividida em duas partes. Primeiramente, foi realizada uma série de ensaios de separação em batelada com o hidrociclone de aço inoxidável HC2015. Nessa etapa, características relevantes ao desempenho de separação e ao acoplamento do HC a biorreatores foram avaliadas, e são descritas no item 5.1. No item 5.2, são apresentados os resultados das corridas em perfusão conduzidas em biorreatores de escala laboratorial e piloto com esse equipamento. Na segunda parte, item 5.3, são apresentados os resultados das corridas em perfusão conduzidas com o ATF e o sedimentador CS10.

5.1 Ensaios em batelada com hidrociclones

Inicialmente, foram realizados ensaios com o objetivo de determinar as condições mais adequadas para operar e conectar o hidrociclone ao biorreator.

5.1.1 Intensidade de pulsação da bomba peristáltica de alimentação

Nesse experimento, foram comparados dois cabeçotes compatíveis com o modelo de bomba peristáltica 520U fabricada pela Watson-Marlow: cabeçote 520R2 (em forma de U), de alta pulsação; e cabeçote 505L, cujo sistema de seis rolamentos de aço inoxidável acoplados em duplo trilho e operação em *offset* praticamente elimina a pulsação peristáltica característica. Até então, com exceção de Elsayed et al. (2012), todos os trabalhos anteriores empregando hidrociclones na separação de células animais utilizaram o cabeçote de baixa pulsação (505L) na bomba de alimentação do HC (ELSAYED et al., 2006; JOCKWER et al., 2001; PINTO; MEDRONHO; CASTILHO, 2008; SCHRÖDER et al., 2010), de modo a minimizar danos sobre as células submetidas a altas tensões de cisalhamento.

Em uma calibração prévia relacionando a velocidade rotacional da bomba de baixa pulsação e a queda de pressão (ΔP) obtida no HC2015, o valor de ΔP alcançado na máxima rotação (220 rpm) foi de aproximadamente 1,65 bar para ambas as mangueiras Marprene com diâmetro interno de 8,0 mm quanto de 9,6 mm. Esse valor de ΔP é próximo ao reportado por Elsayed et al. (2006) para um HC2520, de 1,4 bar, bombeado com o mesmo modelo (505L). Uma vez que processos em perfusão com altas concentrações celulares poderiam demandar quedas de pressão superiores a 1,6 bar para aumentar a eficiência de separação, a bomba de alta pulsação foi escolhida para se obter maiores ΔP

e investigar o efeito sobre as células. Esse modelo, além de alcançar maiores vazões, é mais comum de ser encontrado em laboratórios de universidades e empresas do que o modelo 505L, o que facilitaria a utilização do HC em processos em perfusão.

A comparação de ambos os cabeçotes foi inicialmente feita com células CHO DP-12 a uma concentração de $8,0 \times 10^6$ cels/mL. Como se observa na Tabela 5-1, valores similares de vazão de alimentação (Q_f) foram obtidos para ambos os cabeçotes, assim como os valores de razão de fluido (R_f). No entanto, maiores velocidades rotacionais foram aplicadas no cabeçote de baixa pulsação para se obter uma mesma queda de pressão em comparação ao cabeçote de alta pulsação. Em termos de viabilidade celular, reportada por meio de ΔV_u (viabilidade média das células da alimentação menos a viabilidade média das células recuperadas pelo *underflow*), ambos os cabeçotes tiveram desempenho semelhante, sendo que ΔV_u aumentou à medida em que ΔP aumentou. As eficiências de separação E_T e E' também aumentaram ao incrementar ΔP de 0,5 para 1,0 bar, e para ambos os tipos de cabeçote. Elsayed et al. (2012) também não observaram diferenças na eficiência de separação de células viáveis comparando ambos os modelos de cabeçote para quedas de pressões entre 0,25 e 1 bar em um HC2010. Foi determinado que a concentração de células recuperadas no *underflow* aumentou em 1,3 vezes em relação à concentração da alimentação, o que também foi reportado para células BHK e HEK separadas em um HC2520 (ELSAIED et al., 2006).

Tabela 5-1. Comparação entre os cabeçotes de alta e baixa pulsação instalados na bomba peristáltica de alimentação do HC2015 para separação de células CHO DP-12. ΔV_u corresponde à diferença entre as viabilidades celulares medidas na alimentação e no *underflow*. As letras f, u e o subscritas referem-se respectivamente a “feed”, “underflow” e “overflow”. Ensaios realizados sem replicata experimental.

Cabeçote	ΔP (bar)	Velocidade (rpm)	Q_f (L/min)	Q_o (L/min)	R_f (%)	X_f ($\times 10^6$ cels/mL)	X_u ($\times 10^6$ cels/mL)	X_o ($\times 10^6$ cels/mL)	E_T (%)	E' (%)	ΔV_u (%)
Baixa pulsação (505L)	0,5	135	1,17	0,27	76,5	8,68	10,11	3,54	90,6	59,2	0,06
	1,0	162	1,40	0,32	76,9	8,53	10,73	1,65	95,6	80,6	0,71
	1,5	200	1,57	0,35	77,8	8,29	10,72	1,93	95,1	76,8	1,10
Alta pulsação (520R2)	0,5	100	1,18	0,28	76,0	7,41	10,01	3,67	89,6	50,5	-0,25
	1,0	141	1,45	0,34	76,4	7,69	9,67	2,07	93,8	73,1	0,15
	1,5	185	1,61	0,38	76,7	7,27	9,83	1,84	94,6	74,7	1,05

Devido a uma limitação do volume de suspensão de células disponível para esse ensaio, não foi possível realizar replicatas experimentais. Portanto, para prosseguir com a comparação entre os cabeçotes, *beads* de agarose (Superose 6) em concentrações variando entre 30×10^6 e 150×10^6 /mL foram empregadas. Essa faixa de concentração foi

selecionada para abranger processos em perfusão normalmente reportados na literatura. Novamente, assim como o ensaio com células, maiores velocidades rotacionais foram demandadas pelo cabeçote de baixa pulsação para atingir as mesmas quedas de pressão no hidrociclone. Velocidades de 130, 170 e 200 rpm foram aplicadas no cabeçote 505L para atingir 0,5, 1,0 e 1,5 bar respectivamente, ao passo que rotações menores (110, 130 e 150 rpm) foram respectivamente aplicadas com o cabeçote 520R2. De um modo geral, não foram observadas diferenças significativas com relação à eficiência total (E_T) para ambos os cabeçotes (Figura 5-1). A razão de fluido R_f foi, em média, de 76% para ambos os cabeçotes. No entanto, os valores de Q_f obtidos com o cabeçote 520R2 e ΔP de 0,5 bar foram significativamente maiores (até 12%) em relação ao cabeçote 505L (Figura 5-1A).

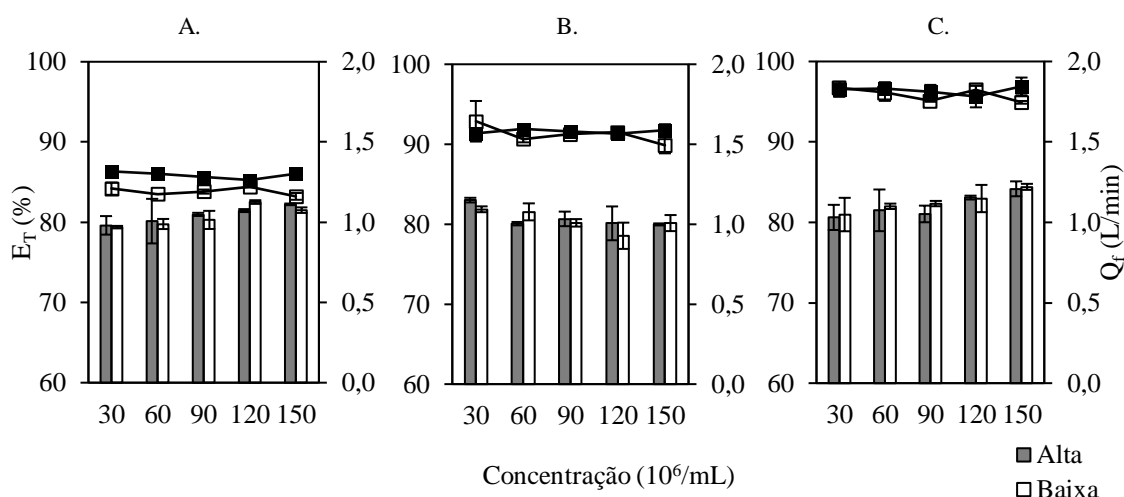


Figura 5-1. Eficiência total (barras) e vazão de alimentação (símbolos) medidos a A) 0,5 bar; B) 1,0 bar; C) 1,5 bar usando cabeçotes de alta (fechados) e baixa (abertos) pulsação instalados na bomba peristáltica de alimentação do HC2015, empregando suspensões de beads cromatográficas com concentração entre 30×10^6 e $150 \times 10^6/mL$. Ensaio realizado em duplicata experimental. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão.

Em estudo semelhante separando células CHO com um HC2010, Elsayed et al. (2012) também determinaram vazões de 10 a 15% maiores para o cabeçote de alta pulsação (520R2) para uma faixa de operação entre 0,25 e 1 bar, porém sem diferenças na eficiência de separação. No entanto, as eficiências de separação das *beads* foram significativamente inferiores em relação aos testes com CHO DP-12, visto que o diâmetro médio das *beads* ($12,6 \pm 0,3 \mu m$) avaliado no contador automático foi menor em relação ao das células ($13,5 \pm 0,1 \mu m$). Considerando que as *beads* e as células possuem densidade ρ_s próxima à da água, e que os testes foram conduzidos em uma mesma temperatura, a dificuldade em se separar as *beads* da fase aquosa estaria diretamente relacionada a uma menor velocidade terminal de sedimentação (v_t) dessas partículas. Essa relação pode ser

observada, por exemplo, na Equação 13, em que v_t em regime laminar é diretamente proporcional ao quadrado do diâmetro d da partícula (CASTILHO; MEDRONHO, 2002):

$$v_t = \frac{(\rho_s - \rho)bd^2}{18\mu} \quad (13)$$

onde b é a intensidade do campo gravitacional ou centrífugo. Essa equação é válida para a sedimentação de uma única partícula, ou seja, em sistemas diluídos. A velocidade de sedimentação diminuiu à medida que a concentração de partículas aumenta (CASTILHO; MEDRONHO, 2002), um fenômeno que não deve ser desprezado em cultivos em perfusão. No entanto, no caso das *beads*, não foi possível correlacionar o aumento da concentração na alimentação com uma menor eficiência de separação para ambos os tipos de cabeçote, como se observa na Figura 5-2.

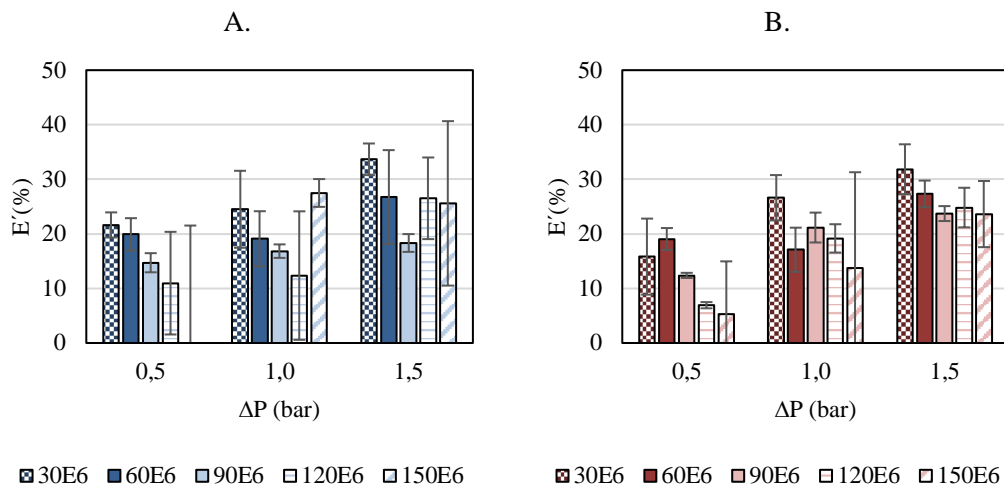


Figura 5-2. Eficiências reduzidas (E') obtidas na separação de beads com HC2015 utilizando os cabeçotes de alta (A) e baixa (B) pulsação. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$.

Portanto, concluiu-se que o tipo de cabeçote utilizado na bomba peristáltica de alimentação do hidrociclone não exerceu efeitos sobre a eficiência de separação. Foi decidido prosseguir com os testes de separação em batelada utilizando apenas o cabeçote de alta pulsação (520R2), levando em consideração:

- a) a baixa queda de viabilidade das células recuperada no *underflow*, igual ou inferior ao observado com o cabeçote de baixa pulsação;
- b) o potencial de se aplicar elevadas ΔP empregando menores velocidades de rotação, reduzindo o estresse mecânico produzidos pelos rolamentos do cabeçote sobre as células;

- c) a limitação de ΔP oferecido pela bomba de menor pulsação, conforme comentado anteriormente;
- d) o fato desse tipo de cabeçote ser mais comum de se encontrar em laboratórios e indústrias do ramo, e que apresenta maior flexibilidade operacional em detrimento ao cabeçote de menor pulsação, o que eliminaria a necessidade de se adquirir um cabeçote 505L exclusivo para uso com o HC.

É importante mencionar que, para a faixa de concentrações avaliada nesse modelo de hidrociclone, a descarga do *underflow* assumiu uma típica conformação de guarda-chuva ou *spray* concomitante à saída de bolhas pelo *overflow*. Essas duas características estão intrinsicamente relacionadas ao estabelecimento do campo centrífugo dentro do hidrociclone, conforme esquema apresentado na Figura 3-7. A ausência de uma ou ambas dessas características poderiam indicar uma perturbação na formação dos vórtices primário e secundário, resultando em menores eficiências de separação, como será discutido em experimentos posteriores.

5.1.2 Separação de células a $\Delta P > 2$ bar

Uma suspensão de células CHO_mAb#2 a $5,0 \times 10^6$ cels/mL foi submetida à separação com o HC2015 operado com quedas de pressão entre 1 e 3 bar. Com a rotação máxima de 220 rpm no cabeçote 520R2, foi obtido o valor de ΔP de 2,9 bar usando tubo Marprene de 9,6 mm DI. À medida que ΔP aumentou, E' aumentou significativamente, de 71% (1,2 bar) a 85% (2,9 bar), conforme mostrado na Tabela 5-2.

Tabela 5-2. Eficiência de separação de células CHO_mAb#2 com HC2015 operado com quedas de pressão de até 3 bar. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$.

ΔP (bar)	Velocidade (rpm)	Q_f (L/min)	Q_o (L/min)	R_f (%)	X_f ($\times 10^6$ cels/mL)	X_u ($\times 10^6$ cels/mL)	X_o ($\times 10^6$ cels/mL)	E_T (%)	$E'(\%)$	ΔV_U (%)
1,2	83	1,47 \pm 0,04	0,33 \pm 0,04	78,0 \pm 2,2	5,08	6,22 \pm 0,31	1,49 \pm 0,40	93,8 \pm 0,6	71,5 \pm 5,4	-0,20 \pm 0,29
1,7	100	1,83 \pm 0,06	0,40 \pm 0,01	78,1 \pm 0,3	4,80	5,44 \pm 0,23	0,97 \pm 0,17	95,3 \pm 0,9	78,3 \pm 4,4	-0,46 \pm 0,19
2,1	120	1,95 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	78,0 \pm 0,2	4,32	5,34 \pm 0,29	0,87 \pm 0,09	95,6 \pm 0,7	79,9 \pm 3,0	0,30 \pm 0,23
2,4	140	2,06 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01	77,7 \pm 0,6	4,53	5,57 \pm 0,32	0,89 \pm 0,07	95,6 \pm 0,1	80,3 \pm 0,2	0,57 \pm 0,01
2,7	170	2,21 \pm 0,05	0,49 \pm 0,00	77,8 \pm 0,4	4,24	4,92 \pm 0,35	0,62 \pm 0,11	96,5 \pm 0,7	84,3 \pm 3,6	2,39 \pm 0,69
2,9	220	2,30 \pm 0,03	0,51 \pm 0,01	77,9 \pm 0,1	3,89	4,47 \pm 0,13	0,54 \pm 0,01	96,7 \pm 0,1	85,0 \pm 0,3	3,39 \pm 0,11

Em termos de eficiência total E_T , o incremento foi menor para o mesmo intervalo de ΔP (de 94 para 97%), já que R_f permaneceu constante em aproximadamente 77%. De acordo com Deckwer et al. (2005), a máxima queda de pressão para separação de células com esse tipo de hidrociclone é de 4 bar, sendo recomendado aplicar 2 bar. Um dos motivos seria justamente uma significativa queda da viabilidade das células recuperadas pelo *underflow* e, portanto, as que seriam retidas no biorreator. As maiores reduções na viabilidade foram determinadas para 2,7 e 2,9 bar (Tabela 5-2). A queda de viabilidade no *underflow* foi consideravelmente menor do que o valor obtido por Pinto et al. (2008) para um HC2020 operado a 3 bar, de 14%. Já Luebberstedt et al. (2000) não determinaram uma perda significativa de viabilidade para células HeLa recuperadas pelo *underflow* de um hidrociclone comercial Dorr-Oliver. Apesar do considerável aumento da eficiência e uma perda relativamente pequena da viabilidade celular, os efeitos deletérios de quedas de pressão superiores a 2,5 bar poderiam prejudicar uma perfusão a longo prazo, especialmente no caso de o hidrociclone ser operado continuamente, condição que poderia ser aplicada em biorreatores de escala industrial (> 300 L, por exemplo).

5.1.3 Controle da vazão de overflow usando uma bomba peristáltica

Uma segunda bomba 520U/520R2 usada para controlar Q_o foi calibrada com uma mangueira de Marprene de 3,2 mm DI, sem o hidrociclone acoplado. A curva de calibração obtida é apresentada na Figura 5-3, em que as velocidades de rotação de bomba foram correlacionadas com as vazões obtidas com água em temperatura ambiente. As velocidades de 17 e 35 rpm foram obtidas respectivamente para as vazões de 0,035 e 0,070 L/min, as quais equivalem a 50 e 100 L/d. Essas vazões foram selecionadas porque elas equivalem respectivamente a taxas de perfusão de 1 e 2 vvd para um biorreator de 50 L, o qual seria utilizado posteriormente em corridas em perfusão.

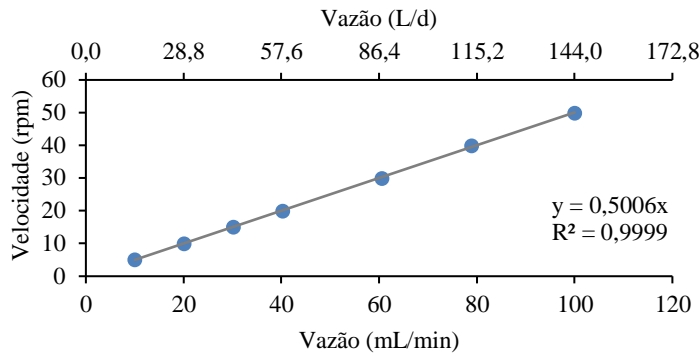


Figura 5-3. Curva de calibração para velocidade da bomba peristáltica 520U/520R2 e mangueira Marprene 3,2 x 2,4 mm.

O conjunto incluindo a bomba e a mangueira calibrada foi então instalado na linha do *overflow* do HC2015 montado no sistema de teste. Para todos os valores de ΔP aplicados, as vazões de *overflow* obtidas com a bomba foram ligeiramente superiores às vazões determinadas na calibração (0,040 e 0,077 L/min). Já as vazões de alimentação foram similares àquelas obtidas na condição controle (i.e., com a linha de *overflow* irrestrita, sem controle de Q_o). Contudo, um significativo aumento de R_f de 76% para 98% foi observado para ambas as vazões de *overflow* controladas (Figura 5-4), uma consequência da restrição de Q_o . Com a redução de Q_o , a maior parte da alimentação foi direcionada à saída do *underflow* e, conseqüentemente, aumentou a razão de fluido. Ressalta-se que altos valores de R_f seriam desejáveis para a aplicação do HC em biorreatores menores, já que maiores E_T poderiam ser obtidas a baixas vazões de perfundido, e desde que um alto valor de E' fosse mantido para garantir uma clarificação do perfundido. No entanto, a restrição de Q_o reduziu significativamente os valores de E' para todos os ΔP para ambas as suspensões de *beads* utilizadas, como mostrado na Figura 5-4. Apesar do aumento de E_T para valores muito próximos a 100%, em especial a 0,035 L/min (Figura 5-4 A, C), a concentração de *beads* no *overflow* foi igual à medida na alimentação. Portanto, a eficiência reduzida foi desprezível. A restrição de vazão provocada pela bomba auxiliar provavelmente alterou o padrão de correntes dentro do hidrociclone, dificultando o estabelecimento do campo centrífugo. A ausência de bolhas observada no *overflow* foi outra evidência de que o padrão de escoamento dentro do hidrociclone foi alterado, afetando a capacidade de separação do equipamento.

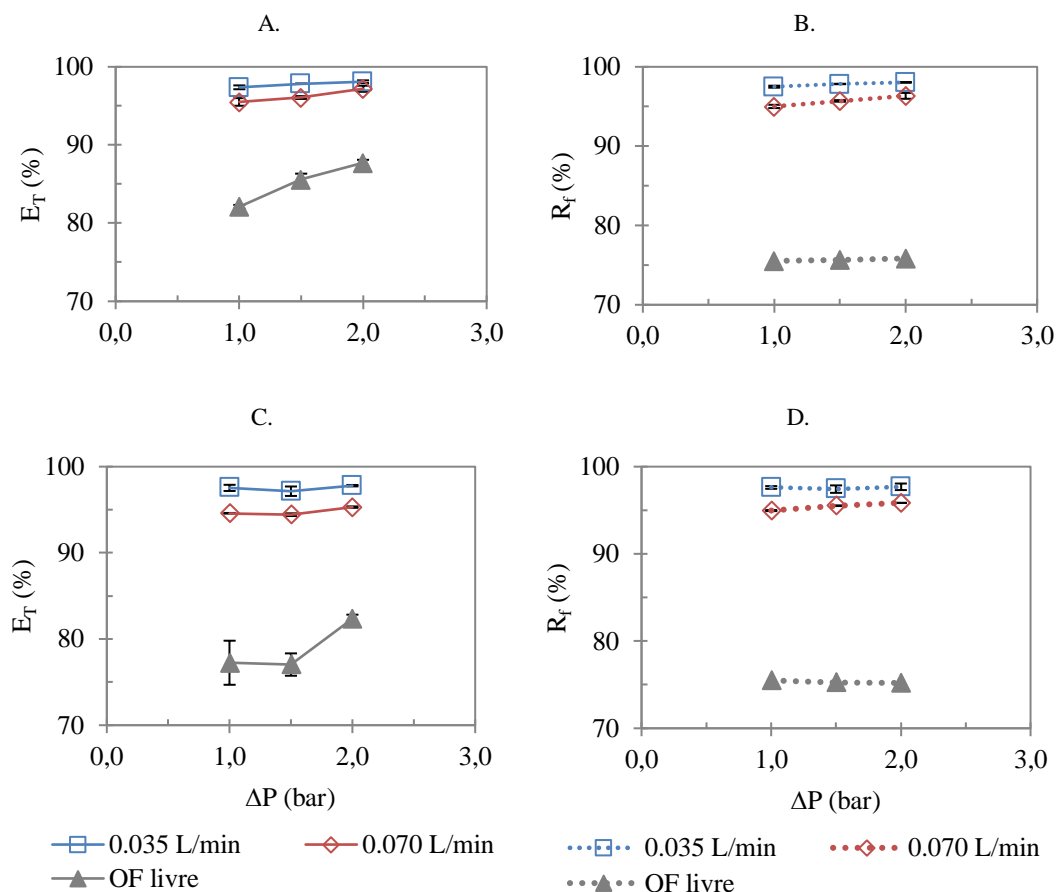


Figura 5-4. Eficiência total (E_T) e razão de fluido (R_f) obtidos para vazões de overflow controladas por bomba peristáltica a 0,035 e 0,070 L/min, utilizando suspensões de beads a 5×10^6 (A, B) e 50×10^6 beads/mL (C, D). Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$.

O emprego de uma bomba na linha do *overflow* também foi avaliado por Elsayed et al. (2012) em um HC2010 a uma vazão de *overflow* de 0,05 L/min. Um aumento em E_T também foi observado, porém esses autores não mencionaram os efeitos sobre a eficiência reduzida.

Portanto, a operação do hidrociclone com Q_o controlada a um valor menor ao obtido com o *overflow* livre não poderia ser adequada em um biorreator, visto que a separação de células foi obtida unicamente pela distribuição de correntes entre o *overflow* e *underflow* (efeito de um divisor de correntes). Assim, o HC2015 foi empregado sem a restrição no *overflow* tanto nos testes de separação subsequentes quanto nas corridas em perfusão. Neste último caso, o hidrociclone foi operado de forma intermitente.

5.1.4 Efeito do diâmetro na linha de reciclo de células (saída do *underflow*)

Duas opções de diâmetro interno de mangueira de silicone instaladas à saída do *underflow* foram comparadas: 9,5 mm (preso à saída do *underflow*), e 25,4 mm (preso ao

corpo do hidrociclone). Ambos os tamanhos foram selecionados devido ao diâmetro semelhante da conexão de saída do *underflow* (3/8") e do corpo cilíndrico externo do hidrociclone (30 mm), respectivamente. O tubo com maior diâmetro preservaria a descarga do *underflow* em formato de guarda-chuva, ao passo que o tubo menor seria a opção mais fácil para instalar o HC na bolsa descartável do biorreator utilizando as conexões de 3/8". Contudo, essa restrição poderia afetar o padrão de descarga do *underflow* e, portanto, alterar o padrão de escoamento de fluido dentro do HC e consequentemente a eficiência de separação.

Foram aplicadas suspensões de *beads* a 5×10^6 e 50×10^6 *beads*/mL com quedas de pressão de entre 1 e 2 bar. Em comparação à condição-controle (i.e., *underflow* livre), as rotações requeridas na bomba de alimentação para atingir cada ΔP foram as mesmas. No entanto, na presença do tubo menor, os valores de E' obtidos no hidrociclone foram significativamente menores em relação ao tubo maior e à condição-controle (Figura 5-5). Ainda, conforme esperado, a descarga do *underflow* não assumiu a forma de guarda-chuva, já que o pequeno diâmetro restringiu o rápido escoamento do fluido. Não foram observadas bolhas de ar saindo pelo *overflow* na presença do tubo de 9,5 mm, ao passo que o tubo de maior diâmetro apresentou características de escoamento (i.e., bolhas no *overflow* e descarga em guarda-chuva) e desempenho semelhantes à condição-controle. Da mesma forma que o experimento com a Q_0 controlada, foi observado um aumento em E_T para 94% com o tubo menor, mas obtido com o aumento de R_f de 77% para 85% (5×10^6 *beads*/mL) e 82% (50×10^6 *beads* /mL). Para o tubo maior, foi determinado um R_f de 76%, além de valores de E' ligeiramente maiores em relação à condição-controle a 5×10^6 /mL.

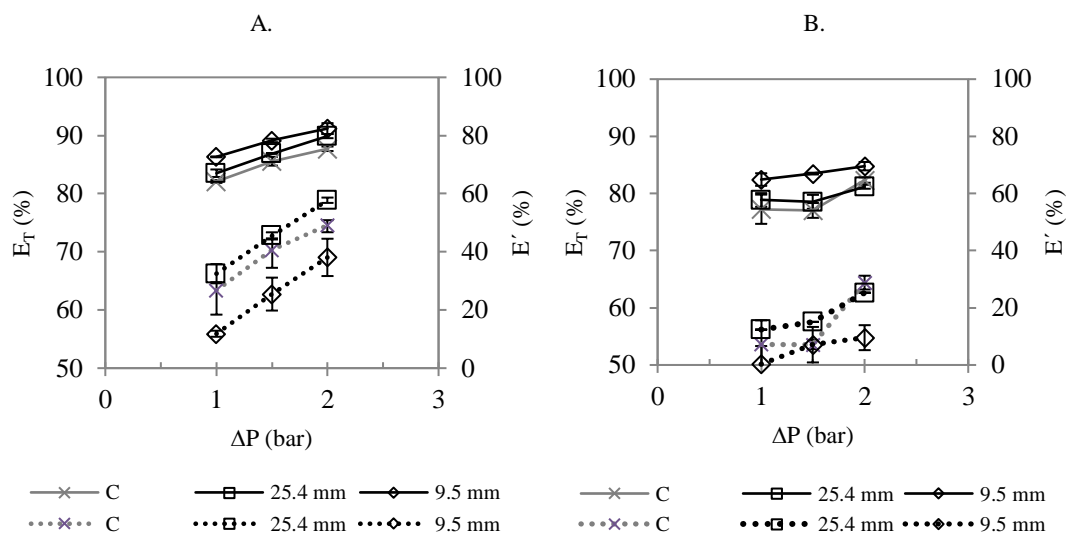


Figura 5-5. Efeito do diâmetro de tubo preso ao underflow (9,5 vs 25,4 mm DI) na eficiência de separação total E_T (linha contínua) e reduzida E' (linha pontilhada) de beads a A) 5×10^6 e B) 50×10^6 /mL. A condição "C" refere-se ao underflow livre. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, com $n = 2$.

Uma vez que a instalação de uma mangueira com diâmetro de 25,4 mm não afetou negativamente a eficiência de separação, o passo seguinte consistiu em aplicar esse mesmo diâmetro de tubo na construção da linha de reciclo de células com conectores rápidos de diferentes diâmetros, de forma a permitir a conexão do HC ao biorreator de bolsa descartável. Nesses testes, foi utilizada a suspensão de células CHO produzida na corrida HC-1 (item 5.2.1). No último dia dessa corrida, o HC foi removido, e as duas opções de linha de reciclo com conectores ReadyMate™ foram montadas, conforme descrito no item 4.2.3. Foram aplicadas ΔP entre 1 e 3 bar, e coletadas amostras da suspensão de alimentação, *underflow* e *overflow*. À medida que os testes foram realizados, e o conteúdo do *underflow* era reciclado ao biorreator, a concentração de células na alimentação aumentou de 15×10^6 para 24×10^6 cels/mL. Na presença do menor redutor (12,7 mm DI), ao aumentar ΔP de 1,3 para 2,1 bar, foi observado o preenchimento da linha de reciclo com líquido, suprimindo a descarga em guarda-chuva do *underflow*. Com isso, foi observada uma queda significativa na E' de 76 para 61%, como mostra a Tabela 5-3. Já na presença do redutor maior (19,7 mm DI), esse fenômeno não foi observado, mesmo para um ΔP tão alto quanto 2,8 bar. Conforme esperado, E' aumentou para aproximadamente 80% com o aumento de ΔP de 1,3 para 2,2 bar (Tabela 5-3), e permaneceu quase constante para ΔP de aproximadamente 3 bar. Com isso, foi alcançada uma eficiência total de aproximadamente 96% utilizando uma suspensão a 24×10^6 cels/mL. Pela primeira vez, foi reportado esse resultado com uma suspensão

celular com concentração superior a $9,8 \times 10^6$ cels/mL (ELSAYED, 2005), e aplicando uma queda de pressão tão alta quanto 3 bar.

Tabela 5-3. Efeito do diâmetro dos conectores da linha de reciclo sobre a separação e viabilidade de células CHO. Dados obtidos em duplicata técnica, exceto para 19,7 mm/ 2,8 bar ($n = 1$), e apresentados como média \pm desvio-padrão.

Mínimo DI (mm)	12,7		19,7		
ΔP (bar)	1,3	2,1	1,3	2,2	2,8
X_f (10^6 cels/mL)	15,35 \pm 2,74	17,09 \pm 0,22	18,99 \pm 1,79	22,06 \pm 1,24	23,77
X_o (10^6 cels/mL)	4,21 \pm 0,03	6,41 \pm 0,01	5,47 \pm 0,38	4,51 \pm 0,01	4,36
E_T (%)	94,1 \pm 0,02	90,8 \pm 0,1	93,0 \pm 0,6	95,3 \pm 0,1	95,8
E' (%)	76,3 \pm 0,8	60,6 \pm 0,3	71,5 \pm 2,7	79,9 \pm 0,5	81,7
R_f (%)	74,9 \pm 0,8	76,6 \pm 0,1	75,5 \pm 0,2	76,5 \pm 0,2	77,0
ΔV_u (%)	-0,50 \pm 1,02	0,16 \pm 0,04	0,12 \pm 0,27	-0,26 \pm 0,60	0,23

A partir desses resultados, foi planejada a customização das bolsas descartáveis a serem utilizadas a partir da corrida HC-2, utilizando conectores ReadyMate™ e tubos que mantivessem uma restrição máxima de diâmetro em torno de 19,7 mm. Dentre as opções disponíveis comercialmente, um conector ReadyMate™ ligado a um conector com diâmetro de 1 ½” foi soldado às bolsas customizadas, enquanto que a extremidade proveniente do *underflow* consistiu em um tubo de 25,4 mm preso ao corpo do hidrociclone, e acoplado a um segundo ReadyMate™ (Standard TC, # 28-9568-89), conforme mostrado na Figura 5-6.



Figura 5-6. Proposta final para a linha de reciclo do underflow para o biorreator descartável, por meio de uma conexão com ReadyMate™ com diâmetro interno de 19,7 mm acoplado a uma mangueira de silicone com 25,4 mm de diâmetro. Nesse experimento, o conteúdo do underflow foi coletado em uma garrafa Schott de 10 L.

5.2 Uso do hidrociclone em corridas em perfusão

O mesmo hidrociclone HC2015 utilizado nos testes de separação em batelada foi acoplado a um biorreator com bolsas descartáveis, de modo a caracterizar a sua operação e o impacto sobre a eficiência de separação. Para cada corrida, distintas formas de se conectar o HC ao biorreator foram avaliadas. Ressalta-se que, apesar de todo o aparato ser descartável (*single-use*), apenas o hidrociclone era de aço inoxidável, sendo, portanto, reutilizado.

5.2.1 Corrida HC-1: recuperação da viabilidade celular de um cultivo em fase final de batelada alimentada

Na corrida HC-1, a conexão do HC em uma bolsa de 50 L não customizada foi testada ao final de uma cultura em batelada alimentada, aproveitando-se a bolsa com células e utilizando as portas disponíveis da bolsa para conectar as linhas de alimentação e de reciclo celular.

No 13º dia da batelada alimentada, cerca de 40 dos 50 L de cultura foram removidos, e as células (CHO_mAb#1) foram diluídas para um volume final de 40 L com 30 L de meio fresco ActiPro. Nesse instante (dia 0 do processo com HC), a concentração e viabilidade iniciais medidas foram respectivamente de $2,1 \times 10^6$ cels/mL e 69,7%. O sistema foi operado em batelada simples até o dia 3, com concentração e viabilidade estáveis ($3,0 \times 10^6$ cels/mL e 66,0%). Nesse ínterim, o HC foi assepticamente conectado à bolsa e posicionado acima do biorreator. Com a junção das extremidades do *underflow* e da bolsa via conector ReadyMate™, o comprimento total obtido na linha de reciclo foi de aproximadamente 2 metros. Além disso, devido ao fato de se utilizar uma bolsa não customizada para a instalação do HC, foi necessário utilizar um redutor de diâmetro interno de 3/8” nessa linha, conforme destacado na Figura 5-7 B.

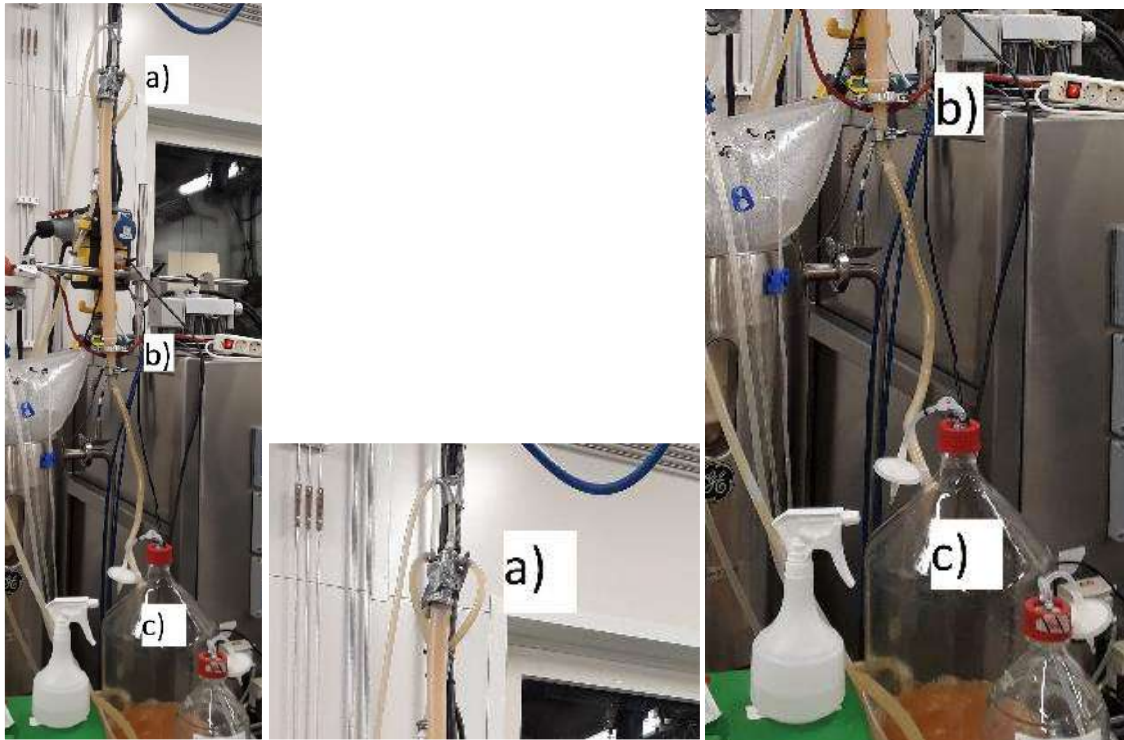


Figura 5-7. Perfusão HC-1 com hidrociclone HC2015. A) hidrociclone posicionado acima do biorreator; B) redução do diâmetro interno da linha de reciclo para 3/8". C) frasco Schott instalado na linha de reciclo a partir do dia 14, numa tentativa de aumentar o escoamento do *underflow* para o biorreator e eliminar o afogamento do orifício do *underflow*.

O hidrociclone foi operado uma vez ao dia, de forma a se remover pelo *overflow* um volume equivalente a 0,25 vvd no dia 3, e 0,5 vvd e 1 vvd nos demais dias. Aplicando um ΔP entre 1-1,3 bar, o tempo de operação do HC requerido foi de aproximadamente 1 h 40 min. A longa extensão e o pequeno diâmetro da linha de reciclo não foram suficientes para permitir o rápido escoamento da suspensão do *underflow* liberada a uma elevada vazão e, portanto, após alguns minutos de operação do HC, a linha de reciclo ficou cheia de líquido, eliminando a descarga em guarda-chuva do *underflow*. Imediatamente, as bolhas de ar que saíam pelo *overflow* também foram suprimidas. O HC foi operado nessa configuração até o dia 14, resultando em uma eficiência reduzida média de $68,6 \pm 6,8\%$ (Figura 5-8D). A partir do dia 14, numa tentativa para aumentar o escoamento do *underflow*, foi instalada uma garrafa Schott de 10 L com portas duplas (uma para conectar a saída do *underflow*, e outra para retornar a suspensão concentrada para o biorreator), conforme mostrado na Figura 5-7C. No entanto, essa configuração não funcionou, possivelmente devido ao pequeno diâmetro das portas da garrafa Schott. Assim, o líquido continuou a se acumular na linha de reciclo. Além disso, uma segunda bomba foi necessária para transferir o conteúdo coletado na garrafa para o biorreator, já que não ocorreu o escoamento por diferença de altura (i.e., posicionando a garrafa acima

do biorreator). Uma tentativa de se aplicar vácuo dentro da garrafa aspirando ar pelo filtro instalado na tampa também não resultou em um escoamento mais rápido do líquido acumulado próximo ao orifício do *underflow*. Dos dias 14 a 18 (último dia da corrida), o valor médio de E' obtido com essa nova configuração do reciclo foi de $70,5 \pm 4,9\%$. A perda de células viáveis pelo perfundido (*overflow*) foi de, no máximo, $5,0 \times 10^6$ cels/mL para uma concentração no biorreator próxima de 14×10^6 cels/mL (Figura 5-8 A). Em outros trabalhos (ELSAYED, 2005; JOCKWER, 2001), o acoplamento do hidrociclone ao biorreator foi realizado de forma indireta, instalando o HC diretamente na tampa de um frasco Schott (sem conexão com manguueiras), e não diretamente no reator. Essa ligação intermediária provavelmente foi feita para preservar a descarga do *underflow* em guarda-chuva e garantir a máxima eficiência de separação.

Apesar da operação não-ideal do HC, a viabilidade das células aumentou para 90% em oito dias, atingindo um valor máximo 96,4% e uma X_v máxima de 14×10^6 cels/mL entre os dias 13-14 de cultivo. O hidrociclone auxiliou na remoção de células não-viáveis do biorreator, visto que a viabilidade e diâmetro médios no *overflow* foram menores em relação ao biorreator (Figura 5-8 B, C). Outro benefício promovido pela perfusão com o HC foi a redução dos níveis de lactato e amônio (Figura 5-8 E, F) em comparação à fase operada em batelada. A partir do dia 10, o meio de alimentação foi suplementado com 12 g/L de glicose e 3 mM de glutamina, a fim de aumentar a concentração celular mantendo a taxa de perfusão de 0,5 vvd. O aumento em X_v foi discreto, de 11×10^6 para o máximo de 14×10^6 cels/mL. No entanto, em termos de μ , houve uma redução importante, de 0,6 para $0,2 \text{ d}^{-1}$ nesse período (dados não mostrados). A glicose não foi limitada, visto que as concentrações medidas antes dos ciclos com o HC variaram entre 1,4 e 3,0 g/L no intervalo dos dias 10 a 20. A menor CSPR aplicada foi de aproximadamente 35 pL/cel/d entre os dias 13 e 14. No entanto, verificou-se que a glutamina foi exaurida entre os dias 6-14, o que poderia estar relacionado ao crescimento limitado das células.

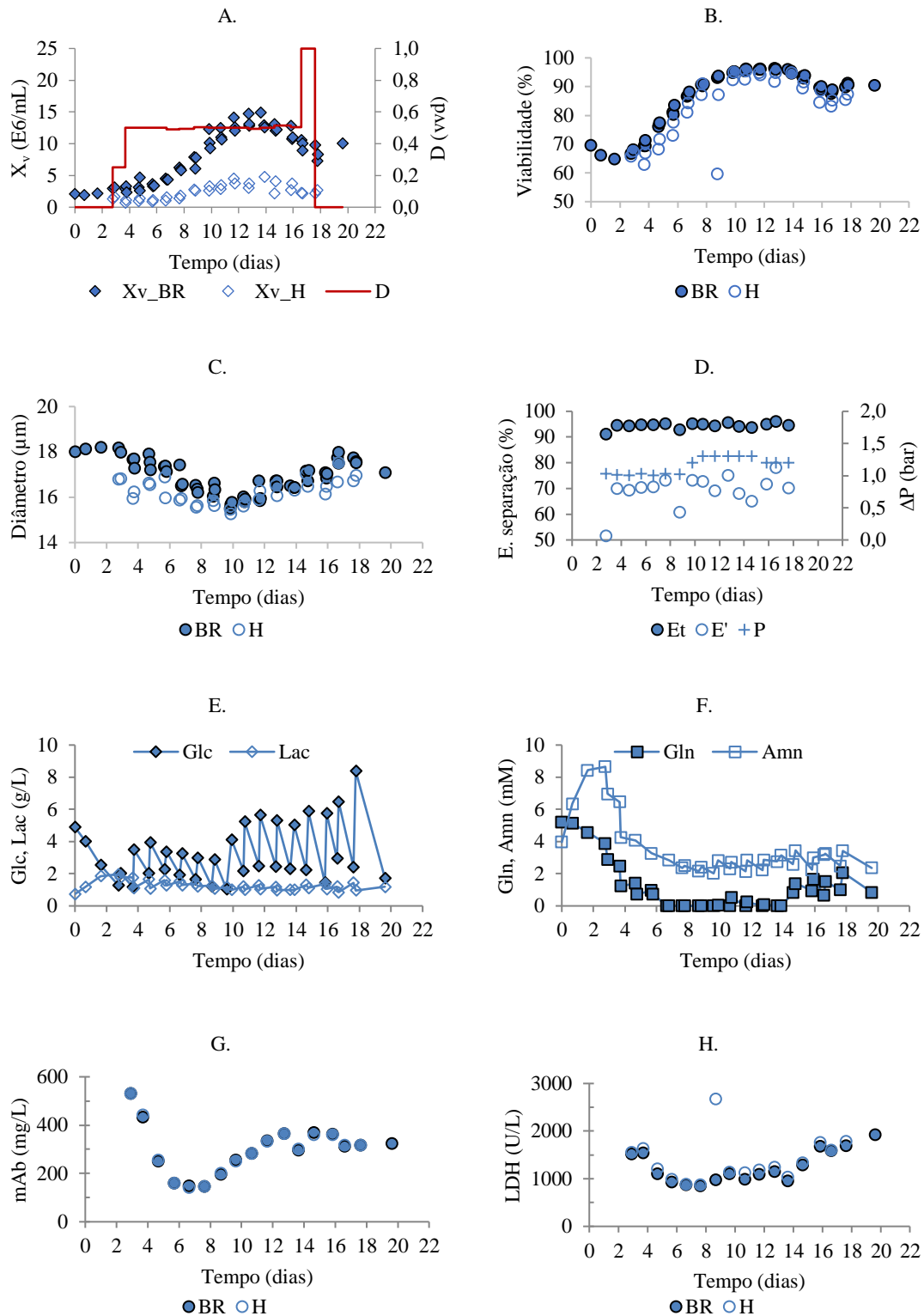


Figura 5-8. Perfusão HC-1 com o HC2015 com linhagem CHO_mAb#1, iniciada a partir de uma batelada alimentada com viabilidade a 70%. A) X_v e taxa de perfusão; B) Viabilidade medida no biorreator (BR) e no perfundido (H); C) diâmetro médio das células; D) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 1,3 bar; E) glicose e lactato no biorreator (medidas antes e após cada ciclo de perfusão-reabastecimento com meio fresco); F) glutamina e amônio no biorreator; G) concentração de mAb; H) atividade de LDH extracelular.

O perfil de mAb acompanhou o de concentração celular, atingindo um valor máximo de 370 mg/L no dia 15 (Figura 5-8G). Uma concentração de mAb superior a 500 mg/L foi medida no dia 3 antes de iniciar a perfusão, possivelmente um resultado da diluição da alta concentração obtida na batelada alimentada que antecedeu o ensaio. Conforme esperado, o hidrociclone não provocou a retenção de produto dentro do biorreator, uma vez que as concentrações medidas no *overflow* foram iguais às do biorreator.

A medição dos níveis de LDH é uma maneira de avaliar a concentração de células lisadas, já que metodologia de contagem com azul de tripan identifica as células mortas que não foram lisadas (WANG et al., 2017). O monitoramento da atividade de LDH extracelular na corrida HC-1 indicou um perfil correlacionado à concentração de células ao longo de todo o processo (Figura 5-8H), o que sugere que a aplicação do hidrociclone não contribuiu significativamente para a ocorrência de lise celular. Valores mais altos, próximos a 1500 U/L, foram determinados no início da corrida, possivelmente decorrentes da alta concentração de células não-viáveis e lisadas provenientes da batelada alimentada. Entretanto, à medida que o sistema foi diluído pela troca de meio, os níveis de LDH caíram para aproximadamente 880 U/L, e depois aumentaram gradativamente conforme a concentração de células aumentou no biorreator. Ainda, a atividade de LDH medida no perfundido foi maior em comparação ao biorreator, em consonância com a menor viabilidade celular avaliada nas amostras do *overflow*. A atividade de LDH medida no perfundido foi, em média, 6% superior em comparação à do biorreator, atingindo 14% no dia 11 de cultivo. Uma discrepância similar (de até 10%) também foi reportada na separação de células CHO com um HC2520 operado a 0,85 bar (ELSAYED, 2005). Segundo o autor, as células liberadas pelo *overflow* são submetidas a maiores tensões de cisalhamento ao se deslocarem do vórtice primário (descendente) para o vórtice secundário interno (ascendente, em direção ao *overflow*). Ainda, a separação promovida pelo hidrociclone poderia favorecer à desagregação de grumos celulares, em que as células mortas aprisionadas seriam liberadas ao meio extracelular, assim como a LDH (PINTO; MEDRONHO; CASTILHO, 2008). No dia 9, observou-se que a viabilidade no *overflow* foi bastante baixa em relação à média dos demais dias (60%), ao passo que o nível de LDH medido foi muito elevado (~2700 U/L, ou um aumento de 173% em relação à atividade medida no biorreator). O motivo para esse pico é desconhecido, visto que as condições de operação do hidrociclone não foram modificadas nesse dia.

Nessa corrida, não estavam disponíveis um medidor de vazão para a linha de alimentação do HC, nem uma balança para monitorar a vazão de *overflow*. Medindo Q_f e Q_o , seria possível determinar a eficiência de separação total conforme a Equação 5. O valor de E_T nessa corrida foi calculado baseando-se nas concentrações celulares medidas no biorreator e no *overflow* (usadas para estimar E'), e assumindo um R_f de 82%. Esse valor de R_f , maior do que o valor determinado para essa geometria (76%), foi determinado posteriormente em um teste em batelada que simulou o afogamento do *underflow*. Para esse teste, foi instalada na saída do *underflow* uma tubulação com o mesmo redutor utilizado na linha de reciclo de células conectada ao biorreator, mas com comprimento menor do que 2 m (por motivos práticos durante a experimentação). Com base nessas considerações, eficiências de separação total de aproximadamente 94% foram determinadas. Considerando um R_f mais alto, os valores de E_T e E' foram próximos aos obtidos no ensaio em batelada com esse hidrociclone para um ΔP de 1,2 bar (Tabela 5-2), mesmo com a supressão da descarga de células em guarda-chuva pelo *underflow* e com a ausência de bolhas saindo pelo *overflow*.

5.2.2 Corrida HC-2: aplicação do HC em uma bolsa descartável customizada com pequeno diâmetro na linha de alimentação

A corrida seguinte foi realizada em uma bolsa descartável de 50 L produzida de forma customizada para a instalação do hidrociclone, de modo a evitar o afogamento do orifício do *underflow*, conforme mencionado no item 5.1.4. Foi adicionado um conector ReadyMate™ extra no topo da bolsa, com diâmetro interno de 19,7 mm, que foi conectado a outro ReadyMate™ instalado no *underflow* do HC, como mostra a Figura 5-9.



Figura 5-9. Proposta para a conexão entre o underflow e o biorreator utilizando conectores ReadyMate™ (esq.). HC2015 instalado; a posição vertical foi obtida dobrando-se cuidadosamente a bolsa (dir.).

Após a inoculação com células CHO_mAb#2, o biorreator foi operado em batelada durante os três primeiros dias. Ao ser instalado, e durante os primeiros dias de operação, o HC foi posicionado paralelamente (i.e., deitado) em relação ao topo da bolsa. Embora o posicionamento do HC não interfira na eficiência de separação (MEDRONHO, 1984), o HC foi cuidadosamente colocado na posição perpendicular amassando delicadamente a bolsa (Figura 5-9), para manter uma configuração próxima aos ensaios de batelada. Em ambas as posições, foi possível observar a forma de guarda-chuva assumida pela descarga do *underflow*.

O HC foi operado apenas uma vez ao dia durante os três primeiros dias da perfusão, promovendo trocas de meio entre 0,25 e 0,50 vvd (Figura 5-10 A). A partir do dia 6 (quarto dia de perfusão), a bomba de alimentação do HC foi acionada durante 15 min por meio de um temporizador analógico, e o número de ciclos ao longo de 24 horas foi definido de acordo com a taxa de perfusão desejada. Essa estratégia visou reduzir a grande perturbação causada pela remoção e adição de grandes volumes em um único momento do dia. O sistema empregado, embora baseado em um temporizador simples comprado no mercado local, mostrou-se robusto ao longo de toda a perfusão, exceto entre os dias 19-20, quando um ciclo não foi executado conforme a programação do temporizador, por motivos desconhecidos.

O meio de alimentação do biorreator foi modificado ao longo da corrida. Do dia 3 a 16, foi empregado apenas o meio basal ActiPro. A partir do dia 8, uma solução de glicose a 40% (m/v) foi adicionada a uma taxa de 150-200 mL/d, de modo a evitar a depleção de glicose. A máxima X_V obtida em ActiPro foi de 27×10^6 cels/mL no dia 9,

como mostra a Figura 5-10A. Entretanto, a concentração caiu para aproximadamente 20×10^6 cels/mL no dia 12, o que a princípio sugeriu limitação da glicose (Figura 5-10D). A queda em X_v permaneceu ao se dobrar a CSPR para aproximadamente 40 pL/cel/d (Figura 5-10D), em função da diluição. A partir do dia 17 até o fim da corrida, ActiPro fortificado com CB7a/b foi usado na alimentação, conforme estratégia descrita no item 4.3.2, com o objetivo de se aumentar a concentração celular a uma taxa de perfusão constante. A taxa de perfusão com o meio fortificado foi reduzida de 0,5 para 0,25 vvd, para evitar um eventual choque de osmolalidade sobre as células. Com a redução em D, a CSPR foi reduzida a um valor muito baixo (8 pL/cel/d), e observou-se uma redução de μ de 0,4 para $0,2 \text{ d}^{-1}$ (Figura 5-10H). Em contrapartida, a produtividade específica q_p aumentou, o que está de acordo com o resultado obtido por Reinhart et al. (2018) para essa formulação de meio. A concentração máxima de células obtida no biorreator foi de 37×10^6 cels/mL no dia 19 com ActiPro fortificado, com uma viabilidade bastante alta (98,2%), ao passo que no *overflow*, a concentração máxima determinada foi de 15×10^6 cels/mL, equivalente a uma eficiência reduzida de aproximadamente de 62%. De modo semelhante à fase anterior com ActiPro, a concentração celular caiu de forma significativa para aproximadamente 25×10^6 cels/mL, o que poderia estar associado, em princípio, a uma maior quantidade de células eliminadas pelo *overflow* ocasionada pela maior taxa de perfusão aplicada a partir do dia 21.

Com relação aos metabólitos, a glicose foi totalmente consumida nos dias 6 (sendo reestabelecida para até 1 g/L com a introdução da solução concentrada a 40%), 18 e 20 (Figura 5-10D). Nestes dois últimos casos, a glicose foi reestabelecida após o aumento da taxa de perfusão para 0,5 e 1 vvd respectivamente, aplicando ActiPro fortificado com CB7a/7b. Durante a fase exponencial, o lactato rapidamente atingiu uma concentração máxima de 3,4 g/L no dia 6, e em seguida manteve-se entre 1-2 g/L. O lactato foi praticamente exaurido entre os dias 19 e 20 (assim como a glicose), devido a uma falha na ativação da bomba do HC e, conseqüentemente, da bomba de alimentação de meio.

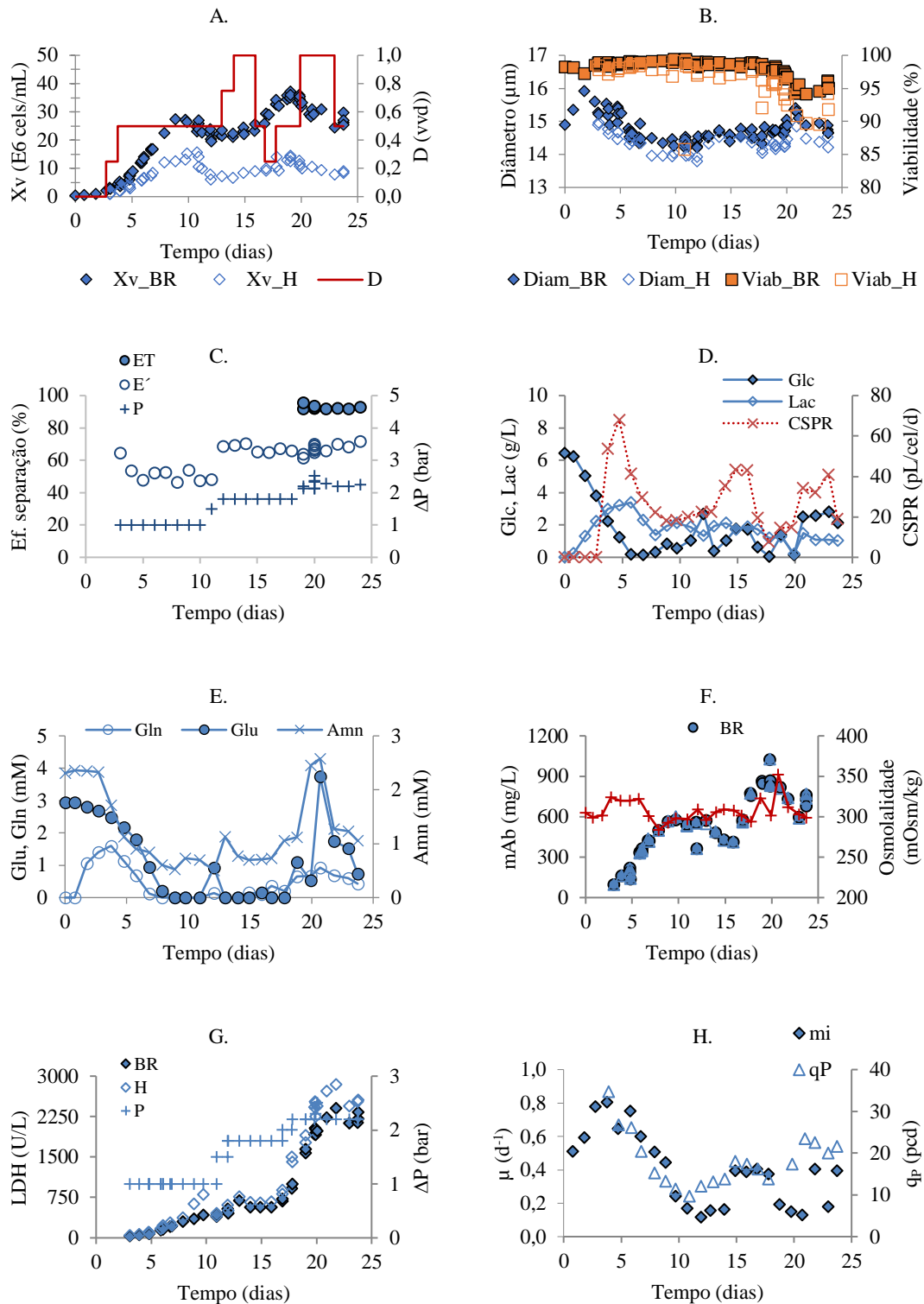


Figura 5-10. Perfusão HC-2 com o HC2015 com linhagem CHO_mAb#2, utilizando um biorreator descartável customizado (modelo PRO). A) X_v no biorreator (BR) e perfundido (H), e taxa de perfusão; B) viabilidade e diâmetro celular; C) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 2,5 bar. Valores de E_T calculados a partir do dia 19 após a instalação de um rotâmetro na linha de alimentação do HC, permitindo calcular Q_w ; D) glicose e lactato no biorreator (medidos antes de um ciclo de troca de meio), e CSPR; E) glutamato, glutamina e amônio no biorreator; F) concentração de mAb e osmolalidade; G) atividade de LDH extracelular; H) taxas específicas de crescimento e produtividade.

O meio ActiPro fortificado também aumentou a concentração de glutamato, o qual havia sido exaurido entre os dias 9-18. A concentração de glutamina produzida, por se tratar de uma célula amplificada pelo sistema GS (glutamina sintetase), aumentou rapidamente durante a etapa de batelada, ao passo que o amônio se manteve constante, como mostra a Figura 5-10E. Com o início da perfusão, a concentração de ambos os metabólitos caiu, sendo que a glutamina foi totalmente consumida entre os dias 8 e 14. Com a introdução do ActiPro fortificado, ambas as concentrações desses metabólitos aumentaram, em especial a de amônio, que alcançou uma concentração máxima de 2,6 mM no dia 21 quando a CSPR praticamente dobrou (~15 para 34 pL/cel/d).

A concentração de anticorpo (Figura 5-10F) seguiu um perfil semelhante ao de concentração celular (Figura 5-10A), indicando uma produção associada ao crescimento. A máxima concentração de mAb atingida foi de 1030 mg/L, coincidindo com o pico máximo de X_v . Novamente, como esperado, não foi observada retenção de produto no biorreator provocada pelo HC.

Apesar de a configuração utilizada possibilitar a descarga normal do *underflow* sem afogamento e a eliminação de bolhas pelo *overflow*, foram requeridas velocidades na bomba de alimentação do HC até 58% maiores em comparação à calibração prévia (rpm vs. ΔP). Esse comportamento foi observado desde o primeiro dia de operação do HC, em que foi necessário aplicar uma rotação de 93 rpm, em vez de 80 rpm, para atingir 1 bar. A provável causa foi o pequeno diâmetro do tubo de alimentação do biorreator ao hidrociclone, de 1/8" DI (3,2 mm). No modelo de bolsa utilizado (ver item 4.3.2), uma linha bifurcada com restrição de 1/8" saindo do fundo da bolsa foi a única opção para alimentar o HC, ao passo que nas corridas HC-1 e HC-3 utilizando o modelo DEV, foi utilizada uma porta com diâmetro interno de 3/4" (19 mm), a qual proporcionou as quedas de pressão desejadas com menores rotações na bomba. O efeito do diâmetro na linha de alimentação, que até o momento não havia sido considerado, foi posteriormente confirmado em ensaios em batelada. Na Figura 5-11, que compara as quedas de pressão obtidas para dois diâmetros de tubo de alimentação para velocidades entre 83 e 220 rpm (máximo valor da bomba), fica evidente a limitação em ΔP provocada pela restrição no diâmetro do tubo.

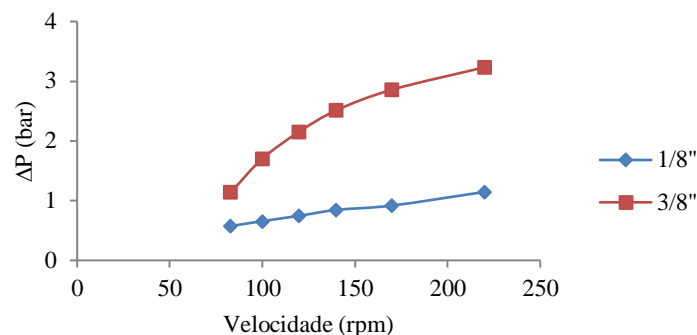


Figura 5-11. Efeito do diâmetro interno na linha de alimentação do HC2015 sobre ΔP medido à entrada do hidrociclone. Testes realizados com água usando a bomba 520U/520R2. No biorreator descartável usado na corrida HC-2, os valores de ΔP foram maiores devido à adição de uma linha extra de amostragem, conforme explicado no texto.

Diante da indisponibilidade de se iniciar uma nova corrida com um modelo mais adequado de bolsa, uma linha extra para amostragem do biorreator, também com 1/8" DI, foi termossoldada à linha de alimentação do HC (dia 12). Com a adição de uma terceira linha à bifurcação, o valor de ΔP aumentou de 1,5 para 1,8 bar para uma mesma velocidade de bomba (137 rpm), como mostra a Figura 5-10C. O aumento em ΔP refletiu em um aumento de E' de 48 para 68%, e consequentemente reduziu a concentração celular no *overflow* de 16×10^6 para aproximadamente 10×10^6 cels/mL. Essa configuração foi mantida até o fim da corrida, com uma eficiência reduzida máxima de 69% obtida empregando-se 220 rpm e $\Delta P > 2$ bar. Em comparação aos ensaios em batelada, as eficiências de separação obtidas foram menores. Aplicando altas velocidades rotacionais, os níveis de LDH extracelular medidos no biorreator e no *overflow* aumentaram entre os dias 17 e 25 (Figura 5-10G). Entretanto, ressalta-se que, no mesmo período, foi utilizado ActiPro fortificado como meio de alimentação, o que possivelmente contribuiu para o aumento da osmolalidade de 294 para 323 mOsm/kg medida no biorreator (Figura 5-10F). Tanto o intenso movimento peristáltico da bomba aplicado como a hiperosmolalidade do meio ActiPro fortificado podem ter sido deletérios para as células, a exemplo do que é reportado na literatura (OZTURK; PALSSON, 1991; WANG et al., 2017; ZHU et al., 2005).

A partir do dia 19, foi possível instalar um rotâmetro de fluxo autoclavável na linha de alimentação do HC para determinação *inline* de Q_f . Previamente à instalação, foi realizada uma calibração entre a resposta do rotâmetro e os valores de vazão obtidos por gravimetria, com água. A comparação mostrou que os valores de vazão fornecidos pelo sensor em linha eram superestimados, e portanto, foram corrigidos utilizando a relação

$y = 0,96x - 0,12$ (y – vazão real dada por gravimetria; x – vazão lida pelo sensor). No biorreator, as vazões determinadas foram significativamente menores em relação aos valores avaliados nos ensaios em batelada para as mesmas rotações da bomba peristáltica. Por exemplo, ao se aplicar 220 rpm, os valores de ΔP e Q_f obtidos foram respectivamente de 2,5 bar e 1,8 L/min, inferiores aos valores de 2,9 bar e 2,3 L/min determinados no ensaio em batelada (Tabela 5-2). A causa dessa redução seria o pequeno diâmetro da linha de alimentação proveniente do biorreator. Conseqüentemente, menores eficiências totais foram calculadas com base nas medidas de vazão (93%, em média), se comparado ao resultado obtido a $\Delta P > 2$ bar nos ensaios em batelada (Tabela 5-2).

Apesar da operação não ideal com menores valores de E' , o hidrociclone foi capaz de promover uma retenção preferencial de células viáveis no biorreator assim como na corrida HC-1, visto que no perfundido foram determinados viabilidade e diâmetro médio menores em comparação à suspensão amostrada do biorreator (Figura 5-10B), os quais estariam relacionados à eliminação de células não viáveis e debris. Outra variável que pode impactar a velocidade terminal de sedimentação, em menor escala, é a densidade da partícula (ρ_s). A separação baseada na diferença de densidade é mais sensível em comparação às diferenças de volume e de massa, de acordo com Grover et al. (2011), que observaram que as células apoptóticas apresentaram maior densidade em relação às células viáveis. Entretanto, o valor de ρ_s muito próximo ao da água eventualmente teria um menor efeito sobre o poder de classificação do hidrociclone empregado em comparação ao diâmetro de partícula. Considerando a perda de células pelo *overflow* como um *bleeding* natural e os valores de μ obtidos nessa corrida, uma concentração de células em torno de 50×10^6 cels/mL poderia ser alcançada no biorreator a uma taxa de perfusão de até 1 vvd, com base no balanço de massa para células viáveis. No entanto, a máxima concentração obtida nessa corrida foi de aproximadamente 35×10^6 cels/mL, sendo observado um decréscimo nesse valor à medida que maiores taxas de perfusão foram aplicadas. O estresse celular provocado pelas altas velocidades da bomba de alimentação no HC, ou a composição do meio empregado na alimentação (a qual não é revelada), poderiam explicar a limitação no crescimento.

5.2.3 Corrida HC-3: obtenção de um cultivo de alta densidade celular com o hidrociclone

Da mesma forma que na corrida HC-2, uma bolsa descartável de 50 L foi customizada adicionando-se uma porta com conector ReadyMate™ exclusiva para o

reciclo das células. Além disso, a customização foi realizada para um modelo DEV da bolsa e, portanto, a linha de alimentação para o hidrociclone tinha um diâmetro maior em relação ao adotado na corrida HC-2.

Ao longo de toda a corrida, foi empregado o meio ActiPro fortificado com CB1 e CB3. O hidrociclone (HC2015) foi operado intermitentemente utilizando a mesma estratégia de ativação da bomba de alimentação com um temporizador.

Nessa corrida, foi alcançada a mais alta concentração celular obtida em uma perfusão com o hidrociclone reportado até o momento na literatura. O valor máximo de X_V de 54×10^6 cels/mL foi alcançado no dia 16, com uma viabilidade de 96%, como mostra a Figura 5-12A. Através da purga natural pelo *overflow*, foi possível estabelecer um estado estacionário entre os dias 13 e 18 a aproximadamente 48×10^6 cels/mL, a 1 vvd. Em termos de CSPR, o valor médio aplicado nesse período foi de 19 ± 2 pL/cel/d (Figura 5-12D). A concentração média de células eliminadas pelo *overflow* foi de aproximadamente 12×10^6 cels/mL, com viabilidade média de 93%. Com isso, as eficiências total (E_T) e reduzida (E') calculadas foram respectivamente de 95 e 75%, considerando um R_f de 77% (o rotâmetro não estava disponível para esse experimento) e a um ΔP de 2,4 bar aproximadamente, como mostra a Figura 5-12C.

Ao longo da corrida, valores de E' maiores que 75% foram calculados entre os dias 3 e 5, para um ΔP de 1 bar. Com o aumento da concentração celular, foi necessário aplicar quedas de pressão de até 2,4 bar para manter E' nesse valor. Diferentemente do observado na corrida HC-2, as velocidades empregadas na bomba de alimentação foram próximas aos valores anteriormente determinados em calibração, sendo necessários apenas incrementos pontuais (de até 10%) à medida que a suspensão celular se tornava mais concentrada. No dia 16 (pico de X_V), a rotação empregada foi de 132 rpm para um ΔP de 2,3 bar, muito menor em comparação à corrida HC-2 (220 rpm). A evolução de atividade de LDH extracelular foi de acordo com o crescimento celular, e não sugeriu um impacto negativo das quedas de pressão superior a 2 bar aplicadas a partir do dia 8 de cultivo (Figura 5-12G).

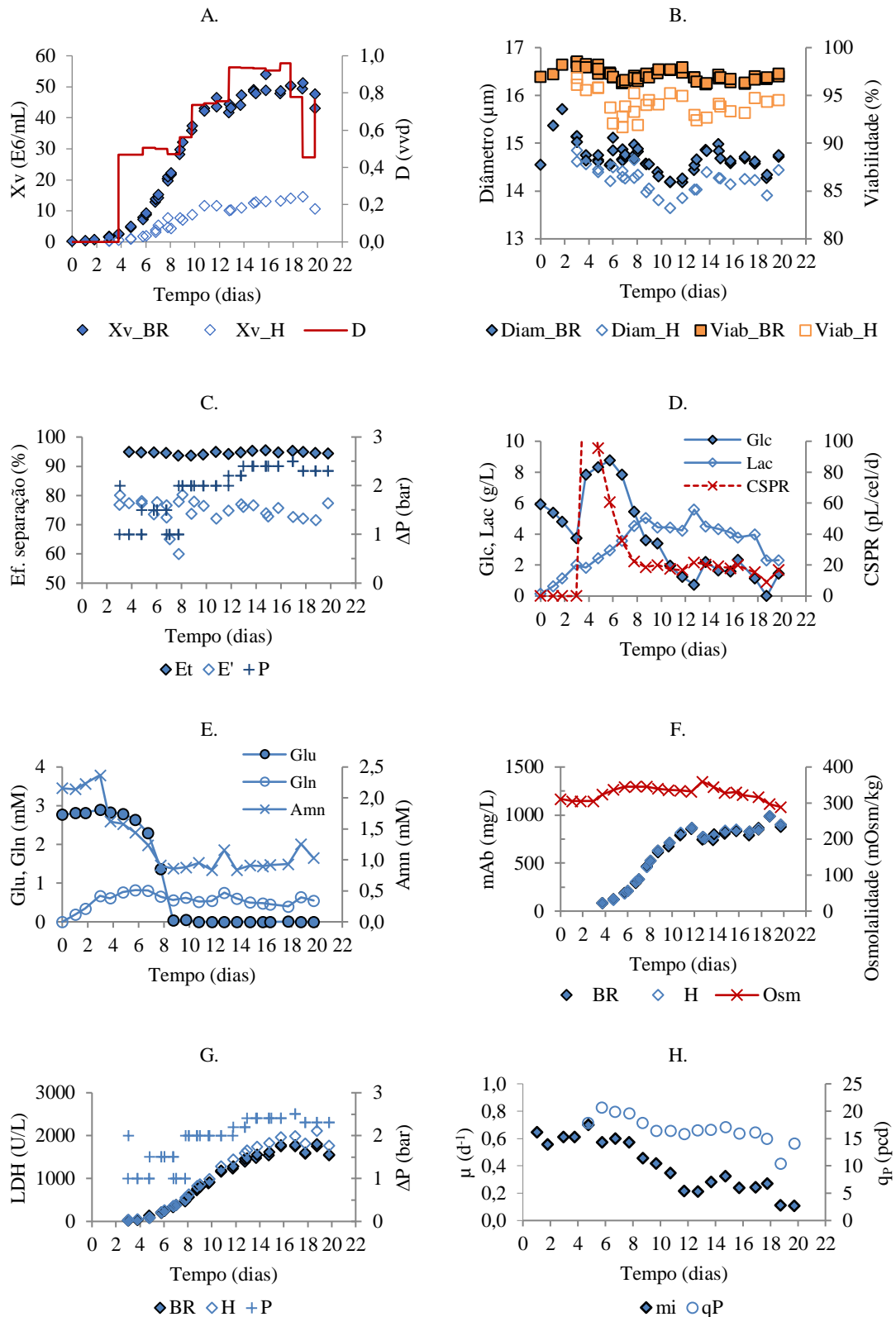


Figura 5-12. Perfusão HC-3 com linhagem CHO_mAb#2, utilizando um biorreator com bolsa descartável customizado (modelo DEV). A) X_v no biorreator (BR) e perfundido (H), e taxa de perfusão; B) viabilidade e diâmetro celular; C) eficiência de separação (E_T e E') para quedas de pressão entre 1 e 2,5 bar; D) glicose, lactato no biorreator (medidos antes da troca de meio), e CSPR (no dia 4, avaliada em 177 pL/cel/d); E) glutamato, glutamina e amônio no biorreator; F) concentração de mAb e osmolalidade; G) atividade de LDH extracelular; H) taxas específicas de crescimento e de produtividade.

Após o início da perfusão a 0,5 vvd, a concentração de glicose aumentou para 9 g/L, sendo gradativamente consumida (Figura 5-12D). Entre os dias 13-18, a concentração média foi de aproximadamente 1,8 g/L. Já o lactato rapidamente acumulou-se para elevadas concentrações, atingindo cerca de 5 g/L no dia 9, e uma concentração próxima de 6 g/L no dia 13 (Figura 5-12D). No último caso, esse acúmulo foi associado a um período de depleção total de oxigênio por aproximadamente três horas, em que o fornecimento de gases foi automaticamente interrompido devido a um pico da pressão interna da bolsa, de 0,7 psi. Uma possível causa para o acionamento do sistema *interlock* do biorreator poderia ser o bloqueio do filtro de exaustão pela alta camada de espuma formada, combinada com a falta de adição de anti-espumante no dia anterior. Apesar da alta concentração de lactato, não foram observados efeitos negativos sobre a viabilidade celular nem sobre a taxa específica de crescimento celular, que se manteve constante em $0,2\text{ d}^{-1}$. Concentrações de lactato acima de 40 mM (5,4 g/L) podem ser inibitórias para as células (HARTLEY et al., 2018). A partir desse evento, e com o emprego de uma taxa de perfusão tão alta quanto 1 vvd, o anti-espumante foi adicionado diariamente.

Os níveis de osmolalidade mantiveram-se superiores a 320 mOsm/kg durante a etapa de perfusão (Figura 5-12F). No dia 13, foi alcançado um pico de 360 mOsm/kg decorrente do acúmulo de lactato e a injeção contínua de base, fatores indesejados de um modo geral na condução de um processo em perfusão. Entre os dias 18 e 20, a CSPR foi reduzida de 20 para aproximadamente 9 pL/cel/d para estimular o *shift* para consumo do lactato e, assim, reduzir o consumo de base. A estratégia de alimentação foi baseada em Konstantinov et al. (2006), em que a taxa de perfusão foi gradualmente reduzida a uma concentração celular constante. No intervalo entre os dias 19 e 20, a concentração de lactato diminuiu para aproximadamente 2 g/L, e a glicose foi zerada, aplicando-se uma taxa de perfusão de 0,45 vvd. Em contrapartida, a taxa específica de crescimento μ e a produtividade específica q_p também diminuíram, conforme mostrado na Figura 5-12H. O efeito da redução gradual da CSPR foi posteriormente investigado em corridas com biorreatores de bancada.

As concentrações de glutamina e amônio mantiveram-se constantes ao longo da perfusão (Figura 5-12E). Já o glutamato foi totalmente consumido a partir do dia 9, e eventualmente pode ter limitado o crescimento celular, de acordo com os valores de μ calculados mostrados na Figura 5-12H.

Assim como na corrida HC-2, os perfis de produção de mAb e de concentração celular se correlacionaram, confirmando a produção associada ao crescimento. No curto

estado estacionário entre os dias 13 e 18, as concentrações médias de anticorpo medidas no biorreator e no perfundido foram respectivamente de 806 ± 41 e 813 ± 39 mg/L (Figura 5-12F), o que novamente comprovou que o hidrociclone não promove retenção de produto, apenas de células. Com a redução da CSPR entre os dias 18 e 19, o produto foi concentrado para aproximadamente 1000 mg/L, apesar da concomitante queda de q_p de 15 para 10 pcd (Figura 5-12H).

5.2.4 Corridas HC-4 e HC-5: aplicação do hidrociclone em biorreatores de bancada:

O hidrociclone HC2015 foi acoplado na tampa de um vaso de 6,7 L compatível com o sistema RALF (Bioengineering) por meio de um adaptador fabricado em aço inoxidável. Com esse adaptador, o HC foi instalado em uma porta com 12 mm de diâmetro na tampa do vaso, de modo que a extremidade do *underflow* não ficasse obstruída dentro do biorreator (Figura 5-13). Dessa forma, não foi necessário construir uma linha de reciclo para as células recuperadas pelo *underflow*. Um segundo adaptador compatível ao vaso da Applikon foi fabricado e instalado da mesma forma, conforme descrito em 5.3.4.

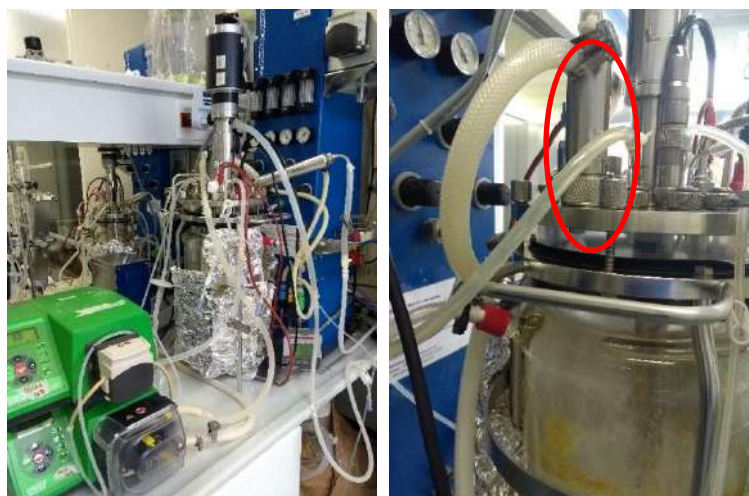


Figura 5-13. À esquerda: o biorreator RALF operando em perfusão com o HC2015 como equipamento de retenção (o HC não aparece nessa foto). À direita: detalhe do HC instalado na tampa no biorreator por meio de um adaptador com 12 mm de diâmetro interno. Observar o posicionamento livre para o orifício do *underflow* dentro do vaso, com espaço para a descarga em guarda-chuva.

Da mesma forma como nas corridas HC-1, HC-2 e HC-3, o HC foi alimentado utilizando uma bomba peristáltica de alta pulsação (520U/520R2), e uma mangueira Marprene com 9,6 mm DI acoplada ao cabeçote da bomba. Essa bomba foi acionada durante um minuto em intervalos determinados de acordo com a taxa de perfusão desejada. Com o esvaziamento parcial do biorreator, em que Q_o variou entre 0,3 e

0,4 L/min (dependendo da ΔP aplicada no HC), o contato entre o sensor de nível e a suspensão celular foi interrompido, acionando a bomba de alimentação de meio até que o contato fosse reestabelecido. Todo esse processo (esvaziamento + enchimento) durou menos de meia hora. Apesar da simplicidade e robustez desse mecanismo, foi necessário um estrito controle sobre a espuma formada para reduzir a interferência desta sobre o sensor de nível. O contato entre a espuma e o sensor interromperia prematuramente a bomba de alimentação, reduzindo o volume de meio introduzido. Foi necessário adicionar antiespumante até duas vezes ao dia, principalmente quando maiores taxas de perfusão foram aplicadas e um maior percentual do conteúdo do biorreator foi trocado.

O pH não foi controlado em ambas as corridas, exceto nos primeiros dias de corrida em que CO₂ foi injetado para compensar a remoção deste gás dissolvido promovida pela corrente de ar (*stripping* de CO₂). O pH foi apenas monitorado nas amostras em um pHmetro externo. Os valores médios de pH na corrida HC-4 (CHO DP-12, alimentada com TC-LECC) foram em torno de 7,0 (Figura 5-14). Na corrida HC-5 com CHO_mAb#2, com valores de pH de aproximadamente 6,6, a máxima concentração de lactato alcançada foi menor que 1,5 g/L, em contraste à corrida HC-3 que empregou o mesmo meio de alimentação (ActiPro + CB1 + CB3) e alcançou uma concentração máxima de lactato de 5,6 g/L a um pH controlado em 7,1. A significativa redução de lactato estaria associada à manutenção do pH em um valor mais baixo, propositalmente estipulado para evitar um alto acúmulo de lactato e reduzir o consumo de base. O consumo de lactato mesmo na presença de glicose é descrito na literatura (LISTE-CALLEJA et al., 2015) e estaria associado a uma maior atividade de proteínas MCT (transportadores de monocarboxilato), que promovem um co-transporte de íons H⁺ e lactato para o interior da célula, como um mecanismo de desintoxicação de prótons no meio extracelular (HARTLEY et al., 2018; LISTE-CALLEJA et al., 2015).

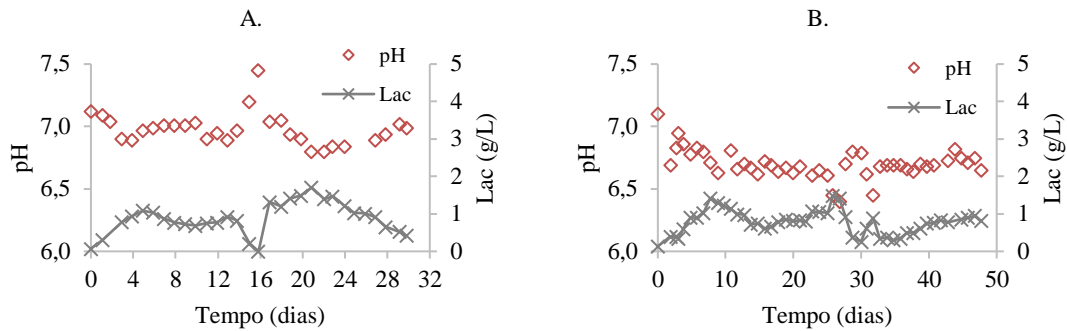


Figura 5-14. Valores de pH monitorados em pHmetro externo calibrado. A) corrida HC-4 com CHO DP-12, alimentada com TC-LECC; B) corrida HC-5 com CHO_mAb#2, alimentada com ActiPro+CB1+CB3.

Como mostra a Figura 5-14, valores de pH mais ácidos corresponderam a maiores concentrações de lactato. O pH é um parâmetro bastante sensível à concentração de lactato, sendo que, quando esse metabólito foi totalmente exaurido no dia 16 da corrida HC-4 (Figura 5-14A), o pH rapidamente subiu para 7,4. A dependência do pH com o lactato já foi inclusive explorada como uma estratégia de controle de pH combinada ao meio de alimentação, de maneira a minimizar o acúmulo de lactato (GAGNON et al., 2011; HILLER et al., 2017). Além do pH, a concentração de lactato está diretamente relacionada à osmolalidade, uma vez que valores de pH mais baixos demandam a introdução de uma base para manter o controle no *setpoint* desejado. Assim, em um efeito cascata, altas concentrações de lactato e a contínua de injeção de base normalmente causam efeitos deletérios sobre as células e perda de produtividade (OZTURK, 1996).

Na corrida HC-4, a alimentação com TC-LECC suplementado com glutamina foi iniciada no dia 3, a uma CSPR inicial de 40 pL/cel/d, a qual foi reduzida para aproximadamente 20 pL/cel/d até o dia 15. A partir do dia 10, o valor de X_v se estabilizou em aproximadamente 33×10^6 cels/mL, e o pico de concentração celular obtido foi de 37×10^6 cels/mL, a uma viabilidade de 93,9%. O primeiro estado estacionário foi estabelecido entre os dias 10-14 a uma CSPR de 19 pL/cel/d, equivalente a uma taxa de perfusão média de 0,64 vvd (Figura 5-15A). Nesse período, os ciclos de ativação do HC de um minuto foram aplicados a cada 6 ou 8 horas por dia. O número de ciclos diminuiu à medida que a velocidade na bomba de alimentação aumentou de 120 para 135 rpm (Figura 5-15C), equivalentes respectivamente a quedas de pressão de 2 e 2,5 bar no hidrociclone. Apesar do aumento de ΔP , não foi observado um aumento em E' , e a concentração de células eliminadas pelo *overflow* ficou estável em 10×10^6 cels/mL (Figura 5-15A).

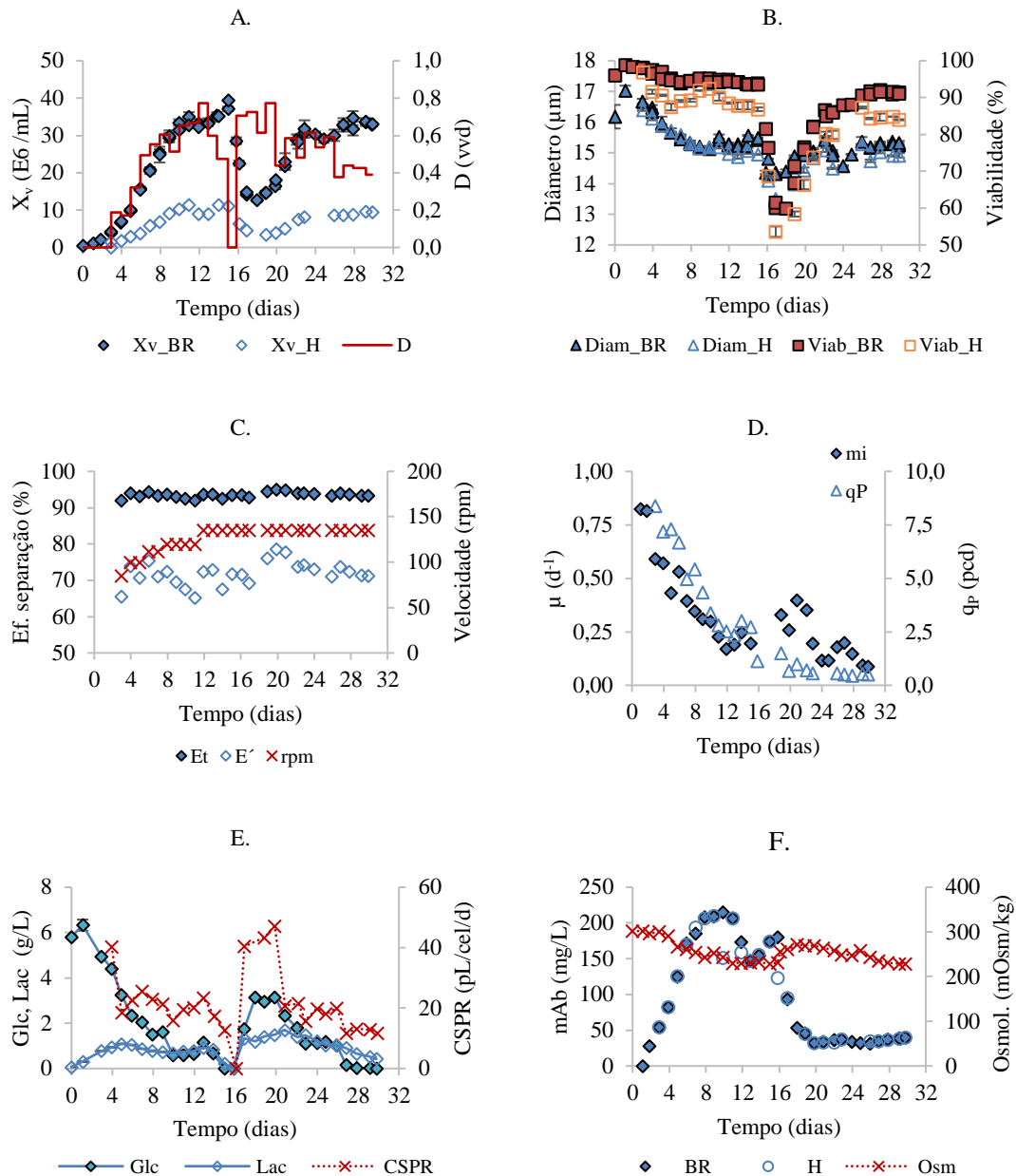


Figura 5-15. Corrida HC-4: perfusão com HC2015, CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) medida em biorreator (BR) e perfundido (H); B) viabilidade e diâmetro celular avaliados em biorreator e perfundido; C) eficiências de separação total (E_T) e reduzida (E'); D) taxas específicas de crescimento e produtividade; E) perfis de glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica), e CSTR; F) perfis de mAb avaliados em biorreator e perfundido.

Uma vez que as concentrações tanto de glicose quanto de lactato não zeraram, o passo seguinte foi reduzir gradualmente a CSTR mantendo X_v constante. No entanto, entre os dias 15 e 16, a linha de *overflow* foi acidentalmente fechada e, com isso, as células foram apenas recirculadas pelo hidrociclone, sem ocorrer a troca de meio durante a noite. Durante a curta operação em batelada de um cultivo a uma X_v tão elevada quanto 40×10^6 cels/mL e nutrientes em concentrações limitantes, glicose e lactato foram

totalmente consumidos (Figura 5-15E), e as células começaram a morrer (Figura 5-15A). A viabilidade caiu rapidamente para 60%, como mostra a Figura 5-15B. A perfusão foi reestabelecida e, a exemplo da corrida HC-1, as células voltaram a crescer. A recuperação levou aproximadamente uma semana, sendo aplicadas CSPRs entre 40 e 50 pL/cel/d para garantir o suprimento de glicose. Uma vez reestabelecido a X_v em $\sim 30 \times 10^6$ cels/mL no biorreator, estados estacionários a 20 pL/cel/d e 13 pL/cel/d foram respectivamente aplicados entre os dias 23-26 e 28-30. Os parâmetros de crescimento e produção obtidos nesses estados estacionários são apresentados na Tabela 5-4.

Apesar da recuperação de X_v para aproximadamente 30×10^6 cels/mL e viabilidade superior a 90%, a concentração de mAb caiu para valores inferiores a 50 mg/L a partir do dia 20 (Figura 5-15F). Mesmo com a diminuição de q_p ao longo de toda a corrida (Figura 5-15D), a concentração de mAb aumentou conforme a concentração de células no biorreator, atingindo um pico de aproximadamente 200 mg/L no dia 11 (Figura 5-15F). Com a redução de D de 0,60 para 0,47 vvd, a concentração de produto atingiu aproximadamente 180 mg/L, assim como glicose foi totalmente exaurida e o lactato passou a ser consumido, atingido 0,8 g/L no dia 14 (Figura 5-15E). Após a interrupção acidental da perfusão entre os dias 15 e 16, a produtividade específica ficou em níveis muito baixos, menores do que 1 pcd. A título de comparação, uma redução em q_p também foi observada nas corridas ATF-1 e ATF-2 (5.3.3.1), mas não na corrida CS-1 com o sedimentador (5.3.2.1) para a mesma linhagem celular cultivada em TC-LECC. A causa principal da perda de produtividade estaria relacionada a um metabolismo ineficiente para a produção de mAb, com conseqüente acúmulo de lactato. Apesar das menores concentrações obtidas na corrida HC-4 em função do menor *setpoint* de pH (6,8) em comparação às corridas com o ATF e o sedimentador (pH 7,1), o lactato não foi totalmente consumido entre os dias 17 e 30, mantendo-se entre 0,4 e 1,7 g/L. Nesse período, a concentração de mAb estabilizou-se em apenas 30 mg/L. A redução da CSPR para valores menores do que 15 pL/cel/d sugere uma tendência de *shift* metabólico para consumo de lactato a partir do dia 27 diante da depleção de glicose (Figura 5-15E), mas sem efeitos significativos sobre a produção. É interessante observar que, enquanto nas corridas ATF-1 e ATF-2 utilizando o ATF foi observada também uma correlação negativa entre a concentração de mAb e lactato, na corrida CS-1 com o sedimentador o lactato foi praticamente consumido no terceiro estado estacionário aplicado, sem redução de q_p . Esse comportamento sustenta a hipótese de que uma maior produção de anticorpo está diretamente relacionada a um metabolismo oxidativo cujo rendimento em ATP é superior

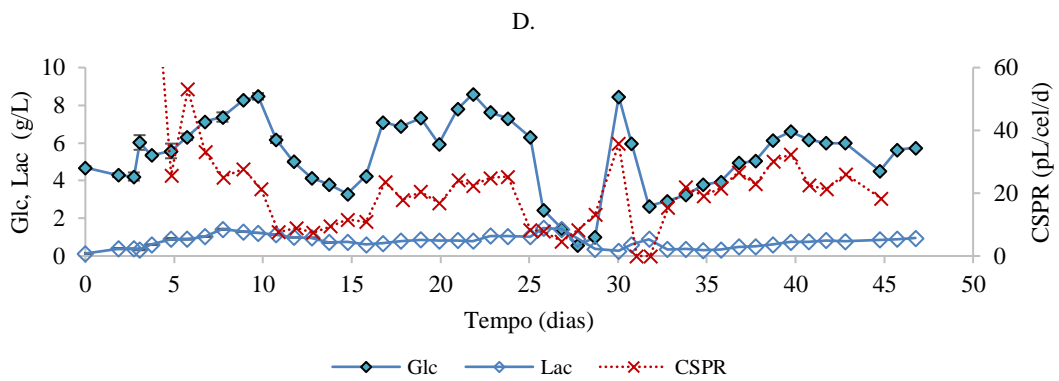
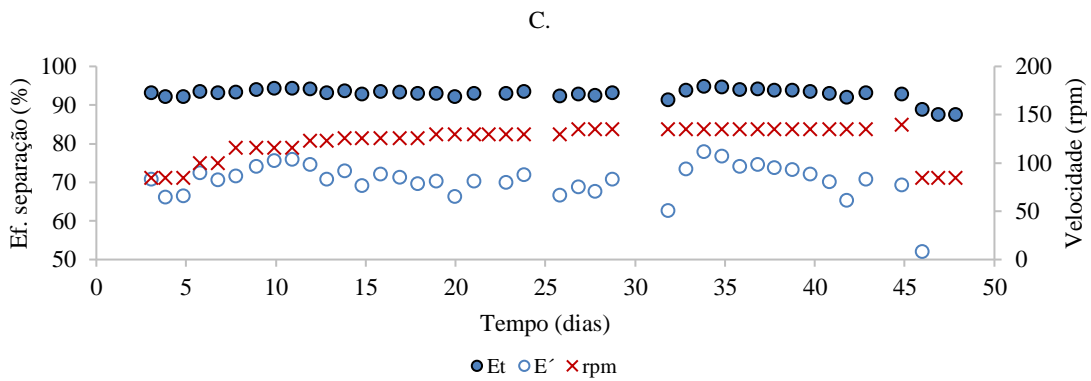
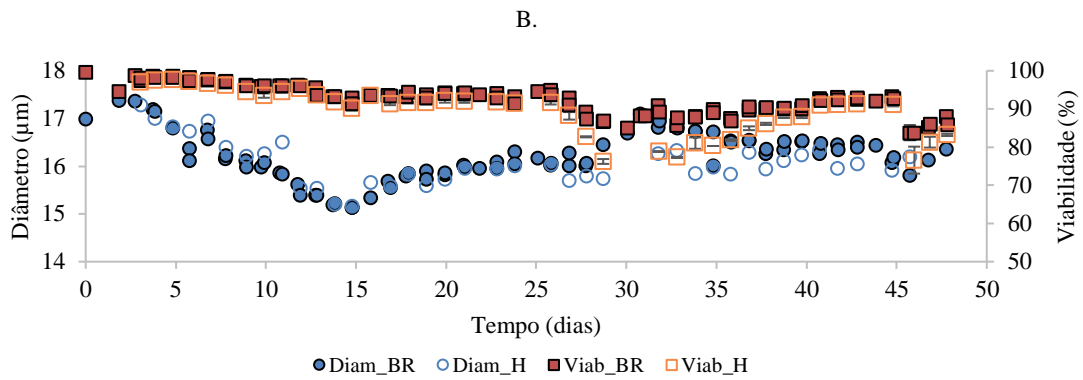
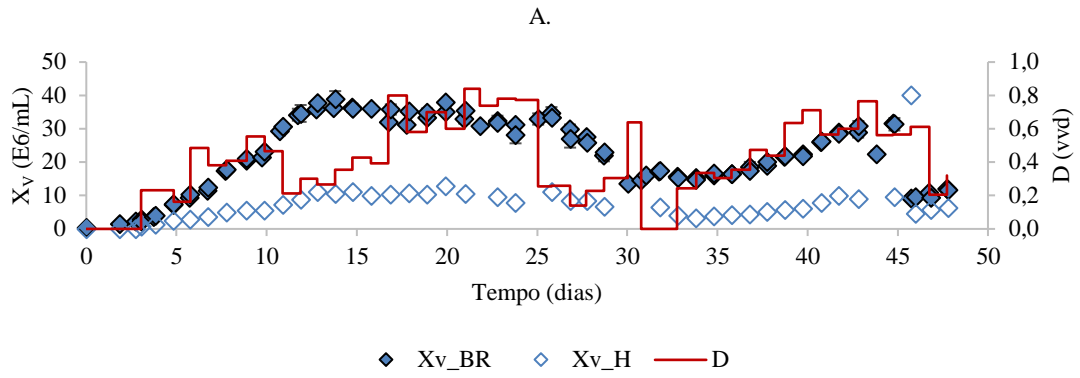
em comparação à glicólise, o que tem sido amplamente investigado e comprovado para processos em batelada alimentada em que o acúmulo de lactato é importante (LUO et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2013; TEMPLETON et al., 2013; XU et al., 2017; ZAGARI et al., 2013). Templeton et al. (2013), por meio de análises de fluxo metabólico, associaram um aumento da produtividade ao consumo de lactato e à máxima atividade no ciclo de ácidos tricarbóxicos, ao passo que maiores taxas de crescimento foram relacionadas à maior produção de lactato. Conforme discutido adiante, à medida que a concentração de lactato aumentou na corrida ATF-1, a produção foi interrompida. Essa redução estaria relacionada à maior proporção de *feed* TCX2D no meio de alimentação, o que também foi observado anteriormente pela autora no cultivo de CHO DP-12 com uma composição semelhante de meio de alimentação, mas que foi atribuída à elevada osmolalidade (BETTINARDI, 2016). Concentrações de lactato superiores a 4 g/L foram obtidas naquelas corridas, diferente da corrida HC-4, que não atingiu 2 g/L, sendo ainda possível manter uma produção mínima de anticorpo. Adicionalmente, na corrida HC-4, a osmolalidade manteve-se próxima aos valores fisiológicos para células CHO (~280 mOsm/kg, Figura 5-15F). A autora também determinou perfis de concentração de anticorpo semelhantes à corrida HC-4 em ensaios de pseudoperfusão com diferentes meios de alimentação baseados em misturas com TC-LECC com TCX2D (BETTINARDI, 2016). Concentrações de lactato entre 0,9 e 4 g/L concomitantes a baixas concentrações de mAb foram observadas por Bettinardi (2016), no entanto não foi estabelecida uma correlação entre ambos naquele trabalho. Uma segunda hipótese poderia ser uma instabilidade genética da CHO DP-12, embora processos com duração superior a 30 dias com essa linhagem tenham sido reportados na literatura, sem redução da produtividade (BECKMANN et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Com relação ao trabalho de Zhang et al. (2015), concentrações de lactato de até 86 mM (7,7 g/L) foram obtidas em uma perfusão com CHO DP-12 imobilizadas, com produtividade de 2-3 pcd. O acúmulo de lactato foi atribuído a uma elevada CSPR, resultando em excesso de glicose. Baixas concentrações de mAb entre 20 e 30 mg/L foram obtidas mesmo para uma concentração celular de 150×10^6 cels/mL, porém resultantes da aplicação de uma alta taxa de diluição (~10 vvd).

A corrida HC-5 foi realizada no mesmo biorreator acoplado com o HC2015, com as células CHO_mAb#2 cultivadas em ActiPro. A perfusão foi iniciada no dia 3 com o meio de alimentação ActiPro+CB1+CB3 (também utilizado na corrida HC-3), como mostra a Figura 5-16A. Durante a fase de crescimento celular (dias 3 a 13), o valor de ΔP

no hidrociclone foi gradualmente elevado de 1 para 2,5 bar, aumentando E' de 67 para aproximadamente 75% (Figura 5-16C). Com isso, a concentração de células no perfundido atingiu um valor máximo de 11×10^6 cels/mL, enquanto a X_v alcançada no biorreator foi de 36×10^6 cels/mL (Figura 5-16A). Considerando a eliminação de células pelo perfundido, o cálculo de balanço de massa para células determinou taxas de *bleeding* variando entre 0,03 a 0,28 vvd em todo o processo. A viabilidade no biorreator caiu gradualmente de 99 para 94%, mantendo-se estável até o dia 26 (Figura 5-16B).

Com o início da perfusão a altas CSPRs, a glicose atingiu um pico de ~ 9 g/L no dia 10 (Figura 5-16D). Com a redução da CSPR para 10 pL/cel/d, as concentrações de glicose e lactato foram reduzidas para 3 e 0,75 g/L, respectivamente.

Foram estabelecidos três estados estacionários com CSPRs de aproximadamente 10, 23 e 7 pL/cel/d. Os dados de concentração celular e taxas de crescimento e produtividade referentes a esses estados são mostrados na Tabela 5-4. Similar à corrida HC-4, os valores médios de X_v obtidos na corrida HC-5 variaram entre 30×10^6 e 40×10^6 cels/mL. Os valores de taxa de crescimento específica μ determinados variaram entre 0,1 e 0,2 d^{-1} , sendo que os maiores valores foram relacionados a taxas de perfusão mais elevadas. Com o meio ActiPro fortificado com CB1 e CB3 introduzido a uma CSPR de 23 pL/cel/d, foi possível manter a proliferação celular a um μ de 0,20 d^{-1} , com uma produtividade específica de aproximadamente 10 pcd. Esses dados são similares aos determinados na corrida HC-3, embora maiores valores de μ e q_p tenham sido medidos durante o estado estacionário a 19 pL/cel/d naquela corrida (0,26 d^{-1} e 16 pcd, respectivamente).



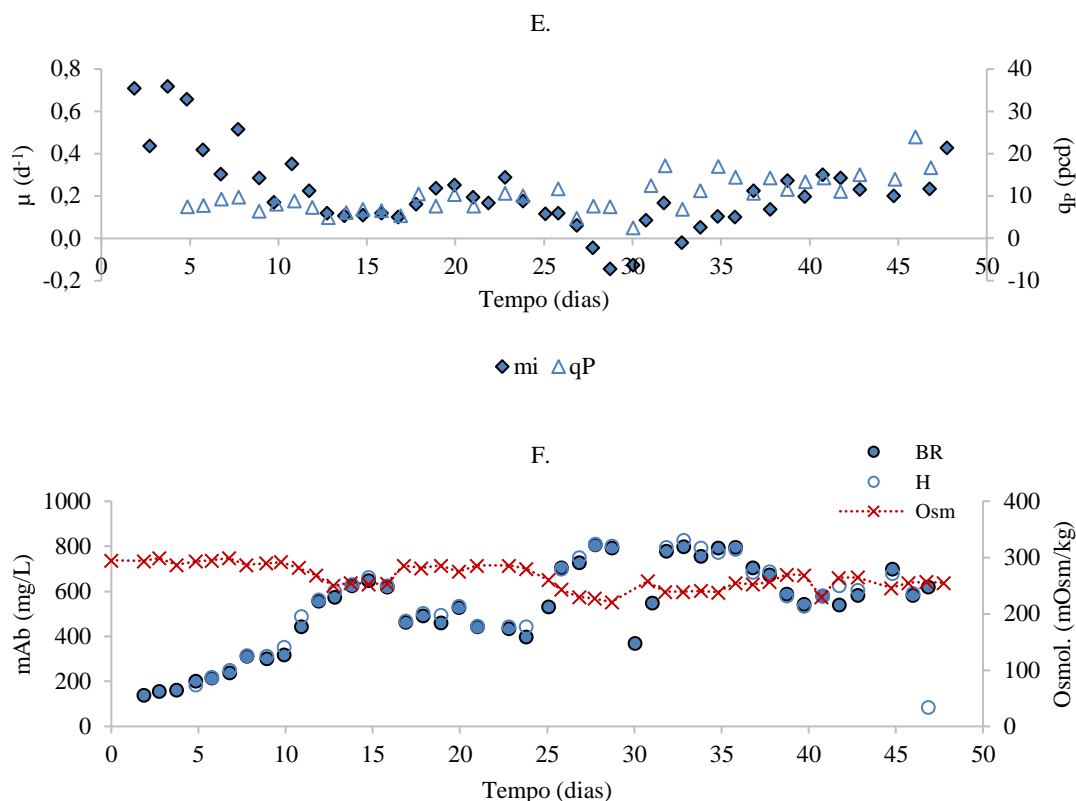


Figura 5-16. Corrida HC-5: perfusão com HC2015, CHO_mAb#2, alimentação com ActiPro+CB1+CB3. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e viabilidade medidas em biorreator (BR) e perfundido (H); B) viabilidade e diâmetro celular avaliados em biorreator e perfundido; C) eficiências de separação total (E_T) e reduzida (E'_r); D) perfis de glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica), e CSPR (entre dias 3 e 4, CSPR a 99 pL/cel/d); E) taxas específicas de crescimento e produtividade; F) perfis de mAb avaliados em biorreator e perfundido.

Tabela 5-4. Crescimento e produção durante os estados estacionários estabelecidos nas corridas HC-4 e HC-5 com HC2015 acoplado ao biorreator RALF com $V_T = 3 L$.

Nº	Sistema biológico	EE	X_v (10^6 /mL)	mAb (mg/L)	Glc (g/L)	Lac (g/L)	CSPR (pL/cel/d)	μ (d^{-1})	q_P (pcd)	P_v (mg/L/d)
HC-4	CHO DP-12/	D10-14	33,59±	179±	0,73±	0,79±	19±2	0,23±	2,8±	93±
			0,97	25	0,17	0,07		0,04	0,3	10
	TC-LECC	D21-26	30,40±	34±	1,11±	1,18±	18±1	0,15±	0,6	17
		D27-30	33,30±	39±	0,02±	0,53±	13±1	0,11±	0,5	17±
			0,67	1	0,01	0,08		0,03		1
HC-5	CHO_mAb#2/	D13-16	36,72±	617±	3,87±	0,76±	10±2	0,11±	6,2±	241±
			1,15	31	0,43	0,15		0,11	0,9	9
	ActiPro+CB1+CB3	D20-24	32,92±	452±	7,46±	0,91±	23±3	0,22±	9,7±	319±
		D26-28	29,78±	748±	1,49±	1,27±	7±2	0,05±	8,1±	171±
			3,58	53	0,95	0,31		0,08	3,5	36

Estados estacionários com CSPR inferiores a 20 pL/cel/d com ActiPro+CB1+CB3 foram aplicados na corrida HC-5. A uma CSPR de 10 pL/cel/d, foi obtida uma concentração de células de 37×10^6 cels/mL com viabilidade de 94%, porém com uma produtividade volumétrica menor devido à redução de q_P para 6 pcd. Com um novo

estágio de redução da CSPR para aproximadamente 7 pL/cel/d, o crescimento celular foi praticamente interrompido (μ de 0,05 d⁻¹), embora o efeito negativo da baixa X_V sobre a produtividade volumétrica tenha sido compensado pela manutenção de q_P em torno de 8 pcd. Para essa CSPR, cuja taxa de diluição foi equivalente a 0,16 vvd, houve uma queda expressiva da viabilidade (< 90%), mesmo sem a depleção total de glicose e lactato nesse período (Tabela 5-4). Entretanto, alguns aminoácidos livres no meio, como ácido aspártico, glutamato, glutamina, asparagina, alanina e tirosina foram totalmente consumidos (Apêndice A8). Em parte, esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Reinhart et al. (2015) em uma comparação de diferentes meios de cultivo, sendo que asparagina, serina, tirosina e ácido aspártico normalmente são os aminoácidos limitantes, embora o metabolismo varie de acordo com cada linhagem celular. Adicionalmente, os autores concluíram que um aumento na concentração dos aminoácidos mais consumidos no meio de cultivo não necessariamente resulta no aumento de X_V e de concentração de produto, mas sim, uma composição balanceada desses componentes que supra as demandas da célula (REINHART et al., 2015). A redução da CSPR para 8-12 pL/cel/d em perfusão com células HEK produtoras de eritropoietina aumentou significativamente o consumo de aminoácidos livres no meio de alimentação, porém a limitação nutricional reduziu a produtividade em detrimento à manutenção de uma alta viabilidade celular (SCHWARZ et al., 2020).

A partir do dia 33 do processo, a CSPR foi elevada para 20-30 pL/cel/d, o que resultou na recuperação de X_V para 30×10^6 cels/mL em aproximadamente 10 dias. Em contraste à corrida HC-4 com CHO DP-12, a severa limitação nutricional imposta por uma baixa CSPR não resultou em redução de q_P durante a fase de recuperação das células CHO_mAb#2. Inclusive, maiores produtividades específicas (~14 pcd) foram determinadas na fase final do processo, provavelmente associadas às CSPRs mais elevadas aplicadas.

Na corrida HC-5, além da redução da CSPR para valores inferiores a 10 pL/cel/d, foi testada a operação contínua do HC entre os dias 45 e 46. Para isso, a linha de *overflow* foi conectada a uma mangueira Marprene com 3,2 mm e acoplada a uma segunda bomba peristáltica mantida a 0,6 rpm. Por sua vez, a velocidade da bomba de alimentação do HC foi reduzida para 85 rpm (ou equivalente a um $\Delta P \sim 1$ bar), para fins de segurança caso o sistema não suportasse a grande restrição imposta no *overflow*, e minimizar as tensões cisalhantes sobre as células continuamente recirculadas pelo hidrociclone. Nessa nova configuração, a vazão de perfundido determinada foi de apenas 1,7 L/d ou $1,2 \times 10^{-3}$ L/min,

cerca de 330 vezes menor em comparação à vazão de *overflow* de 0,4 L/min obtida com o *overflow* livre durante cada ciclo da operação intermitente do HC. Apesar do sucesso em se manter o volume do biorreator constante com a operação contínua do hidrociclone, tanto a concentração quanto a viabilidade das células no biorreator diminuíram (9×10^6 cels/mL e 82% respectivamente), como mostram a Figura 5-16A e Figura 5-16B. A X_v no perfundido aumentou para 40×10^6 cels/mL após 24 horas de operação contínua, praticamente uma inversão dos valores de X_v anteriormente obtidos no biorreator e no perfundido com a operação intermitente do HC. A exata causa desse fenômeno não foi descoberta, mas a exemplo do que foi descrito no item 5.1.3, a forte restrição imposta pelo controle de Q_o com uma bomba interferiu negativamente no estabelecimento do campo centrífugo dentro do HC. A capacidade de separação do hidrociclone foi restaurada com a remoção dessa bomba e com a operação intermitente a ΔP de 1 bar por mais dois dias. A corrida foi então concluída com 48 dias, mas é possível observar uma tendência positiva no crescimento e na recuperação da viabilidade nesse curto período (Figura 5-16A).

De um modo geral, os valores de E' mais baixos obtidos nas corridas HC-4 (Figura 5-15C) e HC-5 (Figura 5-16C) sugerem que os valores de ΔP empregados foram menores em relação aos testes em batelada com o mesmo hidrociclone. Uma possível limitação seria, a exemplo da corrida HC-2, no diâmetro do tubo de aço com 9 mm DI utilizado no RALF para conectar o biorreator às entradas do hidrociclone, já que eficiências similares foram determinadas para concentrações maiores (50×10^6 cels/mL) na corrida HC-3, em que foi empregado um tubo com diâmetro maior (3/4") imediatamente à saída do biorreator. Outra possibilidade poderia ser o efeito da pressão interna do vaso do biorreator sobre a saída do *underflow*, o que poderia alterar a distribuição das correntes de saída do hidrociclone, alterando o valor de R_f (R. Pinto, comunicação pessoal). Porém, a pressão interna dos biorreatores de bancada não foi monitorada, somente a das corridas com as bolsas descartáveis, atingindo até 0,4 psi na corrida HC-3 (exceto o pico de 0,7 psi que acionou o sistema de travamento do sistema).

A Tabela 5-4 resume os dados de crescimento e de produção associados a cada um dos estados estacionários obtidos nas corridas HC-4 e HC-5, ambas realizadas com a mesma configuração de biorreator/hidrociclone mas com linhagens de CHO distintas. A aplicação de uma CSPR em torno de 20 pL/cel/d resultou em maiores taxas de crescimento e produção tanto para o meio TC-LECC quanto para o ActiPro fortificado, e ambas foram reduzidas para CSPRs inferiores. Contudo, cabe salientar o alto potencial

do meio basal TC-LECC para sustentar altas concentrações celulares a uma baixa CSPR, visto que ele foi utilizado sem ser fortificado com meios concentrados. Por outro lado, o potencial do ActiPro fortificado em sustentar uma concentração celular superior a 200×10^6 cels/mL a uma CSPR de 14 pL/cel/d já foi demonstrado (MAYRHOFER et al., 2020). Desconsiderando a perda de produtividade das células CHO DP-12 na metade final na corrida HC-4, tanto o meio TC-LECC quanto ActiPro fortificado com CB1 e CB3 (de acordo com a metodologia descrita em 4.3.2) aplicados a uma CSPR entre 10 e 13 pL/cel/d sustentaram uma alta concentração celular com viabilidade acima de 90%, mas sem cessar completamente a sua proliferação, com taxas específicas de crescimento mínimas de $\mu \sim 0,1 \text{ d}^{-1}$. Em termos de força de meio (definido no item 3.3.2), concentrações celulares tão altas quanto 77×10^6 e 100×10^6 cels/mL poderiam ser minimamente mantidas em crescimento com 1 mL de TC-LECC e ActiPro fortificado respectivamente, por um período de 24 horas.

5.3 Corridas em perfusão em biorreatores de bancada usando sedimentador inclinado e ATF

Nessa seção, serão apresentados os resultados de uma série de cultivos em pequena escala utilizando como equipamento de retenção celular o ATF e o sedimentador inclinado. Os resultados de uma corrida combinando o ATF e o hidrociclone também são apresentados (5.3.4). Essas corridas foram realizadas com duas linhagens celulares (CHO DP-12 e CHO_mAb#2) produtoras de anticorpo monoclonal, cultivadas em meios distintos, conforme apresentado na Tabela 4-2.

Inicialmente, foram realizados cultivos tanto em batelada simples quanto alimentada (*fed-batch*) com ambas as linhagens. O objetivo dessas corridas foi determinar o perfil de crescimento e produção em biorreator, oferecendo um comparativo aos ensaios em perfusão.

5.3.1 Cultivos em batelada simples e batelada alimentada em biorreator

As corridas com CHO DP-12 foram realizadas no biorreator RALF, com um volume de trabalho de 1 L (vaso de 3,4 L), utilizando meio basal TC-LECC para a inoculação. Na batelada alimentada, o meio concentrado TCX2D foi adicionado ao volume de trabalho inicial de forma contínua a partir do dia 4. Os volumes alimentados

foram calculados diariamente para manter uma concentração de glicose de 0,4-1 g/L no biorreator.

A X_v máxima obtida na batelada alimentada (35×10^6 cels/mL) foi aproximadamente duas vezes maior em relação à batelada simples (17×10^6 cels/mL), como mostra a Figura 5-17A. O valor de μ calculado na fase exponencial da batelada simples foi de $0,76 \text{ d}^{-1}$, próximo ao reportado na literatura para essa linhagem nesse meio (BECKMANN et al., 2012; BETTINARDI, 2016). A duração da batelada alimentada também foi superior (12 dias), prologando o número de dias em que as células apresentaram uma viabilidade maior que 80%. Entretanto, devido a problemas na bomba de alimentação, a concentração de glicose rapidamente caiu, e o cultivo foi prematuramente encerrado no dia 12. O volume final obtido foi de aproximadamente 1,8 L.

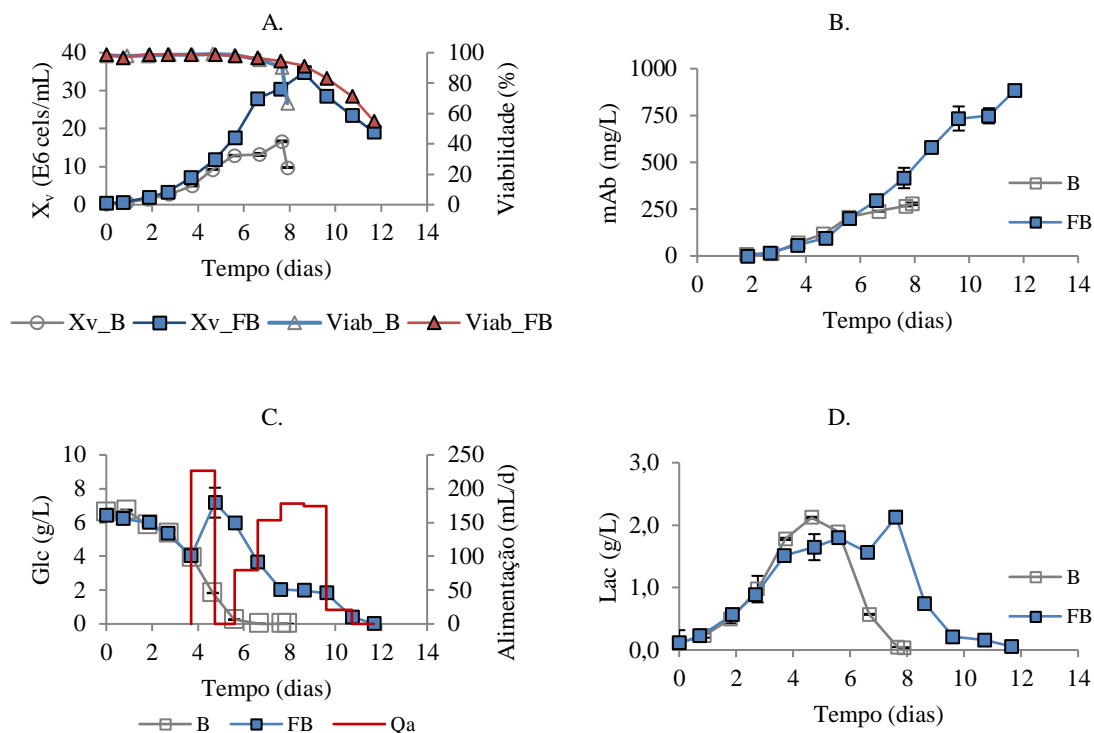


Figura 5-17. Batelada (B) e batelada alimentada (FB) em biorreator com CHO DP-12 em meio basal TC-LECC. A) concentração de células viáveis e viabilidade; B) concentração de mAb; C) perfil de glicose e vazão de alimentação na batelada alimentada (Q_A); D) perfil de lactato. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, em duplicata analítica.

Ainda na batelada alimentada, uma falha na operação da bomba de alimentação ocasionou em uma alta concentração de glicose no dia 5, de 7,2 g/L. Com isso, a alimentação com TCX2D foi interrompida por 24 horas, sendo retomada no dia 7 (Figura 5-17C). Em ambos modos de operação, foi observado o acúmulo de lactato até

aproximadamente 2 g/L durante a fase exponencial de crescimento (Figura 5-17D), o qual foi consumido mediante a depleção da glicose. Ressalta-se que, entre os dias 7 e 8 da batelada alimentada, houve um problema no suprimento de oxigênio ao biorreator e, portanto, a DO não foi controlada durante algumas horas. Nesse período, possivelmente devido à anaerobiose imposta, a concentração de lactato aumentou para 2,2 g/L, o qual foi rapidamente consumido em seguida.

Na batelada alimentada, mesmo sem uma otimização da estratégia de alimentação, uma concentração de mAb de 890 mg/L foi obtida (Figura 5-17B), cerca de três vezes superior à batelada simples. O ganho em termos de produtividade volumétrica na batelada alimentada foi de duas vezes (75,7 mg/L/d na batelada alimentada vs. 35,2 mg/L/d na batelada). Essas características, além da complexidade técnica relativamente baixa, explicam a popularização da batelada alimentada na indústria biofarmacêutica nos últimos 20-30 anos.

Os cultivos descontínuos com a linhagem CHO_mAb#2 também foram realizados no sistema RALF (Bioengineering), em um vaso maior (6,7 L). O volume de trabalho inicial foi de 1,8 L, utilizando ActiPro como meio basal. O meio CB1 a 10% (m/v) foi empregado como meio de alimentação, introduzido a uma taxa de 40 mL/L a partir do dia 2. Nesses ensaios, um aerador microporoso (5 μ m) compatível com esse sistema foi utilizado em vez do tubo aberto adotado nas bateladas com CHO DP-12. Até então, o aerador microporoso não era adotado no LECC/COPPE devido a problemas no controle com espuma (CORONEL, 2015) e ao potencial efeito danoso das microbolhas sobre as células (CHALMERS, 2015; OZTURK, 1996). Para contornar ambos os problemas, as vazões dos gases inseridas na cascata de controle de DO foram limitadas a 0,01 vvm (volume de gás injetado por volume de meio por minuto), em contraste à taxa de 0,2 vvm aplicada com o tubo aberto.

Concentrações celulares máximas de aproximadamente 12×10^6 e 18×10^6 cels/mL foram obtidas respectivamente na batelada simples e alimentada, como mostra a Figura 5-18A. O valor de μ na fase exponencial na batelada simples foi de $0,91 \text{ d}^{-1}$, equivalente a um tempo de duplicação de apenas 18 horas. Viabilidades acima de 98% foram determinadas na fase exponencial de crescimento em ambas as corridas, com destaque para um menor decaimento observado na batelada alimentada em fase avançada do cultivo (Figura 5-18A). Em termos de produção, a concentração máxima de mAb obtida na batelada alimentada foi de 670 mg/L no dia 9 (Figura 5-18B), cerca de três vezes superior em comparação à batelada simples. As produtividades volumétricas, de

36,3 mg/L/d (batelada) e 75,5 mg/L/d (batelada alimentada), foram similares às determinadas nos ensaios com CHO DP-12 e, mais uma vez, evidenciaram o ganho de produtividade obtido com a batelada alimentada. A julgar pela concentração celular e viabilidade obtidos, a estratégia de aeração empregada não apresentou um efeito deletério sobre as células. Apesar da formação de uma espuma estável, não foi necessário empregar antiespumante, visto que a altura da espuma permaneceu constante e não atingiu a tampa do biorreator.

Na batelada simples, a glicose foi totalmente consumida no dia 4 (Figura 5-18C), coincidindo com o *shift* metabólico para o consumo de lactato (Figura 5-18D). No caso da batelada alimentada, a glicose foi totalmente consumida entre os dias 4 e 6, e concentrações de lactato aproximadamente duas vezes maiores em comparação à batelada simples foram observadas (Figura 5-18D). Esse comportamento sugeriu que a estratégia de alimentação pode ter limitado a obtenção de uma maior concentração celular e produtividade devido ao desbalanceamento de ambos os metabólitos, ao contrário do que foi observado com células CHO DP-12 cultivadas em meio TC-LECC com TCX2D. No entanto, a otimização da estratégia de alimentação para batelada alimentada não foi o foco desse trabalho.

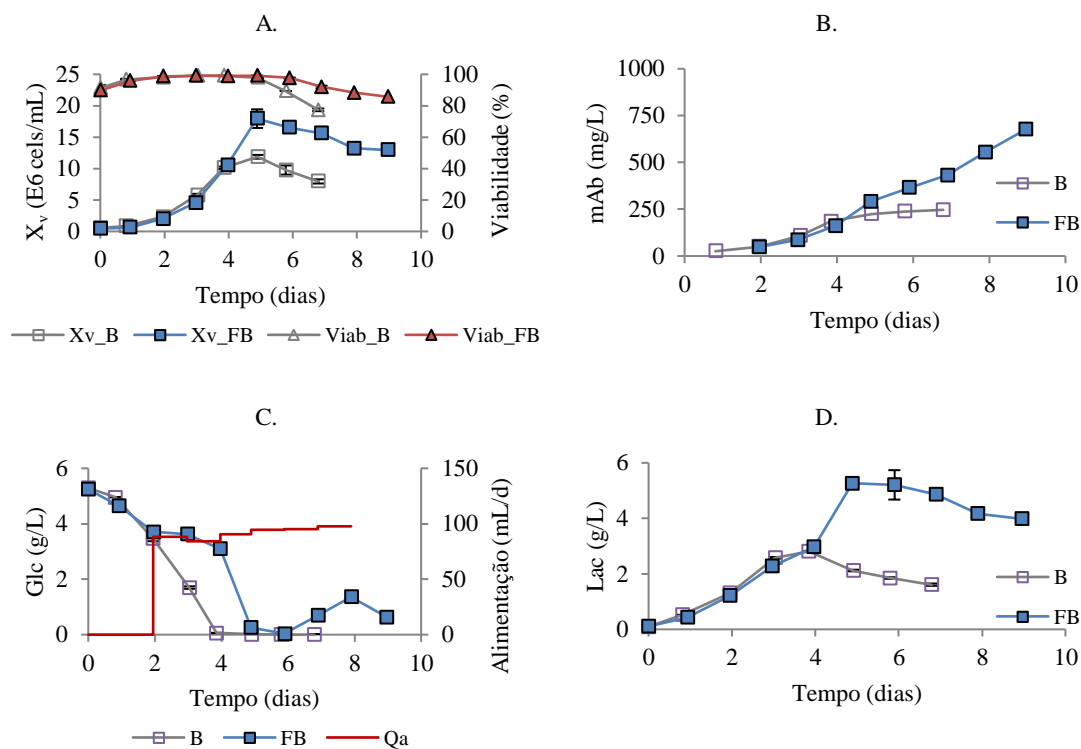


Figura 5-18. Batelada (B) e batelada alimentada (FB) em biorreator com CHO_mAb#2 em meio basal ActiPro. A) concentração de células viáveis e viabilidade; B) concentração de mAb; C) perfil de glicose e

taxa de alimentação com CBI (10% m/v) na batelada alimentada (Q_A); D) perfil de lactato. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, em duplicata analítica.

Os ensaios em batelada simples e alimentada realizados serviram como uma referência para avaliar o crescimento e produção para ambas as linhagens celulares cultivadas em biorreator, mesmo sendo utilizado apenas um único biorreator (RALF). Adicionalmente, esses experimentos foram importantes para avaliar possíveis efeitos negativos da aeração com microbolhas, e efetuar ajustes na operação do biorreator, como adição de antiespumante, controle de periféricos (por exemplo, bomba de alimentação independente) e controle de parâmetros físicos, como DO e pH.

5.3.2 Corridas em perfusão utilizando o sedimentador inclinado (CS10)

As corridas CS-1 e CS-2 consistiram em cultivos em perfusão utilizando o sedimentador inclinado como equipamento de retenção, empregando respectivamente as células CHO DP-12 e CHO_mAb#2. Outras diferenças importantes referem-se aos meios de cultivo e aos biorreatores utilizados, conforme descrito no texto.

5.3.2.1 Corrida CS-1 (CHO DP-12, meio TC-LECC)

Na corrida CS-1, o meio de alimentação foi o TC-LECC suplementado com glutamina a 8 mM. A estratégia de alimentação adotada consistiu em reduzir gradualmente a taxa de perfusão (D) mantendo a concentração celular no biorreator constante (*push-to-low*). O objetivo em reduzir D foi determinar a CSPR mínima capaz de sustentar a concentração e viabilidade celulares, sem diminuir a produção. Com esse experimento, foi possível estimar a capacidade do meio basal TC-LECC em prover nutrientes às células sem a necessidade de suplementação com soluções concentradas de nutrientes.

A perfusão foi iniciada no dia 2, com um volume de trabalho no biorreator de 1 L. O μ avaliado na fase exponencial foi de $0,99 \text{ d}^{-1}$. Para estabelecer uma alta concentração celular, a taxa de perfusão foi mantida entre 0,5 e 1,2 vvd até o dia 7 (Figura 5-19B), quando foi iniciado o *bleeding* a uma X_v de aproximadamente 40×10^6 cels/mL (Figura 5-19A).

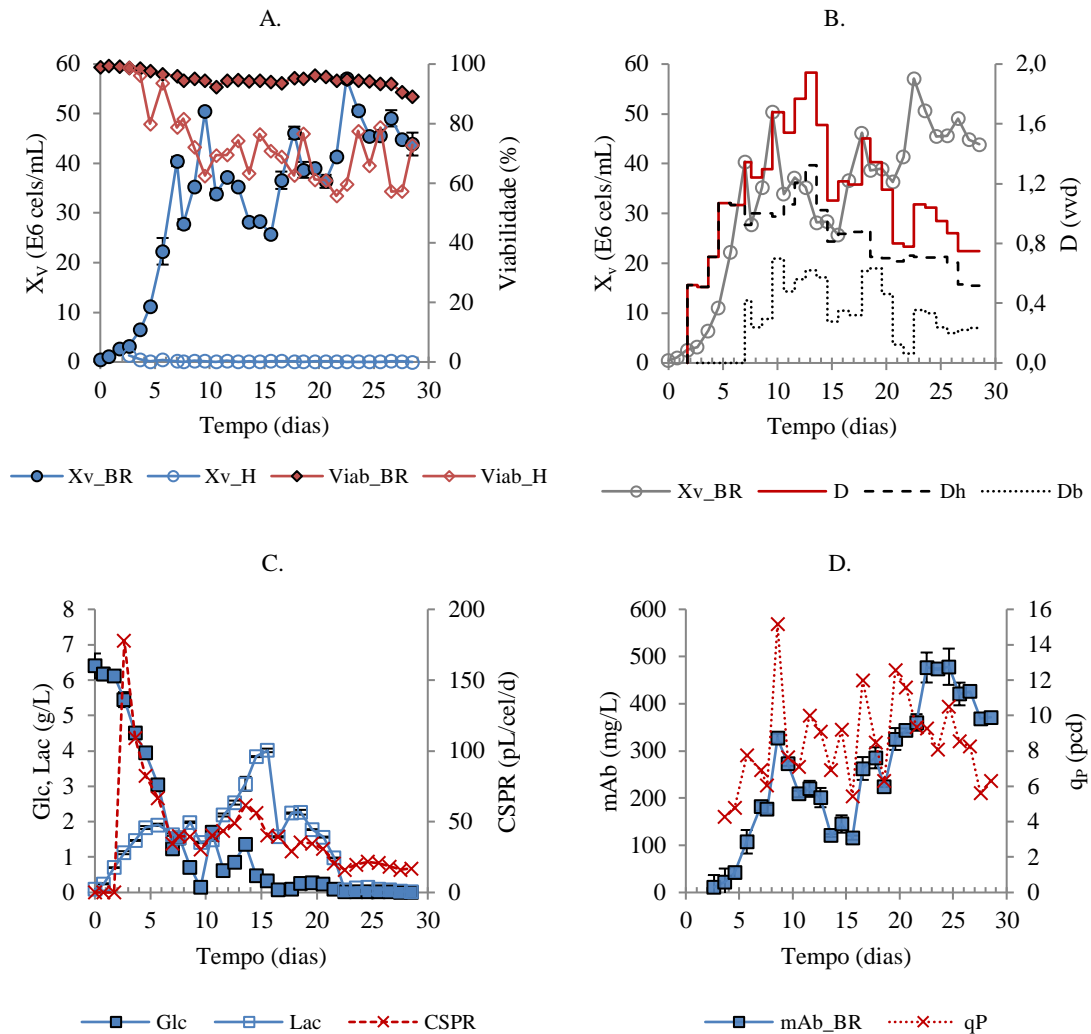


Figura 5-19. Corrida CS-1 em perfusão com CS10, células CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração e viabilidade medidas no biorreator (BR) e perfundido (H); B) taxas de diluição da alimentação (D), perfundido (D_H) e bleeding (D_B); C) perfis de glicose, lactato e CSPR; D) perfil de anticorpo medido apenas no biorreator e produtividade específica. Dados apresentados como média \pm desvio-padrão, em duplicata analítica.

O volume no vaso variou entre 0,9 e 1,3 L ao longo da corrida devido à operação independente das bombas de alimentação, de perfundido e de *bleeding*. A remoção de células pelo *bleeding* foi contínua. Ressalta-se que calibrações correlacionando a vazão e a velocidade rotacional foram previamente efetuadas para cada bomba, porém oscilações das vazões foram observadas. Com essas oscilações, as respectivas taxas de diluição também variaram (Figura 5-19B), resultado dos ajustes manuais necessários para manter o volume de trabalho do biorreator constante. Com as variações do volume, em alguns momentos da corrida não foi possível manter uma X_v constante, por exemplo entre os dias 7-10 e 16-25. Em consequência da variação de X_v , as taxas de *bleeding* (D_B) variaram entre 0,1 e 0,6 vvd, estabilizando-se em 0,2 vvd do dia 25 até o fim do

experimento. Para minimizar flutuações no volume, um controle mais robusto baseado na ativação automática da alimentação por meio de um sensor de nível foi adotado nas corridas subsequentes, inclusive sendo fundamental para os cultivos em pequena escala com o hidrociclone.

Em condições estáveis de operação, a $CSPR_{min}$ seria equivalente à menor taxa de diluição para a qual não ocorresse uma redução no valor de μ (REPLIGEN, 2017b). Apesar das oscilações em X_v e taxas de diluição, foi possível determinar três estados estacionários (EE), conforme mostrado na Tabela 5-5.

Tabela 5-5. Valores médios para parâmetros de crescimento e produção nos estados estacionários estabelecidos na corrida CS-1 com sedimentador inclinado com CHO DP-12 em meio TC-LECC.

EE	X_v (10^6 /mL)	mAb (mg/L)	Glc (g/L)	Lac (g/L)	$Y_{Glc/Lac}$	CSPR (pL/cel/d)	μ (d^{-1})	q_p (pcd)	P_v (mg/L/d)
D7-11	37,57±8,49	233±65	1,07±0,64	1,61±0,22	0,52±0,11	37±0	0,31±0,37	8,7±3,4	306±99
D18-21	40,06±6,26	305±53	0,21±0,09	1,96±0,35	0,59±0,12	31±2	0,51±0,17	10,1±2,9	397±97
D27-29	45,93±2,77	388±32	0,01±0	0,05±0,03	0,01±0,01	17±2	0,20±0,09	6,6±1,4	307±72

Taxas de CSPR decrescentes foram respectivamente aplicadas mantendo a X_v a uma média de 40×10^6 cels/mL. No último EE, mantido a uma CSPR de 17 pL/cel/d (Tabela 5-5), foi observada a depleção de glicose e o consumo de lactato (Figura 5-19C). Nessas condições, o cálculo do coeficiente de rendimento de glicose em lactato ($Y_{Glc/Lac}$) sugeriu um metabolismo oxidativo mais eficiente. A redução em μ estaria associada ao desvio metabólico para a manutenção das células e a produção de mAb (Tabela 5-5). A depleção de lactato é desejável, visto que o seu acúmulo é um indício de altas taxas glicolíticas em detrimento à produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Além disso, o consumo de lactato contribui na redução do consumo de base, evitando o aumento da osmolalidade (XU; CHEN, 2016; ZAGARI et al., 2013; ZHOU et al., 2011). Uma das maneiras de se promover o consumo do lactato consiste em limitar a concentração de nutrientes essenciais como a glicose e a glutamina. Por outro lado, concentrações muito baixas de glicose, além do risco da interrupção indesejável do processo, podem limitar o fornecimento de precursores para as reações de N-glicosilação, alterando a distribuição das isoformas do produto e, conseqüentemente, sua atividade biológica (WONG et al., 2005).

Com a redução de D de 1,5 vvd para aproximadamente 0,9 vvd, a concentração de mAb aumentou em aproximadamente 50%, a uma produtividade específica q_p mantida entre 8 e 10 pcd (Tabela 5-5). Embora o ganho de concentração tenha sido dez vezes

menor em comparação ao alcançado por Konstantinov et al. (2006), ressalta-se que o meio de alimentação (TC-LECC) não foi otimizado ao longo do experimento de forma a atender aos requisitos nutricionais das células. Além disso, aqueles autores aplicaram uma expressiva redução na taxa de diluição do processo, correspondente a uma diminuição da CSPR (cerca de 70%), de 300 para 70 pL/cel/d.

É interessante observar que, no período entre os dias 22-29, a concentração média de mAb determinada, de aproximadamente 420 mg/L (Figura 5-19D), foi 1,5 vezes superior em comparação à concentração final de produto obtida em batelada simples (278 mg/L), apesar da contínua diluição do reator. Já em comparação à batelada alimentada (concentração final de 885 mg/L), a concentração obtida na corrida CS-1 foi cerca de 50% menor, porém uma vez que a coleta foi feita de forma contínua, a produtividade volumétrica da perfusão foi maior, resultando em um ganho de 3,4 vezes na massa acumulada de anticorpo, conforme mostrado na Figura 5-20. Na literatura, estratégias de limitação da CSPR resultaram tanto em uma redução de 30% (TENG et al., 2011) quanto em um aumento de 70% da concentração máxima de mAb obtida na perfusão em comparação à batelada alimentada (FENG et al., 2006). As estratégias de alimentação utilizadas em ambos os modos de operação, assim como os diferentes tipos de linhagens celulares utilizados, justificariam essas diferenças.

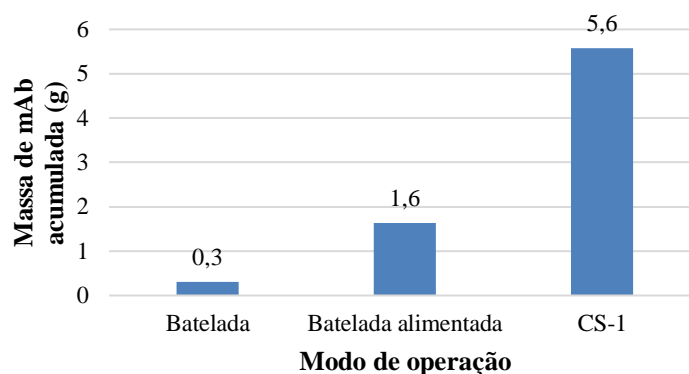


Figura 5-20. Massa de anticorpo acumulada nas corridas em batelada simples e batelada alimentada (descritas no item 5.3.1) em comparação à corrida CS-1, utilizando células CHO DP-12.

A produtividade volumétrica determinada para a fase de produção (i.e, entre os dias 7 e 29) foi, em média, de 341 ± 92 mg/L/d que, mesmo não mantida constante devido às variações de X_v no processo, foi 4,5 vezes superior em relação à batelada alimentada, o que é esperado para esse modo de operação.

Em relação à capacidade de separação do sedimentador, valores de E' superiores a 99% foram determinados ao longo da corrida, exceto entre os dias 3 e 4, quando houve

um problema de refrigeração no condensador de entrada ao equipamento. Desconsiderando esse intervalo, a concentração de células média presentes no perfundido foi de $0,2 \times 10^6$ cels/mL a uma viabilidade de 70%.

5.3.2.2 Corrida CS-2 (CHO_mAb#2, ActiPro fortificado)

O mesmo equipamento foi utilizado em uma perfusão com a linhagem CHO_mAb#2 cultivada em ActiPro (corrida CS-2). Foi utilizado o biorreator da Applikon, com um volume de vaso de 7 L, uma vez que a potência da manta de aquecimento compatível para esse vaso tinha se mostrado capaz de manter a temperatura em testes prévios com água recirculando pelo sedimentador.

O volume inicial (pós-inoculação) foi de 2 L. A alimentação com ActiPro suplementado com CB1 e CB3 foi iniciada no dia 3, na fase exponencial de crescimento ($\mu=0,79 \text{ d}^{-1}$). Com o enchimento do sedimentador, o volume de trabalho dentro do vaso reduziu para 1,6 L no vaso, devido ao volume morto de 0,4 L do sedimentador, serpentina de resfriamento e mangueiras.

Com o início da perfusão, ficou evidente uma redução de μ para $0,4 \text{ d}^{-1}$, como mostrado na Figura 5-21B. Com o baixo crescimento, a concentração máxima de células foi de apenas $16,8 \times 10^6$ cels/mL obtida no dia 15 (Figura 5-21A) e $\mu \sim 0$. A viabilidade caiu de 99 para 87% nesse período. Em princípio, o baixo crescimento foi associado a uma rápida redução da CSPR (de 47 para 16 pL/cel/d), entre os dias 3 e 7. Entretanto, apesar da aplicação de CSPRs significativamente maiores, entre 30 e 100 pL/cel/d dos dias 8 a 16, o crescimento permaneceu limitado. Em decorrência do aumento da taxa de perfusão, a concentração de glicose atingiu 10 g/L (Figura 5-21C). Já a concentração máxima de lactato foi de apenas 2 g/L (Figura 5-21C), em contraste ao observado na perfusão com hidrociclone empregando o mesmo meio de alimentação (corrida HC-3).

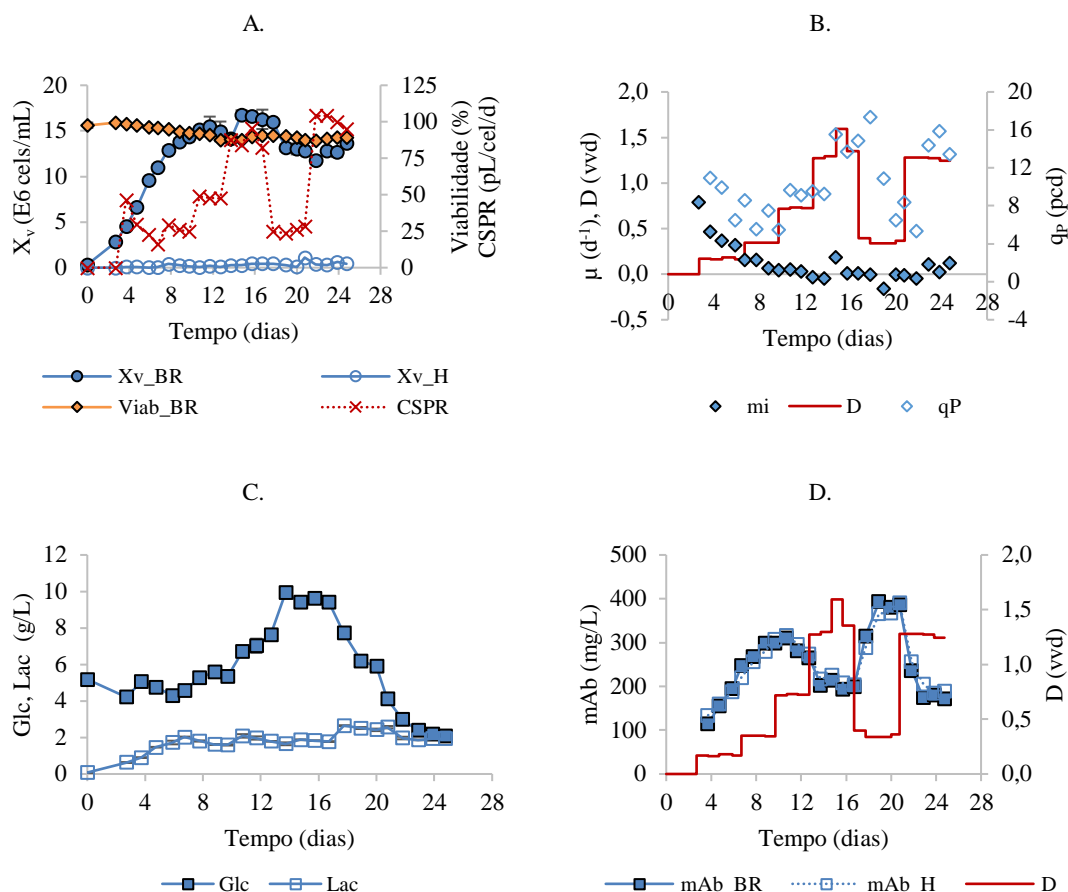


Figura 5-21. Corrida CS-2, perfusão com CS10 com células CHO_mAb#2, alimentada com meio ActiPro+CB1+CB3 entre os dias 3-19, e ActiPro entre os dias 20-24. A) concentração de células viáveis no biorreator (BR) e perfundido (H), viabilidade e CSPR; B) taxas específicas de crescimento e produtividade; C) perfis de glicose e lactato; D) anticorpo medido no biorreator e perfundido. Dados apresentados como média±desvio-padrão, em duplicata analítica.

Em oposição ao baixo crescimento, foi observada uma correlação direta entre q_P e D (Figura 5-21B), o que compensou a diluição de produto no perfundido ao se elevar D de 0,7 para aproximadamente 1,6 vvd entre os dias 13 e 17, como se observa na Figura 5-21D. Conseqüentemente, a concentração de mAb caiu de 300 para cerca de 200 mg/L apenas. Nesse ensaio, as concentrações de mAb no perfundido também foram medidas, sendo iguais à do biorreator (Figura 5-21D). Assim como o hidrociclone, e conforme esperado para equipamentos que não aplicam uma barreira física para a retenção celular, não foi determinada retenção do produto dentro do biorreator para o sedimentador.

Para descartar a possibilidade de o meio fortificado ser a causa da inibição do crescimento, o biorreator passou a ser alimentado com meio basal apenas (ActiPro) a partir do dia 20, a uma CSPR de aproximadamente 20 pL/cel/d. Contudo, mesmo aumentando a CSPR para cerca de 80 pL/cel/d, não houve recuperação no crescimento (Figura 5-21A). No entanto, assim como observado para o ActiPro fortificado, o aumento

da taxa de perfusão com ActiPro também resultou em um aumento significativo em q_p (Figura 5-21B).

Cabe ressaltar que, nesse ensaio, foi observada uma crosta de “caramelização” na parede do vaso. Em princípio, esse fenômeno foi associado a uma elevada temperatura proporcionada pela manta de aquecimento (valor não conhecido) em resposta à redução de temperatura imposta pela recirculação externa ao sedimentador (35 mL/min), conforme descrito em Materiais e Métodos. Apesar de a temperatura do cultivo ter sido controlada em 36,8°C (Apêndice A5), o vidro superaquecido da parede do vaso poderia induzir a apoptose das células, ou então degradar componentes do meio, produzindo metabólitos tóxicos. Ressalta-se que as concentrações de açúcar redutor e de proteínas não seriam desprezíveis nesse sistema, o que pode ter contribuído para a ocorrência de reações de Maillard. Essas reações, além de gerarem compostos potencialmente tóxicos às células (FRIEDMAN, 2005; VAN NGUYEN, 2006), podem modificar a estrutura da proteína de interesse, alterando a sua atividade biológica (ZHANG et al., 2009).

Problemas de caramelização já foram observados por nosso grupo ao utilizar o sedimentador acoplado ao sistema Applikon, resultando em perda de viabilidade (J. CORONEL, dados não publicados). Diante da nossa experiência prévia em perfusão com o sedimentador utilizando o sistema RALF cujo vaso é enjaquetado (CORONEL et al., 2019), foram realizadas algumas tentativas de corridas com a mesma linhagem e meio fortificado com o biorreator da Bioengineering (Apêndice A7). A água na jaqueta foi recirculada por um banho externo cuja temperatura máxima foi manualmente estabelecida em 45° C, necessária para manter a temperatura do cultivo em 36,8°C. No entanto, de modo semelhante à corrida CS-2, o crescimento celular foi interrompido assim que a alimentação com o meio fortificado foi iniciada. Dentre os ensaios, apenas um, em que foi empregado o meio basal ActiPro para a alimentação, foi obtida uma maior concentração celular.

Diante da dificuldade em se estabelecer uma perfusão usando o sedimentador para células CHO_mAb#2 em meio ActiPro fortificado, não seria cabível uma discussão sobre os efeitos de baixas CSPR sobre o crescimento e a produção, nem uma comparação com os demais equipamentos de retenção utilizados nesse trabalho. Todavia, é interessante apontar o potencial desse processo em estabelecer altas produtividades mediante a inibição do crescimento celular (WOLF et al., 2019a). Por outro lado, o acúmulo de metabólitos tóxicos desconhecidos (talvez oriundos da degradação térmica do meio) poderia afetar negativamente a produtividade específica, visto que maiores valores de q_p

foram obtidos ao se elevar as taxas de perfusão (Figura 5-21B). A discussão sobre os atributos críticos de qualidade do produto na corrida CS-1 é apresentada no item 5.3.5.

5.3.3 Corridas em perfusão utilizando o ATF

Neste trabalho, todas as corridas empregando o ATF como equipamento de retenção celular foram realizadas somente com os biorreatores da Applikon, visto a disponibilidade de uma porta de 19 mm DI para a conexão do ATF ao vaso. Serão discutidos os resultados de quatro corridas em perfusão, sendo duas com as células CHO DP-12 (corridas ATF-1 e ATF-2), e duas com as células CHO_mAb#2 (corridas ATF-3 e ATF-4). Os dados de monitoramento dos principais parâmetros físicos do cultivo são apresentados na seção de Apêndice (A1, A2, A3 e A4).

5.3.3.1 Corridas ATF-1 e ATF-2 com células CHO DP-12

A corrida ATF-1 consistiu em reduzir a taxa de perfusão utilizando TC-LECC fortificado com proporções crescentes de meio TCX2D, conforme mostrado na Tabela 5-6. O meio TCX2D foi originalmente formulado para aplicação em batelada alimentada, e estratégias de alimentação empregando esse meio foram anteriormente avaliadas por Bettinardi (2016), em que a taxa de perfusão foi reduzida à medida que a glicose no meio de alimentação foi incrementada com a fortificação com TCX2D. O fator de proporcionalidade aplicado foi a glicose relativa (Glc_{rel}), conforme mostrado na Tabela 5-6. Na corrida ATF-2, o meio TC-LECC suplementado com glutamina foi o único meio de alimentação utilizado na nesta corrida.

Tabela 5-6. Meios de alimentação empregados nas corridas ATF-1 e ATF-2 com CHO DP-12 cultivada em meio TC-LECC. “Glicose relativa (Glc_{rel})” consiste na razão entre a concentração de glicose medida nas formulações fortificadas com TCX2D e a do meio basal TC-LECC.

Corrida	Meio de alimentação	Período de aplicação (dias)	Glicose (g/L)	Glc_{rel}	Osmolalidade (mOsm/kg)	pH
ATF-1	100 % TC-LECC	2 - 11	7,72	1,0	286	7,02
	80 % TC-LECC/ 20% TCX2D	12 - 16	10,2	1,3	332	6,93
	75% TC-LECC/ 25% TCX2D	17 - 23	10,8	1,4	335	7,01
	60 % TC-LECC/ 40% TCX2D	23 - 35	12,6	1,6	373	6,99
ATF-2	100 % TC-LECC	3-31	-	-	280-295	7,2-7,5

Na corrida ATF-1, a recirculação do ATF (sem perfundir) foi iniciada logo após a inoculação com $1,8 \times 10^6$ cels/mL, portanto desde o dia 0 do cultivo. A perfusão foi iniciada no dia 2, quando a X_v era de aproximadamente $7,0 \times 10^6$ cels/mL. Na corrida ATF-2, a recirculação com o ATF foi iniciada somente no dia 3, quando foi alcançada

uma X_V de $3,0 \times 10^6$ cels/mL e imediatamente antes do acionamento das bombas de alimentação e perfundido. O meio de alimentação inicial em ambas as corridas foi TC-LECC suplementado com glutamina a 8 mM. A determinação de μ correspondente aos dois primeiros dias de operação em batelada foi, em média, de $0,8 \text{ d}^{-1}$ para ambas as corridas. Com isso, foi possível verificar que o crescimento celular não parece ser afetado pelo acionamento do ATF ou desde o início do cultivo (após a inoculação), ou somente alguns dias depois, ao iniciar a perfusão, em diferentes concentrações celulares.

A vazão de recirculação do ATF foi aumentada na corrida ATF-2 com incrementos diários de 0,1 L/min, até atingir o valor máximo de 1,4 L/min no dia 10, enquanto que, na corrida ATF-1, a vazão foi mantida constante a 0,8 L/min ao longo de todo o experimento. Essa mudança na estratégia de operação justificou-se pelo fato de que uma X_V muito superior a 40×10^6 cels/mL foi alcançada na corrida ATF-2 em comparação à corrida ATF-1, portanto com maior potencial de entupimento da membrana. Apesar de a pressão transmembrana não ter sido monitorada, a velocidade de recirculação foi aumentada de modo a aumentar a taxa de cisalhamento sobre as membranas, o que minimizaria a colmatção associada à maior concentração de células mortas e debris determinada nos estágios mais avançados do cultivo ATF-2. A taxa de cisalhamento γ calculada de acordo com Clincke et al. (2013a) foi de 3170 s^{-1} , considerando a vazão máxima aplicada de 1,4 L/min no módulo de fibras ocas da Repligen (#F2:RF02PES) usado na corrida ATF-2. Esse valor é comparável às taxas aplicadas por Clincke et al. (2013a) em perfusão com ATF e TFF, sem impactos sobre o metabolismo e produtividade de células. Maiorella et al. (1991) não reportaram perda de viabilidade de linhagens como mieloma e hibridoma para valores de γ de até 3000 s^{-1} em processos de filtração tangencial. Entretanto, como será detalhado mais adiante, apesar da taxa de cisalhamento mais alta, foi observada uma retenção de produto no biorreator de até 48% no 30º dia da corrida ATF-2, indicando que o entupimento da membrana não foi evitado.

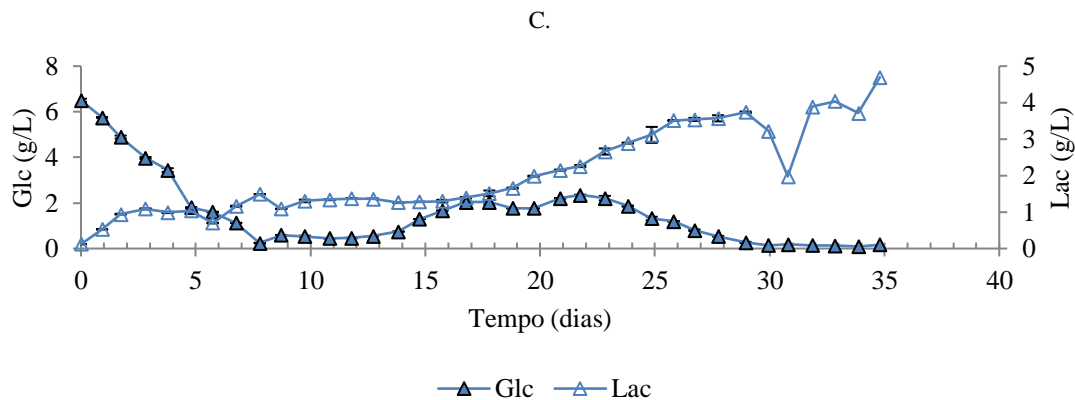
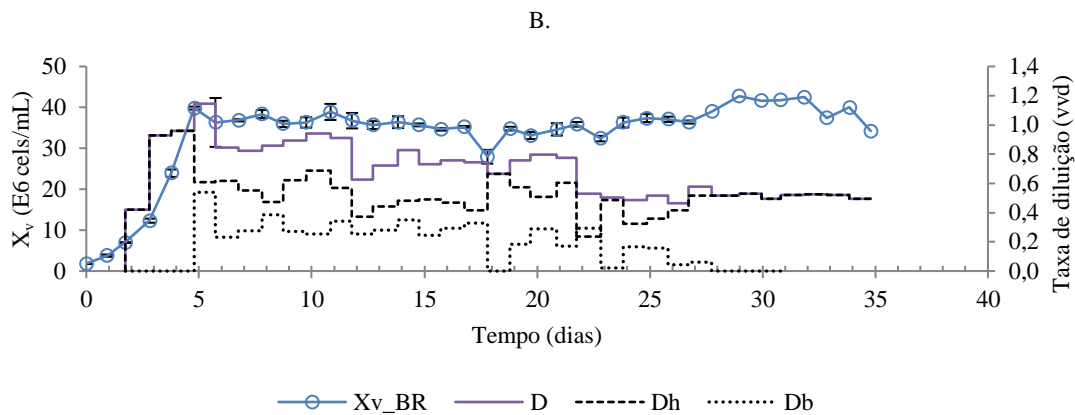
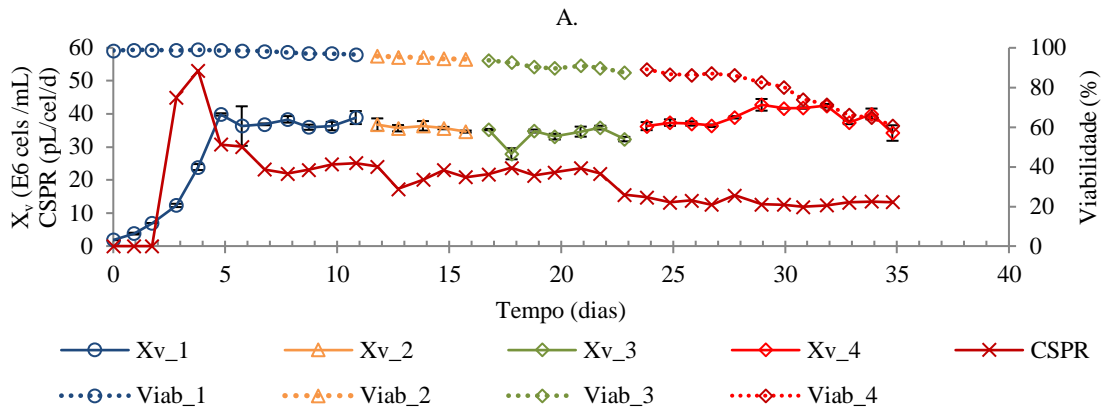
Na Tabela 5-7, são apresentados os valores médios dos principais parâmetros de crescimento e produção relativos a cada EE das corridas ATF-1 e ATF-2.

Tabela 5-7. Crescimento e produção durante os estados estacionários (EE) estabelecidos nas corridas ATF-1 e ATF-2, empregando CHO DP-12 cultivada em meio basal TC-LECC.

Nº	Meio de alimentação	EE	X _v (10 ⁶ /mL)	mAb (mg/L)	Glc (g/L)	Lac (g/L)	CSPR (pL/cel/d)	μ (d ⁻¹)	q _p (pcd)	P _v (mg/L/d)
ATF-1	0% TCX2D	1 (D5-11)	37,51± 1,51	247±33	0,90± 0,61	1,16± 0,26	26±4	0,33± 0,10	6,3±2,0	234± 64
		2 (D12-16)	35,84± 0,81	214±24	0,94± 0,52	1,31± 0,05	21±3	0,27± 0,02	4,6±0,9	161± 35
	25% TCX2D	3 (D17-22)	33,43± 2,71	228±21	2,05± 0,22	1,95± 0,45	21±3	0,21± 0,13	4,2±1,0	144± 32
		4 (D23-35)	38,87± 2,82	98±77	0,57± 0,59	3,49± 0,67	13±1	0,05± 0,12	1,0±1,2	35± 43
	ATF-2	TC-LECC	D9-15	61,46± 6,20	187±22	0,15± 0,20	0,25± 0,19	18±2	0,16± 0,08	3,3±0,6
D16-25			80,74± 9,84	125±21	0,27± 0,46	0,38± 0,31	21±3	0,12± 0,12	1,8±0,3	150± 30
D26-31			120,9± 11,4	129±9	0,05± 0,03	0,88± 0,23	18±2	0,21± 0,11	1,6±0,3	186± 22

A estratégia de alimentação adotada na corrida ATF-1 consistiu em reduzir a taxa de perfusão com meios mais concentrados a partir de uma CSPR de 25 pL/cel/d. A glicose foi adotada como o substrato de referência para determinar as taxas utilizando uma relação inversamente proporcional a Glc_{rel} (Tabela 5-6). Para uma concentração celular constante em aproximadamente 40×10^6 cels/mL, os valores de D aplicados em cada EE apresentado na Tabela 5-7 foram respectivamente $0,92 \pm 0,11$, $0,73 \pm 0,07$, $0,71 \pm 0,10$ e $0,51 \pm 0,03$ vvd (Figura 5-22B), equivalente a uma redução de CSPR de 26 para 13 pL/cel/d (Tabela 5-7). Durante o primeiro EE com meio TC-LECC, a glicose não foi limitante (Figura 5-22C), indicando a possibilidade de se utilizar esse meio a CSPR inferiores a 25 pL/cel/d. As concentrações de glicose e lactato (Figura 5-22C), assim como a taxa específica de crescimento μ (Tabela 5-7), permaneceram constantes mesmo com a redução da CSPR para 21 pL/cel/d no segundo EE, conforme esperado ao adotar a estratégia de reduzir a taxa de perfusão de acordo com uma maior concentração de glicose na alimentação. Valores similares para μ e q_p foram calculados no terceiro EE, que foi operado à mesma CSPR do segundo EE, porém com 25% de meio TCX2D, como mostra a Tabela 5-7. Contudo, neste último EE entre os dias 17-22, as concentrações de glicose e lactato aumentaram significativamente. A partir do dia 23, quando foi introduzido o meio mais concentrado, o crescimento e a produtividade específica caíram drasticamente. A viabilidade reduziu para aproximadamente 60% no dia 35 (Figura 5-22A), mesmo para uma X_v constante. Uma concentração de lactato superior a 4 g/L foi determinada no último EE (Figura 5-22B), uma condição também reportada por Bettinardi (2016) para CHO DP-12 em uma perfusão alimentada com 50% de TCX2D na composição do meio de alimentação. A expressiva queda na viabilidade e produtividade estaria relacionada ao

aumento da osmolalidade que, apesar de não monitorada na corrida ATF-1, tem efeito negativo sobre a cultura celular, conforme anteriormente demonstrado pela autora (BETTINARDI, 2016). O aumento da osmolalidade pode também acelerar a taxa de produção de lactato (HOSHAN et al., 2019; OZTURK; PALSSON, 1991). O desempenho do cultivo celular também foi seriamente afetado em termos de formação de produto: o título de anticorpo ao longo do último EE, aplicando uma taxa de perfusão de 0,5 vvd com meio TC-LECC contendo 40% de TCX2D por um período de 12 dias, caiu progressivamente até chegar a zero (Figura 5-22D).



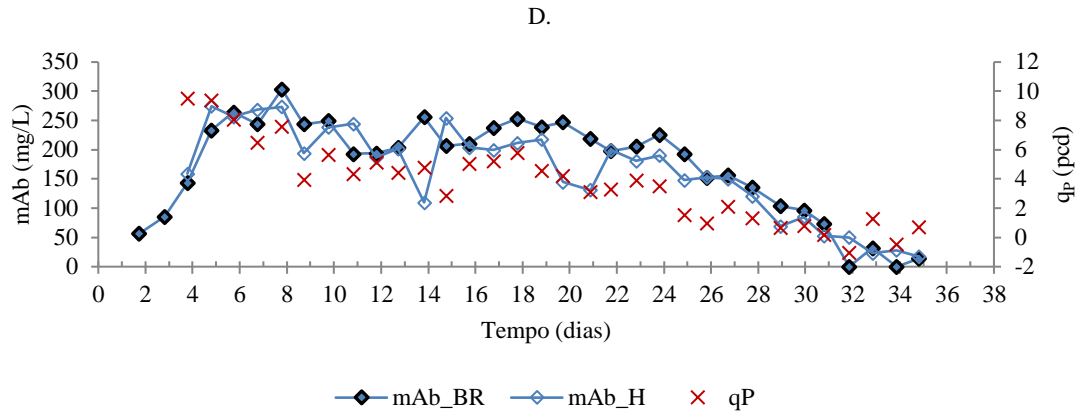
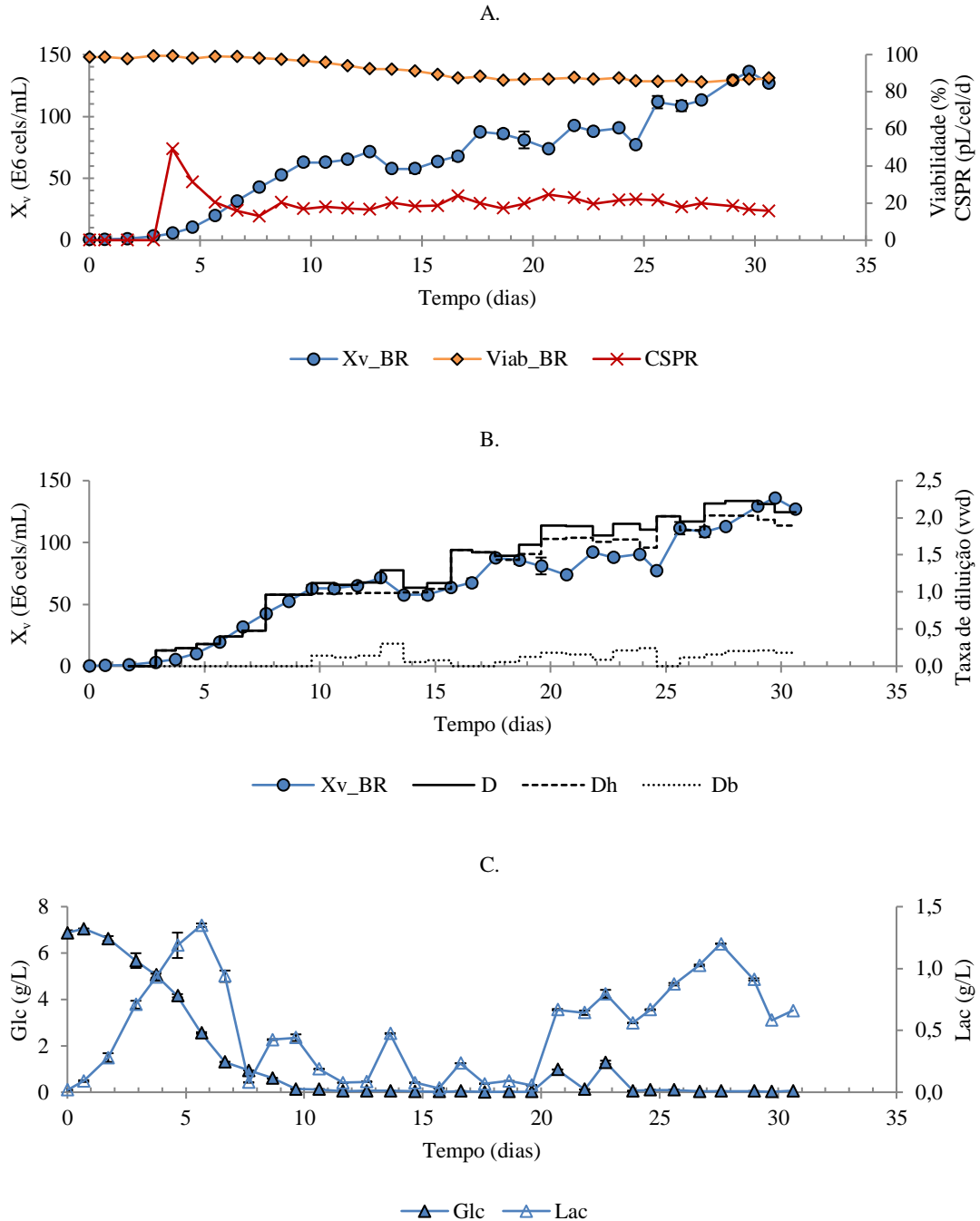


Figura 5-22. Corrida ATF-1, perfusão com ATF com CHO DP-12 usando quatro meios de alimentação, com o meio basal TC-LECC fortificado com TCX2D. A) concentração celular (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e viabilidade medidas no biorreator (BR), e CSPR; B) taxas de diluição da alimentação (D_H), perfundido (D_H) e bleeding (D_B); C) glicose e lactato (média±desvio-padrão, duplicata analítica); D) perfis de anticorpo medido em biorreator e perfundido, e de produtividade específica.

Uma vez que a aplicação do meio TC-LECC sem fortificação a uma CSPR de 25 pL/cel/d não havia resultado na corrida ATF-1 em uma condição limitante em termos de glicose, e considerando os resultados obtidos a uma CSPR de 18 pL/cel/d também com TC-LECC na corrida CS-1 (Tabela 5-5), a estratégia de redução em D usando somente o meio basal foi adotada na perfusão seguinte com o ATF (corrida ATF-2). Entre os dias 9 e 31 da corrida ATF-2, o meio TC-LECC foi alimentado a uma CSPR de 19 ± 3 pL/cel/d. Para manter a CSPR constante ao longo da perfusão, a taxa de perfusão foi aumentada à medida que maiores valores de X_V no biorreator foram obtidos. Com essa estratégia de alimentação, foi observada uma depleção total de glicose e lactato entre os dias 9 e 20, como mostrado na Figura 5-23C. Foram aplicados três valores distintos de D: entre os dias 9-15, a $1,1 \pm 0,1$ vvd; dias 16-24, a $1,5 \pm 0,2$ vvd; e dias 25-31, a $2,1 \pm 0,2$ vvd (Figura 5-23B). A remoção de células por *bleeding* foi realizada a uma taxa entre 0,05 e 0,23 vvd a partir do dia 9. Entretanto, como essa taxa de remoção ainda se mostrou inferior à taxa específica de crescimento, a X_V aumentou ao longo da corrida, atingindo 120×10^6 cels/mL no dia 31 (Figura 5-23A).

O valor máximo de X_V alcançado foi de 136×10^6 cels/mL no dia 30, resultado semelhante ao obtido por Clincke et al. (2013a), de 132×10^6 cels/mL para cultivo de células CHO produtoras de IgG1, e por Duvar et al. (2013), de 130×10^6 cels/mL. Todavia, além da alta taxa de perfusão necessária para atingir a elevada concentração celular (6 vvd), problemas na operação do ATF também foram reportados por Clincke et al. (2013a), o que não permitiu estabilizar a perfusão a altas concentrações (CLINCKE et al., 2013a). Especificamente, os autores afirmaram que o vácuo aplicado foi insuficiente para

alternar os ciclos de pressurização e exaustão sobre o diafragma do ATF, devido à alta viscosidade da suspensão celular. Na corrida ATF-2, não foram constatadas falhas no funcionamento do ATF durante toda a sua operação em perfusão e com uma concentração celular superior a 100×10^6 cells/mL, mantida a uma taxa de perfusão aproximadamente três vezes menor.



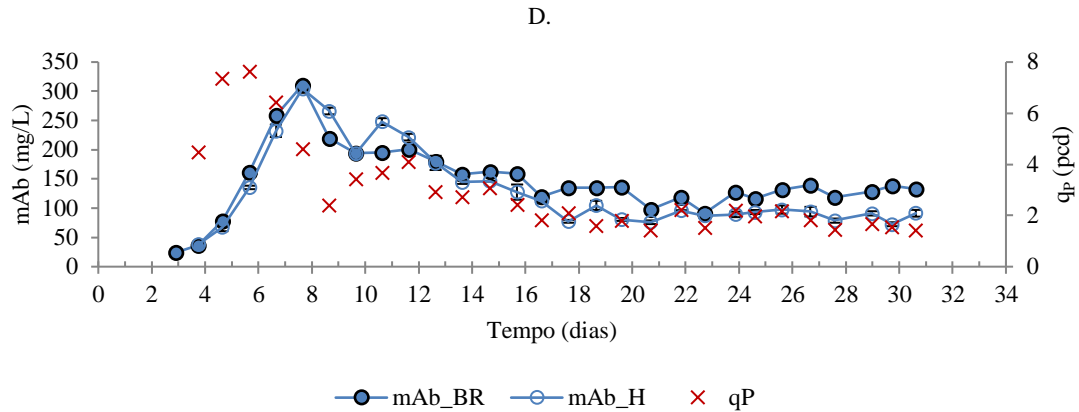


Figura 5-23. Corrida ATF-2: perfusão com ATF, CHO DP-12 em meio TC-LECC. A) concentração e viabilidade medidas no biorreator (BR), e CSPR; B) taxas de diluição da alimentação (D_H), perfundido (D_H) e bleeding (D_B); C) perfis de glicose e lactato; D) perfil de anticorpo medido em biorreator e perfundido (média \pm desvio-padrão, duplicata analítica), e produtividade específica.

Por outro lado, o controle de DO a 30% da saturação do ar mostrou-se desafiador, principalmente a partir do dia 21, em que X_{vs} maiores do que 80×10^6 cells/mL foram estabelecidas. O acúmulo de lactato observado a partir do dia 21 (Figura 5-23C) poderia estar relacionado a situações temporárias de anaerobiose no biorreator decorrentes de falhas no controle de DO (Apêndice A2), fato que também foi observado na corrida HC-3 (5.2.3) e na batelada alimentada com CHO DP-12 (5.3.1) em situações pontuais de aeração interrompida. As estratégias de aeração se limitaram à injeção de oxigênio puro de até 0,3 vvm através de um aerador macroporoso combinada com introdução de ar pela superfície (*overlay*). A agitação foi efetuada com um impelidor de pás inclinadas com 4,5 cm de diâmetro, a um valor máximo de 375 rpm. A título de comparação, a taxa de aeração máxima de aproximadamente 0,25 vvm é recomendada para aeradores macroporosos sustentarem concentrações celulares na ordem de 10^8 cells/mL (OZTURK, 1996), enquanto que frequências de agitação correspondentes a velocidades na ponta do impelidor (u_{tip}) entre 1-2 m/s já foram avaliadas para hibridoma em biorreatores de bancada (FENGE; LÜLLAU, 2006). Na corrida ATF-2, o valor máximo de u_{tip} para as condições empregadas foi estimado em apenas 0,88 m/s, o que sugeriu a possibilidade de utilizar uma frequência de agitação de, no mínimo, 425 rpm. No entanto, o cálculo de u_{tip} não considerou outras informações importantes na caracterização da mistura, como, por exemplo, o tipo de impelidor e a energia aplicada (PLATAS BARRADAS et al., 2012). Além disso, a sensibilidade ao cisalhamento é uma característica inerente à linhagem celular, podendo variar inclusive de acordo com as características do clone selecionado (MA; MOLLET; CHALMERS, 2003).

A queda da viabilidade celular na corrida ATF-2 foi superior em comparação à corrida com o sedimentador inclinado (corrida CS-1), estabilizando-se em 87% a partir do dia 17 (Figura 5-23A). As condições hidrodinâmicas ditadas pela aeração, além do fato de o ATF não promover uma remoção seletiva de células mortas a exemplo do sedimentador e do hidrociclone, poderiam justificar uma queda de viabilidade mais acentuada em comparação aos cultivos com outros equipamentos de retenção celular.

Os perfis de concentração de mAb determinados em amostras coletadas do biorreator e do perfundido mostraram um pico de aproximadamente 300 mg/L no dia 8, seguido por uma redução e estabilização a partir do dia 16 (Figura 5-23D). A produção de anticorpo não acompanhou o perfil de concentração celular, sendo que para uma X_v em torno de 120×10^6 cels/mL, a concentração de mAb se estabilizou em apenas 100 mg/L aproximadamente. A determinação dos valores de q_p ao longo do cultivo indicaram, a exemplo da corrida HC-4, uma redução na produtividade específica das células CHO DP-12 (Figura 5-23D). Apesar da redução de q_p de aproximadamente 4 para 1 pcd, a elevada concentração celular obtida compensou a baixa produtividade das células, sendo estabelecida uma produtividade volumétrica de 190 mg/L/dia (Tabela 5-7), cerca de 50% menor em comparação à corrida com o sedimentador. A queda em q_p também foi constatada por Karst et al. (2016) em experimentos com ATF e TFF, fato atribuído a uma possível instabilidade da linhagem CHO utilizada ou à composição não-otimizada do meio de produção. Todavia, no presente trabalho, o período entre o descongelamento de um criotubo (proveniente de um único banco de trabalho) e a expansão do inóculo foi o mesmo (7-10 dias), para ambas as corridas com ATF e sedimentador. Portanto, a possibilidade de instabilidade genética da linhagem ao longo do cultivo estaria, a princípio, descartada, já que não houve redução de q_p no experimento com o sedimentador.

A depleção de glicose e lactato observada nas corridas ATF-1, CS1 e HC-4 (esta devido à obstrução acidental do *overflow*) poderia, a princípio, justificar a baixa produtividade. Entretanto, a glicose e o lactato foram também totalmente consumidos a partir do dia 23 na corrida CS-1 com o sedimentador e, em contraste às corridas ATF-1 e HC-4, não foi observada uma queda significativa em q_p . A redução em q_p poderia ser associada ao acúmulo de lactato detectado a partir do dia 21, relação anteriormente discutida no item 5.2.4.

As diferenças entre as concentrações de mAb medidas no biorreator e no perfundido sugerem a ocorrência de retenção de produto no biorreator, tornando-se

moderadamente severa (~30%) a partir do dia 24 do cultivo. Apesar da alta taxa de recirculação no ATF, a qual poderia promover um maior cisalhamento a fim de remover o material biológico sobre a superfície das membranas, a ocorrência de entupimento foi observada. Este aumento da retenção de produto com o tempo é um situação operacional relatada na literatura para o ATF, sendo normalmente sanada com a substituição do cartucho de fibras ocas por um novo (CASTILHO, 2015; SCHWARZ et al., 2020). A retenção de produto em processos que empregaram o ATF também foi observada por outros autores e para diferentes produtos. Kudugunti et al. (2017) associaram esse fenômeno ao acúmulo de partículas (debris) com diâmetro próximo a 0,2 μm liberados por células mortas. Kim et al. (2016b) concluíram que o controle da pressão transmembrana poderia minimizar a retenção de Fator VIII em perfusão com o ATF, evitando adsorção da proteína à membrana ou ocorrência de entupimento no sistema. Uma retenção significativa foi determinada em estágio tardio em uma produção de partículas pseudo-virais de Zika em perfusão com esse mesmo equipamento (ALVIM; ITABAIANA; CASTILHO, 2019). Clincke et al. (2013b) e Kudunguti et al. (2017) observaram níveis de retenção do produto entre 40% e 60% em condições semelhantes ao presente trabalho, para cultivos com células CHO a 10^8 cels/mL, e empregando membranas com poro de 0,2 μm . Entretanto, Karst et al. (2016), ao comparar o ATF ao TFF utilizando membranas com poro de 0,5 μm , observaram uma retenção de até 50% somente para o TFF, atribuída ao fluxo unidimensional de recirculação aplicado ao equipamento e que seria pouco eficaz em remover o material biológico depositado sobre as membranas. Ainda segundo esses autores, a menor retenção poderia ser decorrente da utilização de fibras com poro maior (0,5 μm) em ambos os sistemas, ou ainda, ao baixo fluxo de permeado (0,4 L/h/m²). No presente trabalho, considerando uma vazão de perfundido média de 1,9 L/d entre os dias 24-31 e a área filtrante disponível (0,13 m²), o fluxo de permeado calculado foi de, aproximadamente, 0,6 L/h/m². Esse fluxo é muito inferior a valores de referência recomendados para a clarificação de mAbs entre 30 e 50 L/h/m² (GE HEALTHCARE, 2008), embora clarificação e retenção celular ao longo de uma perfusão sejam operações bem distintas. A presença de uma elevada concentração de debris (WANG et al., 2017) e uma maior viscosidade do meio decorrente da liberação do conteúdo intracelular como o DNA (MERCILLE et al., 1994) contribuem significativamente no estabelecimento de um entupimento progressivo, especialmente à medida que a viabilidade da cultura celular diminui (MAIORELLA et al., 1991), como observado na Figura 5-24. Os maiores percentuais de retenção de mAb foram

determinados na corrida ATF-2 a partir do dia 17 (Figura 5-24B), quando a concentração média de células não-viáveis foi de 16×10^6 cels/mL. A retenção de produto também foi observada na corrida ATF-1, mas a princípio sem o comportamento irreversível observado na corrida ATF-2.

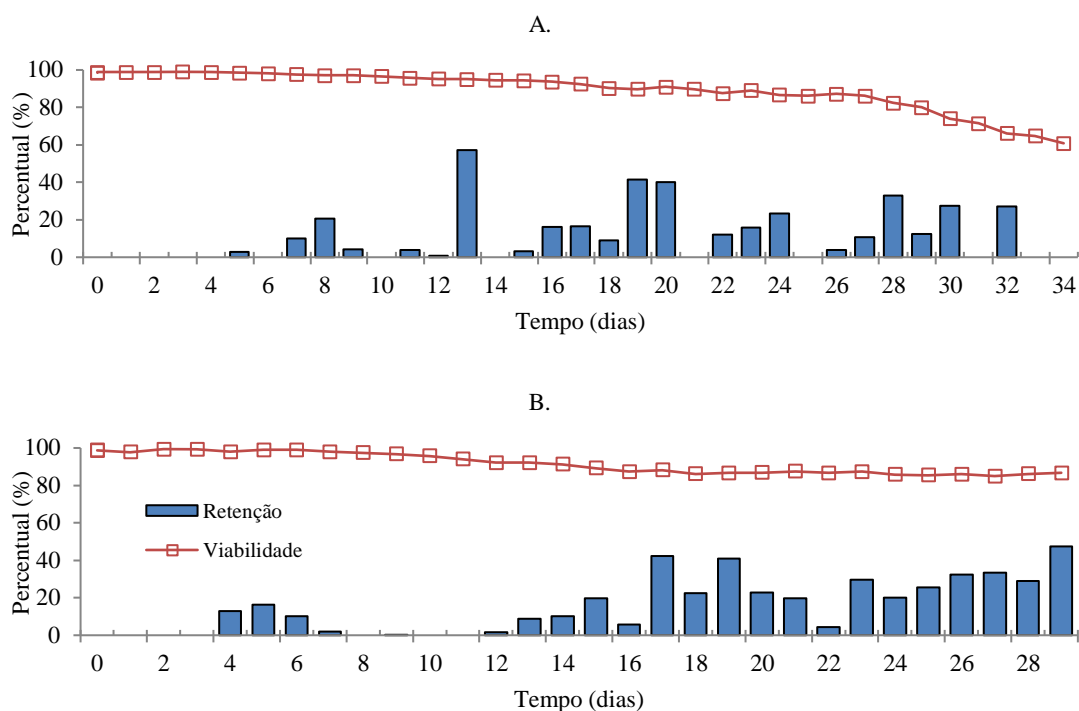


Figura 5-24. Retenção de mAb no biorreator nas corridas ATF-1 (A) e ATF-2 (B) utilizando o ATF com a membrana comercial da Repligen (#F2:RF02PES).

5.3.3.2 Corridas ATF-3 e ATF-4 com células CHO_mAb#2

Nas corridas ATF-3 e ATF-4, a mesma especificação de membrana (#F2:RF02PES) usadas nas corridas ATF-1 e ATF-2 foi empregada, mas para o cultivo de células CHO_mAb#2. A taxa de recirculação usada foi de 1 L/min. Os volumes de trabalho adotados foram de 2 (vaso de 7 L) e 1 L (vaso de 3 L), respectivamente. A configuração do biorreator e os parâmetros de controle adotados foram os mesmos, exceto o pH (6,8 na corrida ATF-3, e 7,1 na corrida ATF-4). O pH mais baixo foi adotado na corrida ATF-3 para inibir o acúmulo de lactato (LISTE-CALLEJA et al., 2015). O meio ActiPro fortificado com CB1 e CB3 foi o meio de alimentação utilizado.

A concentração de células viáveis foi determinada tanto por medidas *off-line* com um contador automático (ViCell) quanto *in-line* com um sensor de capacitância (Fogale Nanotech, França) compatível com ambos os tamanhos de vaso Applikon utilizados (3 e 7 L). A medida de capacitância apresenta correlação com a concentração de células

viáveis, cuja membrana é intacta. Essa ferramenta tem sido amplamente empregada para o monitoramento da biomassa, tanto em cultivos em suspensão quanto em experimentos em que não é possível determinar a concentração de células suspensas (ZHANG et al., 2015). Além disso, é possível controlar a taxa de *bleeding* de acordo com os valores de X_V obtidos pelo monitoramento em tempo real (BIELSER et al., 2018). A Figura 5-25 apresenta os valores de X_V determinados por ambos os métodos para as corridas ATF-3 e ATF-4, sendo plotados somente os valores de permissividade registrados no momento da amostragem do biorreator. Uma alta correlação (R^2 superior a 0,90) foi determinada entre as metodologias de contagem para ambos os conjuntos de dados, apesar dos desvios observados entre os dias 8 e 12 (corrida ATF-3) e pontualmente no dia 9 (corrida ATF-4).

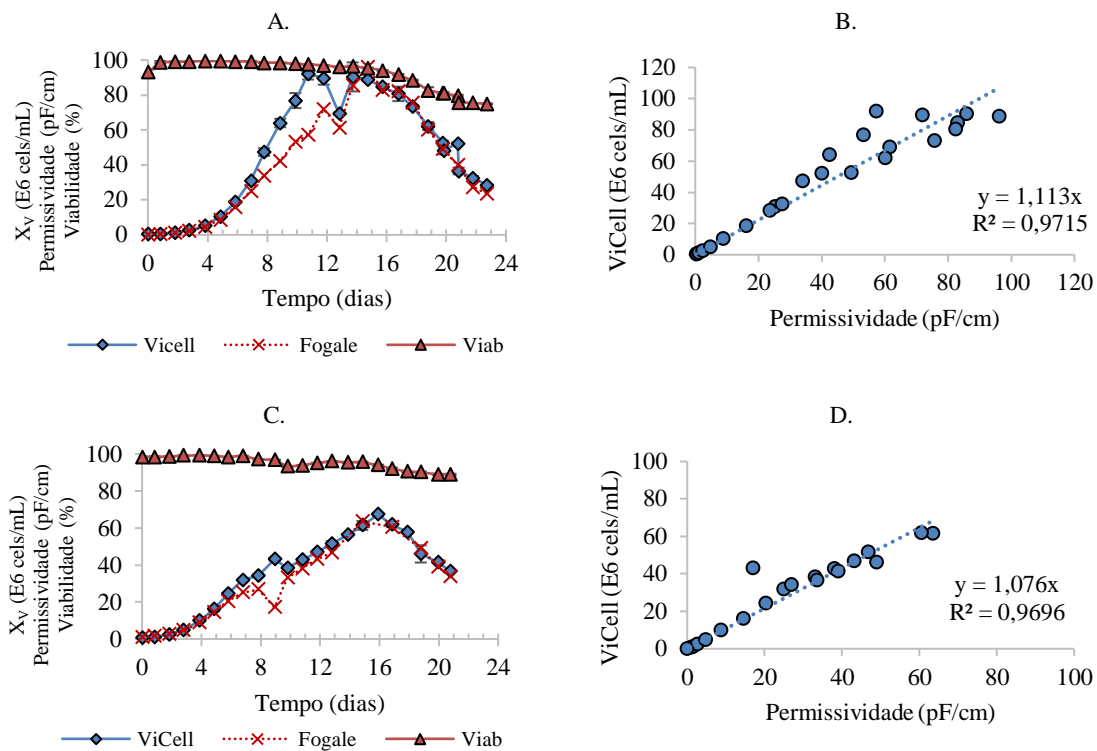
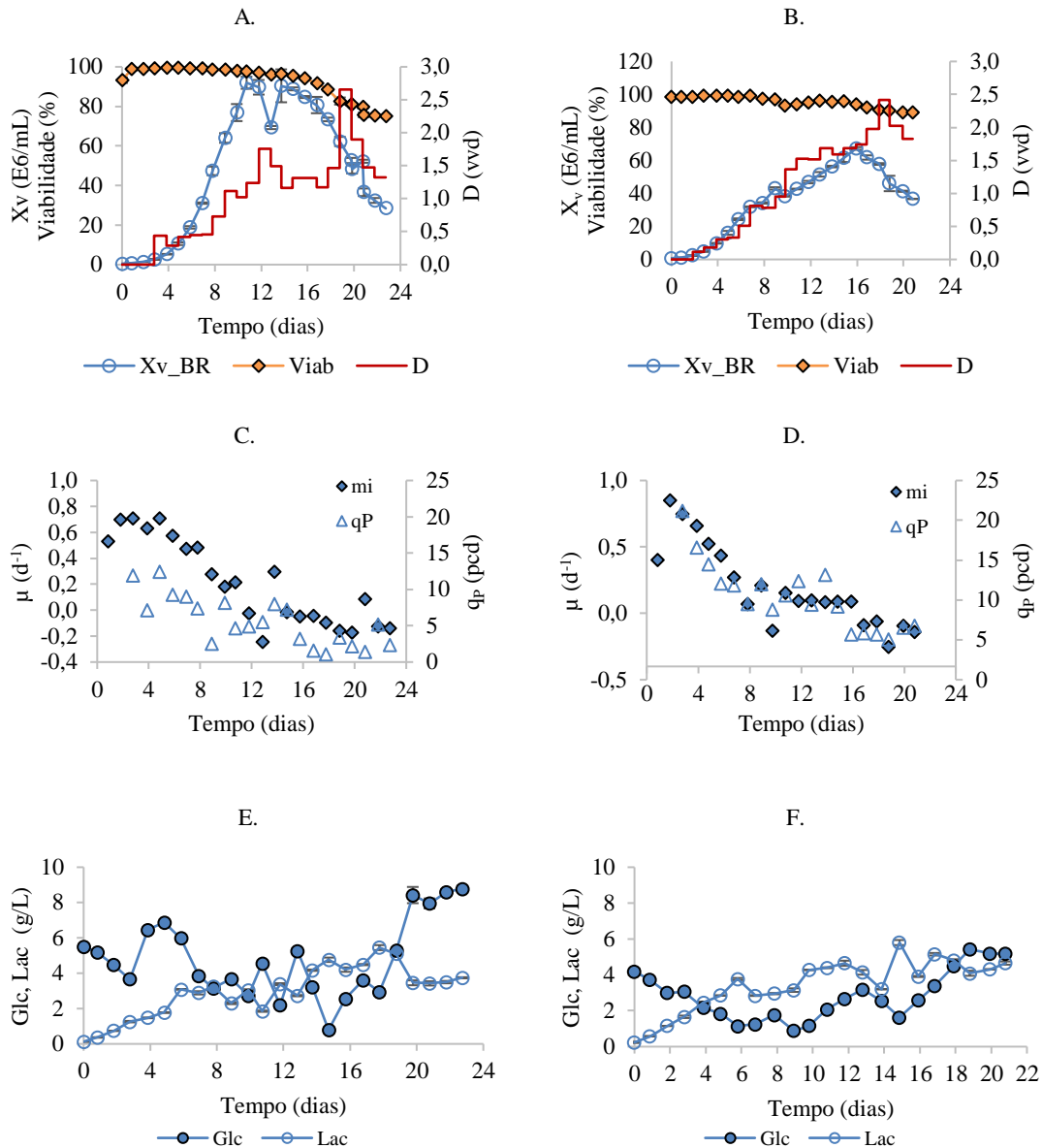


Figura 5-25. Valores de X_V obtidos com ViCell (média±desvio-padrão, duplicata analítica) e sensor de capacitância Fogale nas corridas ATF-3 (A,B) e ATF-4 (C,D) com o ATF O fator de conversão padrão de $1 \text{ pF/cm} \equiv 10^6 \text{ cels/mL}$. São apresentados apenas os valores de permissividade registrados no momento da amostragem com o ViCell, visto que não foi possível gravar o monitoramento completo por limitações técnicas do computador de aquisição de dados.

Os valores máximos de X_V obtidos foram, respectivamente, de 93×10^6 e 67×10^6 cels/mL nas corridas ATF-3 e ATF-4 (Figura 5-26A/B). A redução de μ foi mais rápida na corrida ATF-4 em comparação à corrida ATF-3 após o início da perfusão (Figura 5-26C/D). No entanto, entre os dias 11 e 13 (corrida ATF-4), os valores de μ se

estabilizaram em aproximadamente $0,1 \text{ d}^{-1}$ com a aplicação de uma CSPR de, em média, $30 \pm 3 \text{ pL/cel/d}$ (Figura 5-26H). O pico de concentração celular foi atingido ao final dessa condição. Em seguida, o crescimento celular cessou, mesmo com o aumento da CSPR para valores acima de 40 pL/cel/d . Um perfil semelhante de interrupção de crescimento foi observado na corrida ATF-3, com a diferença de que a CSPR aplicada ao se atingir a X_v máxima foi menor ($\sim 16 \text{ pL/cel/d}$).



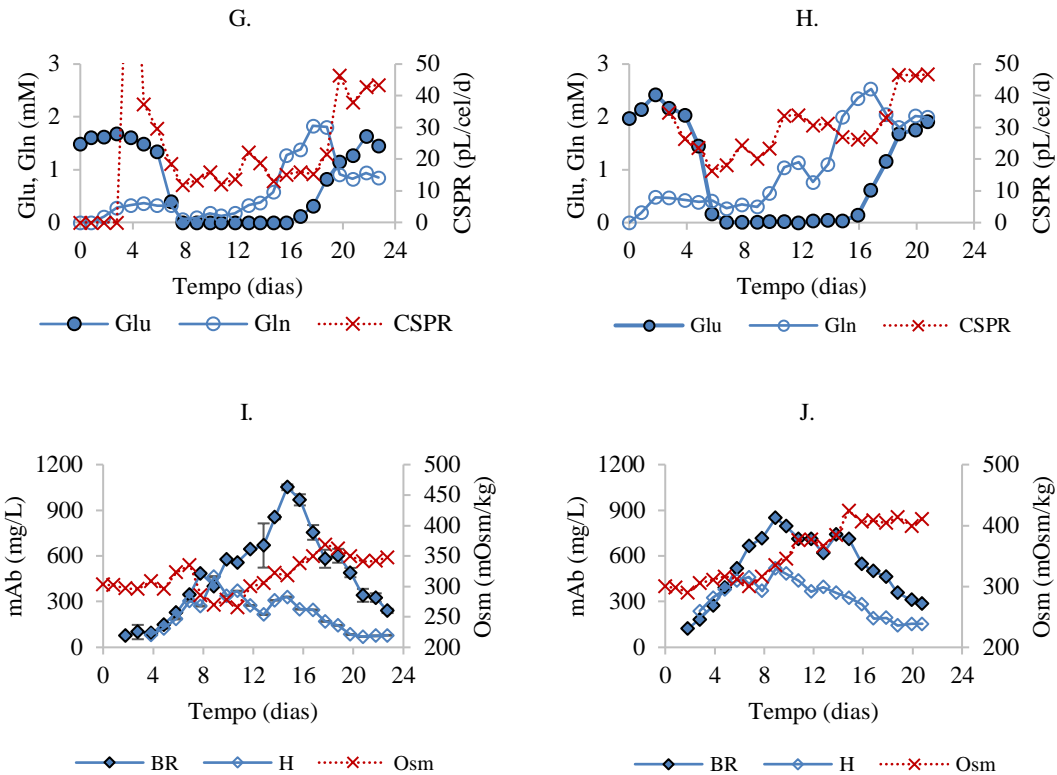


Figura 5-26. Perfusão com células CHO_mAb#2 utilizando o ATF como equipamento de retenção em biorreator de bancada. Concentração celular (medição off-line), viabilidade e taxa de diluição, corridas ATF-3 (A) e ATF-4 (B). Taxas específicas de crescimento e produtividade, corridas ATF-3 (C) e ATF-4 (D). Perfis de glicose e lactato, corridas ATF-3 (E) e ATF-4 (F). Concentração de glutamato e glutamina, corridas ATF-3 (G) e ATF-4 (H); em (G), a CSPR entre os dias 3 e 4 foi avaliada em 115 pL/cel/d. Concentração de mAb medida em biorreator (BR) e perfundido (H), corridas ATF-3 (I) e ATF-4 (J). Dados de X_v , Glc, Lac e mAb apresentados como média \pm desvio-padrão, duplicata analítica.

Não foi observada a depleção de glicose nem de lactato em ambas as corridas (Figura 5-26E/F). Entretanto, o glutamato foi exaurido entre os dias 8-16 e 7-15 respectivamente nas corridas ATF-3 e ATF-4, como mostrado na Figura 5-26 (G/H). A depleção de glutamato foi determinada mesmo ao se aplicar uma CSPR duas vezes maior na corrida ATF-4 (~30 pL/cel/d) em comparação à corrida ATF-3. Contudo, não houve recuperação no crescimento celular para concentrações de glutamato maiores do que zero obtidas com o aumento da CSPR para 40 pL/cel/d em ambos os processos. A irreversibilidade da morte celular poderia sugerir a limitação de um outro substrato que não a glicose nem o glutamato, ou o acúmulo de um subproduto não identificado. Entretanto, a interrupção de crescimento da mesma linhagem celular não foi observada nas corridas HC-5 (item 5.2.4) e HC-6 (item 5.3.4) com o hidrociclone, exceto quando uma CSPR de apenas 7 pL/cel/d foi aplicada na corrida HC-5. O crescimento celular estaria diretamente associado ao fato de que o hidrociclone promove uma eliminação de células naturalmente pelo perfundido, o que também ocorre no sedimentador inclinado a

uma eficiência reduzida muito maior. O ATF, no entanto, promove a retenção de 100% tanto de células viáveis quanto não viáveis. Para remover parte das células mortas, foram efetuados *bleedings* na corrida ATF-3 de aproximadamente 0,1 vvd nos dias 12 e 20, e de 0,2 vvd no dia 21. No dia 12, foi empregada uma bomba para a remoção contínua ao longo de 24 h das células do biorreator, ao passo que nos dias 20 e 21, o volume de *bleeding* foi removido em uma única etapa, com o reestabelecimento do volume de trabalho com o meio de alimentação. No primeiro caso, a bomba de *bleeding* não removeu todo o volume necessário e, com isso, o volume do biorreator aumentou, diluindo as células para $\sim 69 \times 10^6$ cels/mL (Figura 5-26A). Na segunda remoção de células, houve uma pequena recuperação na X_v (de 48×10^6 para 52×10^6 cels/mL). Já no terceiro caso, ao se aplicar uma taxa maior de *bleeding*, não foi observada uma recuperação no crescimento celular.

Em ambas as corridas, não foi observado o *shift* metabólico do lactato, sendo observados acúmulos de até 6 g/L (Figura 5-26E/F). A concentração de lactato foi ligeiramente menor na corrida ATF-3, cujo pH foi controlado em 6,8. Esses resultados estão de acordo com os obtidos na corrida HC-3 (pH controlado a 7,1). A adição contínua de base pode ter contribuído para o acúmulo de lactato para esse sistema (CHO_mAb#2/ActiPro), visto que, em oposição a esses dados, a concentração de lactato limitou-se a apenas 2 g/L na corrida HC-5, na qual o pH não foi controlado. Uma possível causa para a limitação de crescimento seria a estratégia de controle de pH baseada na adição de base, a qual juntamente com o lactato acumulado, contribuiu para o aumento da osmolalidade superior a 350 mOsm/kg (Figura 5-26I/J). Uma vez que a adição de base contribui para o aumento de osmolalidade (OZTURK, 1996) e, por conseguinte, para maiores taxas de formação de lactato, isto pode ter prejudicado o crescimento celular. Com o objetivo de reduzir o consumo de base e melhorar o desempenho do processo, alternativas de controle de pH em que a alcalinização do meio é mediada por uma maior taxa de remoção de CO₂ do cultivo vêm sendo propostas (HOSHAN et al., 2019; XU; CHEN, 2016). Sobre o impacto na produtividade, foi observada uma diminuição em q_p ao longo das corridas ATF-3 e ATF-4 (Figura 5-26C/D), principalmente na corrida ATF-3. Esses resultados se opõem àqueles observados nos cultivos HC-3 (com pH controlado em 7,1, vide Figura 5-12H) e HC-5 (pH sem controle, vide Figura 5-16E) utilizando o hidrociclone e, sobretudo, no cultivo com o sedimentador (corrida CS-2). Entretanto, considerando que no cultivo CS-2 também houve redução de crescimento, mas com menor acúmulo de lactato (< 3 g/L), uma possível causa para a redução na produtividade

nos cultivos ATF-3 e ATF-4 seria o controle de pH ineficiente combinado a uma baixa taxa de perfusão, a qual reduziu a eliminação de subprodutos tóxicos do biorreator. Na corrida ATF-4, os maiores valores de q_p foram determinados para CSPRs superiores a 30 pL/cel/d, a exemplo dos dias 3-6 e 10-16. Entretanto, q_p não aumentou na fase final de ambos os cultivos, quando a CSPR foi incrementada na tentativa de recuperar o crescimento celular.

Apesar das elevadas concentrações máximas de anticorpo determinadas no biorreator nas corridas ATF-3 e ATF-4 (~1 e 0,85 g/L, respectivamente, vide Figura 5-26 I/J), a retenção do produto no biorreator devido ao entupimento da membrana resultou em uma menor produtividade global em ambos os processos. No geral, o desempenho das corridas ATF-3 e ATF-4 se assemelhou ao de uma batelada alimentada parcial, em que uma máxima concentração celular foi alcançada após 15 dias, seguida por um decaimento, além da retenção parcial de produto no biorreator. Esse comportamento (redução de crescimento acompanhada por retenção de produto) também foram observados por Gagnon et al. (2018) para processos em perfusão operados com TFF (poro de 0,2 μ m) e mantidos a taxas de CSPR muito baixas (<10 pL/cel/d) na fase produtiva durante a fase de produção da perfusão.

5.3.4 Corrida HC-6: perfusão com dois equipamentos de retenção (ATF e HC)

A corrida HC-6 teve como objetivo avaliar o desempenho do hidrociclone para suspensões com X_v superiores a 50×10^6 cels/mL, que foi a máxima concentração obtida usando esse equipamento (corrida HC-3, item 5.2.3). Para isso, tanto o ATF quanto o HC foram instalados no biorreator (vaso de 7 L), com o objetivo de usar o ATF para atingir altas concentrações celulares e, depois, passar a usar o HC para realizar a perfusão. Assim como nas corridas HC-4 e HC-5, o hidrociclone foi instalado por meio de um adaptador rosqueável compatível com a porta de 19 cm na tampa do vaso (Figura 5-27). Assim, não foi necessário construir uma linha de reciclo, e as células separadas no *underflow* foram descarregadas diretamente dentro do biorreator, preservado a forma de descarga em guarda-chuva. O cultivo foi realizado com células CHO_mab#2, alimentado com meio ActiPro fortificado com CB1 e CB3.

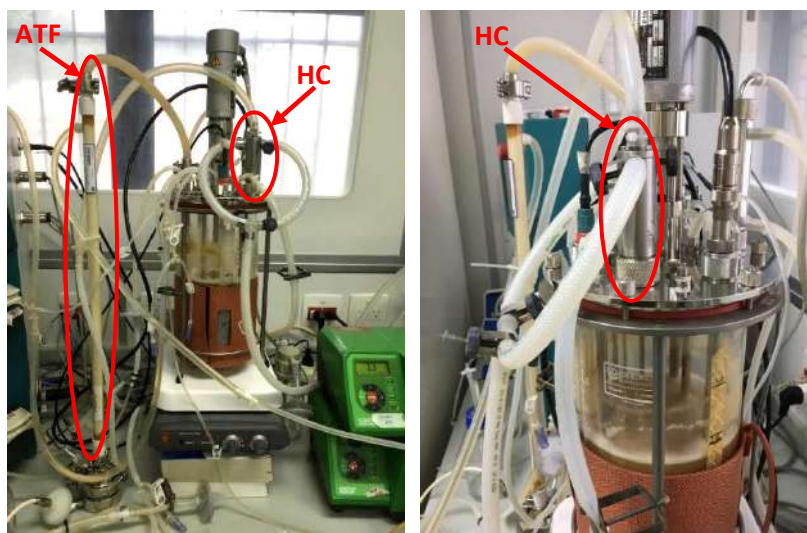
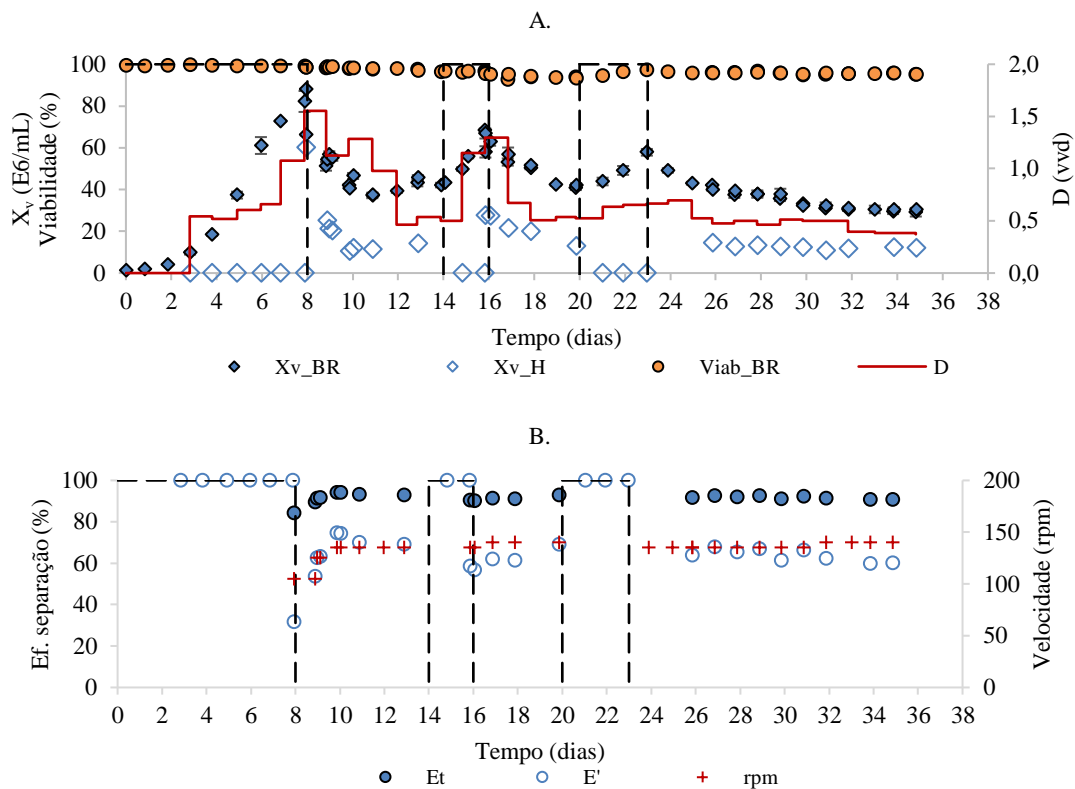


Figura 5-27. À esquerda: o biorreator Applikon com o ATF e o HC2015 acoplados como equipamentos de retenção celular. À direita: em primeiro plano, o HC instalado na tampa no biorreator por meio de um adaptador com 19 mm de diâmetro interno.

A corrida foi iniciada a uma X_v de $1,1 \times 10^6$ cels/mL com o ATF recirculando desde o dia 0 a 1 L/min. A perfusão foi iniciada no dia 3 utilizando o ATF, e mantida com esse equipamento até o dia 8. A partir do dia 8, foi iniciada a operação intermitente do hidrociclone. As bombas de alimentação do HC e de meio funcionaram de forma independente e, para isso, foram utilizados dois temporizadores, um para cada bomba. Do mesmo modo que as corridas HC-4 e HC-5, a bomba do HC foi acionada em intervalos de um minuto, enquanto que a bomba de alimentação foi sincronizada para ligar imediatamente após cada ciclo do hidrociclone durante 5 – 7 minutos, introduzindo meio fresco a uma vazão de aproximadamente 0,083 L/min. Essa estratégia foi adotada para que o enchimento do biorreator ocorresse no menor intervalo possível e, de maneira geral, mostrou-se robusta, uma vez que poucas variações no volume de trabalho do biorreator (3,5 L) foram observadas.

No dia 8, quando foi atingida uma X_v de 82×10^6 cels/mL com uma viabilidade de 99%, o ATF foi interrompido, e o hidrociclone foi operado durante 3 minutos a 105 rpm ($\Delta P \sim 1$ bar). Nesse caso, o HC foi operado por um período mais longo para que o volume do biorreator diminuísse o suficiente para que o tubo pescador do ATF ficasse exposto ao ar e, assim, a suspensão residual dentro do ATF (cerca de 0,1 L) retornasse ao biorreator. A bomba de alimentação de meio foi acionada em seguida por 15 minutos, até o enchimento do biorreator. Na operação do HC, a concentração celular medida no biorreator antes do reabastecimento com meio de cultivo aumentou para 88×10^6 cels/mL oriunda do reciclo de células pelo *underflow*, enquanto que a concentração medida no

overflow foi de 60×10^6 cels/mL (Figura 5-28A). Para esse valor de X_V , e considerando o diâmetro celular médio, a concentração volumétrica foi estimada em 19%. Como esperado, um maior teor de sólidos resultou em menores eficiências de separação, sendo calculada uma eficiência reduzida E' de apenas 31,7% (Figura 5-28B). A eficiência total estimada foi de 84%, considerando um valor de R_f de 77%. Após o reabastecimento do reator com meio de alimentação, a concentração de células viáveis no reator diminuiu para 66×10^6 cels/mL. Entre os dias 8 e 9, o hidrociclone foi operado por 1 minuto a cada 2 horas, a uma velocidade de 125 rpm na bomba de alimentação do HC, resultando em uma taxa de diluição de 1,1 vvd ou uma CSPR de 17 pL/cel/d. Entretanto, a X_V no biorreator caiu para 51×10^6 cels/mL. A concentração celular estabilizou-se em 40×10^6 cels/mL entre os dias 10 e 14 (Figura 5-28A), que também correspondeu à máxima X_V obtidas nas corridas HC-4 e HC-5 em biorreator de bancada operando com o HC.



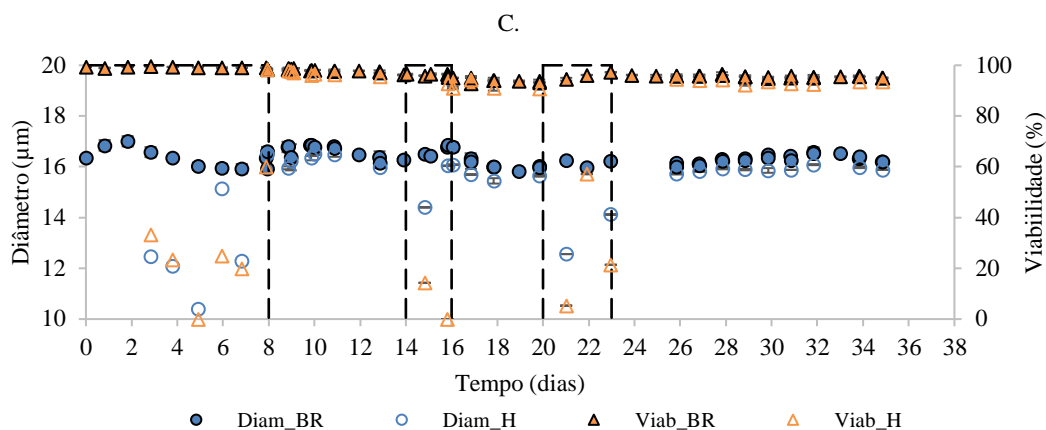


Figura 5-28. Perfusão HC-6 com CHO_mAb#2 em meio ActiPro utilizando dois equipamentos de retenção celular (ATF e HC2015) em um biorreator Applikon. O ATF foi operado nos intervalos entre os dias 0-8, 14-16 e 20-23 (áreas delimitadas pelas linhas tracejadas). A) concentração celular medida em biorreator (BR) e perfundido (H) (média±desvio-padrão, duplicata analítica); B) eficiência de separação; as velocidades rotacionais (rpm) referem-se à bomba de alimentação do HC; C) diâmetro e viabilidade celular medidos em biorreator e perfundido.

Devido aos ajustes na rotação da bomba do HC, as taxas de CSPR obtidas oscilaram entre 28 e 12 pL/cel/d entre os dias 10 e 14. Entre os dias 12 e 14, o processo foi mantido a uma CSPR de 12 pL/cel/d com o HC operando com rotação de 135 rpm. Nesse experimento, não foi possível instalar o manômetro próximo às portas de alimentação de HC devido à impossibilidade de autoclavá-lo. Portanto, as velocidades impostas na bomba de alimentação foram baseadas em uma calibração prévia feita antes da esterilização do biorreator. A fim de determinar se um ΔP mais elevado poderia resultar em maiores valores de E' e, conseqüentemente, em uma menor taxa de *bleeding* ocasionada pela perda de células pelo *overflow*, o ATF foi novamente acionado entre os dias 14 e 16 para reter todas as células no biorreator. Nesse período, o HC foi mantido desligado. Em dois dias, a concentração celular aumentou para 68×10^6 cels/mL, quando o HC foi operado a 2,5 bar. O valor de E' obtido para essa concentração na alimentação foi de 58,5% (Figura 5-28B), sendo medida uma concentração celular no *overflow* de aproximadamente 28×10^6 cels/mL. Apesar da maior eficiência de retenção de células ($E_T = 91\%$) em comparação à primeira aplicação do HC no dia 8 ($E_T = 84\%$), a concentração celular novamente diminuiu para 40×10^6 cels/mL no dia 19 (Figura 5-28A). Os valores de μ variaram entre 0,07 e 0,21 d^{-1} durante o período de operação do HC, como mostrado na Figura 5-29C. O ATF foi acionado pela terceira vez a partir do dia 20, para reproduzir o desempenho do hidrociclone a uma alta X_V . No entanto, no dia 23, a coleta de permeado foi interrompida, momento em que a X_V era de 58×10^6 cels/mL. Aparentemente, uma alta viscosidade da suspensão celular prejudicou o estabelecimento

dos ciclos de pressurização e exaustão sobre o diafragma e, com isso, não foi possível recircular a suspensão pelo ATF. O fato de o módulo filtrante não ter sido substituído para cada nova ativação do ATF, associado à interrupção dos ciclos alternados que promovem uma tensão de cisalhamento sobre as membranas, podem ter contribuído para o rápido estabelecimento de entupimento, mesmo com o cuidado em esvaziar o diafragma após o início de atuação do HC. A partir do dia 23 até o final da corrida, o hidrociclone foi mantido como o único equipamento de retenção celular, mantendo-se uma taxa de CSPR entre 12 e 14 pL/cel/d.

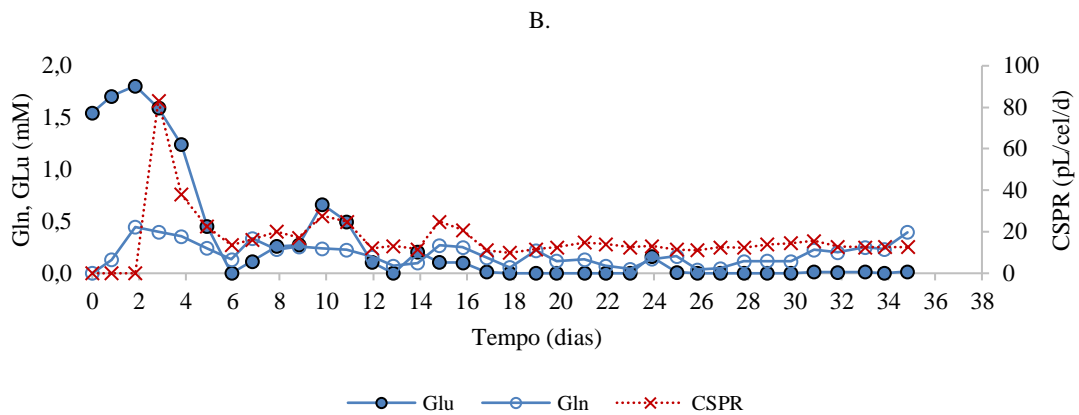
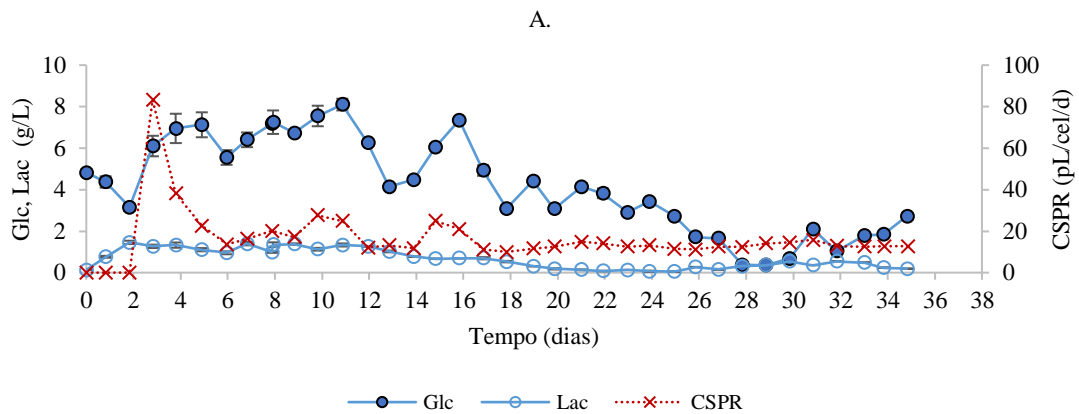
A partir do dia 26, alterações no controle de pH e de temperatura do cultivo foram estabelecidas, conforme mostrado na Tabela 5-8. Com o aumento do pH controlado de 6,8 para 7,10, a concentração de lactato dobrou, mas manteve-se inferior a 1 g/L. Concomitantemente, a glicose diminuiu de 1,6 para 0,4 g/L (Figura 5-29A). Os demais parâmetros avaliados, como a taxa específica de crescimento e a de produtividade específica, mantiveram-se constantes. A um pH constante em 7,1, a redução de temperatura para 34 e, por último, 31°C, resultou em uma queda em X_v para aproximadamente 30×10^6 cels/mL (Tabela 5-8), embora a uma vazão de *overflow* e taxa de crescimento específica constantes. A queda na concentração celular estaria associada à redução da eficiência de separação para 60%, mesmo para uma suspensão menos concentrada comparada àquela obtida a 36,8°C, cuja E' foi de até 74% para uma X_v de 40×10^6 cels/mL (Figura 5-28B). A queda em E' poderia estar relacionada ao aumento da viscosidade do fluido a temperaturas menores, o que reduziria a velocidade terminal de sedimentação das células (Equação 13). Não foram observados aumentos significativos em q_p com a redução da temperatura, em contraste ao reportado na literatura (AHN et al., 2008; CORONEL et al., 2019; ZHANG et al., 2015). Todavia, o número de dias avaliado foi muito pequeno para permitir conclusões sólidas sobre os efeitos da temperatura sobre a produtividade e o crescimento celular.

Tabela 5-8. Crescimento, produção e eficiência de separação para diferentes temperaturas aplicadas entre os dias 26 e 35, corrida HC-6. Nesse período, a CSPR variou entre 12 e 14 pL/cel/d.

Condição	Período	X_v (10^6 /mL)	E' (%)	mAb (mg/L)	Glc (g/L)	Lac (g/L)	μ (d^{-1})	q_p (pcd)	P_v (mg/L/d)
36,8°C, pH 6,80	D26-28	38,45± 1,10	65,6±2,0	868±54	1,24± 0,76	0,24± 0,08	0,10±0,07	11,5± 2,3	445±7
36,8°C, pH 7,10	D29-31	34,69± 2,57	67,0±4,0	912±33	0,51± 0,23	0,45± 0,13	0,10±0,01	11,9± 0,5	410±39
34,0°C, pH 7,10	D32-33	31,05± 0,78	64,4±2,8	823±25	1,64± 0,55	0,46± 0,09	0,13±0,02	10,4± 1,6	319±47
31,0°C, pH 7,10	D34-35	29,85± 0,60	59,9±0,3	799±6	2,28± 0,62	0,22± 0,04	0,13	9,6± 0,1	283±7

A viabilidade celular se manteve muito alta (> 95%) ao longo de toda a corrida (Figura 5-28C). A exemplo das corridas anteriores com o hidrociclone, suspensões celulares com viabilidade ainda elevada (embora significativamente menor em relação ao biorreator) foram descartadas pelo *overflow*.

Não foram observados impactos sobre a taxa específica de crescimento ao se alternar a operação do ATF e do hidrociclone na perfusão, como mostrado na Figura 5-29C. Os maiores valores de μ corresponderam à aplicação de CSPR mais altas, como no dia 10 ($0,4 \text{ d}^{-1}$ a 28 pL/cel/d) e 16 ($0,3 \text{ d}^{-1}$ a 21 pL/cel/d). Foi observada uma tendência de aumento de q_p durante os dias 8 e 13, correspondentes à primeira aplicação do hidrociclone, assim como entre os dias 16 e 20 (segunda aplicação do HC), embora no primeiro caso a aplicação de uma CSPR maior (entre 17 e 28 pL/cel/d) poderia ser o principal motivo para o aumento da produtividade. Em oposição ao observado nas corridas ATF-3 e ATF-4 com o ATF, não foi observado decaimento em q_p ao longo na corrida HC-6.



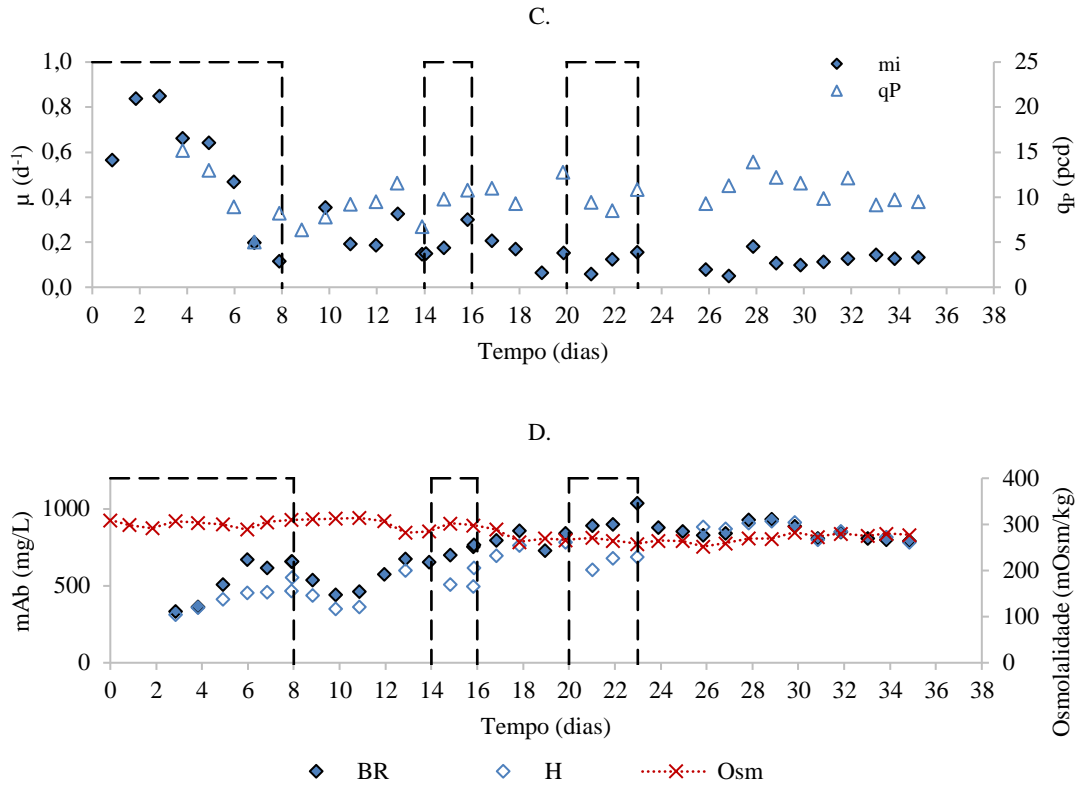


Figura 5-29. Corrida HC-6 alternando o ATF e o hidrociclone como equipamentos de retenção. A) perfis de glicose e lactato (média \pm desvio-padrão, duplicata analítica); B) taxas específicas de crescimento (μ) e de produtividade (q_p); C) perfis de glutamato e glutamina; D) concentração de mAb em biorreator (BR) e perfundido (H).

A concentração máxima de produto no biorreator, de 1 g/L, foi obtida no dia 23 com o ATF (Figura 5-29D). Entretanto, ressalta-se que uma retenção de até 34% foi determinada nos períodos de utilização do ATF comparando-se as concentrações de mAb medidas no perfundido e no biorreator. Conforme citado anteriormente, o ATF deixou de ser operado a partir do dia 23 por falha no reestabelecimento da recirculação, o que corroboraria a ocorrência de entupimento na membrana. Deve-se ressaltar que a retenção de mAb também foi observada nas demais corridas com o ATF, nas quais foram utilizados módulos comerciais da Repligen com características físicas distintas, e com poro nominal de 0,2 μ m. Todavia, foi possível manter o ATF em funcionamento de forma ininterrupta naquelas corridas. Adicionalmente, considerando a vazão de recirculação (1 L/min), o diâmetro de lúmen e número de fibras do módulo utilizado (vide item 4.4.2), a taxa de cisalhamento (γ) estimada para a corrida HC-6 foi de 5365 s^{-1} , maior do que no módulo da Repligen usado nos experimentos anteriores, e que possivelmente contribuiu para menores índices de retenção em comparação com as corridas ATF-3 e ATF-4 com a mesma célula/meio de cultivo. Uma diferença menor (\sim 20%) de concentração de mAb

também foi observada com a utilização do hidrociclone entre os dias 8-14 e 16-20, o que não era esperado para esse tipo de equipamento, cuja separação não é mediada por barreiras físicas. Entretanto, com a reintrodução do hidrociclone a partir do dia 26, não foram observadas diferenças entre as concentrações de mAb do biorreator e do perfundido, como esperado.

É interessante mencionar que, com exceção da corrida HC-3 realizada em biorreator com bolsa descartável, quando se atingiu um valor máximo de X_V de 54×10^6 cels/mL e um valor médio de 48×10^6 cels/mL entre dias 13 e 18 (Figura 5.12), concentrações celulares máximas entre 30 e 40×10^6 cels/mL foram alcançadas em todas as corridas com o HC2015 (HC-4, HC-5 e HC-6) em ambos os biorreatores de bancada, e para ambos os sistemas biológicos (CHO/meio de alimentação). Os EEs foram mantidos entre 10 e 19 pL/cel/d. Considerando apenas os cultivos HC-5 e HC-6 com as células CHO_mAb#2, de maior produtividade do que CHO DP-12, não foi observado um decaimento significativo em q_P para essa faixa de CSPR, mantendo-se entre 10 e 12 pcd. Nessas condições, foram aplicadas taxas de perfusão menores do que 1 vvd, variando entre 0,3 e 0,6 vvd. O impacto dessa redução em D torna-se significativo especialmente para maiores escalas de volume de trabalho (> 2000 L). A partir dessa premissa, e alegando grande complexidade técnica oferecida pelos equipamentos de retenção na perfusão, Gagnon et al. (2019) propuseram o clássico tanque agitado em modo contínuo (CSTR) como biorreator de produção, acoplado a um reator N-1 em perfusão em alto estado proliferativo e elevada X_V , para a produção de mAb com células CHO. A corrente de *bleeding* do reator N-1 introduziu células continuamente ao CSTR que, mantido a taxas de diluição muito baixas, garantiu uma produtividade volumétrica duas vezes superior à da batelada alimentada. Nas condições estudadas, concentrações em torno de 30×10^6 cels/mL também foram estabilizadas a uma taxa de diluição entre 0,12-0,15 vvd, correspondendo a uma CSPR (ou melhor, CSDR – *cell-specific dilution rate*) de apenas 5 pL/cel/d. Segundo os autores, o aumento de três vezes de q_P no reator contínuo em comparação à perfusão N-1 poderia ser atribuído, em parte, à baixa taxa de diluição imposta, resultando em uma menor taxa μ . Nessa condição, as células dispenderiam menos energia para proliferar, favorecendo ao metabolismo produtivo. Assim, a aplicação do quimiostato, usualmente adotado apenas para estudos de caracterização fisiológica das células, viabilizaria a utilização do hidrociclone nas plataformas de produção de biofármacos com células animais, tendo como vantagens adicionais a simplicidade de operação e a ausência de retenção de produto.

5.3.5 Atributos críticos de qualidade obtidos para diferentes equipamentos de retenção

A heterogeneidade dos anticorpos monoclonais resulta tanto das modificações pós-tradução promovidas pela célula hospedeira durante a sua síntese em biorreator, quanto das etapas de purificação e formulação final. As modificações na molécula podem ser de natureza química ou enzimática, e inclui a formação de ligações dissulfeto, glicosilação, deamidação, oxidação, entre outras (LIU et al., 2008). Cabe ao fabricante propor a faixa de variação aceitável para cada atributo de cada biofármaco mediante uma extensa caracterização analítica, e submetê-la para uma avaliação pelas agências reguladoras (TYTHER; JENKINS, 2011).

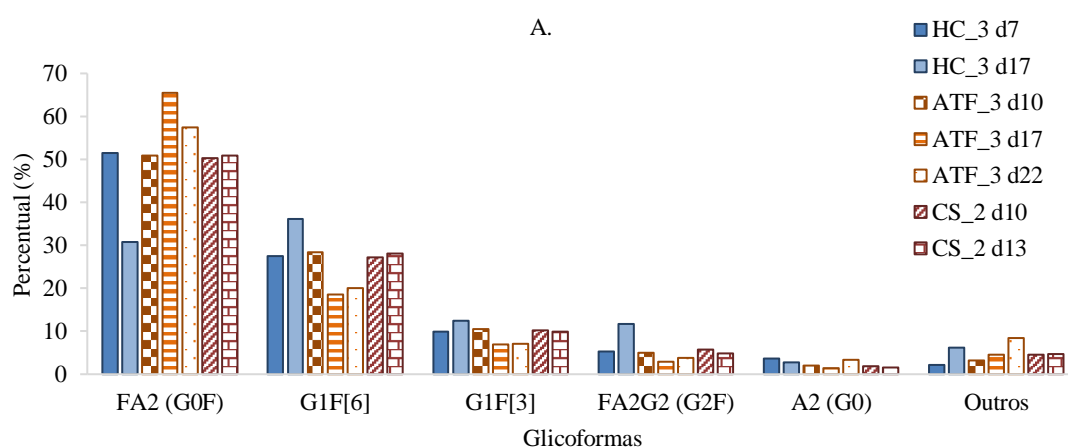
Os atributos críticos de qualidade analisados foram o perfil de espécies N-glicosiladas, agregados e variantes de carga para o anticorpo monoclonal produzido por CHO_mAb#2 cultivada em perfusão nas corridas HC-3 (HC2015, amostras dos dias 7 e 17), ATF-3 (ATF, amostras dos dias 10, 17 e 22) e CS-2 (CS10, amostras dos dias 10 e 13), todas alimentadas com ActiPro fortificado com CB1 e CB3. A Tabela 5-9 apresenta os principais parâmetros de cultivo obtidos no momento da amostragem.

Tabela 5-9. Parâmetros referentes aos cultivos HC-3, ATF-3 e CS-2 operados com diferentes equipamentos de retenção para as amostras coletadas para determinação do perfil de N-glicosilação, agregados e variantes de carga. N.D. – não determinado.

Amostra	CSPR (pL/cel/d)	X _v (10 ⁶ cels/mL)	Viabilidade (%)	Glc (g/L)	Amn (mM)	Osmolalidade (mOsm/kg)	q _p (pcd)
HC_3 d7	36	13,01	96,3	7,83	1,24	346	19,9
HC_3 d17	20	47,93	96,2	2,33	0,92	322	16,1
ATF_3 d10	14	84,41	97,7	3,64	N,D,	272	6,4
ATF_3 d17	16	77,04	89,6	3,28	N,D,	360	1,3
ATF_3 d22	43	30,45	75,4	8,69	N,D,	345	3,7
CS_2 d10	20	14,34	92,3	1,05	N,D,	273	5,5
CS_2 d13	38	14,94	87,4	1,54	N,D,	291	9,5

Para todas as amostras analisadas, foi observado o predomínio das glicofornas fucosiladas (> 91%), conforme mostrado na Figura 5-30A. Dentre estas, a abundância das espécies agalactosiladas (G0F) corresponderam a, no mínimo, 50% das glicofornas detectadas em todas as amostras, exceto na corrida HC-3 (dia 17), em que a proporção de espécies monogalactosiladas (G1F[6]+G1F[3]) foi predominante (49%). De modo geral, a distribuição de abundâncias determinadas para as três corridas é similar àquela obtida por Sanchez-De Melo et al. (2015) para a molécula de IgG1 produzida em células humanas, e também aos valores de referência apresentados por Reusch e Tejada (2015) para um anticorpo terapêutico produzido por células CHO recombinantes.

Diferentes linhagens celulares, meios de cultivo e condições de cultivo são os fatores que mais impactam a micro heterogeneidade encontrada em uma glicoproteína (BUTLER, 2006; HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009). Especialmente no caso da produção da proteína de interesse em biorreatores, as condições de temperatura, pH e DO e a estratégia de alimentação devem ser levados em consideração para garantir uma qualidade consistente ao longo da perfusão (KARST et al., 2017a; WALTHER et al., 2019). Por exemplo, uma redução da quantidade de espécies galactosiladas foi observada à medida que a DO diminuiu (KUNKEL et al., 1998, 2000). Situações de hipóxia no biorreator são passíveis de ocorrer em suspensões com alta concentração celular retidas em equipamentos de retenção externos, a exemplo das células aprisionadas ou no módulo de fibras ocas do ATF, ou no interior de um sedimentador cujo volume morto é relativamente alto. Há evidências de que o pH extracelular interfere na distribuição das glicofomas, mas sem resultados congruentes. Foi observada, por exemplo, a predominância das formas di-galactosiladas em IgG produzida por hibridoma em pH 7,4 ou sistemas tamponados com HEPES (MÜTHING et al., 2003), o que estaria de acordo com os maiores percentuais de G2F determinados na corrida HC-3, cujo pH foi controlado em um valor superior (7,1) em relação às demais corridas (pH 6,8). Já para um outro anticorpo também produzido por hibridoma, espécies com maiores índices de galactosilação e sialilação foram obtidas em valores de pH mais baixos, de até 6,8 (IVARSSON et al., 2014).



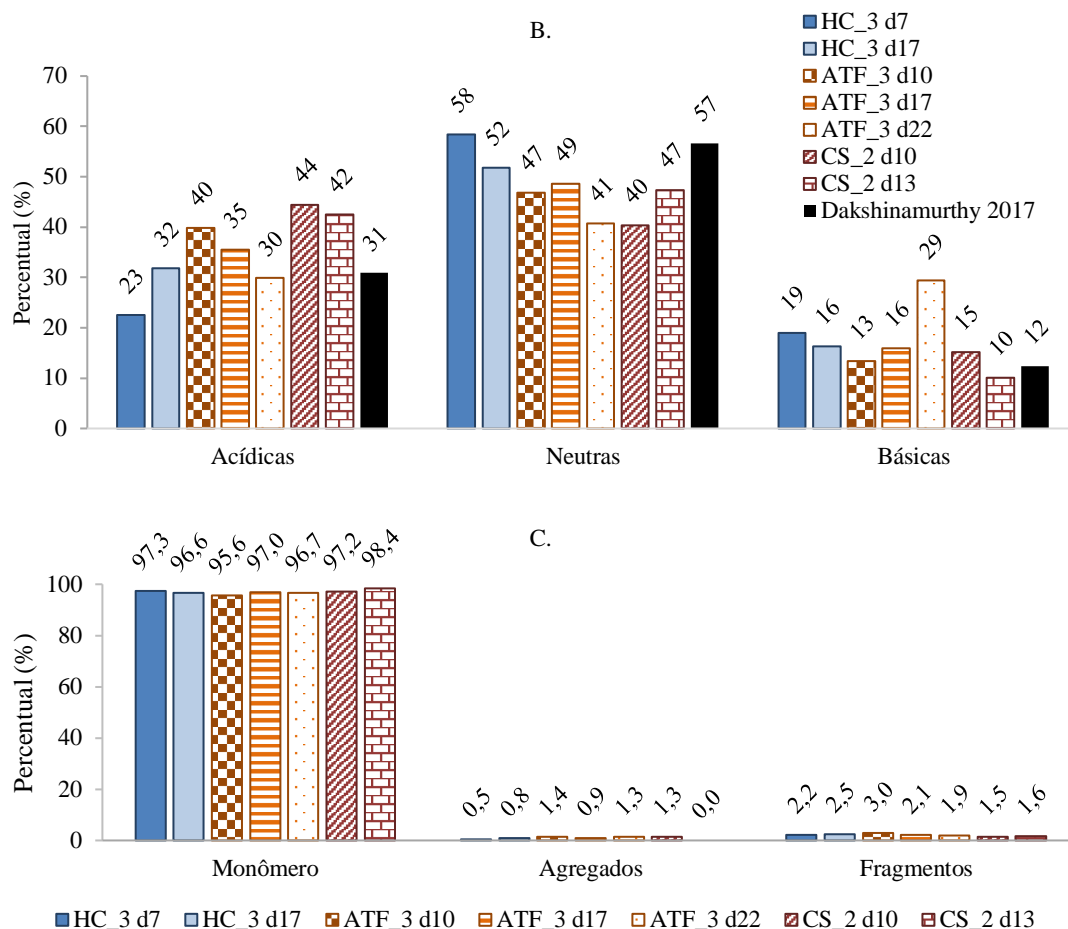


Figura 5-30. Distribuição de: A) espécies N-glicosiladas; B) variantes de carga e C) agregados para amostras coletadas nas corridas HC-3, ATF-3 e CS-2 com equipamentos de retenção distintos com CHO_mAb#2 e ActiPro+CBI+CB3.

Concentrações de amônio maiores que 2 mM podem alterar o pH dentro do complexo de Golgi, reduzindo a atividade das enzimas envolvidas na glicosilação, em especial a sialil-transferase (BUTLER, 2006; HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009). A secreção de tPA com menos sítios de Asn184 glicosilados foi atribuída a um menor tempo de residência da proteína dentro do retículo endoplasmático, em consequência das maiores taxas de síntese proteica em resposta a maiores tensões cisalhantes em cultivo em biorreator (SENGER; KARIM, 2003). Por outro lado, nenhuma ou poucas alterações na micro heterogeneidade de glicoproteínas decorrentes do emprego de distintos sistemas de aeração (VELEZ-SUBERBIE et al., 2013) ou de taxas de aeração submersa de até 0,2 vvm (IVARSSON et al., 2014; VELEZ-SUBERBIE et al., 2013) foram observadas. Um outro aspecto refere-se a um maior tempo de residência da proteína dentro do complexo de Golgi, o que resultaria em uma maior exposição às transferases e, assim, em estruturas glicosiladas mais completas (LIPSCOMB et al., 2005). Apesar de não ter sido

estabelecida uma relação entre uma maior produtividade específica e um menor tempo de processamento pós-tradução (HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009), menores taxas específicas de crescimento decorrentes da aplicação de uma menor temperatura de cultivo ou de aditivos químicos foram associadas a uma melhor qualidade do produto (ANDERSEN et al., 2000). Isso justificaria a maior consistência nas amostras da corrida CS-2, cujos valores de μ foram baixos. No escopo do presente trabalho – a aplicação de baixas taxas de perfusão – uma redução na CSPR que mantivesse uma taxa de crescimento μ mínima, mas sem exaurir os nutrientes-chave necessários para suprir os precursores dos glicanos, poderia ser explorada. Por exemplo, concentrações menores do que 0,1 mM de glutamina e de 0,7 mM de glicose reduziram a quantidade de espécies sialiladas, acarretando o aumento do percentual de formas híbridas e de alta manose de um interferon-gama produzido por células CHO (WONG et al., 2005). Uma estratégia de alimentação ideal seria capaz de balancear o mínimo suprimento nutricional para as células e uma maior consistência na qualidade de produto, além de gerar menores quantidades de sobrenadante a ser purificado.

As variações nas abundâncias das glicofomas ao longo de um cultivo podem ser associadas a diversos fatores e, apesar da ausência de réplicas analíticas na comparação entre o ATF, sedimentador e hidrociclone, a comparação entre diferentes equipamentos de retenção realizada em outros trabalhos não apontou diferenças significativas no padrão de N-glicosilação (KARST et al., 2016; RYLL et al., 2000).

Com relação às variantes de carga, a forma neutra foi a mais abundante para todas as amostras, exceto na corrida CS-2 com o sedimentador (dia 10), como mostra a Figura 5-30B. Esses resultados são comparáveis aos determinados por Dakshinamurthy et al. (2017) para uma glicoproteína semelhante. Adicionalmente, esses autores verificaram que as formas acídicas do biossimilar anti-HER2 apresentaram menor potencial de ligação e atividade antiproliferativa reduzida em ensaios *in vitro* com células de câncer de mama. As espécies acídicas correspondem às moléculas com ponto isoelétrico menor, cuja carga líquida é negativa no pH do processo. A formação dessa variante é normalmente relacionada a reações de deamidação e sialilação, além da remoção de lisina da extremidade C-terminal. Formas acídicas também podem ser formadas a partir da glicação que, diferente da glicosilação, consiste na reação não-enzimática entre um açúcar redutor com uma amina primária da extremidade N-terminal ou amina da cadeia lateral da lisina (LIU et al., 2008). A glicação pode ser relevante em casos em que meios com alta concentração de glicose são utilizados (GRAMER, 2013; QUAN et al., 2008), o que

poderia explicar a maior abundância das formas acídicas em comparação às formas básicas nas corridas HC-3, ATF-3 e CS-2, nas quais o meio ActiPro fortificado com uma concentração inicial de glicose de aproximadamente 15 g/L foi empregado. A cor da formulação final do anticorpo também é um atributo crítico de qualidade e, de acordo com Vijayasankaran et al. (2013), há uma correlação positiva entre o teor de formas acídicas e a cor do produto final formulado que, por sua vez, foi associada a maiores concentrações de ferro presente no meio de cultivo. Embora a composição dos meios não seja revelada, a intensa coloração alaranjada obtida na mistura ActiPro com CB1 e CB3 poderia ser eventualmente associada a uma alta concentração de ferro.

A forma monomérica do mAb produzido foi a mais abundante em todas as corridas analisadas, superior a 95% (Figura 5-30C), enquanto que a proporção de fragmentos foi maior do que a de agregados. A presença de agregados de alta massa molecular constitui um dos atributos de qualidade do produto de maior criticidade segundo Tyther e Jenkins (2011), contribuindo para um rendimento de produto e redução da eficácia, além do maior potencial imunogênico. Apesar da remoção eficiente dos agregados durante a purificação, minimizar a sua formação na etapa de cultivo, cuja abundância pode atingir 20% (GOMEZ et al., 2012), contribui para um maior rendimento global do processo. A agregação pode aumentar com a presença de proteínas incorretamente enoveladas, resultado de um alto nível de expressão na célula hospedeira, ou então devido a uma alta concentração de produto secretado para o meio extracelular (GRAMER, 2013). Fatores físicos como temperatura, pH e osmolalidade, além de componentes presentes no meio, são determinantes para minimizar a formação de agregados no sobrenadante (JING et al., 2012).

Neste trabalho, a variação das condições de cultura ocorridas nas três corridas não permite aprofundar uma investigação do efeito da CSPR sobre a qualidade do produto, conforme mostrado na Tabela 5-9. Na literatura, dados contrastantes sobre o efeito das baixas taxas de perfusão sobre os atributos críticos de qualidade são reportados. Por exemplo, WOLF et al. (2019b) concluíram que o perfil de glicofomas e variantes de carga era independente das taxas de perfusão, X_v e CSPR estipuladas. Como foi utilizado um único meio de cultivo para a determinação da $CSPR_{min}$ (~30 pL/cel/d), os autores concluíram que a adição de suplementos e variação nos parâmetros de controle de cultivo (pH, osmolalidade e temperatura) introduziriam mudanças significativas na qualidade do produto. A adoção de meios mais concentrados estabelecida por Gagnon et al. (2018) para operar a CSPRs muito mais baixas (10 pL/cel/d) possivelmente foi determinante na

variação observada para percentual de agregados, variantes de carga e glicoformas ao longo da fase de produção. A quantidade de espécies de alta manose e agalactosiladas aumentou com o progresso da corrida, assim como o percentual de espécies básicas. A menor consistência temporal, naquele caso, foi atribuída pelos autores à variação das condições de cultivo ao longo do tempo, uma vez que não foi estabelecido um estado estacionário de células, o que também foi o caso das corridas ATF-3 e CS-2 no presente trabalho.

6 Conclusões e sugestões

6.1 Conclusões

Uma comparação entre três sistemas de retenção celular para a produção de anticorpos monoclonais foi estabelecida com duas linhagens de células CHO (DP-12 e CHO_mAb#2) cultivadas em meios quimicamente definidos (TC-LECC e ActiPro, respectivamente). A redução da taxa específica de perfusão (CSPR) e a aplicação de três equipamentos de retenção (ATF, sedimentador lamelado e hidrociclone) foram investigadas em biorreatores de escala laboratorial e piloto (50 L).

Na primeira parte desse trabalho, foram avaliados fatores relativos à instalação e à operação de um hidrociclone (HC2015) sobre a eficiência de separação em ensaios de separação em batelada e, posteriormente, em três corridas com um biorreator de bolsas descartáveis de 50 L e três corridas em biorreator de bancada. A partir desses experimentos, concluiu-se que:

- Não houve diferença entre cabeçotes de alta e baixa pulsação acoplados em uma mesma bomba peristáltica de alimentação do hidrociclone em termos da eficiência de separação alcançada para uma dada queda de pressão (ΔP). Uma vez que o cabeçote de alta pulsação é o modelo mais comum em laboratórios de desenvolvimento de processos, e por permitir obter maiores valores de ΔP (de até 3 bar) e, conseqüentemente, maiores eficiências de separação no HC2015, esse modelo foi selecionado para a perfusão com o hidrociclone. Uma redução inferior a um ponto percentual na viabilidade das células recuperadas pelo *underflow* foi observada para ΔP de até 2,5 bar. Nessa condição de pressão, um valor de eficiência de separação total (E_T) de 97% e uma eficiência de separação centrífuga (E') de 85% foram obtidas para a geometria 2015 do hidrociclone para uma suspensão alimentada de baixa concentração celular (até 5×10^6 cels/mL);
- A restrição da vazão de *overflow* com uma segunda bomba peristáltica, visando permitir um ajuste da vazão de perfundido independente das demais variáveis operacionais, reduziu significativamente o valor de E' , não permitindo obter uma suspensão com concentração reduzida de células pelo *overflow*. Portanto, o hidrociclone foi operado com o *overflow* livre e de modo intermitente, de maneira

a permitir o ajuste da taxa de perfusão desejada em biorreatores com volumes de trabalho entre 3 e 40 L;

- A linha de reciclo de células, que conecta a saída do *underflow* ao biorreator, deve possuir um diâmetro adequado para a abertura de ângulo da descarga em guarda-chuva da saída inferior (*underflow*) do HC. O comprimento dessa linha de reciclo também deve ser o mais curto possível, para evitar o afogamento do *underflow*. A disposição ideal é a que viabiliza a descarga de células concentradas pelo *underflow* diretamente dentro do biorreator, posicionando o hidrociclone no topo do vaso ou bolsa. Na necessidade de se construir uma linha de reciclo, uma restrição mínima de 19,7 mm de diâmetro não afetou negativamente a eficiência de separação. Além disso, a linha de alimentação do HC deve possuir grande diâmetro interno, como por exemplo 3/8", que é o mesmo diâmetro do espigão presente nas entradas do HC utilizado. Um diâmetro reduzido da linha de alimentação do hidrociclone (por exemplo, 3,2 mm ou 1/8" DI) demandou a aplicação de velocidades de rotação da bomba até 60% maiores em relação às velocidades estabelecidas nos testes em batelada. Com isso, maiores tensões de cisalhamento foram aplicadas sobre as células, o que possivelmente contribuiu para maiores níveis de atividade de LDH e gradual queda de viabilidade celular;
- Pela primeira vez, foram estabelecidos processos com concentrações de células viáveis (X_V) superiores a 10×10^6 cels/mL em um processo de perfusão utilizando um hidrociclone. Foram estabelecidos estados estacionários de X_V entre 20×10^6 e 50×10^6 cels/mL com viabilidade acima de 95%. Eficiências de separação E_T de até 96% foram obtidas aplicando quedas de pressão de até 2,5 bar. O hidrociclone foi operado de forma robusta por até 50 dias, sem promover a retenção de produto no biorreator, como esperado. O equipamento foi aplicado com sucesso em biorreatores de bancada de 3 a 7 L (BioEngineering e Applikon) e piloto de 50 L utilizando bolsa descartável (XCellerex, Cytiva) quando operado de forma intermitente;
- O *bleeding* natural promovido pelo hidrociclone por meio do *overflow* contribuiu positivamente para o desempenho da cultura, sendo possível recuperar o crescimento, a viabilidade e a produtividade tanto em fase final de uma batelada alimentada com viabilidade de 70%, quanto em um cultivo anteriormente

submetido a uma baixa CSPR (7 pL/cel/d) que, em decorrência das limitações nutricionais, havia cessado o crescimento;

- Eficiências totais de separação (E_T) de 84 e 91% foram obtidas com o hidrociclone respectivamente para concentrações de alimentação de 80×10^6 e 60×10^6 cels/mL (alcançadas neste trabalho por meio da instalação de um ATF no mesmo biorreator, o qual foi operado previamente ao HC);
- Uma limitação oferecida pelo hidrociclone foi o não desacoplamento entre as taxas de perfusão e de *bleeding*, visto que ambas as correntes são estabelecidas por meio de uma mesma saída (*overflow*). A introdução de maiores vazões no hidrociclone, por um lado, proporciona maiores ΔP e, por conseguinte, maiores eficiências centrífugas de separação (E'), reduzindo a concentração de células liberadas pelo *overflow*. Entretanto, isto também ocasiona maiores vazões de perfundido e, conseqüentemente, uma maior quantidade de células pode ser eliminada do sistema.

A partir dos estudos acerca da redução das taxas específicas de perfusão (CSPR) realizados em processos em perfusão operando com o filtro tangencial alternante (ATF), hidrociclone (HC) e sedimentador inclinado (CS), concluiu-se que:

- Concentrações de células viáveis de 120×10^6 , 47×10^6 e 48×10^6 cels/mL foram mantidas respectivamente com o ATF, HC e CS10. As taxas de perfusão aplicadas corresponderam a uma CSPR de aproximadamente 19 pL/cel/d;
- O meio basal TC-LECC foi capaz de sustentar concentrações de CHO DP-12 de até 136×10^6 cels/mL a uma CSPR de, em média, aproximadamente 18 pL/cel/d, mantendo uma taxa específica de crescimento de $0,2 \text{ d}^{-1}$. Com o meio ActiPro suplementado com CellBoost™ CB1 e CB3 (Cytiva), foi possível alcançar uma concentração máxima de células de 90×10^6 cels/mL a uma CSPR de 16 pL/cel/d. Ambos os valores máximos de X_V foram obtidos com o ATF que, ao contrário do sedimentador e do hidrociclone, promove uma retenção total de células. Todavia, em todos os cultivos com o ATF (no total, 5), foi observada a retenção de mAb no biorreator em estágios avançados da cultura, indicando a ocorrência de entupimento progressivo das membranas utilizadas: poli (éter sulfona), poros de $0,2 \mu\text{m}$ e a área de filtração de $0,13 \text{ m}^2$, Repligen; e polissulfona, poros de $0,65 \mu\text{m}$ e área de filtração de $0,095 \text{ m}^2$, da Cytiva);

- Quedas na produtividade específica (q_p) de CHO DP-12 foram associados ao acúmulo de lactato em concentrações superiores a 1 g/L, possivelmente devido a um metabolismo ineficiente relacionado à elevada osmolalidade (corrida ATF-1, fortificação de TC-LECC com TCX2D), condições temporárias de anaerobiose por controle ineficiente da DO (corrida ATF-2) ou acúmulo/depleção de um metabólito-chave desconhecido. A manutenção de baixas taxas de perfusão, equivalentes a 18 pL/cel/d, na corrida CS-1 com o sedimentador lamelado, favoreceu o *shift* metabólico para o consumo de lactato, mantendo a produtividade específica nos mesmos patamares até o final da corrida. No entanto, esse desvio metabólico não ocorreu ao reduzir a CSPR nas corridas em perfusão com o ATF (corrida ATF-2) e HC (corrida HC-4) para 18 pL/cel/d;
- Dentre os cultivos em perfusão utilizando a célula CHO_mAb#2 e o meio fortificado ActiPro + CB1 + CB3 como meio de alimentação, as corridas com o sedimentador (CS-1) e o ATF (ATF-3 e ATF-4) resultaram em baixas taxas específicas de crescimento. Entretanto, uma expressiva redução da produtividade específica foi observada apenas na corrida ATF-3, durante a qual q_p não foi reestabelecido ao elevar a CSPR de 15 para 40 pL/cel/d. No caso particular do sedimentador, a recirculação de um grande volume morto do equipamento (400 mL em comparação a 100 mL do ATF e a 3 mL do hidrociclone) resfriado a 20°C pode ter contribuído para um superaquecimento da manta térmica adjacente à parede do vaso do reator, com a formação de metabólitos inibitórios ao crescimento a partir do aquecimento do meio rico em açúcares. Adicionalmente, essas reações não controladas podem ter contribuído para a formação de variantes acídicas para o processo com o sedimentador. Entretanto, a aplicação de uma CSPR de aproximadamente 10 pL/cel/d não resultou em inibição de crescimento e de produtividade na perfusão com o hidrociclone utilizando este meio de cultivo e linhagem celular;
- Uma concentração máxima de 40×10^6 cels/mL foi alcançada com o hidrociclone para ambos os sistemas biológicos (DP-12/TC-LECC e CHO-mAb#2/ActiPro) em dois modelos distintos de biorreator de bancada (RALF e Applikon), operados com volume de trabalho entre 3 e 4 L. As possíveis causas para a limitação em X_v poderiam ser uma limitação nutricional proporcionada pelas baixas taxas de alimentação e a eficiência de separação relativamente baixa do equipamento. Na

corrida HC-6, taxas de CSPR entre 12 e 14 pL/cel/d mantiveram um crescimento limitado μ a aproximadamente $0,1 \text{ d}^{-1}$ sem reduzir significativamente a produtividade específica.

6.2 Sugestões

Para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa, são feitas as seguintes sugestões:

- O desenvolvimento de geometrias de hidrociclone com maior razão de fluido (R_f), de modo a aumentar a eficiência total de separação e diminuir a vazão de *overflow*, possibilitando uma operação contínua do hidrociclone em escala de bancada e piloto. A operação intermitente do hidrociclone confere uma operação semicontínua que, apesar do sucesso com o emprego de um temporizador convencional adquirido do mercado local, promove uma variação temporal nas condições de cultura, o que não é o ideal para o desempenho da cultura e a consistência dos atributos críticos de qualidade. Além disso, a operação contínua evitaria volumes mortos nas linhas de conexão entre o hidrociclone e o biorreator;
- Hidrociclones com diâmetro de corpo cilíndrico menor do que 1 cm, para os quais são esperadas maiores eficiências de separação a vazões de operação mais baixas, são atualmente factíveis devido ao aperfeiçoamento das técnicas de impressão em 3D e à popularização da tecnologia *single-use* em bioprocessos;
- O estabelecimento de composições de meio de perfusão capazes de sustentar concentrações celulares superiores a 40×10^6 cels/mL a baixas CSPRs utilizando o hidrociclone, mantendo uma alta produtividade, e conferindo ao produto os atributos críticos de qualidade dentro das faixas de especificação;
- Reduzir ou eliminar a retenção de produto pelos sistemas de microfiltração, avaliando características da membrana como os polímeros usados na sua composição, diferentes tamanhos de poro nominal e estratégias para mitigar a formação da camada de incrustação. Por outro lado, a retenção total do produto estabelecida por membranas de ultrafiltração, tanto em processos em perfusão como em batelada alimentada, tem sido explorada para concentrar a proteína de interesse e reduzir os volumes de sobrenadante destinados à purificação;
- A exploração de outras abordagens para aumentar a produtividade durante a fase de produção baseadas na paralisação do ciclo celular e consequente redução do

crescimento. As estratégias mais comuns são adição de ácidos graxos e aplicação de hipotermia moderada, sendo que, nesta última, a menor temperatura pode impactar negativamente a eficiência de separação do hidrociclone;

- O acoplamento do hidrociclone em biorreatores como um dispositivo que promova um *bleeding* parcial de células do sistema, em especial as não-viáveis, de modo a permitir a recuperação do crescimento celular, como por exemplo no final de uma corrida em batelada alimentada, ou após um evento de depleção nutricional ocasionado em um processo em perfusão operado a taxas de alimentação limitantes.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^a ed. Filadélfia: Elsevier, 2008.
- ADAMS, G. P.; WEINER, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1147–1157, 2005.
- AHN, W. S. et al. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 1234–1244, 2008.
- ALTAMIRANO, C. et al. Improvement of CHO cell culture medium formulation: Simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 1, p. 69–75, 2000.
- ALTAMIRANO, C. et al. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: Substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 171–179, 2004.
- ALVIM, R. G. F.; ITABAIANA, I.; CASTILHO, L. R. Zika virus-like particles (VLPs): Stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform. **Vaccine**, v. 37, n. 47, p. 6970–6977, 2019.
- AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.) **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1^a ed. Nova York: Taylor&Francis, 2008.
- ANDERSEN, D. C. et al. Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 25–31, 2000.
- ANVISA. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico 2018**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/publicacoes?tagsName=cmed>>. Acesso em: 31 dez. 2019.
- ARNOLD, L. et al. Implementation of fully integrated continuous antibody processing: effects on productivity and COGm. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2019.
- BANIK, G. G.; HEATH, C. A. High-density hybridoma perfusion culture: Limitation vs

- Inhibition. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 61, n. 3, p. 211–229, 1996.
- BATT, B.; DAVIS, R.; KOMPALA, D. Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 6, p. 458–464, 1990.
- BAUSCH, M.; SCHULTHEISS, C.; SIECK, J. B. Recommendations for comparison of productivity between fed-batch and perfusion processes. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 1700721, 2019.
- BEBBINGTON, C. R. et al. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. **Biotechnology (Nature Publishing Company)**, v. 10, n. 2, p. 169–175, 1992.
- BECKMANN, T. F. et al. Effects of high passage cultivation on CHO cells: A global analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 659–671, 2012.
- BETTINARDI, I. W. **Desenvolvimento de estratégias de alimentação com meios concentrados para cultivo de células animais em perfusão**. Dissertação de M.Sc., COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.
- BI, J. X.; SHUTTLEWORTH, J.; AL-RUBEAI, M. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 7, p. 741–749, 2004.
- BIBILA, T. A.; ROBINSON, D. K. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 1995.
- BIELSER, J. M. et al. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 1328–1340, 2018.
- BIOATLA. **Antibody nomenclature**. Disponível em: <<http://bioatla.com/appendix/antibody-nomenclature/>>. Acesso em: 16 jul. 2017.
- BIRCH, J. R.; MAINWARING, D. O.; RACHER, A. J. Use of the glutamine synthetase (GS) expression system for the rapid development of highly productive

- mammalian cell processes. In: KNÄBLEIN, J. (Ed.) **Modern Biopharmaceuticals**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008.
- BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 5–6, p. 671–685, 2006.
- BOEDEKER, B. G. D. The manufacturing of the recombinant factor VIII, Kogenate. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 256–260, 1992.
- BONHAM-CARTER, J.; SHEVITZ, J. A brief history of perfusion. **BioProcess International**, v. 9, n. 9, p. 24–30, 2011.
- BORYS, M. C.; LINZER, D. I. H.; PAPOUTSAKIS, E. T. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 6, p. 505–514, 1994.
- BRINEY, B. et al. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. **Nature**, v. 566, n. 7744, p. 393–397, 2019.
- BRÜHLMANN, D. et al. Tailoring recombinant protein quality by rational media design. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 3, p. 615–629, 2015.
- BUNNAK, P. et al. Life-cycle and cost of goods assessment of fed-batch and perfusion-based manufacturing processes for mAbs. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 5, p. 1324–1335, 2016.
- BÜNTEMEYER, H. Methods for Off-Line Analysis of Nutrients and Products in Mammalian Cell Culture. In: PÖRTNER, R. (Ed.) **Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols**, 2^a ed. New Jersey: Humana Press, 2007.
- BURGENER, A.; BUTLER, M. Medium development. In: OZTURK, S. S.; HU, W. (Eds.) **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
- BUTLER, M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. **Cytotechnology**, v. 50, n. 1–3, p. 57–76, 2006.
- CARVALHO, R. J.; CASTILHO, L. R. Tools enabling continuous and integrated upstream and downstream processes in the manufacturing of biologicals. In:

- SUBRAMANIAN, G. (Ed.) **Continuous Biomanufacturing - Innovative Technologies and Methods**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2018.
- CASTILHO, L. R. Continuous Animal Cell Perfusion Processes: The First Step Toward Integrated Continuous Biomanufacturing. In: SUBRAMANIAN, G. (Ed.) **Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015.
- CASTILHO, L. R. Biopharmaceutical products. In: THOMAZ-SOCCOL, V.; PANDEY, A.; RESENDE, R. R. (Eds.) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- CASTILHO, L. R.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 4, p. 776–781, 2002.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 74, p. 129–169, 2002.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A. Animal cell separation. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.) **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1^a ed. Nova York: Taylor&Francis, 2008.
- CHALMERS, J. J. Mixing, aeration and cell damage, 30+ years later: What we learned, how it affected the cell culture industry and what we would like to know more about. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 10, p. 94–102, 2015.
- CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO-CARDERO, A. Bioreactors for animal cells. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.) **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1^a ed. Nova York: Taylor&Francis, 2008.
- CHOTTEAU, V. Perfusion processes. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.) **Animal Cell Culture**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2015.
- CHRISTIE, A.; BUTLER, M. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. **Journal of Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 277–290, 1994.
- CLINCKE, M.-F. et al. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in

- WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 754–767, 2013a.
- CLINCKE, M. F. et al. Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE bioreactor™-part II: Applications for antibody production and cryopreservation. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 768–777, 2013b.
- CONITEC. **Relatório de recomendação nº 480 - Adalimumabe, golimumabe, infliximabe e vedolizumabe para tratamento da retocolite ulcerativa moderada a grave.** Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2019/Relatorio_Biologicos_Colite_Ulcerativa.pdf>. Acesso em: 31 dez. 2019.
- CORONEL, J. **Desenvolvimento de um processo de cultivo contínuo com reciclo celular para produção de um biofármaco lábil.** Tese de D.Sc., COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.
- CORONEL, J. et al. Perfusion process combining low temperature and valeric acid for enhanced recombinant factor VIII production. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 9, p. 1168–1170, 2019.
- COSTA, A. R. et al. Feed optimization in fed-batch culture. In: PÖRTNER, R. (Ed.). **Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols.** Springer, 2014.
- CRUZ, H. J. et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 43–52, 2000.
- DAKSHINAMURTHY, P. et al. Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. **Biologicals**, v. 46, p. 46–56, 2017.
- DALM, M. C. F. et al. Stable hybridoma cultivation in a pilot-scale acoustic perfusion system: Long-term process performance and effect of recirculation rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 7, p. 894–900, 2005.
- DECKWER, W. D. et al. **Method for separating viable cells from cell suspensions.**, US Patent 6,878,545 B2. 2005.
- DESAI, S. G. Continuous and semi-continuous cell culture for production of blood clotting factors. **Journal of Biotechnology**, v. 213, p. 20–27, 2015.

- DESCHÊNES, J.-S. et al. Use of cell bleed in a high cell density perfusion culture and multivariable control of biomass and metabolite concentrations. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 1, n. 1–2, p. 82–91, 2006.
- DOWD, J. E. et al. On-line control and optimization of perfusion CHO cell cultures based on a viable cell probe. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 221, p. U115–U115, 2001.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and Tissue Culture: laboratory Procedures in Biotechnology**. 1^a ed. Chichester: Wiley, 1998.
- DUVAR, S. et al. Developing an upstream process for a monoclonal antibody including medium optimization. **BMC Proceedings**, v. 7, n. Suppl 6, p. P34, 2013.
- ELSAYED, E. A. **Application of hydrocyclone for cell separation in mammalian cell perfusion cultures**. Ph.D. Thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2005.
- ELSAYED, E. A. et al. Use of Hydrocyclones for Mammalian Cell Retention: Separation Efficiency and Cell Viability (Part 1). **Engineering in Life Sciences**, v. 6, n. 4, p. 347–354, 2006.
- ELSAYED, E. A. et al. Feed flow pulsation in the separation of CHO cells in hydrocyclones: effects of pressure drop and pumphead type on separation efficiency and cell viability. In: JENKINS, N.; BARRON, N.; ALVES, P. (Eds.) **Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT)**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 341–344.
- ELSAYED, E. A.; WAGNER, R. Application of hydrocyclones for continuous cultivation of SP-2/0 cells in perfusion bioreactors: Effect of hydrocyclone operating pressure. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 8, p. 65, 2011.
- FARID, S. S. Integrated Continuous Biomanufacturing: Industrialization on the Horizon. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 3–5, 2019.
- FARID, S. S. et al. Benchmarking biopharmaceutical process development and manufacturing cost contributions to R&D. **mAbs**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2020.
- FARID, S. S.; THOMPSON, B.; DAVIDSON, A. Continuous bioprocessing: The real thing this time? **mAbs**, v. 6, n. 6, p. 1357–1361, 2014.

- FENG, Q. et al. Application of “oxygen uptake rate-amino acids” associated mode in controlled-fed perfusion culture. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 422–430, 2006.
- FENGE, C.; LÜLLAU, E. Cell culture bioreactors. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. (Eds.) **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies**. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- FIGUEREDO-CARDERO, A. et al. Rotating cylindrical filters used in perfusion cultures: CFD simulations and experiments. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1093–1102, 2014.
- FIKE, R. **Nutrient supplementation strategies for biopharmaceutical production**. Disponível em: <<http://www.bioprocessintl.com/upstream-processing/biochemicals-rawmaterials/%0Anutrient-supplementation-strategies-for-biopharmaceutical-production-%0A185084/>>. Acesso em: 9 jun. 2017.
- FREUND, N. W.; CROUGHAN, M. S. A simple method to reduce both lactic acid and ammonium production in industrial animal cell culture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.
- FRIEDMAN, M. Biological effects of maillard browning products that may affect acrylamide safety in food. In: FRIEDMAN, M.; MOTTRAM, D. (Eds.). **Chemistry and Safety of Acrylamide in Food**. Boston: Springer, 2005.
- GAGNON, M. et al. High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1328–1337, 2011.
- GAGNON, M. et al. Shift to high-intensity, low-volume perfusion cell culture enabling a continuous, integrated bioprocess. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p. 1472–1481, 2018.
- GAGNON, M. et al. Novel, linked bioreactor system for continuous production of biologics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 8, p. 1946–1958, 2019.
- GAUGHAN, C. L. The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. **Molecular Diversity**, v. 20, n. 1, p. 255–270, 2016.
- GE HEALTHCARE. **Selection handbook - Hollow fiber cartridges and systems for**

- membrane separations.** Disponível em: <http://www.gelifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2016/07/Hollow_fiber_filter_selection_-_litdoc18116529_20150330002702-4.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- GENZEL, Y. et al. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 58–69, 2008.
- GODAWAT, R. et al. End-to-end integrated fully continuous production of recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Biotechnology**, v. 213, p. 13–19, 2015.
- GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Cell metabolism. In: OZTURK, S. S.; HU, W.-S. (Eds.) **Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
- GOMEZ, N. et al. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 125–136, 2012.
- GONZALEZ, T. N.; LEONG, S. R.; PRESTA, L. G. **Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies**. US Patent 6,025,158, 2000.
- GOTTSCHALK, U. Bioseparation in antibody manufacturing: The good, the bad and the ugly. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 3, p. 496–503, 2008.
- GRAMER, M. J. Product quality considerations for mammalian cell culture process development and manufacturing. In: ZHOU, W.; KANTARDJIEFF, A. (Eds.). **Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlim: Springer, 2013.
- GRONEMEYER, P.; DITZ, R.; STRUBE, J. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. **Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 188–212, 2014.
- GROVER, W. H. et al. Measuring single-cell density. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 10992–10996, 2011.
- HABERT, C. A.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: E-Papers, 2006.
- HAN, X.; HEWIG, A.; VEDANTHAM, G. Recovery and purification of antibody. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. Dordrecht:

- Springer, 2011.
- HARTLEY, F. et al. Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 1890–1903, 2018.
- HEIDEMANN, R. et al. A new seed-train expansion method for recombinant mammalian cell lines. **Cytotechnology**, v. 38, p. 99-108, 2002.
- HILLER, G. W. et al. Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1438–1447, 2017.
- HIMMELFARB, P.; THAYER, P. S.; MARTIN, H. E. Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension. **Science**, v. 164, n. 3879, p. 555–557, 1969.
- HOSHAN, L. et al. Effective bioreactor pH control using only sparging gases. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 2019.
- HOSSLER, P.; KHATTAK, S. F.; LI, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. **Glycobiology**, v. 19, n. 9, p. 936–949, 2009.
- HUFFORD, K. **Comparison of the growth and monoclonal antibody production of suspended mammalian cells in three perfusion systems**. Dissertation M.Sc., Massachusetts Institute of Technology, 2007.
- IRANI, N. et al. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 4, p. 238–246, 1999.
- IVARSSON, M. et al. Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. **Journal of Biotechnology**, v. 188, p. 88–96, 2014.
- JAYAPAL, K. et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. **Chemical Engineering Progress**, v. 103, n. 10, p. 40–47, 2007.
- JING, Y. et al. Identification of cell culture conditions to control protein aggregation of IgG fusion proteins expressed in Chinese hamster ovary cells. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 69–75, 2012.
- JOCKWER, A. et al. The Use of Hydrocyclones for Mammalian Cell Retention in Perfusion Bioreactors. In: LINDNER-OLSSON, E.; CHATZISSAVIDOU, N.;

- LÜLLAU, E. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Target to Market**. Dordrecht: Springer, 2001.
- JOCKWER, A. **Einsatz neuartiger Hydrocyclone zur Rückhaltung tierischer Zellen in Perfusions-Bioreaktoren**. Diplom-Chemiker der Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2001.
- JOSTOCK, T. Expression of antibody in mammalian cells. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. [s.l.] Springer, 2011.
- KADOURI, A.; SPIER, R. E. Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells. **Cytotechnology**, v. 24, n. 2, p. 89–98, 1997.
- KAISER, S. C. et al. Single-use bioreactors for animal and human cells. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Animal Cell Culture**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2015.
- KARST, D. J. et al. Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 17–26, 2016.
- KARST, D. J. et al. Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 298–307, 2017a.
- KARST, D. J. et al. Modulation and modeling of monoclonal antibody N-linked glycosylation in mammalian cell perfusion reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 9, p. 1978–1990, 2017b.
- KARST, D. J.; STEINEBACH, F.; MORBIDELLI, M. Continuous integrated manufacturing of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 53, p. 76–84, 2018.
- KELLEY, B. Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. **mAbs**, v. 1, n. 5, p. 440–449, 2009.
- KELLY, W. et al. Understanding and modeling alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 6, p. 1291–1300, 2014.
- KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306–322, 2018.
- KHATTAK, S. et al. **Continuous processing using a chemostat culture**. In:

Proceedings of the 26th ESACT Meeting, 2019.

KIM, B. J.; OH, D. J.; CHANG, H. N. Limited use of centrtech lab ii centrifuge in perfusion culture of rcho cells for the production of recombinant antibody. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 1, p. 166–174, 2008.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 917–930, 2012.

KIM, S. C. et al. Modified harvest system for enhancing Factor VIII yield in alternating tangential flow perfusion culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 561–565, 2016a.

KIM, S. C. et al. Effect of transmembrane pressure on Factor VIII yield in ATF perfusion culture for the production of recombinant human Factor VIII co-expressed with von Willebrand factor. **Cytotechnology**, v. 68, n. 5, p. 1687–1696, 2016b.

KISHISHITA, S. et al. Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 1, p. 78–84, 2015.

KLUTZ, S. et al. Cost evaluation of antibody production processes in different operation modes. **Chemical Engineering Science**, v. 141, p. 63–74, 2016.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975.

KOMPALA, D. **Novel, efficient scale-up of inclined settlers for perfusion bioreactor cultures**. In: Proceeding of the XV Cell Culture Engineering, 2016

KONAKOVSKY, V. et al. Metabolic control in mammalian fed-batch cell cultures for reduced lactic acid accumulation and improved process robustness. **Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 5, 2016.

KONSTANTINOV, K. et al. The “push-to-low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 101, p. 75–98, 2006.

KONSTANTINOV, K. B. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 2, p. 271–289, 2000.

- KONSTANTINOV, K. B.; COONEY, C. L. White Paper on Continuous Bioprocessing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 813–820, 2015.
- KUCZEWSKI, M. et al. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 1, p. 56–65, 2011.
- KUDUGUNTI, S. et al. Mitigation of protein retention in perfusion process and effect of filter pore size material & methods. In: Proceedings of the 25th ESACT Meeting, 2017
- KUNERT, R.; REINHART, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3451–3461, 2016.
- KUNKEL, J. P. et al. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. **Journal of Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 55–71, 1998.
- KUNKEL, J. P. et al. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 3, p. 462–470, 2000.
- KUYSTERMANS, D.; AL-RUBEAI, M. Bioreactor systems for producing antibody from mammalian cells. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. 1^a ed. Dordrecht: Springer, 2011.
- KUYSTERMANS, D.; AL-RUBEAI, M. Biopharmaceutical products from animal cell culture. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Animal Cell Culture**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2015.
- KWON, T. et al. Microfluidic cell retention device for perfusion of mammalian suspension culture. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6703, 2017.
- KWON, T. et al. Continuous removal of small nonviable suspended mammalian cells and debris from bioreactors using inertial microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 18, p. 2826–2837, 2018.
- LA MERIE PUBLISHING. **Biologics sales reach another all time high in 2018 driven by innovative antibodies**. Disponível em: <<https://lamerie.com/biologics-sales-reach-another-all-time-high-in-2018-driven-by-innovative-antibodies/>>. Acesso em: 31 dez. 2019.

- LAO, M. S.; TOTH, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 688–691, 1997.
- LEHR, B.; LYONS, D. Perfusion in the 21st century. **BioPharm International**, v. 29, n. 8, p. 24–26, 2016.
- LIN, H. et al. Principles and approach to developing mammalian cell culture media for high cell density perfusion process leveraging established fed-batch media. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 4, p. 891–901, 2017.
- LINDSKOG, E. K. The upstream process: principal modes of operation. In: JAGSCHIES, G. et al. (Eds.). **Biopharmaceutical Processing**. [s.l.] Elsevier, 2018.
- LIPSCOMB, M. L. et al. Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 40–49, 2005.
- LISTE-CALLEJA, L. et al. Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9951–9960, 2015.
- LIU, H. et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2426–2447, 2008.
- LU, S.; SUN, X.; ZHANG, Y. Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1917–1921, 2005.
- LUCA, C. DE et al. From batch to continuous chromatographic purification of a therapeutic peptide through multicolumn countercurrent solvent gradient purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1625, p. 461304, 2020.
- LUEBBERSTEDT, M.; MEDRONHO, R. A.; ANSPACH, F. B. Separation of mammalian cells using hydrocyclones. **Proceedings of the World Congress on Biotechnology**. Frankfurt am Main: Dechema eV, 2000
- LUO, J. et al. Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 146–156, 2012.

- MA, N.; MOLLET, M.; CHALMERS, J. J. Aeration, Mixing and Hydrodynamics in Bioreactors. In: OZTURK, S. S. (Ed.). **Encyclopedia of Cell Technology**. 1^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- MAIORELLA, B. et al. Crossflow microfiltration of animal cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 2, p. 121–126, 1991.
- MARKS, L. **Monoclonal antibodies: the invisible allies that changed the face of medicine**. Disponível em: <theconversation.com/monoclonal-antibodies-the%0Ainvisible-allies-that-changed-the-face-of-medicine-45807>. Acesso em: 10 set. 2015.
- MARTÍNEZ, V. S. et al. Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 660–666, 2013.
- MATTHEWS, T. E. et al. Closed loop control of lactate concentration in mammalian cell culture by Raman spectroscopy leads to improved cell density, viability, and biopharmaceutical protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 11, p. 2416–2424, 2016.
- MAYRHOFER, P. et al. Rapid development of clone-specific, high-performing perfusion media from established feed supplements. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 2, p. 1-14, 2019.
- MEDRONHO, R. A. **Scale-up of hydrocyclones at low feed concentrations**. Ph.D. Thesis, University of Bradford, 1984.
- MEDRONHO, R. A.; SCHUETZE, J.; DECKWER, W. D. Numerical simulation of hydrocyclones for cell separation. **Latin American Applied Research**, v. 35, p. 1–8, 2005.
- MERCILLE, S. et al. Filtration-based perfusion of hybridoma cultures in protein-free medium: Reduction of membrane fouling by medium supplementation with DNase I. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 9, p. 833–846, 1994 .
- MEUWLY, F. et al. Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 45–56, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP)**. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/parcerias-para-o-

- desenvolvimento-produtivo-pdp.>. Acesso em: 30 nov 2020.
- MÜLLER-SPÄTH, T. et al. Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1166–1177, 2008.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MÜTHING, J. et al. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 321–334, 2003.
- NEWMAN, P. **The top-level value of N-1 perfusion processes for 100-1000kg/yr biologics manufacture**. Disponível em: <<https://www.biopharmservices.com/the-top-level-value-of-n-1-perfusion-processes-for-100-1000kg-yr-biologics-manufacture/>>. Acesso em: 15 dez. 2020.
- OTTO, R.; SANTAGOSTINO, A.; SCHRADER, U. **Rapid growth in biopharma: Challenges and opportunities**. Disponível em: <<http://www.mckinsey.com/industries/pharmaceuticals-and-medical-products/our-insights/rapid-growth-in-biopharma>>. Acesso em: 4 jun. 2017.
- OZTURK, S. S. Engineering challenges in high density cell culture systems. **Cytotechnology**, v. 22, n. 1–3, p. 3–16, 1996.
- OZTURK, S. S. Continuous Biomanufacturing. In: LEE, G. M. et al. (Eds). **Cell Culture Engineering**. Weinheim: Wiley-VCH, 2019. p. 347-364
- OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 989–993, 1991.
- OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 418–431, 1992.
- PACIS, E. et al. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2348–2358, 2011.

- PATIL, R.; WALTHER, J. Continuous Manufacturing of Recombinant Therapeutic Proteins: Upstream and Downstream Technologies. In: KISS, B.; GOTTSCHALK, U.; POHLSCHEIDT, M. (Eds.). **New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 277–322.
- PHRMA. **Biopharmaceutical research industry profile**. Disponível em: <<http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/biopharmaceutical-industry-profile.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2016.
- PINTO, R. C. V.; MEDRONHO, R. A.; CASTILHO, L. R. Separation of CHO cells using hydrocyclones. **Cytotechnology**, v. 56, n. 1, p. 57–67, 2008.
- PINTO, R. C. V. **Separação de células CHO utilizando hidrociclones**. Tese de D.Sc., COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- PLATAS BARRADAS, O. et al. Evaluation of criteria for bioreactor comparison and operation standardization for mammalian cell culture. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 5, p. 518–528, 2012.
- POHLSCHEIDT, M. et al. Optimizing capacity utilization by large scale 3000 L perfusion in seed train bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 1, p. 222–229, 2013.
- POLLOCK, J.; HO, S. V.; FARID, S. S. Fed-batch and perfusion culture processes: Economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 206–219, 2013.
- PÖRTNER, R. Bioreactors for mammalian cells. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Animal Cell Culture**. 1ª ed. Heidelberg: Springer, 2015.
- QUAN, C. et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody : Where it is , how it got there , and how it affects charge-based behavior. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 179–191, 2008.
- RAUEN, A. T. **Políticas de inovação pelo lado da demanda no Brasil**. Disponível em: <[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7969/1/Políticas de inovação pelo lado da demanda no Brasil.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7969/1/Políticas%20de%20inovação%20pelo%20lado%20da%20demanda%20no%20Brasil.pdf)>. Acesso em: 31 dez. 2019.
- REINHART, D. et al. Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11,

p. 4645–4657, 2015.

REINHART, D. et al. Differential gene expression of a feed-spiked super-producing CHO cell line. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 23–37, nov. 2018.

REPLIGEN. Operator Manual - ATF2 System and ATF4 System with C24U-v2.0 Controller, 2015.

REPLIGEN. **Repligen**. Disponível em: <www.repligen.com>. Acesso em: 19 jun. 2017a.

REPLIGEN. **Frequently asked questions – perfusion**. Disponível em: <<https://www.repligen.com/products/upstream-solutions/xcell-atf-cell-retention-system/faq-perfusion/>>. Acesso em: 17 jun. 2017b.

REUSCH, D.; TEJADA, M. L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. **Glycobiology**, v. 25, n. 12, p. 1325–1334, 2015.

REYNOLDS, E. B.; ZYLBERBERG, E.; CAMPO, V. DEL. **Brazil's Role in the Biopharmaceutical Global Value Chain MIT-IPC Working Paper**. Cambridge: [s.n.]. Disponível em: <<https://ipc.mit.edu/sites/default/files/2019-01/16-004.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2019.

RITACCO, F. V.; WU, Y.; KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. **Biotechnology Progress**, 5 out. 2018.

RODRIGUES, M. E. et al. Technological progresses in monoclonal antibody production systems. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 2, p. 332–351, 2010.

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 639–654, 2004.

RYLL, T. et al. Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 4, p. 440–449, 2000.

SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8522/1/TD_2398.pdf>.

SAMSUNG. **Samsung BioLogics implements large scale N-1 perfusion for commercial application.** Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/samsung-biologics-implements-large-scale-n-1-perfusion-for-commercial-application-300899326.html>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

SANCHEZ-DE MELO, I. et al. N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. **Journal of Proteomics**, v. 127, p. 225–233, 2015.

SARRION-PERDIGONES, A. et al. Production of antibodies in plants. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2011.

SAUER, P. W. et al. A High-Yielding, Generic Fed-Batch Cell Culture Process for Production of Recombinant Antibodies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 585–597, 2000.

SCHRÖDER, B. et al. Advantages of Hydrodynamic Cell Separation in Industrial Cell Culture Processes. In: **Cells and Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010.

SCHWARZ, H. et al. Small-scale bioreactor supports high density HEK293 cell perfusion culture for the production of recombinant Erythropoietin. **Journal of Biotechnology**, v. 309, p. 44–52, 2020.

SEARLES, J. A.; TODD, P.; KOMPALA, D. S. Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 2, p. 198–206, 1994.

SENGER, R. S.; KARIM, M. N. Effect of shear stress on intrinsic cho culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1199–1209, 2003.

SHEVITZ, J. **Fluid filtration system** US 6,544,424 B1, 2003.

SHIRGAONKAR, I. Z.; LANTHIER, S.; KAMEN, A. Acoustic cell filter: a proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 6, p. 433–444, 2004.

SHUKLA, A. A.; THÖMMES, J. Recent advances in large-scale production of

- monoclonal antibodies and related proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 253–261, 2010.
- SIECK, J. B.; SCHILD, C.; VON HAGEN, J. Perfusion Formats and Their Specific Medium Requirements. In: SUBRAMANIAN, G. (Ed.). **Continuous Biomanufacturing - Innovative Technologies and Methods**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. p. 171–200.
- SPEARMAN, M.; DIONNE, B.; BUTLER, M. The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. In: AL-RUBEAI, M. (ed.). **Antibody Expression and Production**, [s.l.] Springer, 2011, p. 251–292.
- SUZUKI, E.; OLLIS, D. F. Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 3, p. 231–236, 1990.
- SYED, M. S. et al. A 3D-printed mini-hydrocyclone for high throughput particle separation: application to primary harvesting of microalgae. **Lab Chip**, v. 17, n. 14, p. 2459–2469, 2017.
- TACHIBANA, H.; TAKEKOSHI, M. Production of antibody Fab fragments in *Escherichia coli*. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2011.
- TAMASHIRO, W. M.; AUGUSTO, E. F. P. Monoclonal antibodies. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.) **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1^a ed. Nova York: Taylor&Francis, 2008.
- TANAKA, R. L.; AMORIM, M. C. S. O mercado e as possibilidades da indústria de biofármacos no Brasil. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 16, p. 86–92, 2014.
- TEMPLETON, N. et al. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 2013–2024, 2013.
- TENG, X. N. et al. Modeling and application of controlled-fed perfusion culture of CHO cells in a bioreactor. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, n. 3, p. 385–394, 2011.
- THOMAS, D. W. et al. **Clinical Development Success Rates**. Disponível em: <https://www.bio.org/sites/default/files/Clinical_Development_Success_Rates

- 2006-2015 - BIO, Biomedtracker, Amplion 2016.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2020.
- TYTHER, R.; JENKINS, N. Quality issues arising from post-translational modification of recombinant antibodies. In: AL-RUBEAI, M. (ed.). **Antibody Expression and Production**, [s.l.] Springer, 2011, p. 293–303.
- URQUHART, L. Top drugs and companies by sales in 2019. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 4, p. 228, 2020.
- VAN NGUYEN, C. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1140–1149, 2006.
- VÁZQUEZ-RAMÍREZ, D. et al. High titer MVA and influenza A virus production using a hybrid fed-batch/perfusion strategy with an ATF system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 3025–3035, 2019.
- VEGA-GARCIA, D.; BRITO-PARADA, P. R.; CILLIERS, J. J. Optimising small hydrocyclone design using 3D printing and CFD simulations. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 653–659, 2018.
- VELEZ-SUBERBIE, M. L. et al. Impact of aeration strategy on CHO cell performance during antibody production. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 1, p. 116–126, 2013.
- VIJAYASANKARAN, N. et al. Effect of cell culture medium components on color of formulated monoclonal antibody drug substance. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1270–1277, 2013.
- VILLACRÉS, C. et al. Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 7, p. 1051–1066, 2015.
- VOISARD, D. et al. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 751–765, 30 jun. 2003.
- WAHRHEIT, J. **The central metabolism in Chinese hamster ovary cells**. Ph.D. Thesis. Universität des Saarlandes, 2014.
- WAHRHEIT, J.; NICOLAE, A.; HEINZLE, E. Dynamics of growth and metabolism

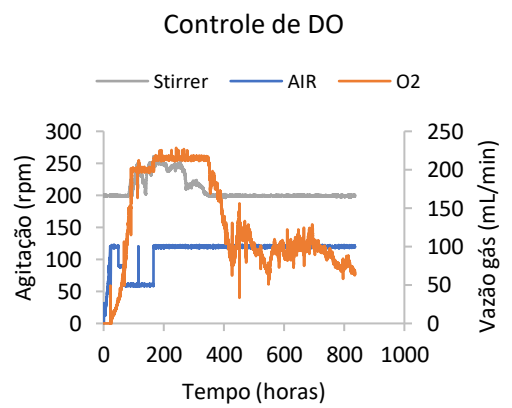
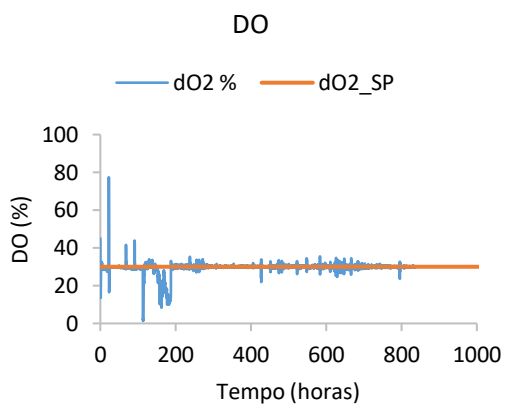
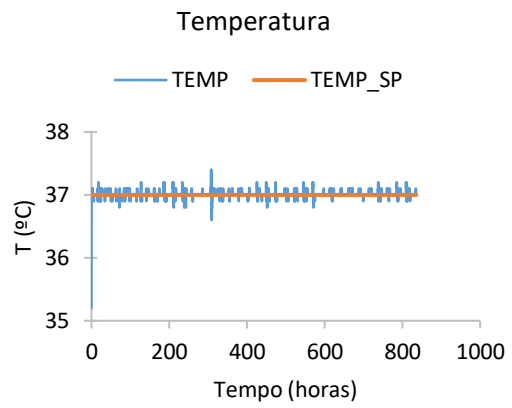
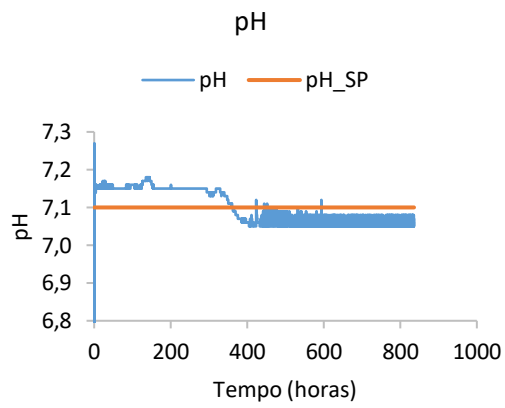
- controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1771–1783, 2014.
- WALKER, N. **Perfusion Appears to be Gaining Traction in Biopharma Manufacturing**. Disponível em: <<https://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/340000-Perfusion-Appears-to-be-Gaining-Traction-in-Biopharma-Manufacturing/>>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 135–138, 2002.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 6 dez. 2018.
- WALTHER, J. et al. Perfusion cell culture decreases process and product heterogeneity in a head-to-head comparison with fed-batch. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2019.
- WALTHER, J.; MCLARTY, J.; JOHNSON, T. The effects of alternating tangential flow (ATF) residence time, hydrodynamic stress, and filtration flux on high-density perfusion cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 320–332, 2019.
- WANG, S. et al. Shear contributions to cell culture performance and product recovery in ATF and TFF perfusion systems. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 52–60, 2017.
- WARIKOO, V. et al. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 12, p. 3018–3029, 2012.
- WHITFORD, W. Single-use perfusion bioreactors support continuous biomanufacturing. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 75–93, 2015.
- WOLF, M. K. F. et al. Improved performance in mammalian cell perfusion cultures by growth inhibition. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 1700722, 2019a.
- WOLF, M. K. F. et al. A two-step procedure for the design of perfusion bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107295, 2019b.
- WONG, D. C. F. et al. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism,

- productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 164–177, 2005.
- WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004.
- XENOPOULOS, A. A new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: Process modeling and cost of goods studies. **Journal of Biotechnology**, v. 213, p. 42–53, 2015.
- XU, S. et al. Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 4, p. 867–878, 2017.
- XU, S.; CHEN, H. High-density mammalian cell cultures in stirred-tank bioreactor without external pH control. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 149–159, 2016.
- XU, S.; HOSHAN, L.; CHEN, H. Improving lactate metabolism in an intensified CHO culture process: productivity and product quality considerations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 11, p. 1689–1702, 2016.
- YANG, J. D. et al. Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 1, p. 74–82, 2000.
- YANG, M.; BUTLER, M. Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 1, p. 129–138, 2002.
- YANG, W. C. et al. Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity. **Journal of Biotechnology**, v. 217, p. 1–11, 2016.
- YANG, W. C. Mammalian fed-batch cell culture for biopharmaceuticals. In: LEE, G. M. et al. (Eds). **Cell Culture Engineering**. Weinheim: Wiley-VCH, 2019. p. 313–345.
- YOSHINORI, K.; MASAMICHI, K. Production of antibody by transgenic avians. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2011.
- ZAGARI, F. et al. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of

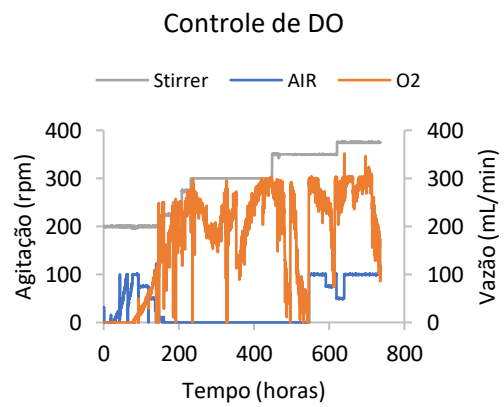
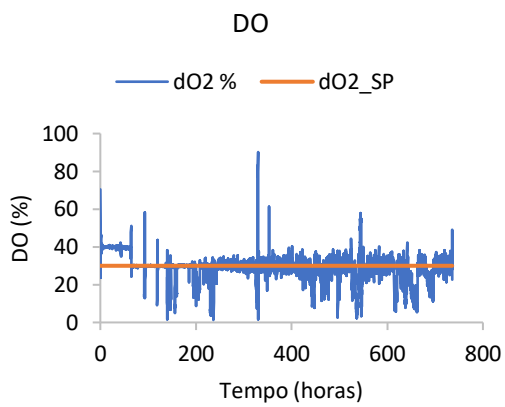
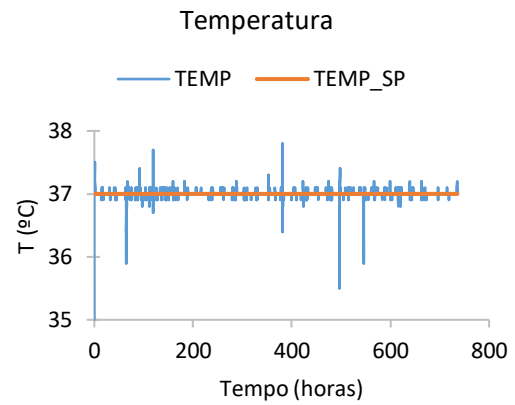
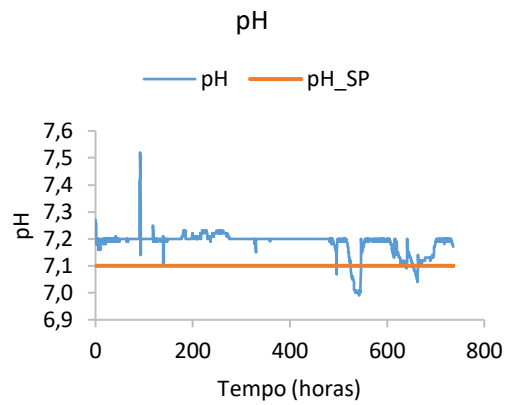
- mitochondrial oxidative activity. **New Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 238–245, 2013.
- ZHA, D.; LINDEN, T.; POTGIETER, T. Production of monoclonal antibodies in glycoengineered *Pichia pastoris*. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Antibody Expression and Production**. 1^a ed. Heidelberg: Springer, 2011.
- ZHANG, Q. et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2009.
- ZHANG, Y. et al. Very high cell density perfusion of CHO cells anchored in a non-woven matrix-based bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 213, p. 28–41, 2015.
- ZHOU, M. et al. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. **Journal of Biotechnology**, v. 153, n. 1–2, p. 27–34, 2011.
- ZHU, M. M. et al. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 70–77, 2005.
- ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 465–475, 2016.

Apêndices

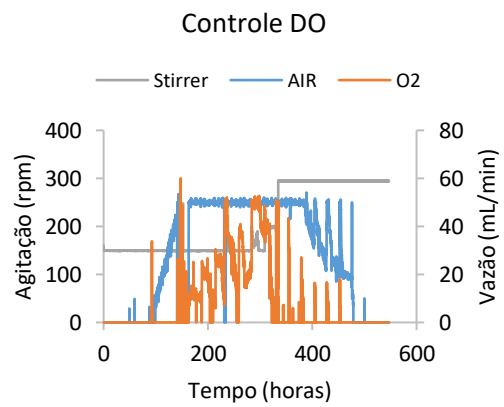
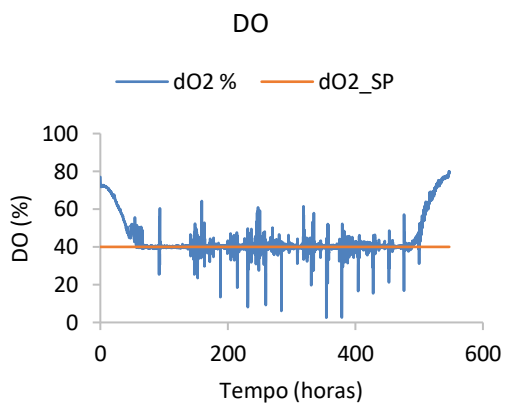
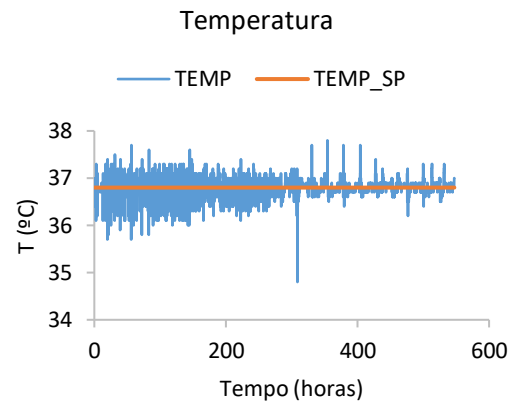
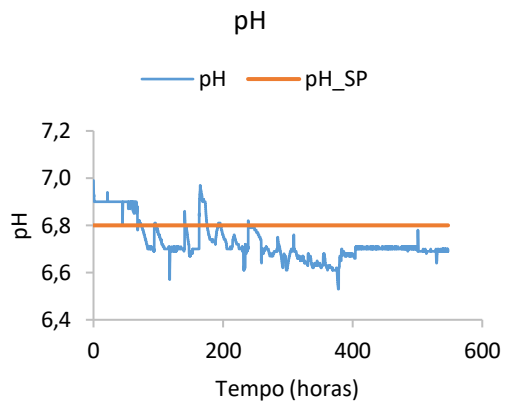
A1. Registro de dados – perfusão ATF-1



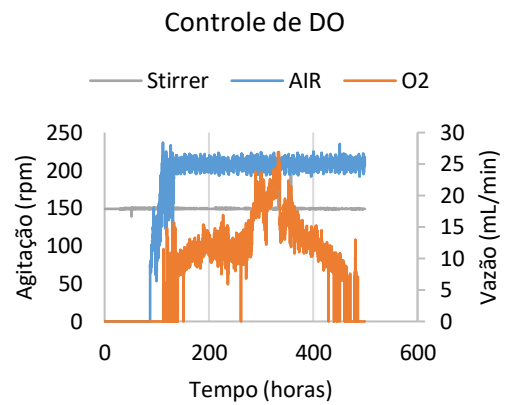
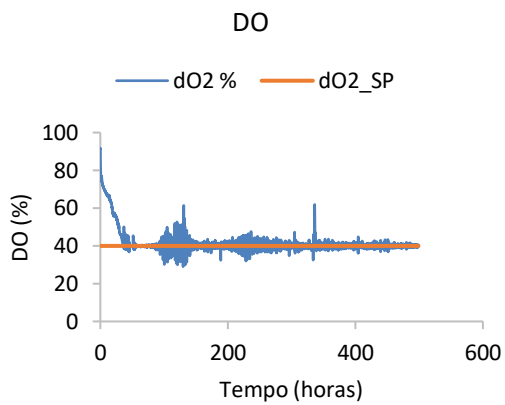
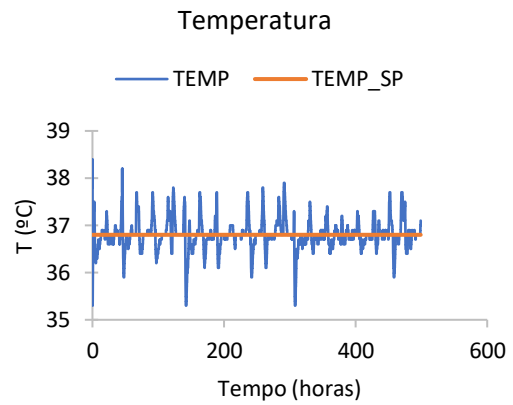
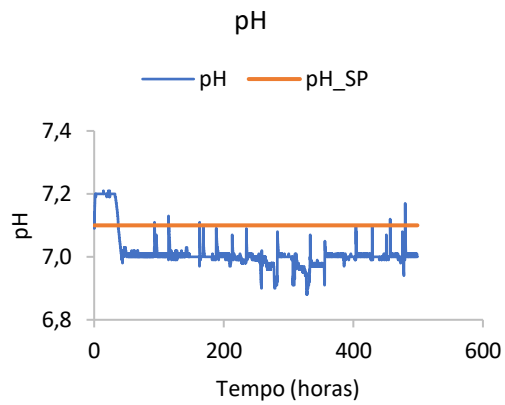
A2. Registro de dados – perfusão ATF-2



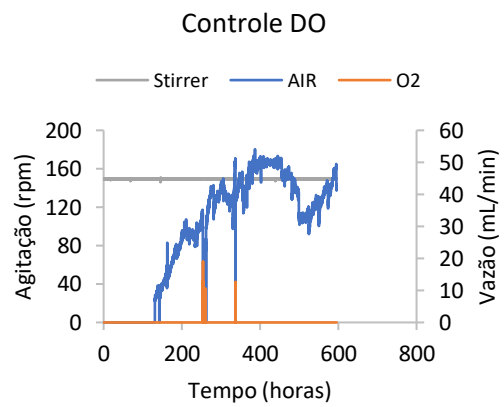
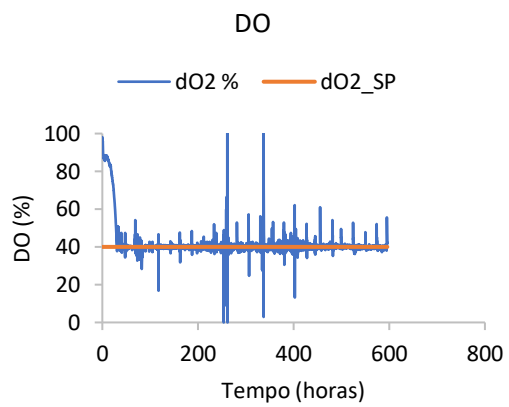
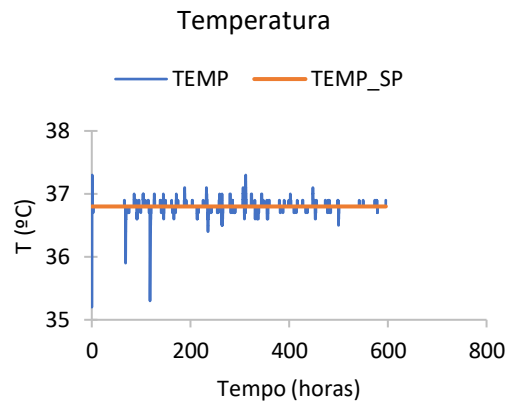
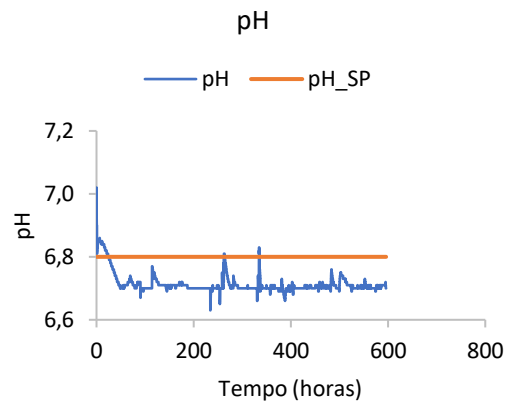
A3. Registro de dados – perfusão ATF-3



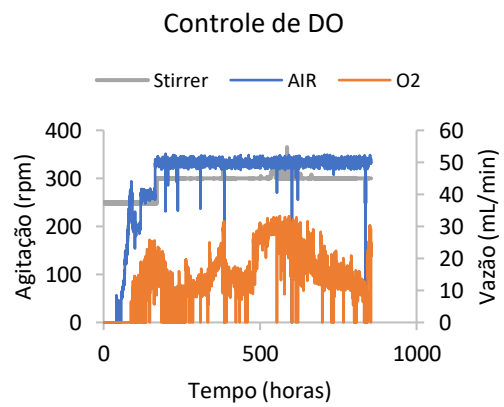
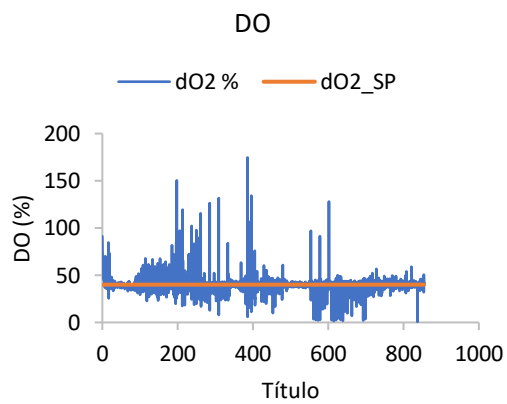
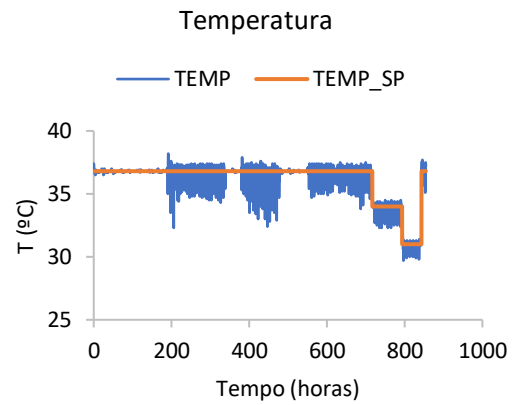
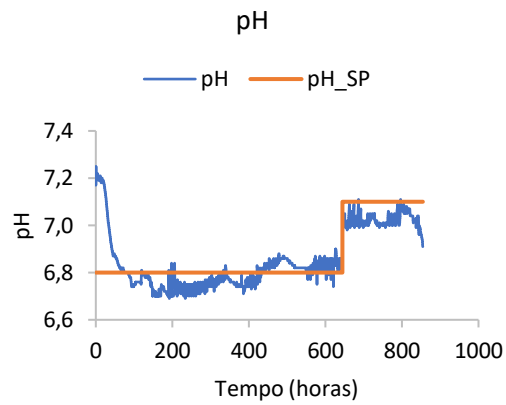
A4. Registro de dados – perfusão ATF-4



A5. Registro de dados – perfusão CS-2



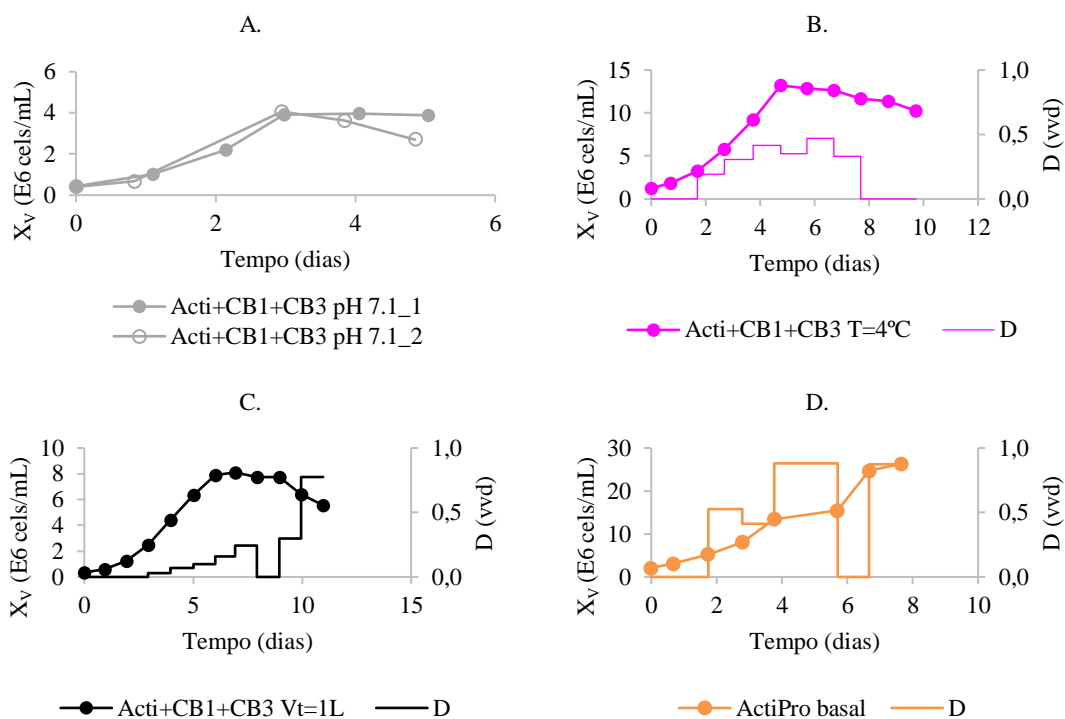
A6. Registro de dados – perfusão HC-6



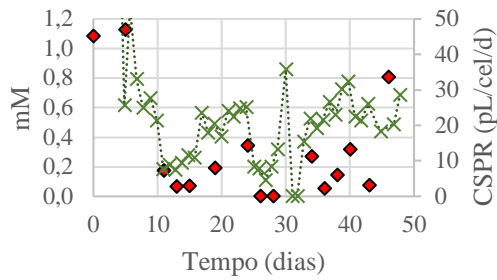
A7. Corridas com CHO_mAb#2 utilizando ActiPro fortificado e sedimentador inclinado

Tentativas sucessivas de perfusão com o sedimentador e utilizando o meio ActiPro suplementado com CB1 e CB3 para alimentação foram realizadas. Foi utilizado o biorreator RALF com volume de vaso de 2 L, e volume de trabalho de 0,6-0,7 L (exceto Figura C).

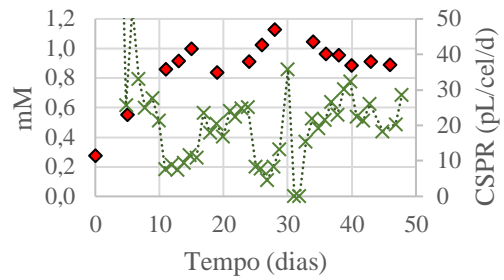
Na Figura A, o pH foi controlado em 7,1, sendo aplicada uma taxa de perfusão de até 0,5 vvd. Na Figura B, o pH não foi controlado, e o *carboy* contendo o meio de alimentação foi mantido a 4°C. Três dias após o início da perfusão, o crescimento foi interrompido. Um perfil semelhante de crescimento foi obtido adotando-se um volume de trabalho maior no vaso (1 L), conforme mostrado na Figura C. A alimentação foi interrompida entre os dias 8-9, mantendo apenas a recirculação do sedimentador. Uma concentração celular máxima superior a 20×10^6 cells/mL foi obtida apenas ao introduzir o meio basal ActiPro (Figura D), porém o crescimento também diminuiu a partir do dia 4. Acredita-se que a alta proporção do volume morto do CS10 em recirculação, combinada ao um meio com alta concentração de glicose e um controle de temperatura inadequado nesse sistema, contribuiu para a formação de compostos tóxicos não identificados.



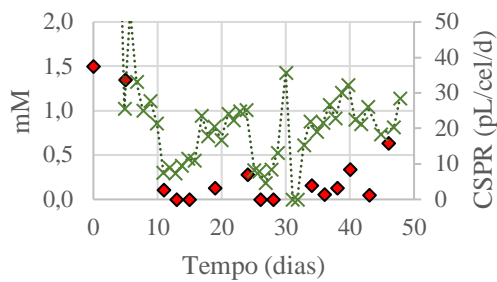
A8. Perfil de aminoácidos medidos na perfusão HC-5 com o HC2015, CHO_mAb#2 em ActiPro+CB1+CB3



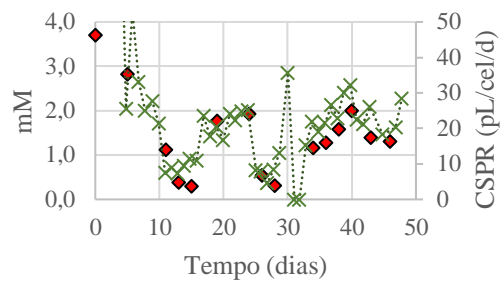
◆ Ácido aspártico ····×···· CSPR



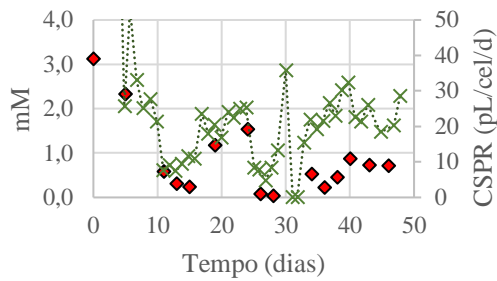
◆ OH Prolina ····×···· CSPR



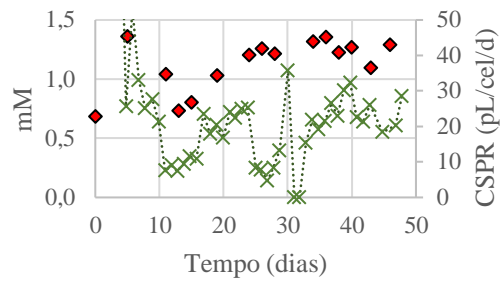
◆ Glutamato ····×···· CSPR



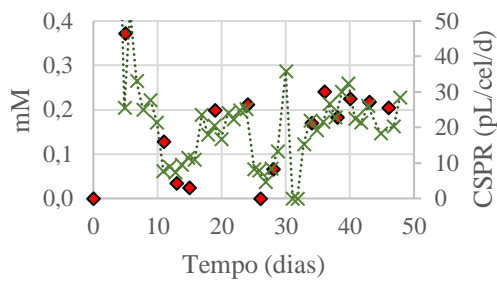
◆ Serina ····×···· CSPR



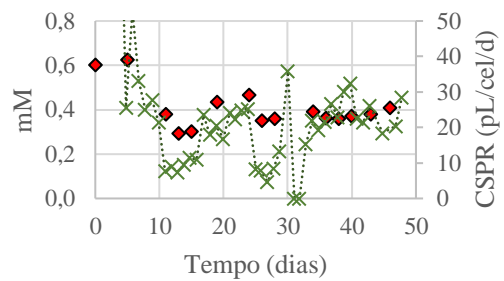
◆ Asparagina ····×···· CSPR



◆ Glicina ····×···· CSPR



◆ Glutamina ····×···· CSPR



◆ Histidina ····×···· CSPR

